



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

2015-2016

MASTER FAGE
**Biologie et Ecologie pour la Forêt,
l'Agronomie et l'Environnement**
Spécialité
FGE

**Impact des éléments traces métalliques (ETMs) sur la
structure génétique des populations de vers de terre**



Valentin DESCHINS

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 07/09/2016

Maître de stage : DUPONT Lise, maître de conférences

Enseignant référent : AMIAUD Bernard, professeur à l'Université de Lorraine

Structure d'accueil : Université Paris-Est-Créteil-Val-de-Marne, Campus Centre, 61 avenue du Général de Gaulle 94010 Créteil Cedex, Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris (IEES), équipe Biodis.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon maître de stage Lise Dupont, qui m'a permis d'effectuer ce stage au sein de son équipe et ainsi d'acquérir de nouvelles connaissances.

Je souhaite également remercier toute l'équipe Biodis pour leur accueil et leur aide durant ce stage.

Je remercie aussi Vincent Arnaud, avec qui j'ai pu partager quelques galères de laboratoire, telles que des PCR ratées, et Nicolas Richeux, tous deux stagiaires dans le même laboratoire, pour leur aide et leur bonne humeur.

Merci surtout à Emilie Aubry, pour son soutien, son aide, ses conseils et sa patience envers moi durant ce stage.

Et enfin je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont permis de me détendre et de penser à autre chose durant mes moments de stress, mes parents, mon frère ainsi que le reste de ma famille, mais aussi Isabelle Aubry, Maël Dromard, Guillaume Sabourin, Lise Ia-Laurent, Jonathan Grenier, Nina Bayer, Antonin Mercier, Clark Raveloson et Abdou.

SOMMAIRE

1) INTRODUCTION	p.3
2) MATERIEL ET METHODE	p.5
a) Modèle biologique	p.5
b) Site	p.5
c) Echantillonnage des vers de terre et de sol	p.5
d) Identification morphologique des vers	p.7
e) Analyses statistiques des données de communautés	p.7
f) Extraction d'ADN	p.8
g) Selection des marqueurs microsatellites	p.8
h) Génotypage et analyse des données génétiques	p.9
3) RESULTATS	p.10
a) Analyses de pollution	p.10
b) Analyses générales sur les communautés de vers	p.11
c) Analyses des populations de <i>Lumbricus castaneus</i>	p.13
d) Analyses génétiques des populations de <i>Lumbricus castaneus</i>	p.14
4) DISCUSSION	p.17
a) Pollution du sol	p.17
b) Impact de la pollution sur les communautés de vers de terre	p.17
c) Impact de la pollution sur la structure génétique des populations de <i>Lumbricus castaneus</i>	p.18
5) CONCLUSION	p.20
6) BIBLIOGRAPHIE	p.22
7) RESUMES	p.24

INTRODUCTION

Les activités humaines, en particulier dans l'industrie, entraînent la contamination de l'environnement par des métaux lourds ou éléments traces métalliques (ETMs) comme le zinc et le cuivre. Ces éléments entraînent une modification importante de la chimie du sol (Kelepertzis *et al.*, 2013) et peuvent avoir de nombreux effets négatifs sur l'environnement ainsi que sur la santé humaine. En effet, même si certains de ces éléments ont un rôle important chez les organismes, comme le cuivre nécessaire à la formation de l'hémoglobine, leurs fortes concentrations dans les sols en font des éléments extrêmement dangereux, pouvant avoir des effets neurotoxiques, cancérigènes, mutagènes ou encore tératogènes (McCluggage *et al.*, 1991). Les organismes du sol (bactéries, animaux, végétaux et champignons) sont particulièrement susceptibles d'être touchés par les ETMs car en contact direct avec cette pollution, et risquent donc de voir leur physiologie (léthalité), leur comportement (dispersion), leur cycle de vie et de reproduction affectés.

C'est le cas notamment des vers de terre, présents en abondance dans nos sols et constituant la biomasse la plus importante de ces derniers. Ils sont considérés comme les principaux ingénieurs des sols et sont reconnus pour les services écosystémiques qu'ils fournissent et cela à différentes échelles. Au niveau de la structure du sol, les nombreuses galeries qu'ils creusent permettent de lutter contre la compaction du sol en l'aérant (Jouquet *et al.*, 2013) et en facilitant le ruissellement de l'eau en profondeur ce qui limite l'érosion de sol. Ces galeries sont formées par ingestion de terre et de ce qu'elle contient, c'est-à-dire de la matière organique morte d'origine animale, végétale, fongique et microbienne. En passant dans le système digestif des vers de terre, cette matière organique et cette terre sont digérées en partie par la flore intestinale et ce qui ressort, le « lombrimix » (Bouché, 2014) qui n'est rien d'autre que les déjections des vers de terre, est très riche en matière organique (carbone) et minérale (azote) sous des formes facilitant donc la décomposition du sol (humification). Il a de plus été montré que les vers de terre, par la sécrétion du mucus, entraînaient une meilleure humification (Bityutskii *et al.*, 2011) et favorisaient ainsi la formation de litière. Une étude a également montré la diminution du nombre de nématodes dans du lisier après inoculation de vers ainsi que des traces de nématodes bactériovores dans leur système digestif (Monroy *et al.*, 2008), ce qui pourrait être une piste dans la lutte contre les pathogènes des végétaux si les vers de terre ont un effet similaire sur les nématodes herbivores. Les vers peuvent également avoir une action de désacidification grâce à l'enfouissement de carbonate de calcium, à la fois par ingestion de ce CaCO_3 par les vers et par ruissellement via les galeries (Jouquet *et al.*, 2013). Par ailleurs, les vers de terre sont depuis longtemps considérés comme des bons indicateurs de la qualité d'un sol (Tanara, 1651).

Par ailleurs les vers de terre ont une vitesse de déplacement limitée dans le sol probablement liée à la résistance de ce dernier et ont une capacité de recolonisation des milieux lents (Pop *et al.*, 1987). Ils sont également pourvus d'une forte capacité de sélection de leur habitat (Mathieu *et al.*, 2010). Des études ont en effet démontrées une relation entre l'augmentation en métaux lourds dans le sol et la diminution du nombre de vers de terre dans le sol (Nahmani *et al.*, 2003). Cette relation semble s'appliquer en particulier en présence de cuivre et de zinc (Paoletti *et al.*, 1999), très présents dans les engrais, herbicides, pesticides et fongicides de

synthèses (cuivre) et les déjections animales (zinc). Les vers de terre possèdent également une forte capacité d'accumulation d'éléments, dont des métaux lourds. Veltman *et al.*, (2007) ont montrés chez l'espèce épigée *Lumbricus rubellus* que la concentration en ETMs du sol est corrélée à celles retrouvées dans les tissus de vers de terre. Les vers sont en effet connus pour leur tolérance aux métaux et ainsi que leur capacité de bioaccumulation (Suthar *et al.* 2008). Des études ont même montré des concentrations en métaux plus importants dans les tissus des vers que dans le sol environnant (Latif *et al.*, 2012). Ces études montrent que l'utilisation de vers de terre comme bioindicateurs de la pollution (et donc de la qualité) du sol est possible grâce à l'estimation du taux de pollution d'un sol ou même d'un écosystème à partir de la mesure directe de la quantité de métaux retrouvés dans les tissus des vers (Paoletti *et al.*, 1999).

Malgré tout, très peu de choses concernant le rôle des métaux lourds sur la dynamique des populations de vers de terre sont connues. L'utilisation des marqueurs microsatellites permettent de chercher certains éléments de réponse sur l'effet des ETMs sur la génétique des populations de vers de terre. Ces marqueurs découverts au début des années 1980 sont des séquences non codantes contenues dans le génome et présents chez tous les organismes eucaryotes (Ellegren *et al.*, 2004). Ces séquences, également connues sous les termes anglosaxons de short tandem repeats (STRs) et simple sequence repeats (SSR), sont spécifiques pour chaque espèce, et consistent en des répétitions de courts motifs allant généralement de 1 à 6 nucléotides et pouvant aller jusqu'à 13 nucléotides. Ces marqueurs, codominants et suivant les lois de Mendel (Jarne & Lagoda, 1996) sont souvent utilisés à cause de leur polymorphisme important au sein d'une espèce. En effet, ces marqueurs font partie des séquences ADN les plus variables au sein du génome et leur taux de mutation élevé reflète le processus de mutation au sein d'une population (Ellegren *et al.*, 2004), et particulièrement lorsque cette dernière a été exposé à des éléments génotoxiques comme les métaux lourds (Mussali-Galante *et al.*, 2014). Ces séquences sont donc caractérisées par une hétérozygotie importante et la présence d'allèles multiples (Ellegren *et al.*, 2004). Ces caractéristiques permettent ainsi d'observer les événements mutationnels sur une courte période (Ellegren *et al.*, 2004), en comparaison à des marqueurs tels que la séquence CO1 qui quant à elle reflète les événements passés (Leguizamón *et al.*, 2012). Ces marqueurs génétiques n'ont en revanche pas été développés pour l'espèce qui nous intéresse ici, *Lumbricus castaneus*. Un des objectifs de ce stage a donc été de développer des marqueurs spécifiques pour cette espèce.

Au cours de mon stage, j'ai pu développer et utiliser des marqueurs microsatellites spécifiques d'une espèce afin d'étudier la structure génétique d'une population de vers de terre sur un site contaminé aux ETMs. Grâce à ces marqueurs et après le génotypage des individus sélectionnés pour l'étude, nous testerons l'hypothèse que la pollution par les métaux altère la dispersion et la reproduction des vers de terre, ce qui se traduirait par des différences (i) de nombre d'individus (notamment de juvéniles) et (ii) de structure génétique (estimée à l'aide d'indice d'équilibre génétique (Fis) mesurant l'écart à la panmixie entre les parcelles polluées et non polluées. Par exemple, Peles *et al.* (2002) ont montrés que la présence de métaux lourds engendrerait, en plus d'une diminution éventuelle du nombre d'individus, une hétérozygotie multi-locus plus importante par rapport à une population de référence issue

d'un site non polluée. Toutefois des modifications de la structure génétique peuvent aussi s'expliquer par des processus dépendant de la densité d'individus au sein d'une population (Mathieu *et al.*, 2010). En effet, plus la densité est forte et plus la dispersion active sera importante. Cette dispersion sera visualisée par la mesure d'isolement par la distance (isolation by distance, IBD en anglais), plus la dispersion sera importante, plus cet isolement sera faible. Nous nous attendons notamment à trouver dans la zone non polluée un IBD assez net comparé à ce qu'on retrouvera dans la zone polluée.

MATERIELS ET METHODES

MODELE BIOLOGIQUE

L'espèce *Lumbricus castaneus* a été choisie pour ce projet. Les individus de *L. castaneus* mesurent 30 à 70 mm de long et sont de couleur brun rouge sur le dessus et blanc jaunâtre sur le dessous. Le clitellum est orangé et se situe entre les segments 27 et 34 (non inclus). Il s'agit d'une espèce épigée, c'est-à-dire vivant préférentiellement en surface dans la litière et qui se nourrit de matière en décomposition. Cette espèce a été sélectionnée en raison de son abondance sur le site observée après un premier échantillonnage en novembre 2015.

SITE

Le site de Pierre-Fitte est une ancienne exploitation de carrière de 8 hectares en cours de réhabilitation et de reconversion en zone dédiée à l'accueil du public et à une utilisation maraichère. Ce terrain en friche est situé au sein d'une zone industrielle et à proximité des Ravelosonquartiers d'habitations Paul Bert et Parc en Seine, sur les bords de Seine à Villeneuve-le-Roi (94). La partie sud de la friche est ouverte au public et est considérée comme non polluée. En revanche, une évaluation quantitative des risques sanitaires (EQRS) réalisée par BG Ingénieurs Conseil, a montré qu'en plus des traces d'enfouissement de gravats, une importante pollution aux métaux lourds était présente dans la zone nord du site. Ces fortes concentrations, supérieures à celles censées être retrouvées en prenant en compte la situation géochimique locale sont liées à l'ancienne activité du site : on retrouve en effet des zones avec des traces d'hydrocarbures, des zones de brûlage et des zones de dépôt. Cette zone, identifiée comme étant très polluée, est par conséquent fermée au public.

ECHANTILLONNAGE DE VERS DE TERRE ET DE SOL

L'échantillonnage a été réalisé dans une parcelle de 50mx60m, elle-même divisée en 8 placettes afin de faciliter les mesures. Cette parcelle couvre une partie de la zone nord « polluée » et une partie de la zone sud « non polluée ». Un échantillonnage aléatoire stratifié par placette a été effectué, permettant la répartition homogène des quadrats dans notre zone d'étude. Au total, 87 quadrats de 50cm x 50cm ont été échantillonnés. Des travaux précédents suggèrent que l'hétérogénéité spatiale de la pollution est à une échelle plus petite que celle des quadrats. L'échantillonnage de 50 cm de résolution permet donc de capturer cette hétérogénéité. La distance entre chaque quadrat et au minimum 3 de ses voisins a été mesurée afin d'établir une carte d'échantillonnage précise.

Pour chaque quadrat, 10 litres d'un mélange irritant à base d'isothiocyanate d'allyle (AITC), d'isopropanol et d'eau suivant les proportions 10 : 1000 : 100000mL a été versé en deux fois afin de faire remonter les vers de terre à la surface. Les vers de terre prélevés ont ensuite été rincés dans de l'eau, endormis dans de l'éthanol 10% puis conservés dans des bocaux d'alcool 100%. Au laboratoire, les vers ont été triés et comptés et les adultes et les juvéniles ont été séparés. Ces adultes ont ensuite été identifiés à l'aide de clés de détermination. Parmi ces adultes, 190 *L. castaneus* ont été sélectionnés pour le génotypage, la totalité des 94 individus trouvés sur la zone non polluée et 96 parmi ceux retrouvés dans la zone polluée.

De plus, un échantillonnage de sol a été réalisé au niveau de chaque quadrat. Trois prélèvements de sol ont été effectués par quadrat. Les échantillons ont ensuite été mélangés par quadrat, homogénéisés et tamisés à 2 mm, puis séchés à l'étuve à 40°C. Avant d'être analysés par spectroscopie de fluorescence X aux rayons X (XRF), 10 sols pris au hasard sur les 87 ont été pesés puis séchés à 104°C pendant 24h afin d'enlever la totalité de l'humidité, puis pesé de nouveaux une fois secs. Ces mesures nous ont permis de calculer le taux d'humidité des sols après le séchage 40°C et sont récapitulées dans le tableau 1. Ici on peut voir que le pourcentage de la masse perdue n'excède pas 2,5%, le séchage effectué est donc suffisant pour que l'humidité n'entraîne pas de biais au niveau des mesures XRF. Il semble en effet que l'humidité peut entraîner des biais qu'à partir de 20% d'humidité (Kalnicky *et al.*, 2001).

La spectroscopie de fluorescence X aux rayons X consiste en l'émission de rayons X sur un échantillon à partir d'un tube à rayon X. En atteignant l'échantillon, les rayons X vont être réfléchis vers un détecteur qui va enregistrer les différentes longueurs d'ondes réémises par l'échantillon. Les longueurs d'ondes étant égales à l'inverse de l'énergie d'un atome, le détecteur va pouvoir faire correspondre les longueurs d'onde détectées à des atomes, et donc à des polluants. Pour les mesures, 7 grammes de sol ont été placés dans un film de prolène de 4µm d'épaisseur puis placé dans un appareil de mesure Epsilon 3XL Panalytical, puis recouverts d'un cache en argent afin d'éviter tout signal pouvant provenir de l'appareil. Les concentrations en métaux sont ensuite calculées grâce au logiciel Omnian, logiciel semi quantitatif qui va calculer les concentrations à partir d'une droite de calibration obtenue à partir de mesures de différents standards, c'est-à-dire à partir d'échantillons dont les concentrations en métaux sont connues.

A partir des données xrf une carte de pollution de la zone d'échantillonnage a pu être élaborée. Les concentrations en métaux retrouvés sur les quadrats ont ensuite été comparées grâce à un test non paramétrique de Wilcoxon réalisé avec le logiciel R.Studio® afin de savoir si les différences entre les deux zones étaient significatives.

Tableau 1 : tableau récapitulatif des mesures de taux d'humidité des échantillons de sol

N° échantillons	Masse initiale (g)	Masse finale (g)	% de la masse perdue
6	18,787	18,644	0,761
14	19,153	18,914	1,248
21	19,149	18,883	1,389
30	18,961	18,734	1,197
34	19,014	18,82	1,02
44	19,024	18,855	0,888
57	19,054	18,784	1,417
69	18,954	18,608	1,825
77	19,404	19,052	1,814
82	19,167	18,68	2,541

IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE DES VERS

Tous les vers échantillonnés ont ensuite été comptés et identifiés à l'aide de clés de détermination (mettre référence clé). Cela nous a permis d'une part d'obtenir des données de communauté avec le nombre d'individus adultes pour chaque espèce, et d'autre part le nombre d'individus adultes et juvéniles retrouvés par quadrat (tableau 2).

Tableau 2 : Tableau récapitulatif de l'identification morphologique des vers

pollution	<i>A. longa longa</i>	<i>L. terrestris</i>	<i>A. chlorotica</i>	<i>A. giardi</i>	<i>A. icterica</i>	<i>E. hortensis</i>
polluée	7	1	69	4	6	6
non polluée	30	12	349	11	41	43
total	37	13	418	15	47	49

<i>L. rubellus</i>	<i>L. festivus</i>	<i>O. cyanus</i>	<i>A. rosea rosea</i>	<i>L. castaneus</i>	juvéniles	total
2	24	0	1	177	295	592
1	0	1	4	94	814	1400
3	24	1	5	271	1109	1992

ANALYSES STATISTIQUES DES DONNEES DE COMMUNAUTES

A partir de l'identification et le comptage des vers et des données de pollutions, des analyses statistiques sur l'effet de la pollution sur les communautés ont pu être faites. Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée à partir des données de pollution. L'influence du niveau de pollution de chaque quadrat sur les proportions de juvéniles et d'adultes a été testée à l'aide d'un test non paramétrique de Wilcoxon. Pour cela, les coordonnées de chaque quadrat sur l'axe 1 de l'ACP ont été utilisées comme valeur de pollution. L'influence de la pollution sur le nombre d'individus au mètre carré pour l'ensemble des espèces et pour les 5 espèces les plus représentées a été testée par une Anova. L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées sous R.studio version 0.98.1091.

Les proportions de juvéniles, d'adultes toutes espèces confondues et d'adultes de l'espèce *L. castaneus* retrouvés sur le site ont été comparés en fonction des l'axe 1 de l'ACP pour chaque quadrat par un test non paramétrique de Wilcoxon grâce au logiciel R. Le nombre d'individus au mètre carré, toutes espèces confondues, pour les 5 espèces les plus représentées et pour les individus *L. castaneus* en fonction de la pollution a été testé par une ANOVA, toujours grâce au logiciel R.studio. La densité moyenne en individus par quadrat et par espèce en fonction de

la zone de pollution a été testée grâce à un test de χ^2 d'indépendance. Le nombre d'espèce entre les deux zones a également été comparé à l'aide d'un test de Wilcoxon.

EXTRACTION d'ADN

Pour chacun des 190 individus, au minimum 20 mg de tissu a été prélevé et conservé dans de l'éthanol 100% jusqu'à extraction. L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide du kit NucleoSpin 96 Tissue de Macherey–Nagel selon les recommandations du fournisseur à l'exception de l'éluion finale qui a été réalisée dans deux fois 50µl de tampon d'éluion.

La qualité de l'extraction d'ADN a d'abord été vérifiée sur gel d'agarose à 1% puis à l'aide d'un nanodrop. Un marqueur de taille obtenu en mélangeant 4 µL d'ADN contenant plusieurs types de fragments ayant des tailles connues et 2 µL de colorant a été utilisé comme témoin positif. La cuve d'électrophorèse a été branchée à 100 V et 500 mA pendant 45 minutes. Lors de la vérification sur nanodrop, 1,5 µL d'ADN est placé dans l'analyseur nanodrop. Cet analyseur nous donne la concentration d'ADN de l'échantillon en ng/µL (voir annexe).

SELECTION DES MARQUEURS MICROSATELLITES

Vingt séquences microsatellites spécifiques de *Lumbricus castaneus* ont été sélectionnées à partir d'une liste de 664 séquences possibles. Les 664 séquences ont été triées en fonction de la longueur de leurs amorces, du nombre de répétition d'une même base à la suite au sein de ces amorces, de la probabilité que leurs amorces avaient de former une « tête d'épingle » ou de s'auto appairer. Cette étape de sélection a été faite à l'aide du site PRIMER3. Les séquences restantes ont ensuite été triées en fonction du nombre de base dans la répétition, de manière à obtenir assez de variabilité entre elles : répétitions di, tri et tétranucléotides. La taille des fragments que ces amorces permettent d'obtenir a aussi été un critère de sélection. Une forte amplitude de tailles entre marqueurs permet d'éviter la superposition des différents marqueurs lors du génotypage en multiplexe.

Les amorces ont ensuite été testées par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les ADN de deux individus de l'espèce *L. castaneus* ont été utilisés, chacun provenant d'un quadrat différent sur le site de Pierre-Fittes. Les réactions PCR sont effectuées dans un volume final de 15µL en ajoutant 1µL d'ADN concentré à 5mM à un volume réactionnel composé de 3µL de Tampon 5X, de 1.5 mM de $MgCl_2$, d'un mélange de dNTP à 0.5 mM (dATP, dTTP, dCTP et dGTP), de 0.6µL de solution d'amorce « forward » et 0.6 µL de solution d'amorce « reverse » (1.2µL par paire) concentrées à 5 mM, de 0.1µL de FlexiTaq Promega à 5unités/µL et de 1µL d'ADN concentré à 5mM. Ce mix a été ensuite complété par de l'eau ultrapure pour un volume final de 15µL. Les échantillons ont ensuite été placés dans un thermocycleur et ont subi le programme suivant : dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes, 35 cycles d'hybridation (1 cycle = 94°C pendant 30 secondes, 52°C pendant 45 secondes et 72°C pendant 1 minutes) et enfin élongation pendant 10 minutes à 72°C. Le résultat de la PCR a été visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (voir paragraphe 3). Ce premier test a permis la sélection de 8 paires d'amorces permettant lors de la PCR de former un unique fragment ayant la taille attendue.

Ces 8 paires d'amorces ont ensuite été testées avec l'ADN de 8 individus provenant de différents endroits permettant de visualiser la variété allélique. Parmi ces 8 échantillons 1 provenait du site de Pierre-Fitte et les 7 autres provenaient de différents parcs parisiens et ont été prélevés dans le cadre du projet ANR Ecoville. Le résultat de ces PCR a été visualisé par électrophorèse sur un gel d'agarose à 3% après 50 minutes de migration. Cette concentration élevée permettant de distinguer des bandes correspondantes à des allèles différents en cas de polymorphisme. Les 6 amorces ayant les meilleurs résultats d'amplification ont été sélectionnées puis marquées avec un fluorophore afin de pouvoir visualiser les résultats d'amplification par électrophorèse capillaire (PCR et première vérification sur gel d'agarose), et le produit PCR obtenu a été préparé en vue d'une analyse Genescans. Pour cela un kit GeneScan™ –500 LIZ® Size Standard. 0.5 µL de produit PCR a été mélangé à 0.5µL de LIZ 500 et 11µL de formamide puis conservé à l'obscurité jusqu'au laboratoire de l'hôpital Henri Mondor de Créteil où l'analyse a eu lieu.

Les amorces ont ensuite été testées en multiplexe, c'est-à-dire toutes en même temps lors d'une seule PCR, selon le même programme que précédemment décrit, avec pour seule différence l'augmentation de la température d'hybridation jusqu'à 54°C. Pour cela, le mélange PCR pour chaque échantillon d'ADN est constitué de 7.5µL de « Master Mix » contenant Taq « hot start » ayant besoin d'être activée à haute température, polymérase, tampon et dNTP, de 1.5 µL de « Primer Mix » contenant les amorces « forward » marquées et « reverse » de chaque marqueur Microsatellite concentrées à 2µM, de 5 µL d'eau et de 1 µL d'ADN. Le « Primer Mix » est composé de 10µL de solution contenant chacune des séquences (soit en tout 120 µL : 6 marqueurs sélectionnés, 2 séquences par marqueurs, donc 12 x 10µL) auxquels ont été ajoutés 380µL d'eau. Les résultats ont ensuite été visualisés et traités à l'aide du logiciel GeneMapper® nous permettant de restreindre un peu plus notre sélection à 5 paires d'amorces (tableau 3).

Tableau 3 : récapitulatif des marqueurs sélectionnés pour l'analyse

NOM	MARQUEUR FLUORESCENT UTILISE	SEQUENCE	MOTIF DE LA REPETITION	NOMBRE DE REPETITIONS	TAILLE DU PRODUIT PCR ATTENDUE
LC02F	5'-AT565	GTTATCGGTGCCTTCCATGT	tc	10	111
LC02R		GTGACCATCCTTTGATTGCC			
LC05F	5'-FAM	ATACGTGCTCTGGAAGGGTGG	gt	8	142
LC05R		CTCCGTTGTACCCTGTGTA			
LC10F	5'-AT550	GAAGCCATACTGCCACTGGT	aatc	10	177
LC10R		GCTTTACTTGTGGCATTCTGTT			
LC16F	5'-AT565	AACAACCGAAAAGTCAAGTC	gaca	8	248
LC16R		CCTCAAGGCAAGCTCAGGTA			
LC18F	5'-FAM	GAGGCCAAAACCCATCACTA	tcaa	11	271
LC18R		TGTCITTCAGGGCAGAAGTG			

GENOTYPAGE ET ANALYSE DES DONNEES GENETIQUES

Ensuite les individus ont pu être génotypés. Pour cela, l'ADN extrait a été amplifié par PCR suivant le même protocole de multiplexe que celui du paragraphe précédent mis à part pour les concentrations en amorces et la température d'hybridation : les concentrations des amorces LC02 et LC05 ont été divisées par trois et les concentrations des amorces LC10 par deux et la température d'hybridation a été augmentée à 58°C. Les amorces utilisées étant les 5 sélectionnées lors du test de multiplexage détaillé au paragraphe précédent, tout comme le mélange élaboré en vue de l'analyse avec le logiciel GeneScan® puis lues à l'aide du logiciel Genotyper® d'Applied Biosystems.

La variabilité et la diversité génétique au sein des deux zones ont été comparées grâce à la mesure du nombre total d'allèle, de l'hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e) et du polymorphisme (un locus est considéré comme polymorphe si la fréquence de l'allèle le plus commun est inférieure à 95%) à l'aide du logiciel GENETIX v4.05. L'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été testé pour chaque population et pour chaque locus grâce à l'estimateur de Weir & Cockerham de l'indice de fixation F_{is} (Weir & Cockerham, 1984) à l'aide du même logiciel. La fréquence d'allèles nuls a été estimée à l'aide du logiciel Genepop. Les analyses d'isolement par la distance et d'auto-corrélation spatiale ont été effectuées à l'aide du logiciel SPAGeDi v1.3 afin de savoir s'il existe une corrélation entre la distance génétique (et donc l'apparentement) et la distance géographique entre les individus. L'hétérozygotie multi-locus a quant à elle été mesurée en mesurant, pour chaque individu, le nombre de loci pour lesquels ils étaient hétérozygotes. Les résultats obtenus ont été comparés entre les deux zones grâce à un test de Wilcoxon. La fréquence d'allèle nul a également été comparée entre les deux zones,

Enfin, grâce au package Geneland du logiciel R nous avons pu mettre en évidence l'existence de sous-populations au sein de la zone d'échantillonnage. Cela est possible grâce au regroupement des individus en sous unités panmictique (chacune à l'équilibre de Hardy-Weinberg) grâce à différents algorithmes bayésiens à partir des génotypes multilocus et des coordonnées géographiques de chaque individu.

RESULTATS

ANALYSES DE LA POLLUTION (acp et comparaison)

Les concentrations en métaux retrouvés sur chaque quadrat du site de Pierre Fitte ont été comparées entre elles. Dans un premier temps, nous avons visualisé les concentrations en cuivre, plomb, zinc et strontium, reconnus pour leur toxicité, par quadrat. Une différence significative en terme de pollution entre les deux zones est observée (figure1) $p=7,5e-13$ pour le plomb, $p=5,883e-12$ pour le cuivre, $p=7,929e-14$ pour le zinc et $p=2,56e-9$ pour le strontium.

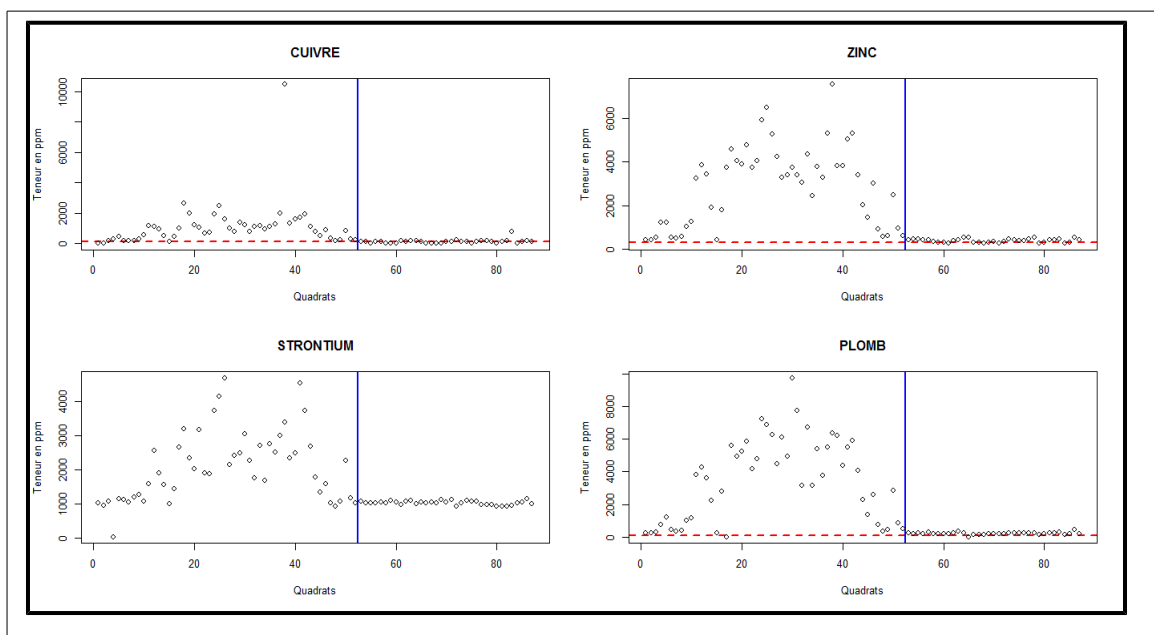


Figure 1: teneur en métaux en ppm en fonction du quadrat où les échantillons ont été prélevés ; la ligne pointillée horizontale rouge correspond à la valeur de concentration seuil d'après l'arrêté du 08.01.1998 prise en compte ici comme limite pour que le sol soit considéré comme polluée ; la ligne verticale bleue correspond à la limite entre la zone polluée et la zone non polluée, les quadrats allant de 1 à 52 sont dans la zone polluée. les quadrats de 53 à 87 se situent dans la zone non polluée.

Les concentrations en métaux retrouvés sur chaque quadrat du site de Pierre Fitte ont été comparées entre elles. Dans un premier temps, nous avons visualisé les concentrations en cuivre, plomb, zinc et strontium, reconnus pour leur toxicité, par quadrat. Une différence significative en terme de pollution entre les deux zones est observée (figure1) $p=7,5e-13$ pour le plomb, $p=5,883e-12$ pour le cuivre, $p=7,929e-14$ pour le zinc et $p= 2,56e-9$ pour le strontium.

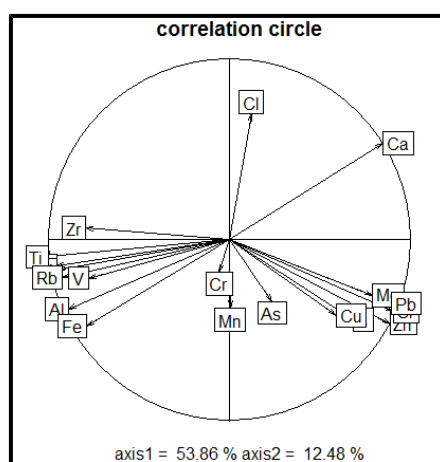


Figure 2 : ACP des concentrations en polluants retrouvées sur les différents

Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée à partir des concentrations de tous les métaux retrouvés sur chaque quadrat. Le premier axe de l'ACP capture 53.86% de la variance totale (figure 2). La majeure partie des métaux retrouvés sur le site sont corrélés, positivement ou négativement, avec cet axe. Les métaux connus considérés comme des polluants importants, tels que le cuivre, le plomb ou encore le zinc, sont corrélés positivement

à cet axe, tandis que les métaux ayant un effet plus faible sur l'environnement et les organismes comme le fer ou l'aluminium sont corrélés négativement à cet axe. Ce premier axe peut être interprété comme représentant la valeur de pollution globale (tous éléments confondus) pour chaque quadrat.

ANALYSES GENERALES SUR LES COMMUNAUTES

La densité de chaque espèce varie entre la zone polluée et la zone non polluée ($p < 0.05$, figure 3). Il y a donc, un effet de la pollution sur la densité en vers de terre. On a ensuite comparé le nombre d'espèces retrouvées par quadrat entre les 2 zones. Le plot obtenu avec le logiciel R (figure 4) montre une différence entre la zone polluée et la zone non polluée, avec une tendance à avoir une richesse spécifique moyenne plus importantes sur les quadrat de la zone non polluée. La p-value du test de comparaison du nombre d'espèces retrouvées entre les deux zones d'étude est significative ($p < 0.05$) et nous permet de conclure que la différence qui ressort graphiquement (figure 4) est bien significative. La pollution a donc un effet sur la diversité spécifique à l'échelle du quadrat. En revanche, à l'échelle de la zone d'échantillonnage, le nombre d'espèces retrouvées est le même dans les 2 zones de pollution (11). Il n'y a pas d'effet de la pollution sur la présence ou non d'espèces, les deux zones ne différant dans leur composition que pour 1 espèce.

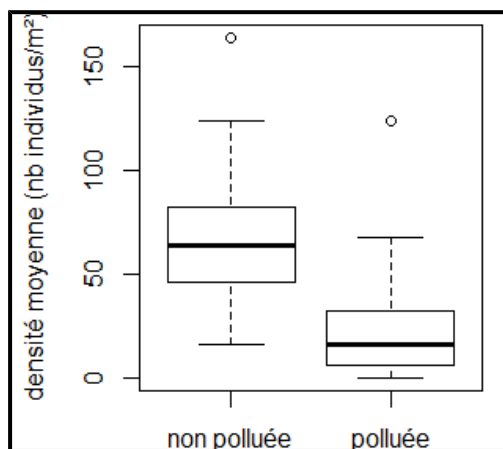


Figure 3 : Plot comparatif entre la densité pour chaque espèce moyenne de la zone polluée et celle de la zone non polluée. La différence observée est confirmée par un test de Khi^2 ($p=0.007126$).

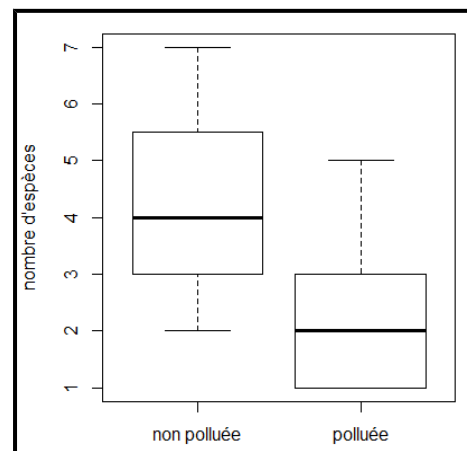


Figure 4 : Plot comparatif entre le nombre d'espèces moyen par quadrat de la zone polluée et celui de la zone non polluée. La différence observée est confirmée par un test de Wilcoxon ($p= 1.42e-10$).

La p-value ($p=2.2e-16 < 0.05$) du test Anova de comparaison du nombre d'adultes toutes espèces confondus avec la valeur de pollution du quadrat où ils ont été échantillonnés indique qu'il y a bien une différence significative entre le nombre d'individus adultes retrouvés en moyenne au sein de chaque quadrat dans la zone polluée et celui de la zone non polluée, tout comme la figure 5a qui montre le même effet de la pollution que la figure 5b représentant quant à elle le nombre d'adulte retrouvés sur chaque quadrat en fonction de la valeur de pollution associée au quadrat. La même démarche a ensuite été faite pour les juvéniles. Pour cela, le nombre de juvéniles par quadrat en fonction de la valeur de pollution de chaque quadrat ont été comparés grâce à une ANOVA. La p-value obtenue est encore une fois

inférieure au seuil de 5% ($p= 1.136e-14$). La diminution de ce nombre lorsque la valeur de pollution augmente est d'ailleurs visible sur la figure 5c et confirme la tendance observée lors de la comparaison du nombre moyen de juvéniles retrouvé par quadrat entre la zone polluée et la zone non polluée (figure 5d).

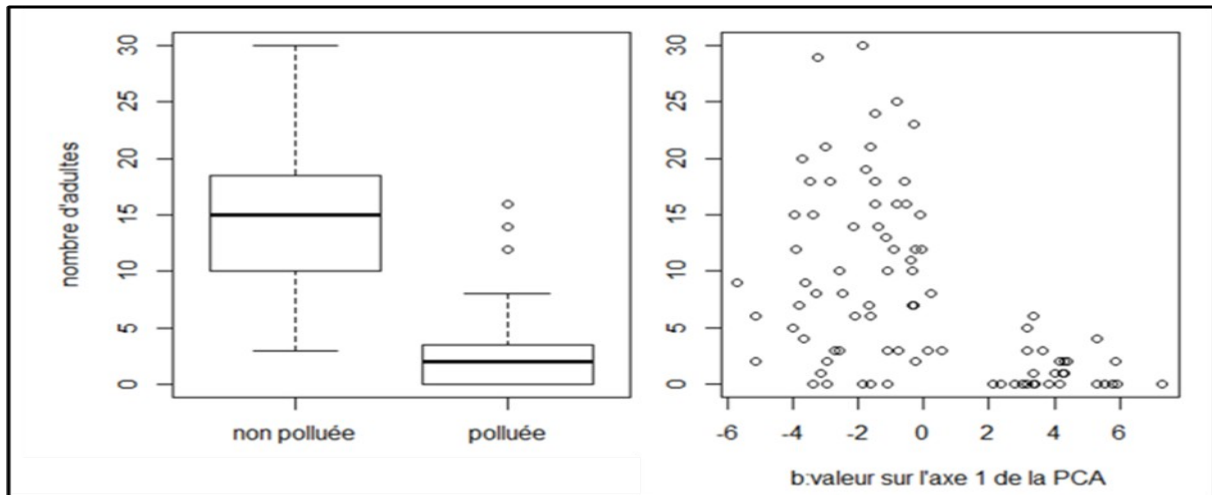


Figure 5a : a)plot du nombre moyen de vers adultes retrouvés par quadrat sur les zones polluée et non polluée du site, on observe une différence assez nette ; b)nombre d'adultes retrouvés sur chaque quadrat en fonction de la valeur de pollution déterminée à partir de l'axe 1 de l'ACP de chaque quadrat, plus la valeur est positive, plus le sol du quadrat correspondant est considéré comme pollué ;

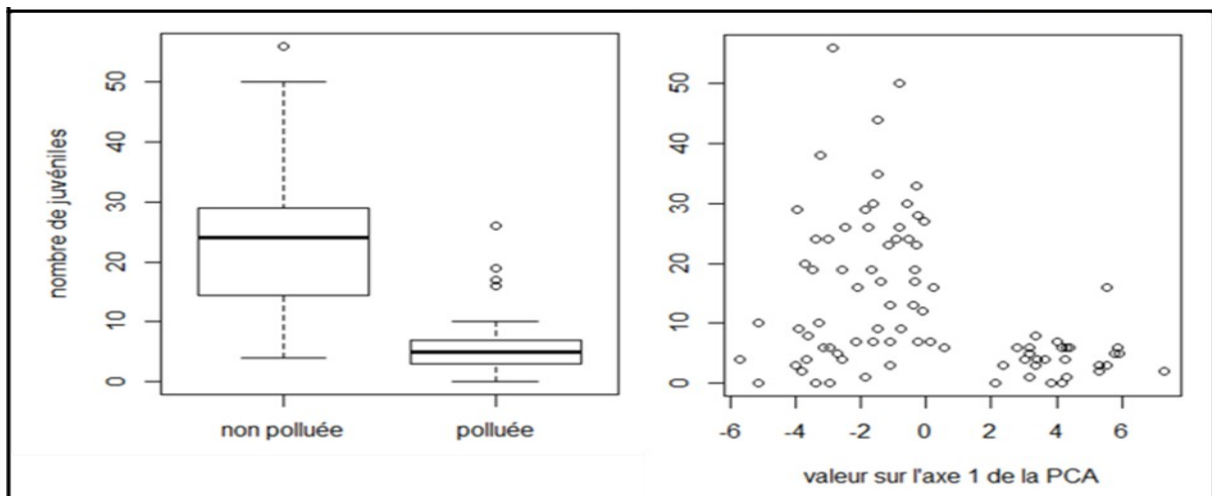


Figure 5b : a)plot du nombre moyen de vers juvéniles retrouvés par quadrat sur les zones polluée et non polluée du site, on observe une différence assez nette ; b)nombre de juvéniles retrouvés sur chaque quadrat en fonction de la valeur de pollution déterminée à partir de l'axe 1 de l'ACP de chaque quadrat, plus la valeur est positive, plus le sol du quadrat correspondant est considéré comme pollué.

ANALYSE DES POPULATIONS DE *LUMBRICUS CASTANEUS*

Lorsque les mêmes tests de description sont faits sur les individus de l'espèce *L. castaneus*, la séparation entre les deux zones est beaucoup moins visible. En effet on peut voir sur la figure 6 que la pollution ne semble pas avoir d'effet, que ce soit sur l'abondance en fonction de la zone (polluée/non polluée), ou sur l'abondance en fonction de la valeur de pollution du quadrat. Cela est confirmé par le résultat du test de Wilcoxon supérieur au seuil de 5% (0,7454) pour l'abondance en fonction de la zone d'échantillonnage. Ce qui est montré par la figure 6b est également confirmé par le résultat du test ANOVA, lui aussi supérieur au seuil de 5% ($p= 0.3664$).

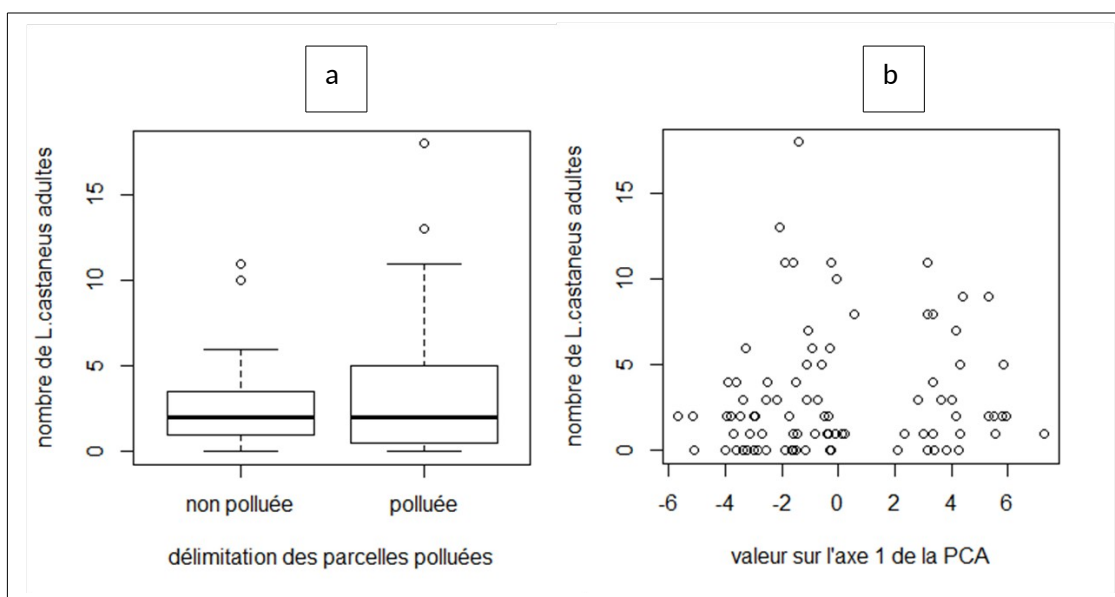


Figure 6 : a) plot du nombre de *L. castaneus* adultes retrouvés par quadrat en fonction de la zone d'échantillonnage ; b) nombre de *L. castaneus* retrouvés sur chaque quadrat en fonction de la valeur de pollution déterminée à partir de l'axe 1 de l'ACP de chaque quadrat, plus la valeur est positive, plus le sol du quadrat correspondant est considéré comme pollué.

ANALYSES GENETIQUES DES POPULATIONS DE *L. CASTANEUS*

Pour pouvoir effectuer des analyses de génétique des populations, il a d'abord fallu s'assurer de la variabilité des marqueurs microsatellites mis au point lors du stage. Pour s'en assurer, le polymorphisme des 5 loci a été testé à l'aide du logiciel Genetix. Les résultats sont compilés dans le tableau 4. Il est constatable que pour les 5 loci, et cela au sein des deux zones, aucun allèle n'a une fréquence supérieure à 95%, les loci sont donc tous polymorphes. Le test de student pour la comparaison du nombre d'allèle pour chaque locus dans chacune des deux zones d'échantillonnage ($p=0.259301 > 0.05$) indique qu'il n'y a pas de différence significative pour le nombre d'allèle de chaque locus entre les deux zones et qu'il n'y a donc pas d'effet de la pollution sur le nombre d'allèle par locus. De plus les fréquences d'allèles nuls varient de 5 à 20% pour les deux zones d'échantillonnage.

Tableau 4 : Récapitulatifs des différents paramètres de caractérisation des loci (fréquence=fréquence de l'allèle le plus répété au sein de la zone considérée, %all nul= pourcentage d'allèles nuls) et les paramètres d'estimation de la variabilité génétique de chaque locus pour chaque zone d'échantillonnage (N allèles=nombre d'allèles, He= hétérozygotie attendue, Ho=hétérozygotie observée, Fis=estimation de l'indice de fixation). Les résultats des tests exacts des écarts à l'équilibre d'Hardy-Weinberg sont signalés par des astérisques qui signalent un écart significatif de la valeur nulle (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$)

Total		Polluée						Non Polluée					
locus	N alleles	N alleles	He	Ho	Fis	fréquence	%all nul	N alleles	He	Ho	Fis	fréquence	%all nul
LC02	6	5	0,3016	0,2553	0,154***	0,8298	0,0895	6	0,2583	0,2785	-0,079	0,8544	0
LC05	11	9	0,2753	0,2903	-0,055	0,8495	0	8	0,1869	0,1975	-0,057	0,9012	0
LC10	18	15	0,8542	0,764	0,106	0,2022	0,0264	16	0,8846	0,7273	0,179***	0,1948	0,0919
LC16	40	33	0,9456	0,575	0,393***	0,1312	0,188	28	0,933	0,7273	0,222***	0,1623	0,1186
LC18	25	20	0,882	0,7444	0,163***	0,2722	0,0964	20	0,8782	0,679	0,228***	0,2531	0,1099

Le tableau 4 montre également que l'hétérozygotie observée Ho a tendance à être inférieure à l'hétérozygotie attendue He pour la majorité des loci sur les deux zones d'échantillonnage

excepté pour un locus sur la zone polluée (LC05) et deux sur la zone non polluée (LC02 et LC05), mais le Fis pour ces locus n'est pas significatif. En revanche, le Fis est significatif pour 3 locus dans chacune des zones : LC02, LC16 et LC18 pour la zone polluée et LC10, LC16 et LC18 pour la zone non polluée. On remarque que les Fis des loci ayant le plus grand nombre d'allèles (LC16 et LC18) sont significatifs pour les deux zones. Les fréquences d'allèles nuls les plus élevées correspondent par ailleurs aux loci présentant un écart à la panmixie, c'est-à-dire ayant un Fis significatif (9% pour LC02, 19% pour LC16 et 10% pour LC18 dans la zone polluée et 9% pour LC10, 12% pour LC16 et 11 % pour LC18 dans la zone non polluée. De plus, le test de Wilcoxon de comparaison de l'hétérozygotie multi-locus par zone n'a pas donné de résultat significatif ($p=0.4231 > 0.05$) ne montrant pas d'effet de la pollution sur ce paramètre comme décrit par Peles *et al* en 2002.

Les analyses d'isolement par la distance n'ont montrés aucune relation entre la distance génétique et la distance géographique (pente de régression=0.2807, $P > 0.05$ pour la zone non polluée et pente de régression=0.7163, $P > 0.05$ pour la zone polluée). Ces résultats sont confirmés par le test de d'autocorrélation spatiale qui ne montre aucune relation entre la distance géographique entre les individus et leur distance génétique (apparentement) et cela que l'on se situe dans la zone polluée ou dans la zone non polluée (figure 7). Le résultat est d'ailleurs le même si on se place à l'échelle du site d'échantillonnage entier.

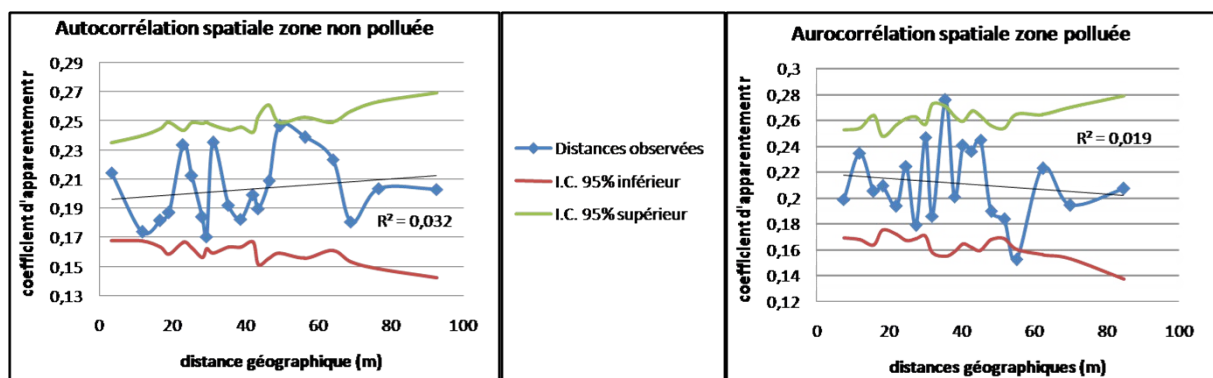


Figure 7 : représentation graphique de l'apparentement des individus (distance génétique) en fonction de la distance géographique.

Ces résultats ne permettant pas de conclure sur le fait qu'il y ait une structuration génétique (que l'on ne voit pas) ou non, le programme Geneland a été utilisé. Les résultats, visibles sur la figure 8, montre en revanche une séparation entre deux patchs génétiques, dont la séparation correspond à la limite zone polluée/zonne non polluée. Il y a donc bien un effet de la pollution sur la génétique de la population de *L. castaneus*.

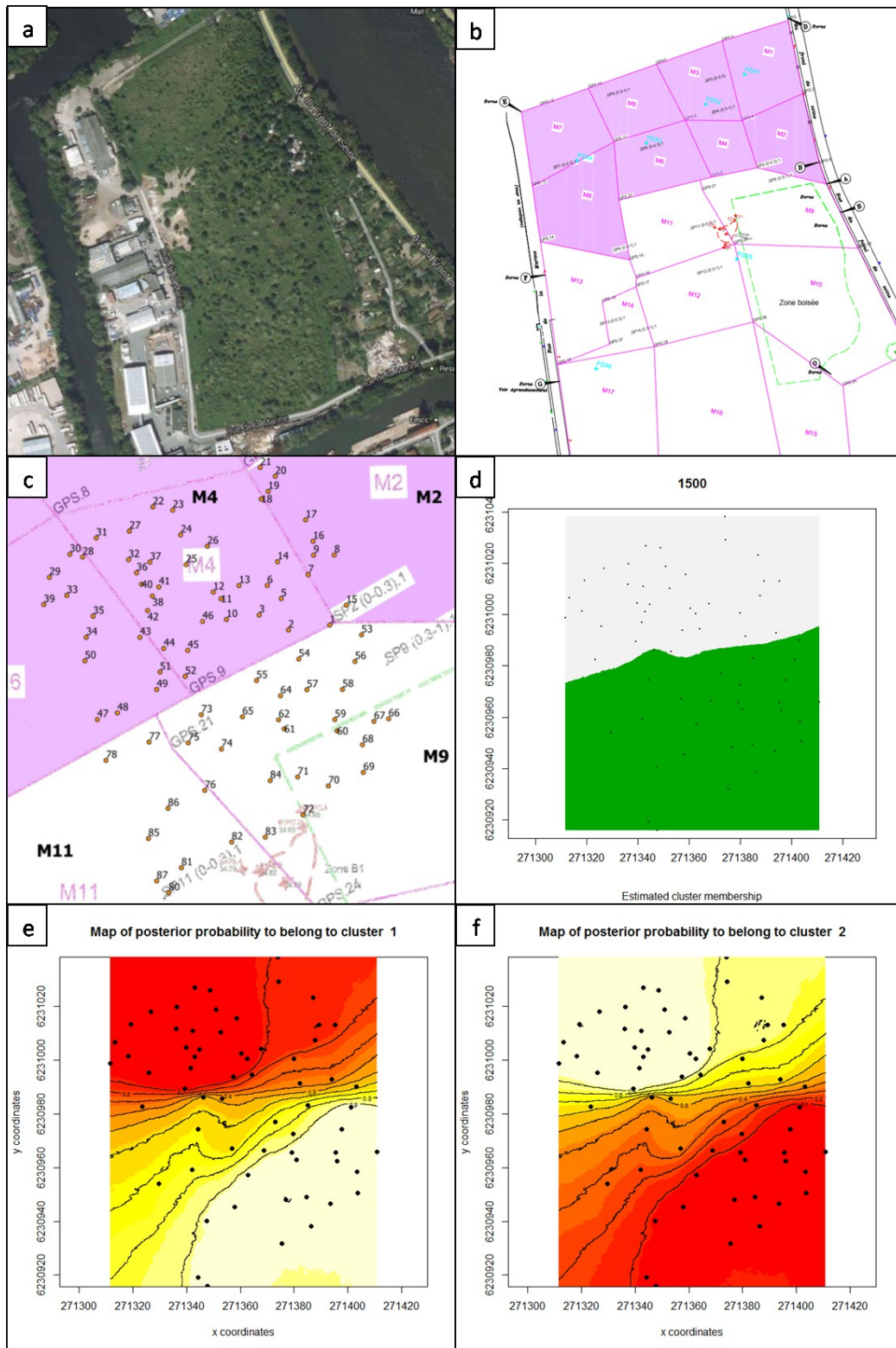


Figure 8 : a) photographie satellite du site de Pierre Fitte à Villeneuve le roi ; b) cartographie du site pour le projet PICRI ; c) localisation des quadrats d'échantillonnage ; d) visualisation des deux populations estimées d'après Geneland sur le site ; e) représentation spatiale des probabilités d'appartenance au cluster « non polluée » pour chaque individus. Plus la zone où se trouve un quadrat est jaune, plus la probabilité que les individus échantillonnés sur ce quadrat appartiennent au cluster « non polluée » est élevée ; f) représentation spatiale des probabilités d'appartenance au patch « polluée » pour chaque individus. Plus la zone où se trouve un quadrat est jaune, plus la probabilité que les individus échantillonnés sur ce quadrat appartiennent au cluster « polluée » est élevée.

DISCUSSION

POLLUTION DU SOL

Les valeurs limites de concentrations en éléments traces dans les sols, obtenues à partir du tableau 2 de l'arrêté du 08/01/1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 08/12/97 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées, ont permis d'évaluer les échantillons de sol prélevés sur le site d'échantillonnage. En regardant les concentrations des métaux les plus retrouvés et reconnus pour leur toxicité (McCluggage *et al.*, 1991) ou leur effet sur les populations de vers de terre (Paoletti *et al.*, 1999) et en les comparant aux valeurs limites (100 mg/kg de MS pour le cuivre, 300 pour le zinc, 100 pour le plomb, figure 1), la séparation entre la zone polluée et la zone non polluée ressort très nettement, avec des valeurs largement supérieures aux limites dans la zone polluée, et des valeurs inférieures ou égales pour la zone non polluée. Pour le Strontium, dont la toxicité à haute dose a également été démontrée sur les animaux (Bartley *et al.*, 1961) mais pour lequel aucune donnée concernant la valeur limite n'a été retrouvée dans la littérature, la différence de concentration est également visible entre les deux zones. Cela a permis de confirmer la séparation « polluée/non polluée », délimitée de manière physique sur le site, prise en compte dans cette étude. Il y a bien deux zones ayant des valeurs de concentrations en métaux distinctes sur le site d'échantillonnage.

IMPACT DE LA POLLUTION SUR LES COMMUNAUTES DE VERS DE TERRE

De nombreux travaux ont étudiés l'impact de la pollution par les métaux sur les communautés de vers de terre. Nahmani *et al* (2003) et Simonsen *et al* (2010) ont notamment montré une relation entre l'augmentation de la concentration en métaux retrouvés dans le sol et la diminution du nombre de vers de terre. Plus le sol était pollué par les métaux lourds, plus le nombre de vers retrouvé chutait. Dans cette étude, l'effet de la pollution sur le nombre de vers retrouvé est bien visible, avec significativement plus de vers échantillonnés dans la zone non polluée lorsque l'on prend en compte la séparation physique du site (figure 5a et 5c) ou la valeur de pollution associée à chaque quadrat (figure 5b et 5d). Dans une étude datant de 2014, Lévêque *et al.* a de son côté montré l'influence de la présence de métaux lourds dans le sol sur la richesse spécifique. Un effet semblable est visible ici, puisque la richesse spécifique par quadrat est significativement plus élevée dans la zone non polluée que dans la zone polluée (figure 4), même si autant d'espèces sont retrouvés dans les deux zones d'échantillonnage. De plus la présence de plomb semble liée à un faible taux d'éclosion de chez *Eisenia fetida* (Reinecke & Reinecke, 1996 et Reinecke *et al.*, 1997) ainsi qu'à des dommages structuraux au niveau du sperme des vers étudiés (Reinecke & Reinecke, 1997), ce qui expliquerait dans le cas de cette étude le faible nombre d'individus dans la zone polluée. De plus ce genre de pollution peut avoir un effet de « goulot d'étranglement » (Mussali-Galante *et al.*, 2014) entraînant alors une diminution de la taille de la population. Il serait cependant intéressant de vérifier que l'effet observé sur le site est bien dû à la pollution, en faisant des mesures de pH ou de teneur en matière organique disponible dans les sols. En effet, les vers de terre, malgré leur capacité de sélection de leur habitat en fonction de sa

qualité (Mathieu *et al.*, 2010), sont reconnus pour leur importante tolérance aux métaux ainsi que pour leur capacité de bioaccumulation (Suthar *et al.*, 2008), et un effet du pH du sol sur la reproduction, la croissance et la survie des vers a été décrit en 2016 par Spurgeon *et al.* De leur côté, Reinecke et Viljoen (1990) ont montrés que la disponibilité en nourriture était très importante pour la production de cocons, et donc de juvéniles. La présence d'un chemin entre les deux zones de pollutions sur lequel ne pousse que de l'herbe pourrait également agir comme une barrière physique en rendant plus difficile le déplacement des vers d'une zone à l'autre. Les vers aurait alors tendance à éviter ce chemin car ne correspondant pas à un habitat de bonne qualité, ou ils se feraient attraper par des prédateurs (oiseaux, taupes, insectes) plus facilement.

En revanche, les résultats concernant les individus de l'espèce *Lumbricus castaneus* sont plus mitigés. En effet, le nombre d'individus retrouvé par quadrat n'est pas différent entre les deux zones, et il n'y a pas d'effet de la pollution sur ce nombre puisqu'il n'y a pas d'effet de la valeur de pollution (valeur sur l'axe 1 de la PCA) sur le nombre d'individus retrouvé (figure 6b). Il semble donc que les individus de cette espèce soient moins sensibles à la pollution aux métaux (plus tolérants) ou qu'une partie de la population se soit adaptée à de fortes concentrations en métaux lourds. Pour visualiser d'éventuels effets de cette pollution, il faut donc regarder au niveau génétique si des différences existent entre les *L. castaneus* échantillonnés en zone polluée et ceux échantillonnés en zone non polluée.

IMPACT DE LA POLLUTION SUR LA STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS DE LUMBRICUS CASTANEUS

L'étude et la comparaison des marqueurs génétiques entre les individus de la zone polluée et ceux de la zone non polluée ne montrent pas d'effet net de la pollution sur cette espèce. En effet, le tableau 4 qui récapitule les paramètres génétiques pour les 5 marqueurs microsatellites ne montre que très peu de différences entre les 2 zones d'échantillonnage : que ce soit pour le pourcentage d'allèles nuls (<20% pour chaque locus dans les deux zones), le nombre d'allèles entre la zone polluée et la zone non polluée ou encore le polymorphisme, il n'y a pas de différence entre les deux zones. Le test de Wilcoxon de comparaison de l'hétérozygotie multi-locus n'indique pas non plus de différence entre les deux zones, et qu'il n'y a donc pas, comme l'a décrit Peleset *al.* en 2002, un plus grand taux de loci hétérozygotes dans la zone polluée que dans la zone non polluée par rapport à notre population de référence issue de la zone non polluée.

L'hétérozygotie observée est inférieure à l'hétérozygotie attendue pour les loci dont le Fis est significatif (trois pour chaque zone), et cela dans les deux zones d'échantillonnage. Un Fis significatif veut dire qu'il existe un écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg, et qu'il y a donc un déficit en hétérozygotes au sein des deux zones d'échantillonnage pour 3 loci. La seule différence entre les deux zones étant que un des loci dont le Fis est significatif est différent : LC02 pour la zone polluée et LC10 pour la zone non polluée. De plus, les allèles les plus fréquents sont les mêmes chez les individus de la zone polluée que chez les individus de la

zone non polluée pour les loci LC02 (allèle 95), LC05 (allèle 136), LC10 (allèle 177) et LC18 (allèle 252). En revanche, pour le locus LC16, l'allèle le plus fréquemment retrouvé chez les individus de la zone non polluée est le 240 alors que chez ceux de la zone polluée c'est l'allèle 224 qui est retrouvé le plus souvent.

Pour les loci LC02 et LC05, il y a non seulement deux allèles majoritaires dont les fréquences sont très élevées par rapport aux autres allèles, mais ils sont également très peu polymorphes. Il est donc difficile d'estimer des déficits en hétérozygotes de manière précise à partir de ces deux loci. Si ces marqueurs ne sont pas pris en compte, il y a donc un écart significatif à l'équilibre de Hardy-Weinberg pour trois loci dans la zone polluée et pour deux loci seulement dans la zone non polluée. Ces écarts à la panmixie peuvent être le résultat de plusieurs facteurs, tels qu'une structuration génétique de la population (effet Walhund), résultant d'une structuration géographique pouvant être causée par des barrières naturelles ou artificielles (grillage, routes, chemin, cours d'eau) ou par les activités humaines, à un taux de consanguinité élevé chez les individus ou à la présence d'allèles nuls.

Les résultats de l'auto-corrélation spatiale n'indiquent cependant aucune relation entre la distance géographique et la distance génétique entre les individus, et cela que ce soit au sein des deux zones d'échantillonnage séparément ou au sein de la zone d'échantillonnage totale. Il n'y a donc pas de regroupements entre individus en fonction de leur apparentement, ce qui permet d'écarter l'hypothèse de la consanguinité. L'hypothèse la plus probable est donc que la fréquence d'allèles nuls pour chaque locus est ce qui a entraîné ces écarts à la panmixie.

En effet, les résultats obtenus grâce au logiciel Geneland par inférences bayésiennes permettent de séparer les individus échantillonnés en deux sous-populations bien distinctes, avec en plus une limite correspondant presque à la barrière mise en place sur le terrain entre la zone polluée et la zone non polluée. Il y a donc bien une subdivision des individus *L. castaneus* en deux sous-populations distinctes, à la fois génétiquement et géographiquement, au sein de la zone d'étude.

Ces différences génétiques, aussi faibles et difficilement détectables soient-elles, peuvent être le résultat de différents facteurs, dont la pollution. Il est en effet bien visible que la population se sépare à la limite entre zone polluée et non polluée. Les métaux lourds étant mutagènes, cette pollution aux métaux pourrait tout d'abord engendrer un taux de mutations plus importants, mais les analyses réalisées ne semblent pas aller dans ce sens puisque qu'il n'y a pas de différence significative dans le nombre d'allèles pour chaque loci entre les deux populations. Une autre hypothèse serait que la pollution entraîne une sélection des génotypes les plus tolérants par sélection. Il faut noter que les marqueurs microsatellites sont neutres, c'est-à-dire qu'ils se situent dans des régions non codantes du génome et ne sont donc pas soumis aux effets sélectifs. Cependant, ils peuvent être soumis à la dérive génétique. En effet, comme il a été montré par Reinecke *et al* (1996 et 1997), un taux en plomb élevé, la diminution en nourriture disponible ou un pH défavorable (trop acide ou trop basique, pouvant également être du aux métaux lourds) peut entraîner une diminution du taux d'éclosion de cocons. Si moins de cocons éclosent en zone polluée, cela revient à dire que les vers de la zone polluée se reproduisent moins, et qu'au fil du temps la taille de la population

est censé diminuer, avec une diminution de fréquences alléliques et génotypiques, et la disparition à terme de certains allèles. En outre, d'après Peles *et al.* (2002) l'hétérozygotie serait sélectivement avantageuse pour les individus qui sont exposés à différents polluants. Ceci entraînerait une hétérozygotie multi-locus plus importante chez les individus les plus exposés, or dans cette étude il n'y a pas de différence de ce paramètre entre les 2 zones. La pollution peut également avoir un rôle de goulot d'étranglement en limitant les déplacements vers la zone polluée, ce qui aurait le même effet que le faible taux d'éclosion de cocons, en particulier en ce qui concerne les fréquences alléliques et génotypiques (Bickham *et al.*, 2000), ce qui n'est pas non plus le cas ici, puisque autant d'individus de l'espèce sont retrouvés en moyenne dans les deux zones d'échantillonnage et que les fréquences alléliques ne sont pas significativement différentes.

Une dernière hypothèse, enfin serait que cette séparation ne soit en aucun cas due à la pollution, mais à la topographie du terrain. En effet, des chemins de terre nue ou avec un léger couvert d'herbes avec très peu de litière sont présents à l'interface entre les deux zones, ce qui rendrait plus difficile les déplacements d'individus entre les deux zones.

Il semblerait donc, au vu des résultats obtenus avec Geneland, que la pollution par les métaux lourds aient un impact sur la génétique des populations de *Lumbricus castaneus* sur la zone d'échantillonnage. Même si le seul effet visible semble être principalement dû à la topographie du site et à la répartition des éléments du paysage, pouvant restreindre voire empêcher les individus de se déplacer librement entre les deux zones d'échantillonnage, les différences de pollution entre les deux zones pourrait expliquer la différence entre les individus des deux zones. Cependant, comme il n'y a pas d'isolement par la distance entre les individus au sein des deux zones il est possible que l'échelle à laquelle l'étude a été réalisée est trop faible pour espérer voire un effet net de la pollution. Un tel effet aurait peut être pu être observé si la zone d'échantillonnage avait été sur une plus grande superficie. Le faible nombre de marqueurs utilisés (5) a également pu empêcher l'obtention de résultats plus visibles.

CONCLUSION

La pollution peut avoir différents impacts sur les vers de terre. Les métaux notamment peuvent présenter un taux de toxicité élevé, pouvant entraîner la mort des individus même si les vers de terre sont connus pour leur résistance importante à la pollution. Les métaux peuvent aussi être mutagènes, entraînant alors des mutations chez les vers de terre pouvant être léthales si elles touchent des cellules somatiques, ou alors engendrer des modifications au sein des populations lorsque celles-ci atteignent les cellules germinales. Ces différents effets peuvent entraîner des modifications de la structure génétique des populations de vers de terre soumises à ces métaux.

Les analyses de sol ont montré qu'il y avait bien une différence dans les quantités de métaux retrouvés entre les deux zones d'échantillonnage, avec des valeurs ne dépassant pas les valeurs seuils retrouvées dans la littérature pour la zone non polluée et des concentrations pouvant être jusqu'à 100 fois supérieures aux valeurs seuils (cuivre et plomb notamment)

dans la zone polluée. Ces résultats nous ont permis de vérifier la pertinence de la séparation physique entre les deux zones (présence d'un grillage sur le terrain).

Avec nettement plus d'adultes et de juvéniles retrouvés en zone non polluée que en zone polluée, il a été possible de voir un effet de la pollution sur les communautés de vers. Les métaux lourds semblent donc avoir un effet sur la taille des populations de vers de terre.

En revanche, les mêmes analyses portant uniquement sur les vers de l'espèce *Lumbricus castaneus* n'ont pas révélées d'effet significatif de la pollution, il n'y a visiblement pas d'effet de la pollution aux métaux lourds sur cette espèce. Il aurait cependant été intéressant de barcoder les individus juvéniles afin de pouvoir identifier ceux appartenant à l'espèce étudiée et ainsi vérifier si il y a un effet de la pollution sur la reproduction.

Les principaux indices de génétiques des populations, notamment les indices d'écart à la panmixie, ainsi que les différents paramètres des marqueurs utilisés ne sont pas significativement différents entre la zone polluée et la zone non polluée. Un écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg a en revanche été observé au sein des deux zones d'échantillonnage. Les analyses d'autocorrélation spatiale ont ensuite permis de rejeter l'hypothèse de la consanguinité. Malgré tout, les fréquences d'allèles nuls étant relativement basses, cela ne semble pas non plus être la cause des écarts à la panmixie observés.

Ce n'est qu'après avoir analysé les données génétiques grâce au package Geneland du logiciel R qu'un effet a pu être observé, avec deux sous-populations apparaissant sur la carte, dont la séparation correspond à limite polluée/non polluée, avec des différences génétiques augmentant avec la distance à la barrière.

Le fait que l'effet de la pollution ait été si difficilement décelable peut être dû à plusieurs facteurs, comme l'espèce étudiée, qui peut être plus résistante que d'autres, comme *Lumbricus rubellus*, très proche morphologiquement et utilisé dans de nombreuses études écotoxicologiques et sur laquelle un effet de la pollution par les métaux lourds a été observé (Peles *et al.*, 2002 ; Simonsen *et al.*, 2010). Cette résistance peut avoir comme effet un impact des métaux lourds plus faible, ce qui rendrait les modifications génétiques plus faibles et donc plus difficiles à détecter. Le faible nombre de marqueurs utilisés dans cette étude a également pu être un frein à la détection d'effets génétiques, il faudrait, pour remédier à cela, compléter les analyses avec des marqueurs supplémentaires.

BIBLIOGRAPHIE

- BARTLEY, John C. et REBER, E. F. Toxic effects of stable strontium in young pigs. *J. Nutrition*, 1961, vol. 75.
- BOUCHÉ, Marcel B. *Des vers de terre et des hommes: découvrir nos écosystèmes fonctionnant à l'énergie solaire*. Actes Sud, 2014.
- BICKHAM, John W., SANDHU, Shabeg, HEBERT, Paul DN, *et al.* Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation research/Reviews in Mutation research*, 2000, vol. 463, no 1, p. 33-51.
- BITYUTSKII, N. P., MAIOROV, E. I., et ORLOVA, N. E. The priming effects induced by earthworm mucus on mineralization and humification of plant residues. *European Journal of Soil Biology*, 2012, vol. 50, p. 1-6.
- ELLEGREN, Hans. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics*, 2004, vol. 5, no 6, p. 435-445.
- JARNE, Philippe et LAGODA, Pierre JL. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*, 1996, vol. 11, no 10, p. 424-429.
- JOUQUET, Pascal, BLANCHART, Eric, et CAPOWIEZ, Yvan. Utilization of earthworms and termites for the restoration of ecosystem functioning. *Applied Soil Ecology*, 2014, vol. 73, p. 34-40.
- KALNICKY, Dennis J. et SINGHVI, Raj. Field portable XRF analysis of environmental samples. *Journal of hazardous materials*, 2001, vol. 83, no 1, p. 93-122.
- KELEPERTZIS, Efstratios. Accumulation of heavy metals in agricultural soils of Mediterranean: insights from Argolida basin, Peloponnese, Greece. *Geoderma*, 2014, vol. 221, p. 82-90.
- LATIF, Robabeh, MALEK, Masoumeh, et MIRMONSEF, Hassan. Cadmium and lead accumulation in three endogeic earthworm species. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 2013, vol. 90, no 4, p. 456-459.
- LÉVÊQUE, Thibaut, CAPOWIEZ, Yvan, SCHRECK, Eva, *et al.* Effects of historic metal (loid) pollution on earthworm communities. *Science of the Total Environment*, 2015, vol. 511, p. 738-746.
- MATHIEU, Jérôme, BAROT, Sébastien, BLOUIN, Manuel, *et al.* Habitat quality, conspecific density, and habitat pre-use affect the dispersal behaviour of two earthworm species, *Aporrectodea icterica* and *Dendrobaena veneta*, in a mesocosm experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, vol. 42, no 2, p. 203-209.

- MCCLUGGAGE, D. Heavy Metal Poisoning, NCS Magazine, Published by The Bird Hospital, CO, USA (1991).
- MONROY, Fernando, AIRA, Manuel, et DOMÍNGUEZ, Jorge. Changes in density of nematodes, protozoa and total coliforms after transit through the gut of four epigeic earthworms (Oligochaeta). *Applied Soil Ecology*, 2008, vol. 39, no 2, p. 127-132.
- MUSSALI-GALANTE, Patricia, TOVAR-SÁNCHEZ, Efraín, VALVERDE, Mahara, *et al.* Genetic structure and diversity of animal populations exposed to metal pollution. In : *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Volume 227*. Springer International Publishing, 2014. p. 79-106.
- NAHMANI, Johanne, LAVELLE, Patrick, LAPIED, Emmanuel, *et al.* Effects of heavy metal soil pollution on earthworm communities in the north of France: The 7th international symposium on earthworm ecology· Cardiff· Wales· 2002. *Pedobiologia*, 2003, vol. 47, no 5, p. 663-669.
- NAHMANI, Johanne, HODSON, Mark E., et BLACK, Stuart. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environmental pollution*, 2007, vol. 149, no 1, p. 44-58.
- PAOLETTI, Maurizio G. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 1999, vol. 74, no 1, p. 137-155.
- PELES, John D., TOWLER, William I., et GUTTMAN, Sheldon I. Population genetic structure of earthworms (*Lumbricus rubellus*) in soils contaminated by heavy metals. *Ecotoxicology*, 2003, vol. 12, no 5, p. 379-386.
- POP, V. V. et POSTOLACHE, T. Giant earthworms build up vermic mountain rendzinas. *On earthworms. Mucchi, Modena*, 1987, p. 141-150.
- REINECKE, A. J. et VILJOEN, S. A. The influence of worm density on growth and cocoon production of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, 1990, vol. 27, no 2, p. 221-230.
- REINECKE, A. J. et REINECKE, S. A. The influence of heavy metals on the growth and reproduction of the compost worm *Eisenia fetida*(Oligochaeta). *Pedobiologia*, 1996, vol. 40, no 5, p. 439-448.
- REINECKE, A. J., MABOETA, M. S., et REINECKE, S. A. Stimulating effects of low lead concentrations on growth and cocoon production of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African Journal of Zoology*, 1997, vol. 32, no 3, p. 72-75.
- REINECKE, SophièA et REINECKE, A. J. The influence of lead and manganese on spermatozoa of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry*, 1997, vol. 29, no 3, p. 737-742.

- SIMONSEN, Vibeke et KLOK, Chris. Genetic and ecological impacts of heavy metal and flooding stress on the earthworm *Lumbricus rubellus* in floodplains of the Rhine river. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, vol. 42, no 2, p. 270-275.
- SPURGEON, D. J. et HOPKIN, S. P. Tolerance to zinc in populations of the earthworm *Lumbricus rubellus* from uncontaminated and metal-contaminated ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, vol. 37, no 3, p. 332-337.
- SUTHAR, Surindra, SINGH, Sushma, et DHAWAN, Sachin. Earthworms as bioindicator of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soils: is metal bioaccumulation affected by their ecological category?. *Ecological Engineering*, 2008, vol. 32, no 2, p. 99-107.
- TANARA, Vincenzo et CORIOLANO, Giovanni Battista. *L'economia del cittadino in villa del sig. Vincenzo Tanara libri 7. per gli eredi del Dozza*, 1651.
- TORRES-LEGUIZAMON, Magally, MATHIEU, Jérôme, LIVET, Alexandre, *et al.* Isolation of polymorphic microsatellite markers in *Aporrectodea icterica* (Savigny 1826). *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, vol. 51, p. 16-19.
- VELTMAN, Karin, HUIJBREGTS, Mark AJ, VIJVER, Martina G., *et al.* Metal accumulation in the earthworm *Lumbricus rubellus*. Model predictions compared to field data. *Environmental Pollution*, 2007, vol. 146, no 2, p. 428-436.
- WEIR, Bruce S. et COCKERHAM, C. Clark. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *evolution*, 1984, p. 1358-1370.

RESUME

Les vers de terre sont présents en abondance dans nos sols, ils constituent en effet la plus importante biomasse animale des ces derniers. Ils sont considérés comme les principaux ingénieurs du sol et sont connus pour les nombreux services écosystémiques qu'ils fournissent. Mais les vers de terre sont très exposés aux polluants d'origines anthropiques, dont les métaux lourds, rejetés en grandes quantités dans l'agriculture et dans l'industrie. Afin d'étudier leur effet sur la structure génétique des populations de vers de terre, des individus de l'espèce *Lumbricus castaneus* ont été échantillonnés sur une ancienne friche industrielle, présentant une zone polluée par les métaux et une zone non polluée. Cinq marqueurs génétiques spécifiques à cette espèce ont été mis au point, permettant la comparaison de différents paramètres de génétique des populations. Les analyses n'ont montrées que de très faibles différences entre les deux zones, mais celles réalisées grâce à Geneland ont permis de mettre en évidence deux sous-populations distinctes, une dans la zone polluée l'autre dans la zone non polluée. Il serait malgré tout intéressant de réaliser de nouvelles analyses avec plus de cinq marqueurs, et d'identifier les individus juvéniles de l'espèce afin d'avoir des données concernant l'effet de la pollution sur la reproduction.

ABSTRACT

Earthworms are abundant in our soils, they form the largest animal biomass of these. They are considered the main engineers of the soil and are known for the many ecosystem services they provide. But earthworms are very vulnerable to anthropogenic sources of pollutants, including heavy metals discharged in large quantities in agriculture and in industry. In order to study their effect on the genetic structure of earthworm populations , the species of *Lumbricus castaneus* individuals were sampled on a former. industrial site, with an area polluted by metals and an unpolluted area Five genetic markers specific to this species have been developed, allowing the comparison of different parameters of populations genetics. Analyses have shown very small difference between the two zones, but those achieved by Geneland highlight two distinct subpopulations, one population in the polluted area and another one in the non-polluted area. Nevertheless it would be interesting to conduct further analysis with more than five markers, and identify juveniles of the species in order to get data on the effect of pollution on reproduction.