



HAL
open science

Conséquences de l'exposition de l'insecte modèle *Aedes aegypti* aux polluants des eaux de surface : Des mécanismes moléculaires à la dynamique des populations

Sophie Prud'Homme

► To cite this version:

Sophie Prud'Homme. Conséquences de l'exposition de l'insecte modèle *Aedes aegypti* aux polluants des eaux de surface : Des mécanismes moléculaires à la dynamique des populations. Toxicologie. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV030 . tel-01419174

HAL Id: tel-01419174

<https://theses.hal.science/tel-01419174v1>

Submitted on 19 Dec 2016

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biodiversité, Écologie, Environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Sophie PRUD'HOMME

Thèse dirigée par **Stéphane REYNAUD** et
codirigée par **Jean-Philippe DAVID**

préparée au sein du **Laboratoire d'Écologie Alpine**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Conséquences de l'exposition de l'insecte modèle *Aedes aegypti* aux polluants des eaux de surface : Des mécanismes moléculaires à la dynamique des populations

Thèse soutenue publiquement le 18/12/2015
devant le jury composé de :

M^{me} Claire VOURC'H

Professeure à l'Université Grenoble Alpes, Présidente

M^{me} Gaelle LE GOFF

Chargée de recherche à l'INRA de Sophia Antipolis, Rapporteur

M. Alain GEFFARD

Professeur à l'Université de Reims, Rapporteur

M. Jean LAROCHE

Professeur à l'Université de Brest, Examineur

M. Vincent LAUDET

Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie - Examineur

M. Fabien PIERRON

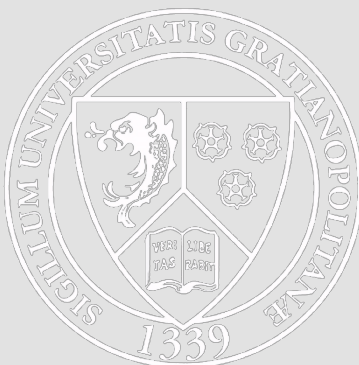
Chargé de recherche au CNRS, UMR5805, Bordeaux - Examineur

M. Stéphane REYNAUD

Maitre de conférences à l'Université Grenoble Alpes – Directeur de thèse

M. Jean-Philippe DAVID

Chargé de recherche au CNRS, UMR5553, Grenoble – Co-directeur de thèse



*« Si les moustiques étaient des abeilles,
ils ramèneraient du sang à la ruche,
et la reine ferait du boudin »*

Philippe Geluck

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	7
Liste des tableaux.....	9
Liste des figures.....	11
Avant propos.....	13
Remerciements.....	15
I. Introduction.....	17
I.1 La pollution des eaux de surface.....	19
I.2 Nouvelles approches en écotoxicologie.....	21
I.2.1 Réalisme des conditions des études en écotoxicologie.....	21
I.2.2 Étude du mode d'action des polluants.....	25
I.2.3 Les changements d'échelle en écotoxicologie.....	27
I.3 Écotoxicologie des insectes aquatiques.....	29
I.3.1 Écologie et sensibilité des insectes aquatiques.....	29
I.3.2 Modèles d'insectes aquatiques en écotoxicologie.....	31
I.3.3 Le moustique <i>Aedes aegypti</i> comme modèle d'insecte aquatique.....	34
I.4 État des connaissances sur les polluants étudiés.....	37
I.4.1 Ibuprofène.....	37
I.4.2 Bisphénol A.....	47
I.4.3 Benzo[a]pyrène.....	54
I.5 Problématique et objectifs de la thèse.....	61
II. Effets des polluants sur les traits d'histoire de vie des populations.....	65
II.1 Objectifs de l'étude.....	67
II.2 Démarche expérimentale et méthodologies adoptées.....	67
II.2.1 Conditions d'élevage en laboratoire.....	67
II.2.2 Dispositif expérimental de l'étude à court terme.....	72
II.2.3 Dispositif expérimental de l'étude à long terme.....	76
II.2.4 Mesure et analyse des traits d'histoire de vie.....	78
II.2.5 Mesure et analyse de la tolérance des populations aux insecticides.....	81
II.3 Résultats.....	82
II.3.1 Concentration en polluants dans les milieux d'exposition.....	82
II.3.2 Impact à court terme de l'exposition aux polluants sur les traits d'histoire de vie des populations.....	84
II.3.3 Impact des polluants sur les traits d'histoire de vie des populations après 6 générations d'exposition.....	94
II.4 Discussion.....	105
II.4.1 Conséquences à court terme de l'exposition aux polluants sur le cycle de vie des individus.....	105
II.4.2 Conséquence de l'exposition multigénérationnelle aux polluants.....	109
II.4.3 Impact des polluants en mélange sur le développement des individus.....	111
II.4.4 Conséquences de la contamination des milieux sur la capacité vectorielle des individus.....	112
II.4.5 Conclusions.....	113
III. Mécanismes moléculaires de l'impact trans-générationnel de l'ibuprofène.....	115
III.1 Objectifs de l'étude.....	117
III.2 Démarche expérimentale.....	117
III.3 Méthodologies adoptées.....	119

III.3.1	Élevage des populations étudiées	119
III.3.2	Etudes des traits d'histoire de vie.....	122
III.3.3	Mesures des ressources métaboliques par RMN-HRMAS	123
III.3.4	Dynamique des ecdystéroïdes au cours de la maturation des œufs	127
III.3.5	Étude de la transcription des gènes	129
III.4	Résultats	138
III.4.1	Impacts de l'ibuprofène sur les traits d'histoire de vie des populations de moustiques....	138
III.4.2	Impact de l'ibuprofène sur les réserves métaboliques	140
III.4.3	Impact de l'ibuprofène sur de la vitellogénèse	142
III.4.4	Impact de l'ibuprofène sur le profil transcriptionnel des individus.....	144
III.5	Discussion.....	162
III.5.1	Impacts de l'ibuprofène sur les individus exposés	163
III.5.2	Impacts de l'ibuprofène sur les individus de la descendance non exposée	167
III.5.3	Origines de l'impact trans-générationnel de l'ibuprofène	178
III.5.4	Conclusions.....	182
IV.	Synthèse générale et perspectives de recherche.....	185
IV.1	Rappel des objectifs de la thèse	187
IV.2	Rappel des principaux résultats.....	187
IV.2.1	Conséquences de l'exposition aux polluants à court terme	187
IV.2.2	Conséquences de l'exposition multigénérationnelle aux polluants	188
IV.2.3	Mécanismes impliqués dans les effets trans-générationnels de l'ibuprofène.....	189
IV.3	Perspectives de la thèse	190
IV.3.1	Validation des mécanismes impliqués dans les effets trans-générationnels de l'ibuprofène.....	190
IV.3.2	Spécificité de l'impact trans-générationnel de l'ibuprofène.....	191
IV.3.3	Conséquences de l'exposition aux polluants sur la dynamique des populations	192
IV.3.4	Conséquences de l'exposition aux polluants sur la tolérance aux stress secondaires	194
IV.3.5	Conséquence de l'exposition aux polluants sur le potentiel vectoriel des populations	195
IV.3.6	L'espèce <i>Aedes aegypti</i> est-elle un bon modèle en écotoxicologie ?	197
IV.4	Conclusion finale.....	198
	Références bibliographiques	199
	Annexe 1	227
	Annexe 2	231
	Annexe 3	233
	Annexe 4	235
	Annexe 5	237
	Annexe 6	247

LISTE DES ABRÉVIATIONS

20E :	20-hydroyecdysonne, forme active principale des ecdysteroïdes
AA :	Acide arachidonique
ACP :	Analyse en composante principale
ADNc :	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire – ADN obtenus à partir de la transcription inverse des ARNm messagers
ARN :	Acide RiboNucléique
B[a]P_GX :	Population exposée durant 6 générations successives au benzo[a]pyrène, considérée à la génération X
BPA_GX :	Population exposée durant 6 générations successives au bisphenol A, considérée à la génération X
Bti :	<i>Bacillus thuringensis israelensis</i> – insecticide biologique couramment utilisé en lutte anti-vectorielle
CL ₅₀ :	Concentration létale pour 50% des individus exposés
CE ₅₀ :	Concentration induisant l'effet considéré chez 50% des individus exposés
COX :	Cyclooxygénase
DNase :	désoxyribonucléase I
EcR :	Récepteur à l'ecdysone - <i>Ecdysone receptor</i>
EIA :	Enzymatic ImmunoAssay
EmT ₅₀ :	Temps pour lequel 50 % des individus d'une population ont émergés.
FemF0 :	Femelles imagos de la génération parentale étudiées lors de l'étude transcriptomique
FPKM :	Fragment Per Kilobase exon per Million – unite de mesure de transcription des gènes
GC-MS/MS :	Chromatographie en phase gazeuse couplée un spectromètre de masse en tandem
HAP :	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HRMAS :	High resolution magic angle spinning
HSF :	Facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress - <i>Heat Shock Factor</i>
HSP :	Protéine de stress - <i>Heat Shock Protein</i>
Ibu_GX :	Population exposée durant 6 générations successives à l'ibuprofène, considérée à la génération X
LC-HRMS/MS :	Chromatographie en phase liquide couplée un spectromètre de masse haute résolution en tandem
L1F1 :	Larves de stade 1 de la descendance étudiées lors de l'étude transcriptomique
L4F0 :	Larves de stade 4 de la génération parentale étudiées lors de l'étude transcriptomique
MAP :	Protéines associées aux microtubules - <i>Microtubule Associated Protein</i>
mRNAseq :	Séquençage massif à haut débit des ARN messagers totaux
OBP :	<i>Odorant Binding Protein</i>

OCDE :	Organisation pour la Coopération et le Développement Economique
OPLS-DA :	Régression partielle des moindres carrés orthogonale en analyse discriminante – <i>Orthogonal Partial Least Squares – Discriminant Analysis</i>
pb :	Paires de bases
PCB :	Polychlorobiphényle
Q ² :	variabilité prédictive d'un modèle OPLS-DA
R ² X :	variabilité intra-classe d'un modèle OPLS-DA
R ² Y :	variabilité orthogonal interclasse d'un modèle OPLS-DA
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
RT-qPCR :	Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction
STEP :	Station d'épuration urbaine
YPP :	<i>Yolk Precursor Proteins</i> , protéines précurseurs du vitellus.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 - Caractéristiques physico-chimiques de l'ibuprofène	39
Tableau I.2- Concentrations environnementales en ibuprofène mesurées dans les effluents de STEP	41
Tableau I.3 - Concentrations environnementales en ibuprofène mesurées dans les eaux de surface	42
Tableau I.4 - Impacts écotoxicologiques de l'ibuprofène sur les invertébrés d'eaux douces.....	45
Tableau I.5 - Caractéristiques physico-chimiques du bisphénol A.....	48
Tableau I.6- Concentrations environnementales en ibuprofène mesurées dans les effluents de STEP.	50
Tableau I.7- Concentrations environnementales en bisphénol A mesurées dans les effluents de STEP.	50
Tableau I.8 - Impacts écotoxicologiques du bisphénol A sur les invertébrés d'eaux douces.	52
Tableau I.9 - Caractéristiques physico-chimiques du benzo[a]pyrène	55
Tableau I.10 - Concentrations environnementales en benzo[a]pyrène mesurées dans les eaux douces mondiales.....	57
Tableau I.11 - Impacts écotoxicologiques du benzo[a]pyrène sur les invertébrés.....	60
Tableau II.1 - Dose de nourriture apportée aux individus au cours de leur développement.....	68
Tableau II.2 - Concentrations d'exposition aux polluants	69
Tableau II.3 - Variabilité de l'extraction et du dosage des polluants étudiés dans les milieux de contrôle établis avec les standards analytiques.	71
Tableau II.4 - Description des populations élevées pour l'étude à long terme de l'impact des polluants.....	76
Tableau II.5 - Evolution des concentrations de polluants dans les milieux contaminés aux cours du temps	82
Tableau II.6 – Evolution de la conductivité et du pH des milieux pollués au cours du temps.....	83
Tableau II.7 - Impact de l'ibuprofène sur les traits d'histoire de vie des populations exposées et sur leur descendance non exposée..	86
Tableau II.8 - Impact du benzo[a]pyrène sur les traits d'histoire de vie des populations exposées et sur leur descendance non exposée..	90
Tableau II.9 - Impact du bisphénol A sur les traits d'histoire de vie des populations exposées et sur leur descendance non exposée.	92
Tableau II.10 - Impact de l'ibuprofène, du bisphénol A et du benzo[a]pyrène en mélange sur les traits d'histoire de vie des populations exposées et sur leur descendance non exposée..	93
Tableau II.11 - Impact de l'ibuprofène 1 µg/l sur les traits d'histoire de vie des populations exposées durant 1 et 6 générations.	96
Tableau II.12 - Impact de benzo[a]pyrène 0,6 µg/l sur les traits d'histoire de vie des populations exposées durant 1 et 6 générations..	99
Tableau II.13 - Impact du bisphénol A 0,4 µg/l sur les traits d'histoire de vie des populations exposées durant 1 et 6 générations.	100

Tableau II.14 - Impact du mélange de polluants aux concentrations x1 sur les traits d'histoire de vie des populations exposées durant 1 et 7 générations.	103
Tableau II.15 - Impact de l'exposition à l'ibuprofène, au benzo[a]pyrène et au bisphénol A seuls ou en mélange à court (1 génération) et long terme (6 générations) sur la tolérance des populations à l'insecticide biologique <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (Bti) et à l'insecticide chimique Temephos.	104
Tableau II.16 - Bilan des impacts de la contamination des milieux sur les traits d'histoire de vie.	106
Tableau III.1 - Interprétation des scores de qualité Phred établis lors du séquençage	131
Tableau III.2 - Paramètres qualitatifs appliqués lors du nettoyage des données brutes de séquençage par le logiciel Trimmomatic	131
Tableau III.3 - Paramètres appliqués à l'alignement des séquences sur le génome de référence par TopHat2.	132
Tableau III.4 - Qualité des transcriptomes expérimentaux assemblés par Cuffmerge.....	134
Tableau III.5 - Classes fonctionnelles établies pour l'analyse des données de transcriptomique.....	135
Tableau III.6 - Séquences des amorces utilisées pour l'étude de la transcription des gènes par RT-qPCR.....	137
Tableau III.7 - Données de séquençage et de l'alignement des séquences.	145
Tableau III.8 - Enrichissement des classes fonctionnelles chez les larves exposées à l'ibuprofène.....	148
Tableau III.9 – Sur-transcription des gènes chez les larves de stade 4 exposées à l'ibuprofène.	149
Tableau III.10– Sous-transcription des gènes chez les larves de stade 4 exposées à l'ibuprofène.....	150
Tableau III.11 - Transcription différentielle des gènes chez les femelles imagos exposées à l'ibuprofène.....	152
Tableau III.12 – Enrichissement des classes fonctionnelles chez les larves de la descendance.....	153
Tableau III.13 - Transcription différentielle des gènes impliqués dans la signalisation des ecdystéroïdes chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène.....	156
Tableau III.14 - Transcription différentielle des gènes impliqués dans les voies de signalisation cellulaires chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène.....	159
Tableau III.15 - Transcription différentielle des gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'insuline chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène.....	161

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 - Exemples de courbes dose-réponse.....	22
Figure I.2 - Echelles biologiques impliquées dans l'impact des conditions environnementales sur les organismes, et la réponse de ces organismes aux conditions environnementales.....	27
Figure I.3 - Cycle de vie semi-aquatique du moustique <i>Aedes aegypti</i>	34
Figure I.4 - Niveaux d'intégration temporels et biologiques pris en compte dans l'évaluation de l'impact de polluants ubiquitaires des eaux de surface sur les populations de moustiques <i>Aedes aegypti</i>	61
Figure II.1 - Dispositif expérimental d'échantillonnage pour la mesure des concentrations effectives de polluants dans les milieux au cours du temps.....	71
Figure II.2 - Dispositif expérimental de l'évaluation à court terme de l'impact des polluants sur les populations.....	72
Figure II.3 - Suivi de l'impact de l'ibuprofène, du bisphénol A et du benzo[a]pyrène à court terme.....	73
Figure II.4 - Dispositif expérimental de l'étude de la tolérance aux insecticides des populations exposées à court terme aux polluants.....	75
Figure II.5 - Dispositif expérimental de l'étude de l'impact à long terme de l'exposition aux polluants -.....	76
Figure II.6 - Dispositif expérimental de l'étude de la tolérance aux insecticides des populations exposées à long terme aux polluants.....	77
Figure II.7 - Méthode de détermination du temps de développement médian des populations observées.....	78
Figure II.8 - Mesure de la taille alaire entre l'apex de l'alule (A) et l'extrémité périphérique de la veine R3 (B).....	80
Figure II.9 - Principe et mise en place des bioessais aux larvicides témephos (A) et Bti (B).....	81
Figure II.10 - Impact à court terme de l'ibuprofène sur le temps de développement des individus exposés et leur descendance.....	85
Figure II.11 - Impact à court terme du benzo[a]pyrène sur le temps de développement des individus exposés et leur descendance.....	89
Figure II.12 - Impact à long terme de l'ibuprofène (1 µg/l) sur le temps de développement des individus.....	95
Figure II.13 - Impact à long terme du benzo[a]pyrène (0,6 µg/l) sur le temps de développement des individus.....	98
Figure II.14 - Impact à long terme du mélange de polluant aux concentrations x1 sur le temps de développement des individus.....	102
Figure II.15 – Profils d'impact du benzo[a]pyrène selon la dose d'exposition.....	108
Figure III.1 - Echantillonnage des individus pour l'étude intégrative du mode d'action de l'ibuprofène.....	119
Figure III.2 - Plan d'échantillonnage des individus lors de l'étude des mécanismes impliqués dans l'impact trans-générationnel de l'ibuprofène.....	121
Figure III.3 - Démarche expérimentale de l'étude des ressources métaboliques dans les femelles imagos et les œufs de la descendance par RMN-HRMAS.....	124

Figure III.4 - Démarche expérimentale de l'étude des transcriptomes des populations exposées à l'ibuprofène et de leur descendance.....	130
Figure III.5 – Temps de vie des imagos.....	139
Figure III.6 - Survie des larves de la descendance en condition de privation totale de nourriture.....	140
Figure III.7 - Abondance relative des réserves métaboliques dans les œufs issus de populations exposées à l'ibuprofène par rapport aux populations témoins.....	141
Figure III.8 – Quantités d'ecdystéroïdes produits au cours de la maturation des oocytes chez les femelles imagos exposées à l'ibuprofène (rose) et les femelles témoins (noir).	142
Figure III.9 - Transcription différentielle de gènes durant la vitellogénèse.....	143
Figure III.10 - Analyse de la transcription différentielle des gènes chez les larves de stades 4 et les femelles imagos exposées à 1 µg/l d'ibuprofène, et chez les larves de stade 1 non exposées de leur descendance.....	147
Figure III.11 – Sur-transcription des gènes impliqués dans les voies de signalisation cellulaires chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène.....	158
Figure III.12 - Perturbations potentielles de la physiologie des larves d' <i>Aedes aegypti</i> par l'ibuprofène. .	166
Figure III.13 - Conséquences de l'exposition à l'ibuprofène sur la physiologie de la descendance.	177
Figure IV.1 - Résultats préliminaires de l'évolution du taux d'accroissement de la population en fonction des doses de Bti utilisées.....	194

AVANT PROPOS

Cette thèse, déposée à l'école doctorale de Chimie et Science du Vivant (EDCSV) de l'Université Grenoble Alpes (UGA) résume les travaux réalisés entre Septembre 2011 et Août 2015 au sein de l'équipe Pollution, Environnement, Écotoxicologie, Écorémédiation (P3E) du Laboratoire d'Écologie Alpine de Grenoble (LECA).

La première année de cette thèse a été financée par l'École Normale Supérieure de Lyon. Depuis Septembre 2012, cette thèse est soutenue par un contrat ministériel d'allocataire de recherche. Les expérimentations ont été intégralement financées par les fonds interne du Laboratoire d'Écologie Alpine.

Cette thèse a été couplée à une activité complémentaire de communication et vulgarisation scientifique au sein du service de communication de l'Université Joseph Fourier. Cette activité complémentaire a été développée dans le cadre du Label Recherche et Enseignement Supérieur dans la section Diffusion des savoirs, organisé par le Collège des Écoles Doctorales de Grenoble.

Le travail de cette thèse a donné lieu à deux communications écrites et deux communications orales lors de congrès nationaux (congrès annuel des doctorants EDCSV 2013 ; Société d'Écotoxicologie Fondamentale et appliquée (SEFA 2014) ; Colloque d'ECophysiology Animale (CEPA 2015)) et internationaux (EcoBIM 2015). Ces travaux de thèse ont également donné lieu à deux publications issues d'un projet collaboratif annexe au sein du laboratoire¹, et donneront lieu à deux articles scientifiques actuellement en préparation.

Les années passées au sein du laboratoire ont été l'occasion de faire découvrir l'univers de la recherche à deux stagiaires lors de stages d'observation et de découverte, ainsi que d'encadrer un stage de Master 1 BEE (Biodiversité – Écologie – Environnement).



¹G.Tetreau*, A. Chandor-Proust*, F. Faucon*, R. Stalinski*, I. Akbouayri*, S.M. Prud'homme*, M. Raveton, S. Reynaud. *Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A. Aquatic Toxicology*, 07/2013; 140-141:389-397. (*: equal contribution)

G.Tetreau*, A. Chandor-Proust*, F. Faucon*, R. Stalinski*, I. Akbouayri*, S.M. Prud'homme*, M. Régent-Kloeckner, M. Raveton, S. Reynaud. *UV light and urban pollution: Bad cocktail for mosquitoes? Aquatic Toxicology*, 01/2014; 146:52-60. (*: equal contribution)

REMERCIEMENTS

Mes pensées vont en premier lieu à **Stéphane Reynaud**, qui a su comprendre mes attentes et mes envies lorsqu'en 2011, par un beau jour de printemps, j'ai toqué à la porte de son bureau. Je sais que tes certitudes, tes doutes et tes réjouissances ont accompagnés les miens durant ces quatre années et pour ça, je te remercie. Plus que cela, ton ouverture d'esprit scientifique et la pertinence de tes remarques m'ont permis d'adopter cette approche intégrative qui nous était chère à tous les deux, et dont, au final, et après moult embuches, je pense pouvoir être fière. Je tiens également à remercier **Jean-Philippe David**, co-directeur de cette thèse, pour son aide précieuse dans l'extraction et l'optimisation du moindre nanogramme d'ARN et pour son implication et son assiduité dans la relecture de ce manuscrit.

Je remercie vivement tous les membres du jury, Mmes **Gaëlle Le Goff** et **Claire Vourc'h**, ainsi que MM. **Alain Geffard**, **Jean Laroche**, **Vincent Laudet** et **Fabien Pierron** qui ont accepté l'importante tâche d'examiner et d'évaluer ce travail de thèse.

Il m'apparaît important de souligner le soutien financier et structurel du Laboratoire d'Ecologie Alpine, et en sa qualité de directrice **Irène Till-Bottraud**, ainsi que tous les membres du Comité de Coordination. Je tiens également à remercier celles qui font tourner le pôle administratif, particulièrement **Florence Sagnimorte**, **Nancy Iacono** et **Delphine Bourlier**, ainsi que **Olivier Lontin**, notre informaticien, pour leur disponibilité et leur patience. Je souhaite également plus particulièrement remercier **Muriel Raveton**, qui lorsque après deux ans de galère a accepté de mettre à ma disposition la pièce expérimentale dans laquelle se sont déroulés les élevages à l'origine de toutes les données et résultats présentés dans ce manuscrit. Je tiens aussi à remercier **Christian Miquel**, dont la serviabilité et le sens du contact humain se sont avérés particulièrement utiles pour orchestrer au mieux les travaux de réfection du laboratoire et limiter au mieux les répercussions sur nos expérimentations.

Je tenais également à remercier de tout cœur les membres de mon comité de thèse, qui bien au-delà de leurs commentaires et conseils décisifs lors des deux comités organisés au cours de ma thèse, ont chacun tenu un rôle fondamental dans mon cheminement à travers ces années : **Chantal Dauphin-Villemant**, qui a partagé avec moi et à de nombreuses reprises sa précieuse expérience, à la paillasse aussi bien qu'au cours de passionnantes discussions ; **Arnaud Chaumot**, dont la bienveillance et la curiosité scientifique sont à l'origine d'une collaboration enthousiasmante, me faisant découvrir un nouveau pan de la biologie. Comment ne pas remercier également **Sophie Sroda**, dont l'arrivée au Laboratoire d'Ecologie Alpine au cours de ma thèse a été une bouffée d'oxygène, et dont les conseils et les critiques ont été particulièrement importants, tant sur le plan scientifique que humain. Enfin, je tiens à remercier **Vincent Laudet**, qui a pris une place toute particulière dans mon cœur de scientifique en herbe, en m'initiant à l'univers des perturbateurs endocriniens et à la toxicologie alors que j'étais encore sur les bancs de l'école.

Parmi tous ceux ayant travaillé en même temps que moi sur les moustiques, **Idir Akhouayri**, **Alexia Chandor-Proust**, **Myriam Régent-Kloekner**, **Renaud Stalinski**, **Guillaume Tetreau**, **Fred Faucon**, et **Thérésia N'kia**, j'étais bien la seule à ne pas chercher un moyen de les éradiquer. Cela ne nous a pourtant pas empêchés de partager points de vue et connaissances au cours de nombreuses discussions. Je remercie également les autres membres de l'équipe, **Sylvie Veyrenc**, **Lucile Sage**, **Sophie Perigon**, **Thierry Gaude** et **Bello Mouhamadou**, toujours disposés à rendre service et à échanger au détour d'un couloir.

J'adresse une mention spéciale à **Fred Laporte**, qui s'est décarcassé pour me permettre de finaliser les dernières manip avant le jour fatidique de la soutenance. Je tiens aussi à remercier et féliciter **Eva Cassar**, qui a patiemment et courageusement disséqué, monté et mesuré 5 254 ailes avec une minutie remarquable, le tout (presque) sans pleurs ni râles. J'ai été ravie d'encadrer ton stage de master 1, et j'espère que tu trouveras ta voie.

J'ai partagé ces quatre années avec de nombreuses personnes, à commencer par **Christophe Regnault, Claire Blondel, Renaud Stalinski, Fred Faucon** et **Thérésia N'kia**, co-thésards, compagnons de galère et compagnons de rires. J'ai également toujours pu trouver au détour d'un couloir ou à la cafétéria du labo un collègue pour partager quelques mots ou de grandes conversations, que ce soit **Mathieu Faure** et **Nico Legay** dont l'humour et le franc parlé m'ont fait rougir plus d'une fois mais qui savent aussi être à l'écoute, **Frédéric Boyer, Florian Alberto** et **Pierre Gos**, toujours prêts pour une discussion engagée, **Michel Tissus**, l'auto-proclamée vieille blatte, jamais avare en anecdotes et récits d'expériences, dont je n'ai pas toujours saisi toute la portée, **Rolland Douzet**, qui n'a pas son pareil pour transmettre sa passion des plantes et de la botanique ou encore les thésards du « premier » et du « troisième », dont le nombre croissant m'empêche d'égrainer les noms..., et bien d'autres encore que je ne peux pas tous citer ici mais à qui je pense également. Parmi tous ces dépendants au café, certaines ont plus particulièrement partagé mon addiction au thé, et ont à force bien dépassé le simple statut de « collègues », j'ai nommé **Alexia Chandor-Proust, Claire Blondel, Cindy Arnoldi, Maud Mouchet, Myriam Régent-Kloeckner** et « **Tata Srosro** », avec qui j'ai partagé des moments privilégiés à m'indigner, refaire le monde, discuter chiffon ou popote au sein du laboratoire aussi bien qu'en dehors.

J'ai à cet instant une pensée émue pour **Serge Aubert**, dont le sourire restera longtemps dans mes pensées.

Chacun d'entre eux ont nourri de nombreuses conversations scientifiques et informelles, plus ou moins sérieuses, évoqué des projets, partagé des points de vue... Ces petites ou grandes conversations ont tenu une place importante au cours de ces quatre années, rendant plus douces les périodes critiques qui ont été traversées. Certains d'entre vous voguent déjà vers d'autres horizons, mais j'ai été ravie de partager un bout de chemin avec vous et j'espère sincèrement que les flots vous mèneront là où il vous plaira.

Je voulais aussi remercier chaleureusement **Aleksandra Bogdanovic-Guillon** qui m'a fait découvrir le monde de la communication scientifique ainsi que le service de communication de l'Université Joseph Fourier et notamment **Muriel Jakobiak-Fontana, Frédéric Lambert** et **Reine Paris** pour leur accueil chaleureux au sein de leur petite équipe. La découverte d'un nouveau domaine professionnel, l'état d'esprit propre à celui-ci et la rencontre de chercheurs de domaines variés ont été une bouffée d'oxygène dans ce marathon de quatre ans qu'a été ma thèse.

La dernière partie de ces remerciements est adressée à ma famille et mes proches, qui durant ces années m'ont soutenue et accompagnée, au sens propre comme au figuré, lors des innombrables allées et venues dominicales et nocturnes. Merci d'avoir supporté mes passages en coup de vent, mes « j'y vais, faut que j'aille manip » ou mes « j'peux pas, faut que j'manip ». Plus spécialement à ma mère qui a courageusement relu ce manuscrit avec attention, et en a retiré bon nombre d'anglicismes et d'originalités stylistiques. J'ai une pensée toute particulière pour celui qui, transfuge entre les deux tableaux, a supporté ce rythme éffréné. Parce que après un « tu veux faire quoi » suivait souvent un « ah ouai carrément ouai », tu t'es bien souvent retrouvé embarqué dans mes projets moins proches du loisir que du travail...

Chacun à son échelle, a forgé une petite partie de l'aspirante chercheuse que je suis aujourd'hui. Merci.

I. INTRODUCTION

I.1	La pollution des eaux de surface.....	19
I.2	Nouvelles approches en écotoxicologie.....	21
I.2.1	Réalisme des conditions des études en écotoxicologie	21
I.2.1.1	Effets des concentrations environnementales de polluants	21
I.2.1.2	Réalisme des durées d'exposition	23
I.2.1.3	Effets des mélanges de polluants.....	23
I.2.2	Étude du mode d'action des polluants	25
I.2.3	Les changements d'échelle en écotoxicologie	27
I.3	Écotoxicologie des insectes aquatiques.....	29
I.3.1	Écologie et sensibilité des insectes aquatiques	29
I.3.1.1	Diversité et rôles écologiques des insectes aquatiques	29
I.3.1.2	Sensibilité des insectes aquatiques à la pollution.....	30
I.3.2	Modèles d'insectes aquatiques en écotoxicologie	31
I.3.3	Le moustique <i>Aedes aegypti</i> comme modèle d'insecte aquatique	34
I.3.3.1	Cycle de vie du moustique <i>Aedes aegypti</i>	34
I.3.3.2	Intérêts du moustique <i>Aedes aegypti</i> comme modèle en écotoxicologie.....	36
I.4	État des connaissances sur les polluants étudiés	37
I.4.1	Ibuprofène	37
I.4.1.1	Origine et devenir de l'ibuprofène dans l'environnement	38
I.4.1.2	Contamination des eaux de surface par l'ibuprofène	40
I.4.1.3	Écotoxicité de l'ibuprofène.....	43
I.4.2	Bisphénol A	47
I.4.2.1	Origine et devenir du bisphénol A dans l'environnement.....	47
I.4.2.2	Contamination des eaux de surface par le bisphénol A	49
I.4.2.3	Écotoxicité du bisphénol A	51
I.4.3	Benzo[a]pyrène.....	54
I.4.3.1	Origine, devenir et contamination du benzo[a]pyrène dans l'environnement	54
I.4.3.2	Impact écotoxicologique du benzo[a]pyrène	57
I.5	Problématique et objectifs de la thèse.....	61

I.1 La pollution des eaux de surface

Les écosystèmes aquatiques d'eau douce ne représentent que 0,8 % de la surface de la Terre (Dijkstra *et al.*, 2014), et regroupent pourtant 9,5 % de la biodiversité mondiale connue (Strayer et Dudgeon, 2010). Le déclin de la biodiversité est cependant plus sévère dans les écosystèmes d'eaux douces que dans les écosystèmes marins et terrestres (Ricciardi et Rasmussen, 1999; Sala *et al.*, 2000). Le fort taux d'endémisme et l'isolement des habitats confèrent à ces milieux une faible résilience face aux perturbations locales et globales (Dijkstra *et al.*, 2014). Cette érosion de la biodiversité est due aux pressions combinées de nombreux facteurs anthropogéniques, tel que le réchauffement climatique global, les modifications de précipitations, la fragmentation des habitats ou la pollution des milieux aquatiques (Ormerod *et al.*, 2010; Vörösmarty *et al.*, 2010).

Les milieux aquatiques d'eau douce sont particulièrement concernés par la pollution de l'environnement par des composés chimiques produits et relargués par les activités humaines. Ces milieux constituent le réceptacle final pour les contaminants apportés par les dépôts atmosphériques, le lessivage et l'érosion des sols. Ils sont également soumis au rejet direct d'effluents urbains, industriels, agricoles ou aquacoles d'eaux polluées, après éventuellement un passage intermédiaire par des stations d'épuration (STEP) (Ramade, 2007). La persistance et la répartition des polluants au sein des milieux contaminés dépendent des caractéristiques physicochimiques propres à chaque molécule, comme leur capacité d'adsorption aux sédiments, leur solubilité dans les milieux aqueux, leur volatilité, leur photosensibilité, ou encore leur sensibilité à la biodégradation par les micro-organismes du milieu (Yamamoto *et al.*, 2009). Certains polluants peuvent ainsi être particulièrement persistants, affectant alors durablement les écosystèmes, même plusieurs années après l'arrêt de leur relargage dans l'environnement.

Il est avéré depuis la deuxième moitié du 20^{ème} siècle que les activités industrielles et agricoles induisent une pollution, parfois massive, des eaux douces de surface. Ces rejets concernent des classes de polluants largement étudiés, tels que les métaux lourds, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB), ou encore les pesticides. Cependant, les politiques publiques du début du 21^{ème} siècle, avec notamment la directive européenne cadre sur l'eau (UE, 2000) concrétisée en France par les Plans Nationaux Santé Environnement successifs (PNSE 2004-2008, PNSE 2 2009-2013, PNSE 3 2015-2019) et le Plan Micropolluants 2010-2013, ainsi que l'évolution de la performance des méthodes de dosages environnementaux de polluants ont permis de mettre en évidence la contamination des eaux de surface par une très large diversité de polluants organiques peu pris en compte jusqu'alors dans l'évaluation de la qualité des milieux

aquatiques. Ces polluants émergents, souvent dus aux activités humaines dans les zones urbaines, représentent une très large variété de composés, incluant des molécules pharmaceutiques, des cosmétiques, des produits d'entretien, des retardateurs de flamme, des plastifiants, des drogues illicites (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2008; Dulio *et al.*, 2009; Pal *et al.*, 2010). Ces polluants, appelés aussi micropolluants, sont généralement présents à faibles concentrations, de l'ordre du nanogramme au microgramme par litre d'eau, n'induisant pas de mortalité massive et évidente chez les organismes aquatiques. Mais au-delà des effets aigus des polluants, souvent dus à de fortes doses d'exposition générées par un relargage massif mais ponctuel dans l'environnement, il existe actuellement des préoccupations majeures vis-à-vis de l'impact de l'exposition chronique des populations d'organismes aquatiques à ces faibles doses de polluants. La diversité des polluants retrouvés dans les eaux de surface fait notamment émerger des questionnements quant à l'effet des mélanges de polluants sur les écosystèmes et la santé humaine (Kavlock *et al.*, 1996; Dulio *et al.*, 2009; Oehlmann *et al.*, 2009; Vandenberg *et al.*, 2012; WHO, 2012)

Le potentiel de certains de ces polluants émergents à perturber le système hormonal des organismes même à très faibles concentrations est aujourd'hui au centre des préoccupations des toxicologues et écotoxicologues. Les perturbateurs endocriniens ont été définis en avril 1995 lors d'un congrès de l'Agence de Protection Environnementale Américaine comme étant des « *agents exogènes pouvant interférer dans la synthèse, la sécrétion, le transport, l'interaction, l'activité ou l'élimination des hormones naturelle qui sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie, la reproduction, le développement ou le comportement* » (Kavlock *et al.*, 1996). Cette définition a été reformulée en 2002 par l'Organisation Mondiale de la Santé : « *Un perturbateur endocrinien potentiel est une substance ou un mélange exogène, possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez ses descendants ou au sein de (sous)-populations* » (WHO, 2012). Des observations réalisées directement dans l'environnement ou sur des modèles de vertébrés et de mollusques aquatiques ont mis en évidence le potentiel de plusieurs polluants à être des « perturbateur endocrinien » (Colborn *et al.*, 1993; Hotchkiss *et al.*, 2008). Outre la capacité de certains polluants à perturber le système endocrinien des organismes aquatiques, les molécules pharmaceutiques à destination humaine ou vétérinaire retrouvées dans les eaux de surface génèrent quant à elles des questionnements particuliers. Ces molécules sont spécifiquement conçues pour être physiologiquement actives et pour interagir avec les récepteurs et les voies physiologiques humaines ou animales. Les polluants pharmaceutiques sont ainsi particulièrement susceptibles d'interagir avec les voies physiologiques les organismes aquatiques, vertébrés ou invertébrés (Seiler, 2002; Dulio *et al.*, 2009).

Les nouveaux types de mécanismes d'action mis en jeu par les polluants émergents, ainsi que la nature diffuse et constante de la pollution des milieux aquatiques par ces micropolluants nécessitent une adaptation des approches expérimentales lors de l'évaluation de l'impact de cette pollution en écotoxicologie.

I.2 Nouvelles approches en écotoxicologie

Face à la contamination des eaux de surface par une grande diversité de micropolluants émergents, plusieurs rapports et auteurs scientifiques ont mis en évidence la nécessité de faire évoluer les approches expérimentales de manière à accentuer la représentativité écologique des études écotoxicologiques (Van Aggelen *et al.*, 2010; Besse et Garric, 2008; Dulio *et al.*, 2009; Hutchinson, 2007; Kramer *et al.*, 2011; Oehlmann *et al.*, 2009; Soin et Smaghe, 2007).

I.2.1 *Réalisme des conditions des études en écotoxicologie*

Les conditions d'exposition des populations d'organismes aquatiques dans l'environnement, c'est-à-dire une exposition chronique à un mélange de polluants à faibles doses, sortent du cadre habituel des mesures de toxicité effectuées en toxicologie et écotoxicologie.

I.2.1.1 *Effets des concentrations environnementales de polluants*

L'adage « Tout est poison, rien n'est poison : c'est la dose qui fait le poison », édicté par le médecin suisse Paracelse au 16^{ème} siècle est souvent considéré comme le concept de base de la toxicologie. Il a été considéré durant longtemps en toxicologie tout comme en écotoxicologie que la réponse d'un organisme à un composé chimique suivait une courbe monotone, c'est à dire que la pente de la courbe peut varier mais ne change pas de signe. Ainsi la démarche classique consiste encore actuellement à tester une gamme de concentration d'un composé, et identifier la dose pour laquelle l'effet observé aux doses supérieures n'apparaît plus, considérant ainsi toute dose inférieure comme non toxique vis-à-vis du paramètre biologique étudié. Une grande partie des études écotoxicologiques considèrent souvent des concentrations 100 à 1000 fois supérieures aux concentrations mesurées dans l'environnement. Certaines d'entre elles vont d'ailleurs jusqu'à conclure au faible risque présenté par ces polluants dans l'environnement au vu des doses auxquelles les effets ont été observé (Pascoe *et al.*, 2002; Staples *et al.*, 2002).

Il apparaît néanmoins depuis les années 1990 et le début des recherches sur les perturbateurs endocriniens que les tests toxicologiques et écotoxicologiques à fortes doses d'un composé chimique ne peuvent pas être utilisées pour évaluer l'innocuité de faibles doses de ce même composé (Vandenberg *et al.*, 2012). Les travaux sur les perturbateurs endocriniens ont en effet mis en évidence à plusieurs reprises qu'outre les réponses monotones habituellement considérées (Figure I.1, A et B), les courbes dose-réponse peuvent également être non monotones, c'est-à-dire que la pente change de signe au sein de la gamme de concentration testée. Les courbes dose-réponse non monotones sont généralement en U (Figure I.1, D), avec des réponses maximales observées aux concentrations les plus fortes et les plus faibles, ou alors en U inversé, avec des réponses maximales observées aux concentrations intermédiaires (Figure I.1, C). De même que pour les mesures d'effet des polluants aquatiques sur les individus, la nature des mécanismes mis en jeu dans ces perturbations sont fortement dépendants de la dose d'exposition (Escher et Hermens, 2002; Seiler, 2002).

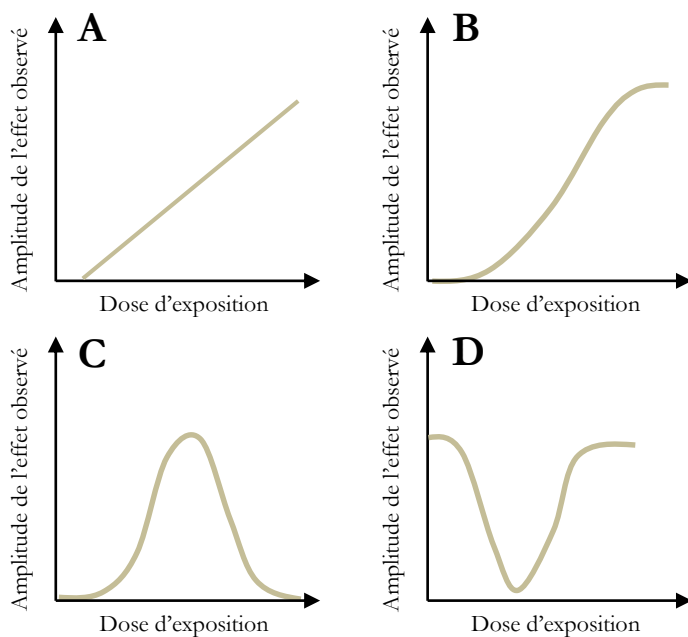


Figure I.1 - Exemples de courbes dose-réponse.

A : Dose réponse monotone linéaire, **B** : Dose réponse monotone non linéaire, **C** : Dose réponse non monotone en U, **D** : Dose réponse en U inversé. Inspiré de Vandenberg *et al.*, 2012.

Il semble ainsi risqué d'extrapoler les effets observés à une concentration donnée pour prédire les effets des concentrations inférieures, particulièrement lorsque les concentrations testées sont plusieurs dizaines ou centaines de fois supérieures aux concentrations mesurées dans l'environnement. Il paraît alors important de tester directement l'impact de doses pertinentes du

point de vue environnemental pour en évaluer les effets sur les organismes aquatiques et les mécanismes impliqués.

I.2.1.2 Réalisme des durées d'exposition

Dans l'environnement, les populations d'organismes aquatiques sont soumises à la pollution tout au long de leur cycle de vie, à chaque génération. Cependant de nombreuses études écotoxicologiques portent sur l'évaluation de l'impact d'une exposition de durée relativement limitée, ne prenant pas en compte à la fois les stades de développement juvéniles et adulte. De nombreux auteurs mettent en évidence la limite des études portant sur une exposition durant une portion limitée du cycle de vie des organismes et la nécessité d'études à long terme pour l'évaluation précise des risques entraînés par la pollution des eaux de surface (Cleavers, 2003; Fent *et al.*, 2006; Besse et Garric, 2007; Hutchinson, 2007; Quinn *et al.*, 2008a; Kim *et al.*, 2009; Bang *et al.*, 2009; Oehlmann *et al.*, 2009; Kramer *et al.*, 2011). En effet l'état physiologique des adultes résulte lui-même des conditions vécues par les organismes durant leur développement (Stoks et Córdoba-Aguilar, 2012; Perez et Noriega, 2012, 2013; Muturi, 2013; Zambrano *et al.*, 2014). Les conditions de vie auxquelles ont été soumis les organismes influencent notamment leur réaction face à un stress créé par un polluant. Ainsi un individu exposé à un polluant tout au long de son développement pourrait, à l'âge adulte, présenter des effets différents d'un adulte exposé durant seulement une courte portion de sa vie. En outre, les périodes de développement juvéniles, durant lesquelles se mettent en place les grandes fonctions physiologiques des organismes sont des phases critiques de sensibilité aux stress, et une exposition transitoire durant le cycle de vie pourrait ignorer une fenêtre de sensibilité particulière des organismes étudiés (Barata *et al.*, 2002, 2004; Vandenberg *et al.*, 2009).

En ce sens, des tests chroniques ont été établis par l'OCDE sur le chironome (*Chironomus spp*) (OCDE, 2010) et la daphnie (*Daphnia magna*) (OCDE, 2012b). Ces tests prévoient une exposition des individus dès les 24 premières heures de leur vie, jusqu'à leur maturité sexuelle et la production d'une descendance. Ce type de tests chroniques standardisés est intéressant dans le cadre d'études écotoxicologiques de micropolluants, et il paraît important d'étendre ces tests standardisés à un plus large panel d'organismes afin de généraliser cette approche

I.2.1.3 Effets des mélanges de polluants

La grande diversité de composés chimiques rejetés quotidiennement dans l'environnement entraîne une exposition des populations d'organismes aquatiques à une multitude de polluants de

types différents. Cette exposition simultanée à de nombreux polluants fait émerger la question de l'impact des mélanges de polluants sur les organismes (Besse et Garric, 2007; Dulio *et al.*, 2009; OCDE, 2012a). Les données concernant les mélanges sont peu nombreuses, notamment à cause de la complexité de la question et des dispositifs expérimentaux qu'elle entraîne. Néanmoins, des études ont déjà montré que la réponse des organismes à des polluants pouvait être différente entre des expositions individuelles à des polluants et une exposition à un mélange de ces mêmes polluants (Cleuvers, 2003; McCarty et Borgert, 2006; Quinn *et al.*, 2009; Gharred *et al.*, 2015).

Selon la nature des polluants présents dans le mélange et leurs modes d'action respectifs, les effets de ceux-ci en mélange pourront être différents. Il existe deux cas principaux dans l'impact des mélanges sur les organismes, selon l'interaction ou non entre les modes d'actions des polluants. Tout d'abord, les polluants n'interagissant pas entre eux ne modifient pas l'action des autres polluants présents dans le mélange. Parmi ces polluants, ceux entraînant individuellement des réponses toxiques identiques induiront une additivité des doses. L'effet observé sur l'organisme correspondra alors à l'effet induit par la somme des concentrations individuelles présentes dans le mélange. Les polluants ayant une relation de type non interactive et provoquant individuellement des réponses biologiques différentes induiront en mélange une additivité d'effets chez les organismes exposés. Les organismes exposés présenteront alors chacune des réponses toxiques individuelles des polluants. Les polluants présents dans les mélanges peuvent également interagir entre eux, à tout niveau du processus menant au potentiel toxique du polluant : l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion et l'activité au niveau du site récepteur. Les polluants présents en mélange peuvent alors avoir soit un effet synergique, soit un effet antagoniste les uns sur les autres. Le synergisme entre polluants résulte en une toxicité chez l'organisme plus importante que la simple addition des effets individuels de chaque polluant, mais peut également donner lieu à l'apparition d'effets toxiques non observés lors d'expositions individuelles (Padrós *et al.*, 2003; De Zwart et Posthuma, 2005; Jin *et al.*, 2012; Sarigiannis et Hansen, 2012; Zenobio *et al.*, 2014).

Bien que plusieurs cas définis soient établis pour expliquer l'impact potentiel de mélange de polluants sur les organismes, plus le nombre de polluants dans un mélange augmente, plus le problème est complexe à cause de l'augmentation des chances de cumuler des phénomènes d'additivité, de synergie et d'antagonisme au sein du mélange. L'effet des mélanges de polluants est ainsi délicat à extrapoler à partir de données écotoxicologiques individuelles, et nécessitent une attention particulière pour une évaluation précise des risques entraînés par la pollution des eaux de surface (Padrós *et al.*, 2003; De Zwart et Posthuma, 2005).

1.2.2 Étude du mode d'action des polluants

Alors que l'évaluation de l'impact des polluants sur les organismes est principalement basée sur la mesure de biomarqueurs d'exposition et d'effets, l'étude des mécanismes mis en jeu dans les perturbations physiologiques observées et des modes d'actions des polluants apparaît particulièrement importante (Seiler, 2002; Escher et Hermens, 2002; Pounds *et al.*, 2008; Oehlmann *et al.*, 2009; Kramer *et al.*, 2011).

La compréhension fine des modes d'action des polluants présente plusieurs intérêts dans le cadre de l'étude de leur impact écotoxicologique. L'étude des mécanismes facilite notamment l'extrapolation du potentiel toxique d'un polluant sur d'autres espèces, permettant ainsi d'avoir une idée plus globale et précise de l'effet du polluant étudié sur les populations d'organismes aquatiques en général. La conservation de certains récepteurs et processus physiologiques au cours de l'évolution rend en effet des espèces plus ou moins proches potentiellement sensibles aux mêmes mécanismes d'action. D'autre part, l'identification des mécanismes mis en jeu, et notamment de la relation entre la structure du polluant et sa toxicité permet d'augmenter la robustesse des modèles visant à la prédiction de toxicité d'autres molécules présentant une structure proche (le Maire *et al.*, 2010). Ces modèles intéressent actuellement les organismes décisionnaires de protection de l'environnement, car ils permettent d'évaluer *a priori* le potentiel de toxicité pour les écosystèmes de manière économe en temps, en argent et en expérimentation animale (OCDE, 2007). Pour finir, l'identification des mécanismes impliqués dans un effet toxique peut également permettre d'identifier d'autres processus physiologiques interconnectés potentiellement perturbés et d'orienter des études complémentaires afin d'identifier d'autres impacts potentiels du polluants sur la physiologie des organismes étudiés (Kramer *et al.*, 2011).

Les mécanismes pouvant être impliqués dans la toxicité des micropolluants des eaux de surface sont variés. Une toxicité aux concentrations environnementale relativement faibles est souvent considérée comme associée à une perturbation hormonale, la signalisation hormonale étant caractérisée par une très forte sensibilité aux quantités infimes d'hormones produites par les tissus endocrine (Vandenberg *et al.*, 2012). Néanmoins, l'appellation « perturbateur endocrinien » peut regrouper de nombreux mécanismes sous-jacents, incluant : (i) le mimétisme de l'action des hormones naturelles (ii) l'inhibition de l'action des hormones naturelles (iii) la modification de la synthèse, du métabolisme ou du transport des hormones naturelles dans l'organisme. Les récepteurs nucléaires aux hormones sont les premiers effecteurs de la signalisation hormonale. Ils régulent une grande diversité de processus développementaux et physiologiques. La plupart des perturbations observées à ce jour mettent en jeu l'interaction d'un polluant avec un récepteur

nucléaire, même si il apparaît maintenant que les modes d'actions peuvent être dus à différents mécanismes tels que l'interaction avec des récepteurs membranaires ou la perturbation des machineries enzymatiques à l'origine de la biosynthèse et du métabolisme des hormones (le Maire *et al.*, 2010). Cependant, outre la perturbation du système hormonal, les micropolluants peuvent également agir via d'autres modes d'action tels que l'inhibition ou la suractivation d'enzymes impliquées par exemple dans le métabolisme énergétique ou la détoxification ou encore par l'inhibition ou la suractivation de récepteurs membranaires impliqués dans la signalisation cellulaire ou la neurotransmission (Escher 2002).

Le développement récent des « omiques » et la baisse des coûts de ces approches ouvrent un large horizon aux approches mécanistiques en écotoxicologie (Dulio *et al.*, 2009; Van Aggelen *et al.*, 2010). Ces outils permettent de générer de grandes quantités de données concernant différents niveaux biologique : la génomique s'intéressant à la séquence des gènes, la transcriptomique s'intéressant à l'expression des gènes, la protéomique s'intéressant à l'ensemble des protéines et la métabolomique s'intéressant aux métabolites. Ces techniques ont le potentiel de couvrir une large partie des mécanismes et modifications mis en jeu dans la toxicité des polluants sur les organismes.

Les voies physiologiques sont souvent interconnectées entre elles et la perturbation d'une voie ou d'un processus peut se répercuter sur d'autres. Par la globalité des données générées par les approches omiques, ces outils présentent l'avantage de permettre d'aborder les études mécanistiques sans poser d'*a priori* sur les voies physiologiques perturbées et les mécanismes mis en jeu, étendant ainsi la compréhension des modes d'actions (Oehlmann *et al.*, 2009; Kramer *et al.*, 2011). Cette vision globale offre d'intéressantes opportunités dans l'avancement de la compréhension et la prédiction de l'impact de cas complexes comme les mélanges de polluants (Escher et Hermens, 2002; Sarigiannis et Hansen, 2012). Outre l'identification des mécanismes impliqués dans les perturbations observées chez les organismes exposés, les outils omiques peuvent également permettre d'identifier de fines modifications de l'état transcriptionnel, protéomique ou métabolique pouvant être les signes précoces de la toxicité des polluants, élargissant ainsi le champ des biomarqueurs d'exposition (Seiler, 2002).

Ces nouveaux outils à disposition des écotoxicologues ouvrent ainsi un vaste horizon dans l'évaluation de l'impact de la pollution sur les organismes. Le rapport portant sur les substances émergentes dans l'environnement produit par l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA) et l'Institut National de l'Environnement industriel et des RISques (INERIS) préconise néanmoins dans ses conclusions la réalisation de travaux de recherche approfondis permettant de

mettre en évidence la pertinence d'un point de vue écologique des « nouveaux » tests écotoxicologiques basés sur les omiques (Dulio *et al.*, 2009).

1.2.3 Les changements d'échelle en écotoxicologie

L'objectif final de l'écotoxicologie est la conservation des populations et *in fine* des écosystèmes (Seiler, 2002). Il est ainsi important de pouvoir relier les événements moléculaires induits par les polluants aux altérations biologiques observées chez les individus pour aboutir à l'identification et la compréhension des impacts du polluant sur les populations et ainsi à l'évaluation du risque écologique (Van Aggelen *et al.*, 2010; Kramer *et al.*, 2011). Les approches mécanistiques et individuelles, souvent basées sur l'étude de biomarqueurs d'exposition et d'effet ne permettent cependant souvent pas de faire le lien entre ces différents niveaux d'intégration et de prédire les risques populationnels associés (Seiler, 2002; Kramer *et al.*, 2011). Il apparaît ainsi intéressant de coupler les approches mécanistiques avec des observations individuelles de manière à permettre une mise en relation de ces deux niveaux inférieurs d'intégration.

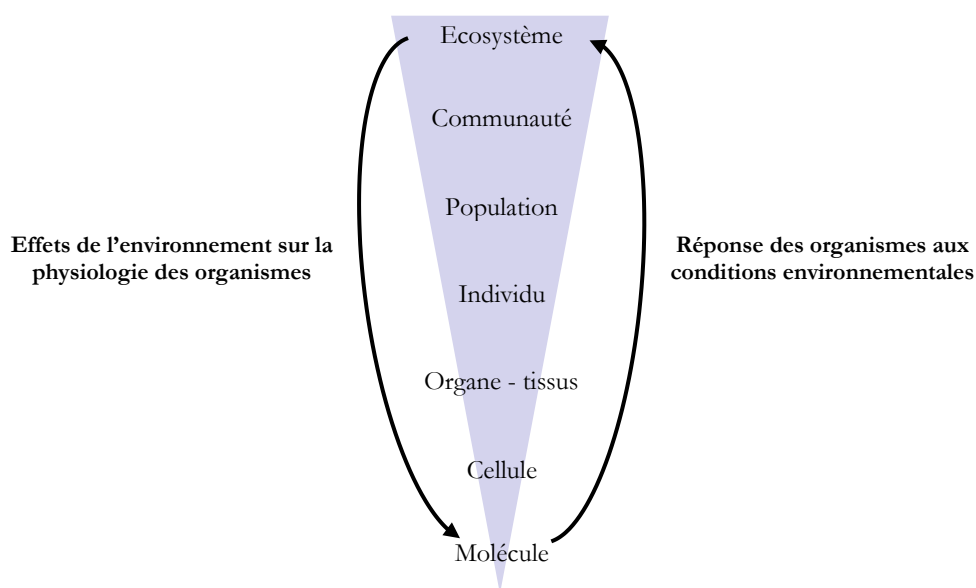


Figure I.2 - Echelles biologiques impliquées dans l'impact des conditions environnementales sur les organismes, et la réponse de ces organismes aux conditions environnementales.

Les approches intégratives mettent en jeu des études à l'échelon sub-individuel, que ce soit au niveau moléculaire, tissulaire ou de l'organe associés à des caractères individuels et populationnels comme la fitness et les traits d'histoire de vie (Figure I.2). A l'échelon individuel, la notion de fitness, bien que souvent discutée, peut se définir comme la capacité des individus à générer une descendance viable et fertile, transmettant ainsi leur patrimoine génétique à la

génération suivante (Sæther et Engen, 2015). De manière générale, les deux principaux paramètres définissant la fitness d'un individu sont sa fonction reproductrice (caractérisée par le nombre et viabilité de la descendance) et sa survie. Néanmoins, d'autres paramètres comme le comportement, la croissance, le développement ou la fonction immunitaire peuvent avoir une influence sur la fitness des individus, en modifiant par exemple leur capacité à trouver un partenaire d'accouplement ou à supporter un stress (Escher et Hermens, 2002; Kramer *et al.*, 2011). Considérant un échelon populationnel, les traits d'histoire de vie sont un ensemble de caractéristiques fonctionnelles permettant de décrire le cycle de vie des individus d'une population, tel que la taille des individus, l'âge à la maturité, le nombre de partenaire d'accouplement, l'abondance de la descendance, la taille et le sex-ratio de cette descendance, la fréquence de reproduction, la longévité... Ces traits d'histoire de vie sont propres à chaque espèce, mais peuvent varier au sein d'une espèce en fonction des conditions environnementales biotiques (compétition intra et interspécifique, prédation...) ou abiotiques (conditions physicochimiques du milieu...).

Alors que les micropolluants émergents ne sont généralement pas létaux aux concentrations mesurées dans l'environnement, ils peuvent affecter la fitness des individus, induire des variations du cycle de vie, du sex-ratio ou encore entraîner des malformations anatomiques modifiant ainsi les performances des populations d'organismes aquatiques au sein de leurs écosystèmes (Fabbri *et al.*, 2014). Les approches trans-générationnelles, sur deux ou plusieurs générations sont particulièrement intéressantes et pertinentes pour étudier de tels impacts. L'étude des traits d'histoire de vie des populations exposées aux polluants, en incluant l'observation des individus exposés durant tout leur cycle de vie, mais également de leur descendance sont nécessaires à l'approche intégrative visant à comprendre les effets de la pollution des eaux de surface sur l'état des populations. L'état physiologique des individus de la descendance, et ainsi leur propre fitness, dépend directement de l'état physiologique et de la capacité reproductrice des parents. Ainsi, en milieu pollué, l'état physiologique d'un individu de la descendance sera dépendant de la capacité reproductrice de ses parents en milieu pollué, mais également de l'impact direct du polluant sur sa propre physiologie. Ainsi, de fines modifications physiologiques peuvent s'accumuler au fil des générations, et entraîner une modification des traits d'histoire de vie et de la dynamique des populations après plusieurs générations de vie au sein d'un milieu pollué (Oehlmann *et al.*, 2009; Kramer *et al.*, 2011).

Les modèles populationnels peuvent aider à intégrer les informations mécanistiques et de fitness individuelle pour établir des prédictions concernant l'état des populations exposées aux polluants (Charles *et al.*, 2009; Kramer *et al.*, 2011; Beaudouin *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2013). Les

données issues des analyses écotoxicologiques de modes d'action de polluants et de mesures de traits d'histoire de vie peuvent ainsi être intégrées en termes d'impact sur une dynamique populationnelle (capacité de croissance démographique, structure d'âge, temps de génération ...), améliorant ainsi l'appréhension des problématiques environnementales liées à la contamination des milieux. La robustesse de ces modèles populationnels dépend de la bonne connaissance du cycle de vie de l'espèce étudiée. Ces modèles gagnent ainsi à être utilisés sur des espèces les mieux documentées possibles.

I.3 Écotoxicologie des insectes aquatiques

Alors que les données concernant l'effet de la pollution aquatique sur les vertébrés sont multiples, les données concernant l'impact de ces polluants sur les populations d'invertébrés sont plus rares et souvent incomplètes. Parmi les études écotoxicologiques étudiant l'impact de polluants des eaux de surface sur les invertébrés, plusieurs rapports ont mis en évidence un manque d'études concernant l'impact des polluants sur les populations d'insectes aquatiques, malgré leur large représentation dans les milieux aquatiques d'eau douce (Dulio *et al.*, 2009; Soin et Smaghe, 2007). Néanmoins, ceux-ci sont, au même titre que les autres invertébrés, susceptibles d'être impactés par la pollution des eaux de surface.

I.3.1 Écologie et sensibilité des insectes aquatiques

I.3.1.1 Diversité et rôles écologiques des insectes aquatiques

Les insectes représentent la classe d'invertébrés la plus riche au sein des écosystèmes (Soin et Smaghe, 2007). Avec près de 100 000 espèces décrites à ce jour, 60 % des espèces animales présentes dans les eaux de surface sont des insectes aquatiques (Dijkstra *et al.*, 2014). Ainsi, la biodiversité des écosystèmes aquatiques d'eau douce repose majoritairement sur les insectes aquatiques. Les espèces ayant des stades aquatiques ou semi-aquatiques appartiennent à 12 des 30 ordres d'insectes connus à ce jour : *Heteroptera*, *Orthoptera*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Neuroptera*, *Ephemeroptera*, *Odonata*, *Plecoptera*, *Megaloptera* et *Tricoptera*. L'ordre des diptères est de loin le plus représenté dans les écosystèmes aquatiques puisque presque la moitié des espèces d'insectes aquatiques connus font partie de cet ordre (Dijkstra *et al.*, 2014). Les insectes aquatiques sont retrouvés dans tous les types d'écosystèmes aquatiques d'eau douce, que les eaux soient stagnantes (espèces lenticques) ou courantes (espèces lotiques) (Merritt et Wallace, 2003). Cette importante diversité se traduit par une diversification des modes de vie chez les insectes aquatiques. Alors que

certaines espèces passent l'essentiel de leur cycle de vie au contact de l'eau, comme les dytiques (*Coleoptera, Dytiscidae*) et les Gerris (*Hemiptera, Gerridae*), la plupart des espèces ont un cycle de vie mixte avec un stade larvaire aquatique et un stade adulte terrestre ou aérien (Dijkstra *et al.*, 2014). Certaines espèces passent l'essentiel de leur vie dans le substrat comme par exemple les espèces du genre *Chironomus*.

Les modes d'alimentation de ces espèces sont également très divers, tant concernant la taille que le type des particules absorbées. Les insectes déchetteurs se nourrissent directement sur de gros morceaux de matière organique. Les collecteurs/filtreurs se nourrissent de fines particules organiques provenant de la fragmentation et de la décomposition de la matière organique ainsi que des micro-organismes en suspension dans la colonne d'eau et les collecteurs/ramasseurs de ceux déposés sur le substrat. Les racleurs récoltent les algues et biofilms bactériens présents sur les supports. Pour finir, les prédateurs, comme les larves de libellules (*Odonata*), chassent généralement d'autres stades larvaires d'insectes aquatiques, allant même jusqu'à attaquer des têtards d'amphibiens (Merritt et Wallace, 2003).

Cette grande variété de mode de vie confère aux insectes aquatiques une importante diversité fonctionnelle. Tandis qu'ils participent largement à la décomposition de la matière organique, aux flux de nutriments et à la filtration des eaux, ils sont également des maillons très importants de la chaîne trophique en étant une des sources d'alimentation principale de nombreux organismes aquatiques (poissons, autres insectes...) ou terrestres (batraciens, oiseaux,...).

1.3.1.2 Sensibilité des insectes aquatiques à la pollution

La grande diversité de modes de vie et d'alimentation des insectes aquatiques implique des expositions différentes aux polluants selon leur répartition dans l'environnement aquatiques. Ainsi, des espèces benthiques et s'alimentant dans les sédiments sont plus exposés à des polluants hydrophobes s'adsorbant aux substrats alors que des espèces pélagiques sont plus exposées à des polluants à forte solubilité dans l'eau.

Bien que communément considérés comme des bioindicateurs de l'état des milieux aquatiques (Parr et Mason, 2003; Bonada *et al.*, 2006), l'intérêt porté aux effets de la pollution sur les populations d'insectes aquatiques concerne le plus souvent des contaminations par des insecticides d'origine agricole ou issus de lutte anti-vectorielle. Cependant, les insectes aquatiques sont également susceptibles d'être affectés par les polluants d'origine industrielle ou urbaine qui

peuvent perturber leur physiologie au même titre que d'autres organismes plus étudiés en écotoxicologie.

Les insectes sont d'autant plus sensibles aux polluants qu'ils subissent au cours de leur développement plusieurs mues et métamorphoses qui sont des phases particulièrement critiques, contrôlée par une signalisation hormonale finement régulée. Les insectes possèdent en effet un système hormonal complexe comprenant trois classes d'hormones principales : les ecdystéroïdes, l'hormone juvénile et les hormones peptidiques (Coast et Schooley, 2011). Ce système hormonal régule une multitude de fonctions physiologiques, comme la mue, la métamorphose, le développement du système nerveux, la vitellogénèse, la diurèse, la mobilisation des ressources énergétiques ou encore la diapause (Clifton et Noriega, 2012). Le rôle des récepteurs nucléaires aux hormones chez les insectes est en outre bien documentés (King-Jones et Thummel, 2005). Plusieurs récepteurs nucléaires connus chez les insectes présentent cependant des analogies structurelles et fonctionnelles avec les récepteurs nucléaires de vertébrés (Bonneton et Laudet, 2012) et il est ainsi probable que des polluants retrouvés dans les environnements aquatiques perturbant les systèmes hormonaux des autres organismes aquatiques puissent perturber les systèmes hormonaux des insectes. D'autre part, les voies métaboliques principales et les systèmes épigénétiques de régulation de l'expression des gènes en réponse à des stimuli endogènes ou environnementaux ont été relativement conservés au cours de l'évolution (Mukherjee *et al.*, 2015).

Ainsi, cette conservation de processus de régulation physiologiques au cours de l'évolution rend les insectes potentiellement sensibles à des molécules affectant la physiologie des vertébrés.

1.3.2 Modèles d'insectes aquatiques en écotoxicologie

Dans ses directives pour l'évaluation de composés chimiques, l'OCDE a développé deux protocoles visant à tester la toxicité aiguë et chronique de composés chimiques sur les insectes aquatiques. Ces tests sont prévus pour être effectués sur trois espèces de chironome, *Chironomus riparius*, *dilutus* et *yoshimatsui*, comme uniques représentants d'insectes aquatiques. Le test de toxicité aiguë consiste en une exposition via l'eau de larves de chironomes au premier stade de développement à différentes doses de polluants, et à relever le nombre de larves immobiles 48h après (OCDE, 2011). Le test de toxicité chronique consiste en un test à plus long terme exposant des larves de chironomes à des sédiments contaminés par les polluants tout au long de leur développement. Les traits d'histoire de vie des individus et de leur descendance exposés aux sédiments pollués sont pris en compte pour évaluer une toxicité chronique des polluants étudiés (OCDE, 2010).

Tout comme pour les tests réglementaires, le modèle d'insecte aquatique majoritairement utilisé en écotoxicologie est le chironome *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). Ainsi, plusieurs études se sont intéressées à l'impact de polluants sur ce modèle d'insecte. Néanmoins, ces études se cantonnent en général à mesurer l'effet des polluants sur différents biomarqueurs morphologiques, biochimiques, métaboliques ou moléculaires ou à des impacts sur les traits d'histoire de vie des individus exposés. Les mécanismes impliqués dans ces observations ne sont que rarement identifiés de façon approfondie. Les quelques approches visant à identifier les mécanismes d'actions au niveau moléculaire se limitent notamment à la mesure de transcription de gènes candidats spécifiques, induisant *de facto* une orientation marquée dans les mécanismes recherchés. Ainsi, les voies physiologiques étudiées par ces travaux concernent majoritairement la voie de signalisation des ecdystéroïdes, et laissent de côté les voies impliquées dans les processus physiologiques hormonaux, métaboliques, neurologiques, osmotiques ou encore immunitaires par exemple. Les études mécanistiques sont en effet notamment freinées par le fait que le génome de *Chironomus riparius* n'est à ce jour pas séquencé, ce qui limite les approches transcriptomiques permettant une appréhension sans *a priori* des mécanismes impliqués.

Il est intéressant de constater que plusieurs études ont recherché l'effet de polluants sur les populations de chironomes (*Chironomus riparius*) durant de multiples générations (Beaudouin *et al.*, 2012; Lilley *et al.*, 2012; Stefani *et al.*, 2014). Ces différentes études mettent en évidence une évolution au fil des générations des traits d'histoire de vie chez les individus exposés à différents polluants. Cependant, Nowak *et al.* ont montré en 2007 que les populations de *Chironomus riparius* provenant de différentes souches de laboratoire présentent un appauvrissement de la diversité génétique par rapport aux populations trouvées dans l'environnement (Nowak, Vogt, *et al.*, 2007), montrant ainsi une sensibilité particulière de cette espèce à la consanguinité. Ces auteurs ont également mis en évidence qu'une augmentation du taux de consanguinité provoque une diminution de la fitness des individus, et influe sur la réponse des individus au cadmium ou au tributylétain (Nowak *et al.*, 2012; Nowak, Jost, *et al.*, 2007). Cette apparition rapide de consanguinité au fil des générations pourrait donc apporter un facteur confondant dans les études écotoxicologiques multigénérationnelles. Mettant ce point en avant, Gagliardi *et al.* ont récemment proposé d'utiliser le chironome parthénogénétique *Paratanytarsus grimmii* comme nouvelle espèce modèle pour les tests standardisés d'écotoxicité. La parthénogénicité de cette espèce permettrait ainsi d'éviter les problèmes de consanguinité et de chute de la diversité génétique dans les populations de laboratoire vis-à-vis des populations sauvages, la diversité génétique de cette espèce étant naturellement basse (Gagliardi *et al.*, 2015). D'autre part, dans ces études, le passage d'une génération à l'autre semble limité par le fait que chez les chironomes, l'embryogénèse débute dès

la ponte des œufs, et que ceux-ci éclosent immédiatement une fois développés, sans phases de quiescence ou de diapause. Pour avoir des individus globalement synchronisés dans chaque génération, les auteurs prélèvent des larves issues des œufs pondus dans les 48 h (Nowak *et al.*, 2009; Stefani *et al.*, 2014) ou les 72 h (Lilley *et al.*, 2012) durant lesquelles les pontes sont les plus abondantes. Procédant ainsi, dans la génération suivante, les descendances des individus au développement le plus rapide ou le plus lent, ne sont pas représentés, ce qui pourrait biaiser la composition des populations au fil des générations. Une autre manière de synchroniser les individus d'une génération est de placer les pontes à 4°C au fur et à mesure de leur dépôt durant 10 jours, de manière à ralentir le développement des œufs. Toutes les pontes sont ensuite placées collectivement à 21°C pour synchroniser leur développement (Beaudouin *et al.*, 2012). Outre le fait qu'un stress au froid durant l'embryogénèse pourrait entraîner des modifications physiologiques durables chez les individus, ce qui ajouterait un facteur confondant dans l'étude, les auteurs mettent en évidence que le développement résiduel des premiers œufs pondus fait qu'ils sont plus éclos lors du prélèvement des individus pour la génération suivante, ce qui favorise leur choix, incluant un biais expérimental dans la population.

En outre, les chironomes sont des organismes benthiques, ce qui rend peu pertinente l'évaluation chez ces insectes de la toxicité de polluants se fixant peu dans les sédiments.

Quelques Ephemères (*Ephemoptera*) font également partie des ordres d'insectes aquatiques parfois étudiés dans le cadre d'études écotoxicologique (pour exemple : Kim *et al.*, 2012). Mais bien que *Heagenia rigida* (*ephemoptera, ephemeridae*) ait été proposée dès 1991 comme organisme modèle en écotoxicologie (Saouter *et al.*, 1991), seules quelques études ont à ce jour utilisé ce modèle en laboratoire pour évaluer l'impact de facteurs biotiques (Smith *et al.*, 2008) ou la bioconcentration et l'impact de polluants dans cette espèce (Odin *et al.*, 1995; Andres *et al.*, 1998; Inza *et al.*, 2001; Jarvis *et al.*, 2014).

Enfin, d'autres insectes aquatiques apparaissent ponctuellement dans des études écotoxicologiques, mais ces études concernent plutôt des évaluations de diversité taxonomiques dans les milieux pollués par évaluation des taxa présents (pour exemple : Yaméogo *et al.*, 1993 ; Hartig *et al.*, 2009) et rarement des expérimentations s'intéressant précisément à l'impact des polluants considérés sur la physiologie de ces insectes aquatiques (Van Der Geest *et al.*, 2002).

I.3.3 Le moustique *Aedes aegypti* comme modèle d'insecte aquatique

I.3.3.1 Cycle de vie du moustique *Aedes aegypti*

Le moustique *Aedes aegypti* (Diptera, culicidae) est une espèce de moustique tropicale. Il est présent dans les régions tropicales et sub-tropicales du monde, et ce sur tous les continents. Ce moustique est le vecteur principal de la dengue, du chikungunya, et de la fièvre jaune, trois maladies qui ont un impact sanitaire mondial particulièrement préoccupant (Black *et al.*, 2002; Tolle, 2009), mais aussi du virus Zika, récemment à l'origine d'une épidémie au Brésil (Zanluca *et al.*, 2015). Cet impact sanitaire particulièrement important a mené la communauté scientifique à s'intéresser à ce moustique dès les années 1930, permettant l'accumulation de très nombreuses données écologiques, comportementales, physiologiques et génomiques sur ce modèle.

Le cycle de vie du moustique *Aedes aegypti* comprend une phase aquatique pré-imaginale suivie d'une phase aérienne adulte (Figure I.3). La phase aquatique comprend 4 stades larvaires successifs séparés par trois mues rythmant la croissance des individus. Une métamorphose marque le passage du quatrième stade larvaire à la nymphe. Ce stade nymphal aboutit à l'émergence d'un imago qui correspond au stade adulte dans le développement d'un insecte. L'émergence marque le passage à la phase aérienne du cycle de vie, impliquée dans la dispersion et la reproduction.

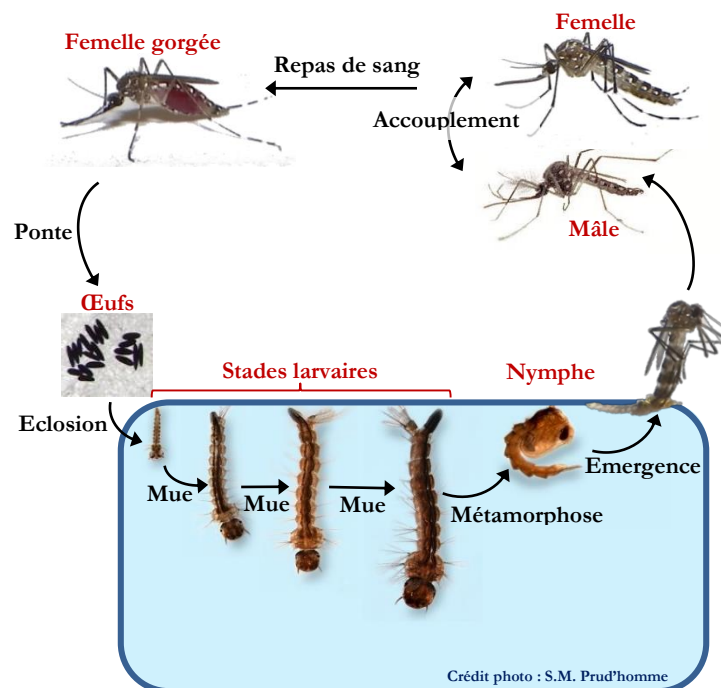


Figure I.3 - Cycle de vie semi-aquatique du moustique *Aedes aegypti*

Les larves et les nymphes respirent à la surface de l'eau à l'aide d'organes respiratoires spécifiques traversant la surface de l'eau : le siphon chez les larves et les trompettes chez les nymphes. Les larves se nourrissent de particules organiques, composées notamment de microalgues et autres organismes microscopiques (Christophers, 1960; Clements, 1992, 1999). Celles-ci sont très mobiles dans la colonne d'eau, avec phases de repos et de respiration dans la partie supérieure de la colonne d'eau alternées avec des descentes au bas de la colonne d'eau lors des phases d'alimentation ou de la fuite d'un stimulus prédateur. Bien qu'également mobiles, les nymphes ne s'alimentent pas, étant dépourvues d'orifice buccal. Celles-ci passent ainsi la majeure partie du temps juste sous la surface de l'eau, et ne descendent dans la colonne d'eau que pour fuir les stimuli prédateurs. Selon la température, la phase larvaire peut durer en moyenne entre 7 jours à 25°C et 5 jours à 30°C. Le stade nymphal dure environ deux jours selon la température.

Le développement nymphal aboutit à l'émergence des imagos, qui achèveront leur maturation après environ 24 h pour les mâles et 72h pour les femelles à une température de 28°C. Les imagos, mâles et femelles, s'alimentent dès leur émergence avec du nectar de fleurs récolté par butinage, ce qui va leur fournir les ressources énergétiques nécessaires au maintien de l'organisme. La taille des imagos ne varie pas au cours de leur vie, et est donc entièrement définie par la croissance durant les stades larvaires. Dès leur maturité, les mâles cherchent à s'accoupler avec les femelles environnantes. En conditions naturelles, les femelles sont ainsi fécondées très tôt après leur émergence par un unique mâle au cours de leur vie, la semence étant stockée dans trois spermathèques. Une fois complètement matures, les femelles entrent dans une phase de quiescence reproductive, jusqu'à ce qu'un hôte soit à disposition pour effectuer un repas de sang. C'est le repas de sang qui fournit aux femelles les nutriments nécessaires à la maturation des œufs. La dynamique du cycle hormonal associé à la maturation des œufs est très homogène parmi les femelles, et aboutit à la ponte des œufs dans le 3^{ème} jour suivant le repas de sang. Les femelles peuvent réaliser ainsi 4 à 5 pontes au cours de leur vie, à chaque fois déclenchées par un nouveau repas de sang. Les femelles pondent leurs œufs sur des supports émergés à l'interface air/eau. Bien que ces œufs soient matures et prêts à éclore deux jours après leur ponte, ceux-ci ont la faculté d'entrer en phase de quiescence et ainsi de tolérer des périodes de dessiccation allant jusqu'à plusieurs mois. Ceux-ci pourront alors éclore en quelques minutes après leur immersion, lors du réapprovisionnement du gîte de ponte en eau par exemple.

I.3.3.2 Intérêts du moustique *Aedes aegypti* comme modèle en écotoxicologie

L'étude du comportement et de la biologie de cette espèce en laboratoire ou dans leur milieu de vie a permis d'identifier de nombreux facteurs pouvant influencer les différentes étapes de ce cycle de vie, que ce soit au niveau de la phase aquatique (pour exemple : Padmanabha *et al.*, 2012; Perez et Noriega, 2012; Couret *et al.*, 2014; Couret et Benedict, 2014) ou aérien (pour exemple : Ponlawat et Harrington, 2007, 2009; Cator et Harrington, 2011; Helinski et Harrington, 2011; Helinski *et al.*, 2012; Perez et Noriega, 2013). La connaissance approfondie de sa biologie permet également la modélisation de la structure et de la dynamique de populations permettant, par une approche *in silico*, d'appréhender l'impact de différents facteurs sur les populations (pour revue : Lord, 2007; Almeida *et al.*, 2010). A échelle plus fine, la régulation hormonale et métabolique des étapes clés du développement (mue, métamorphose, émergence, maturation du système reproducteur) et de la reproduction ont été beaucoup étudiées, et sont bien décrites chez cette espèce (pour exemples : Briegel, 1990; Timmermann et Briegel, 1999; Margam *et al.*, 2006; Dai et Adams, 2009; Hansen *et al.*, 2014; Clifton et Noriega, 2012; Rivera-Perez *et al.*, 2014). Suite au séquençage et à l'annotation de son génome en 2007, de nombreux outils moléculaires tels que les puces à ADN, le RNAi ou la transgénèse (Nene *et al.*, 2007; Strode *et al.*, 2008; Mane-Padros *et al.*, 2012) ont été développés chez ce moustique, permettant l'approfondissement de la connaissance de sa physiologie d'un point de vue moléculaire (Cruz *et al.*, 2009; Telang *et al.*, 2010; Ptitsyn *et al.*, 2011; Bonizzoni *et al.*, 2011; Biedler *et al.*, 2012; Harker *et al.*, 2013). Cela ouvre la possibilité d'utiliser de techniques moléculaires de pointe pour explorer à grande échelle les effets des polluants étudiés, et ainsi permettre la compréhension des mécanismes impliqués dans les perturbations observées.

En plus de d'une biologie relativement bien connue, l'élevage en laboratoire de ce moustique est aisé, et développé depuis la première moitié du 20^{ème} siècle (Christophers, 1960; Kuno, 2010). Avec des pontes multiples au cours de la vie de chaque femelle allant jusqu'à une centaine d'œufs chacune, *Aedes aegypti* est une espèce prolifique permettant facilement d'obtenir des populations de plusieurs milliers d'individus. Il est ainsi relativement aisé d'obtenir suffisamment de matériel biologique pour réaliser différentes expérimentations sur une même population d'individus. En outre, le stockage des œufs rendu possible par leur tolérance à la dessiccation fournit une grande souplesse d'élevage, permettant notamment de stocker les œufs issus des pontes successives d'une population pour faire démarrer le développement de la descendance une fois un nombre suffisant d'œufs obtenu. Cela assure d'obtenir des populations de plusieurs milliers d'individus à chaque génération, augmentant ainsi la représentativité des expérimentations. Il est également possible de

synchroniser l'éclosion des œufs par simple immersion simultanée, permettant une précision à la demi-heure près dans les mesures liées au développement et l'échantillonnage d'individus synchronisés. De manière semblable, le caractère anautogène des femelles *aedes aegypti*, c'est-à-dire la nécessité du repas de sang pour la maturation des œufs, permet une synchronisation du cycle hormonal à l'origine de la maturation des œufs par la mise à disposition du repas de sang. Cela permet, outre la synchronisation de la ponte et donc de l'âge des œufs, une grande précision lors de l'échantillonnage d'individus pour étudier la dynamique de ce processus de maturation. Le cycle de vie relativement court, avec au minimum 15 jours pour l'obtention d'une première ponte prête à éclore, présente par ailleurs un avantage certain dans le cadre d'études multigénérationnelles, permettant d'entretenir des populations consécutives durant plusieurs générations dans des temps cohérents avec les contraintes temporelles des projets scientifiques.

Bien que quelques études aient étudié l'impact de polluants aquatiques à fortes doses sur le moustique *Aedes aegypti* (Poupardin *et al.*, 2008; Riaz *et al.*, 2009; Muturi, 2013), peu d'études écotoxicologiques ont mis à profit la masse de connaissances génomiques, physiologiques et écologiques disponibles chez les diptères du genre *Aedes* pour élucider les mécanismes moléculaires de la toxicité des xénobiotiques à faibles doses chez les insectes et les effets associés à cette toxicité sur leurs traits de vie.

I.4 État des connaissances sur les polluants étudiés

Le travail de thèse présenté ici s'est intéressé à trois polluants en particulier. Le choix des polluants étudiés a été dicté par leur récurrence dans les eaux de surface en aval des agglomérations mondiales et par leur potentiel à perturber la physiologie des invertébrés aquatiques d'eaux douces.

I.4.1 Ibuprofène

L'ibuprofène est un composé pharmaceutique de la classe des anti-inflammatoires non stéroïdiens, employé en médecine humaine pour ses propriétés analgésiques. Découvert dans les années 1960, il est depuis largement utilisé et figure comme principe actif dans 60 références pharmaceutiques en vente actuellement en France sous différentes formes et dosages (VIDAL, 2015) dont la plupart sont en vente libre. Avec 240 tonnes, l'ibuprofène faisait partie des 10 médicaments les plus vendus en France en 2005 (Bouvier *et al.*, 2010). Les différentes données de présence, persistance et d'impacts écotoxicologique de l'ibuprofène ont conduit plusieurs auteurs à considérer ce composé pharmaceutique comme prioritaire vis-à-vis de sa surveillance dans

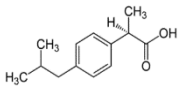
l'environnement et de sa caractérisation écotoxicologique approfondie (Zuccato *et al.*, 2005; AFSSA, 2008; Besse et Garric, 2008).

I.4.1.1 Origine et devenir de l'ibuprofène dans l'environnement

Deux sources de rejet d'ibuprofène dans l'environnement sont identifiées (Dulio *et al.*, 2009; INERIS, 2012). L'excrétion urinaire par les patients est la source de rejet principale. La deuxième voie de contamination est l'évacuation domestique de médicaments périmés ou inutilisés dans les déchets ménagers ou les sanitaires. Les composés pharmaceutiques contaminent ainsi l'environnement via les eaux usées municipales ou via le lessivage des sites d'enfouissement des déchets. La contamination des eaux de surface par l'ibuprofène est principalement d'origine urbaine, et est dépendante de la densité de population environnante, de la présence de centres hospitaliers mais aussi de l'efficacité des dispositifs d'épuration des effluents municipaux.

L'épuration des effluents municipaux apparaît plutôt efficace, avec de 60 à 96% d'épuration selon les systèmes de STEP utilisés (Buser *et al.*, 1999; Metcalfe *et al.*, 2003; Carballa *et al.*, 2004; Roberts et Thomas, 2006; Miège *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009; Boleda *et al.*, 2013). Cette efficacité est variable selon les méthodes d'épuration utilisées par les STEP, le temps de résidence des eaux usées dans les systèmes d'épuration mais aussi selon la période de l'année considérée (Buser *et al.*, 1999; Ashton *et al.*, 2004). Néanmoins, les rejets directs des eaux usées dans l'environnement dus aux débordements lors de gros épisodes pluvieux et dus aux bâtiments non reliés aux systèmes de traitement des eaux peuvent générer des apports massifs d'ibuprofène dans l'environnement (Buser *et al.*, 1999). Dans une moindre mesure, les fuites dans les réseaux d'acheminements aux STEP causent également une contamination des milieux.

Tableau I.1 - Caractéristiques physico-chimiques de l'ibuprofène

Caractéristiques physicochimique	
Nom scientifique	acide(±)2-(4-isobutyphényl)propionique
Numéro CAS	15687-27-1
Structure chimique	
Poids moléculaire ¹	206,28 g/mole
Solubilité à 25°C ¹	21 mg/L
Coefficient de partage octanol-eau, Log K _{oc} ¹	3,97
pK _a (20°C) ^{2,1}	4,52 – 4,9
Tension de vapeur (Pa) ¹	2,48.10 ⁻²
Constante de Henry (atm/m ³ /mole) ¹	1,5.10 ⁻⁷

Sources : ¹ INERIS 2012 ; ² Scheytt *et al.*,2004

Le devenir de l'ibuprofène dans l'environnement aquatique dépend des paramètres physico-chimiques des milieux considérés. L'ibuprofène est relativement soluble dans l'eau (21 mg/l à 25°C) et ses caractéristiques de tension de vapeur et de constante de Henry en font une molécule peu volatile, ce qui rend l'épuration des eaux de surface par évaporation négligeable. L'ibuprofène possédant un groupement acide carboxylique (pK_a=4,52 à 4,9), il est généralement présent sous sa forme anionique (groupement COO⁻) aux pH habituellement retrouvés dans les cours d'eau, ce qui augmente alors sa solubilité dans l'eau et limite son adsorption sur les sédiments (Scheytt *et al.*, 2005). Une récente étude de Duan *et al* étudiant la répartition de l'ibuprofène entre les différentes phases du cours d'eau (sédiment, particules colloïdales et portion réellement dissoute) a démontré qu'entre 9 et 28 % de l'ibuprofène habituellement considéré comme « dissout dans l'eau » est en fait adsorbé aux particules colloïdales. Les particules colloïdes pourraient ainsi jouer un rôle important dans la persistance et la biodisponibilité de l'ibuprofène dans les eaux de surface. Cette étude confirme en outre que seule une infime partie de l'ibuprofène est adsorbé aux sédiments (Duan *et al.*, 2013).

Les temps de demi-vie mesurés pour l'ibuprofène dans l'eau sont variables selon le pH, l'oxygène dissous et des matières en suspension des milieux étudiés, allant de moins d'un jour à 50

jours (Richardson et Bowron, 1985; Buser *et al.*, 1999; Ashton *et al.*, 2004; Zuccato *et al.*, 2005). Plusieurs études ont montré que la biodégradation par des microorganismes est le processus principal d'élimination de l'ibuprofène dans les milieux aquatiques (Buser *et al.*, 1999; Winkler *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2009) et que les processus abiotiques comme la photodégradation par la lumière naturelle, l'hydrolyse ou l'adsorption aux sédiments n'ont qu'une faible part dans l'épuration spontanée des eaux de surface (Buser *et al.*, 1999; Andreozzi *et al.*, 2003; Lin et Reinhard, 2005; Yamamoto *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Bui, 2014). La consommation de médicaments à base d'ibuprofène tout au long de l'année cause néanmoins un rejet continu qui confère à l'ibuprofène un caractère pseudo-persistant dans l'environnement (Hernando *et al.*, 2006).

Il est généralement considéré qu'un coefficient de partage octanol-eau ($\text{Log } K_{oc}$) supérieur à 3 caractérise un potentiel du composé à bioaccumuler, c'est-à-dire à s'accumuler dans les tissus adipeux des organismes (OCDE, 2008). Avec un $\text{Log } K_{oc}$ de 3,97 l'ibuprofène devrait ainsi en théorie se bioaccumuler chez les organismes aquatiques. Cependant, la grande majorité des études de bioaccumulation ont été menées chez le poisson. Tandis que certaines études ont mis en évidence dans différents organes de plusieurs espèces des facteurs de bioconcentration allant de 29 à 882 fois (Fick *et al.*, 2010; Brozinski *et al.*, 2013; Wang et Gardinali, 2013), d'autres n'ont pas observé d'accumulation particulière de l'ibuprofène dans les organismes (Nallani *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015). Une étude chez les invertébrés prélevés dans un milieu pollué a montré la présence d'ibuprofène dans les larves d'hydrapsyche, un insecte aquatique, mais pas dans le planaire *phagocata* ni dans le mollusque bivalve *ancyles* (Huerta *et al.*, 2015). Ces observations, pas toujours corrélées avec le $\text{Log } K_{oc}$ de l'ibuprofène, pourraient être dues à des différences de métabolisation au sein des organes étudiés ou aux modes de vie et d'alimentation des différents organismes considérés (Nallani *et al.*, 2011; Huerta *et al.*, 2015). Cette variabilité, outre la multiplication des organismes et organes étudiés, peut également indiquer que d'autres facteurs que le $\text{Log } K_{oc}$ entrent en jeu, notamment le pH, la présence de colloïdes ou encore la présence d'autres polluants (Zenker *et al.*, 2014; Huerta *et al.*, 2015).

1.4.1.2 Contamination des eaux de surface par l'ibuprofène

L'ibuprofène fait partie des composés les plus couramment retrouvés dans les eaux de surface (Heberer, 2002; Andreozzi *et al.*, 2003; Ashton *et al.*, 2004; Loos *et al.*, 2009; Boleda *et al.*, 2013). Les concentrations d'ibuprofène dans les effluents de STEP et les eaux de surfaces sont très variables selon les pays considérés (Tableaux I.2 et I.3), mais également selon la météo et les saisons d'échantillonnage (Ashton *et al.*, 2004; Vieno *et al.*, 2005; Paillet *et al.*, 2009; Boleda *et al.*, 2013).

Tableau I.2- Concentrations environnementales en ibuprofène mesurées dans les effluents de STEP

Zone étudiée	Zone d'échantillonnage	Fréquence de détection	Concentrations mesurées (ng/l)			Référence
			Moyenne	Médiane	Maximale	
Royaume-Uni	Effluents de STEP	84 %	4201	3086	27256	(Ashton <i>et al.</i> , 2004)
Royaume-Uni	Effluents de STEP	-	143	-	491	(Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2008)
France	Effluents de STEP	-	-	-	219	(Togola, 2006)
Suisse	Effluents de STEP	-	-	-	1400	(Tixier <i>et al.</i> , 2003)
Tyne river, Royaume-Uni	Effluents de STEP	-	-	-		(Roberts et Thomas, 2006)
Taiwan	Effluents de STEP	96 %	-	1758	14500	(Lin <i>et al.</i> , 2008)
Hallifax, Canada	Effluents de STEP	-	-	3600	6300	(Comeau <i>et al.</i> , 2008)
Pictou, Canada	Effluents de STEP	-	-	220	350	(Comeau <i>et al.</i> , 2008)
Canada	Effluents de STEP	-	-	12500	33900	(Metcalf <i>et al.</i> , 2003)
Espagne	Effluents de STEP	-	8200	-	-	(Santos <i>et al.</i> , 2009)
Croatie	Effluents de STEP	-	266	-	800	(Gros <i>et al.</i> , 2006)
Annemasse, France	Effluents hospitaliers	-	-	-	1729	(Perrodin <i>et al.</i> , 2013)

Tableau I.3 - Concentrations environnementales en ibuprofène mesurées dans les eaux de surface

Zone étudiée	Zone d'échantillonnage	Fréquence de détection	Concentrations mesurées (ng/l)			Référence
			Moyenne	Médiane	Maximale	
Union européenne (122 rivières)	Eau de rivière	62 %	395	-	31323	(Loos <i>et al.</i> , 2009)
France	Eau de rivière	-	-	-	5	(Togola et Budzinski, 2008)
France	Eau de rivière	-	-	-	324	(Bui, 2014)
Elly river, Pays de Galles	Eau de rivière	100 %	36	-	93	(Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2008)
Taff river, Pays de Galle	Eau de rivière	100 %	26	-	100	(Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2008)
Royaume-Uni	Eau de rivière	69 %	1105	826	5044	(Ashton <i>et al.</i> , 2004)
Tyne river, Royaume-Uni	Eau d'estuaire	-	-	297	2370	(Roberts et Thomas, 2006)
Luxembourg	Eau de rivière	-	-	-	2383	(Pailler <i>et al.</i> , 2009)
Suisse	Eau de rivière	-	-	-	80	(Pailler <i>et al.</i> , 2009)
Höje river, Suede	Eau de rivière	-	-	70	530	(Bendz <i>et al.</i> , 2005)
Finlande	Eau de rivière	87 %	28	-	69	(Brozinski <i>et al.</i> , 2013)
Rivière Liobregat, Espagne	Eau de rivière <i>Hiver</i>	-	-	-	1440	(Boleda <i>et al.</i> , 2013)
Rivière Liobregat, Espagne	Eau de rivière <i>Printemps</i>	-	-	-	73	(Boleda <i>et al.</i> , 2013)
Rivière Liobregat, Espagne	Eau de rivière <i>Été</i>	-	-	-	313	(Boleda <i>et al.</i> , 2013)
Rivière Liobregat, Espagne	Eau de rivière <i>Automne</i>	-	-	-	230	(Boleda <i>et al.</i> , 2013)
Mississippi, Etats-unis	Eau de rivière	-	-	-	34	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)

Les concentrations maximales mesurées dans les effluents de STEP varient entre 220 ng/l et 34 µg/l selon les sites, tandis que les concentrations maximales retrouvées dans les eaux de surfaces varient entre 5 ng/l et 5 µg/l avec un site exceptionnellement pollué présentant plus de 30 µg/l d'ibuprofène, mais dont la localisation n'est pas explicitée par les auteurs (Loos *et al.*, 2009). Il a en outre été montré que, le long d'un cours d'eau, les concentrations en ibuprofène augmentent fortement entre l'amont et le point d'entrée des effluents de STEP et diminuent progressivement lorsque les prélèvements s'éloignent en aval de ces effluents sous l'effet de la dilution, de la bioaccumulation ou de la dégradation du polluant (Ashton *et al.*, 2004; Roberts et Thomas, 2006; Pailler *et al.*, 2009). Ces observations tendent à confirmer le rôle des eaux usées municipales dans la contamination des eaux de surface. La variabilité des concentrations mesurées dans les différents cours d'eau et effluents de STEP est ainsi probablement en partie due à l'efficacité des procédures

de traitement des eaux usées dans les différentes localités étudiées (Stumpf *et al.*, 1999; Pailler *et al.*, 2009), outre les potentielles différences de consommation du médicament lui-même.

I.4.1.3 Écotoxicité de l'ibuprofène

Chez les mammifères, l'effet anti inflammatoire de l'ibuprofène est dû à l'inhibition de la biosynthèse des eicosanoïdes, des acides gras pro-inflammatoires comprenant les prostaglandines et les leukotriène. L'inhibition de cette voie est due à la compétition de l'ibuprofène avec l'acide gras omega-6 acide arachidonique (AA) au niveau du site actif des cyclooxygénases (COX 1 et COX 2) (Charlier et Michaux, 2003). L'oxydation de l'AA par les COX est l'étape limitante de la synthèse des prostaglandines, qui sont les messagers auto/paracrines de la réaction inflammatoire (Charlier et Michaux, 2003). Outre leur rôle dans les processus inflammatoires, les eicosanoïdes sont également impliqués chez les mammifères dans divers processus physiologiques tels que la régulation de la pression sanguine, la protection des muqueuses gastriques, le maintien de l'homéostasie, la fonction reproductrice et nerveuse, le développement pré-natal et post-natal (Funk, 2001).

L'ibuprofène a été conçu pour être actif sur les mammifères. Cependant, les voies de signalisation cellulaires ainsi que les voies métaboliques principales et les différents récepteurs sont relativement conservés au sein du règne animal (Mukherjee *et al.*, 2015), ce qui pourrait conférer à l'ibuprofène une réactivité potentiellement élevée sur les organismes aquatiques non cibles (Seiler, 2002; Fent *et al.*, 2006; Ankley *et al.*, 2007). Les études écotoxicologiques portant sur l'impact de l'ibuprofène sur les organismes aquatiques sont relativement récentes. Plusieurs études se sont intéressées à l'impact de l'ibuprofène sur différents processus physiologiques des poissons, comme par exemple le développement (pour exemple : Overturf *et al.*, 2012), la fonctionnalité de différents organes (Schnell *et al.*, 2009; Islas-Flores *et al.*, 2014) et la reproduction (Flippin *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2010). En revanche, les études sur les invertébrés sont plus rares (Dulio *et al.*, 2009; Matozzo *et al.*, 2012). Pourtant, la voie de biosynthèse des eicosanoïdes est également présente chez les invertébrés (Rowley, 2005; Stanley, 2006; Heckmann, R. Sibly, *et al.*, 2008), les rendant potentiellement sensibles à l'ibuprofène.

Les études portant sur les invertébrés (Tableau I.4) s'intéressent majoritairement aux crustacés (Cleuvers, 2003; De Lange *et al.*, 2006; Heckmann *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2008; Heckmann, R. M. Sibly, *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2010) ainsi qu'aux mollusques d'eau douce (Pounds *et al.*, 2008; Parolini *et al.*, 2011; Contardo-Jara *et al.*, 2011; Aguirre-Martínez *et al.*, 2015) et d'eau de mer (Ericson *et al.*, 2010; Gonzalez-Rey et Bebianno, 2012; Matozzo *et al.*, 2012; Milan *et al.*, 2013;

Fabbri *et al.*, 2014). L'impact de l'ibuprofène a également été étudié chez le modèle de cnidaire *Hydra attenuata* (Pascoe *et al.*, 2003; Quinn *et al.*, 2008a, 2008b). La grande majorité de ces études se focalise sur l'impact d'une exposition aiguë à l'ibuprofène, durant 24 à 96 h (Fent *et al.*, 2006). Ces mesures de toxicité aiguë mettent en évidence une faible toxicité létale de l'ibuprofène, avec des concentrations médianes de létalité (CL₅₀) de l'ordre de la dizaine de microgrammes par litre (Pounds *et al.*, 2008; Quinn *et al.*, 2008a; Kim *et al.*, 2009) ce qui est plutôt attendu pour un composé pharmaceutique (Fent *et al.*, 2006). Les études de toxicité sublétales chez les mollusques s'intéressent à des biomarqueurs de la réponse anti-oxydante et des fonctions immunitaires et de détoxification, montrant notamment une induction de la réponse anti-oxydante due à un stress oxydatif, une augmentation des activités des enzymes de détoxification et une perturbation des biomarqueurs du système immunitaire. Par ailleurs les études sur la daphnie (*Daphnia magna*) ont mis en évidence une perturbation de sa fonction reproductrice (Heckmann *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2010). Cependant, qu'elles concernent des expositions aiguës ou chroniques (de 7 à 21 jours), ces études examinent en général des concentrations peu représentatives des contaminations environnementales excédant le milligramme par litre. Les seules études s'étant intéressées à des concentrations plus faibles et réalistes d'un point de vue environnemental ont pourtant montré des impacts sur des traits pouvant influencer sur les populations à long terme (Pascoe *et al.*, 2003; De Lange *et al.*, 2006; Parolini *et al.*, 2011; Aguirre-Martínez *et al.*, 2015). Hormis Fabbri *et al.* qui montrent une embryotoxicité de l'ibuprofène chez la moule méditerranéenne (Fabbri *et al.*, 2014), toutes ces études se concentrent surtout sur l'exposition des stades adultes des organismes et peu s'intéressent aux effets transgénérationnels sur descendance des individus exposés au-delà de l'éclosion.

Tableau I.4 - Impacts écotoxicologiques de l'ibuprofène sur les invertébrés d'eaux douces.

Espèce étudiée	Embranchement	Type d'exposition	Concentrations d'exposition	Effets biologique observé	Concentrations effectives	Référence
Daphnie <i>Daphnia magna</i>	Crustacé	Aigue (48h)	1 à 100 mg/l	● Test d'immobilisation	CE ₅₀ = 108 mg/l	(Cleuvers, 2003)
Daphnie <i>Daphnia magna</i>	Crustacé	Aigue (48h) Chronique (21 jours)	1,23-3,7-11,1- 33,3-100 mg/l	● Test d'immobilisation ● Reproduction	CE ₅₀ = 51,4 mg/l NOEC < 1,23 mg/l	(Han <i>et al.</i> , 2010)
Daphnie <i>Daphnia magna</i>	Crustacé	Chronique (14 jours)	20-40-80 mg/l	● ↑ létalité ● ↓ reproduction	80 mg/l dès 20 mg/l, CE ₅₀ = 13,4 mg/l	(Heckmann <i>et al.</i> , 2007)
Daphnie <i>Daphnia magna</i>	Crustacé	Chronique (10 jours) + 10 jours de dépuración	20-40-80 mg/l	● ↓ taux d'accroissement de la population ● ↓ de la taille des pontes ● ↓ âge à la première ponte ● Réversibilité de la perturbation à 10 jours	dès 20 mg/l dès 20 mg/l dès 20 mg/l	(Hayashi <i>et al.</i> , 2008)
Daphnie <i>Daphnia magna</i>	Crustacé	Aigue (24h)	20-40-80 mg/l	● Perturbation de la biosynthèse des eicosanoides (transcriptomique) ● Perturbation du métabolisme de l'hormone juvénile et de l'oogénèse		(Heckmann, R. Sibly, <i>et al.</i> , 2008)
Puce d'eau <i>Moina macrocopa</i>	Crustacé	Aigue (48h) Chronique (7 jours)	3,13-6,25-12,5- 25-50 mg/l	● Test d'immobilisation ● Reproduction	CE ₅₀ = 72,6 mg/l NOEC = 25 mg/l	(Han <i>et al.</i> , 2010)
Gammare <i>Gammarus pulex</i>	Crustacé	Aigue	0,001 à 1000 µg/l	● ↓ activité générale	de 0,001 à 0,01 µg/l	(De Lange <i>et al.</i> , 2006)
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Crustacé	Aigue (24h)		● Test de survie	CE ₅₀ = 19,6 mg/l	(Kim <i>et al.</i> , 2009)
<i>Hydra attenuata</i>	Cnidaire	Chronique (17 jours)	0,01-0,1-1-10 mg/l	● ↓ activité d'alimentation	0,01 à 1 mg/l	(Pascoe <i>et al.</i> , 2003)
<i>Hydra attenuata</i>	Cnidaire	Aigue (96h)	0,1 à 100 mg/l	● ↓ régénération	CE ₅₀ = 3,84 mg/l	(Quinn <i>et al.</i> , 2008b)
<i>Hydra attenuata</i>	Cnidaire	Aigue (96h)	0,1 à 100 mg/l	● ↑ malformation ● ↑ létalité ● ↓ capacité à s'alimenter ● ↓ ancrage	CE ₅₀ = 1,65 mg/l CE ₅₀ = 22,36 mg/ CE ₅₀ = 3,85 mg/l dès 10 mg/l	(Quinn <i>et al.</i> , 2008a)
Planorbe carénée <i>Planorbis carinatus</i>	Mollusque	Aigue (72h)	0,1-1-10-100 mg/l	● ↑ létalité	CE ₅₀ = 17,1 mg/l	(Pounds <i>et al.</i> , 2008)
Planorbe carénée <i>Planorbis carinatus</i>	Mollusque	Chronique (21 jours)	0,41-1-2,3-5.4 mg/l	● ↓ poids des individus ● Reproduction : ↓ taux d'éclosion	LOEC = 2,3 mg/l, NOEC = 1.0 mg/l 5.4 mg/l	(Pounds <i>et al.</i> , 2008)
Corbicule <i>Corbicula fluminea</i>	Mollusque	Chronique (21 jours)	0,1-5-10-50 µg/l	● Stress général : ↓ Stabilité des membranes lysosomales ● Détoxication : ↑ EROD ● Détoxication : ↑ DBF ● Détoxication : ↑ GST ● ↑ Réponse antioxydante	dès 0,1 µg/l 5 µg/l* 50 µg/l 10 µg/l 50 µg/l	(Aguirre-Martínez <i>et al.</i> , 2015)
Moule zébrée <i>Dreissena polymorpha</i>	Mollusque	Aigue (96 h)	0,2-2-8 µg/l	● Stress oxydatif : ↑ peroxydation lipidique ● Réponse antioxydante : ↑ SOD, ↑CAT, ↑GPx, ↑GST ● Cyto-genotoxicité modérée	- dès 0.2 µg/l dès 2 µg/l	(Parolini <i>et al.</i> , 2011)
Moule zébrée <i>Dreissena polymorpha</i>	Mollusque	Chronique (7 jours)	0,2-2-20-206 µg/l	● Réponse antioxydante (transcription) : ↑SOD, ↑CAT, ↑MT ● Détoxication (transcription) : ↑piGST	dès 0.2 µg/l à 2 µg/l	(Contardo-Jara <i>et al.</i> , 2011)

Les mécanismes impliqués dans les impacts de l'ibuprofène ont été peu étudiés, et seules deux études ont cherché à approfondir cette question via l'utilisation d'outils transcriptomiques (Heckmann, R. M. Sibly, *et al.*, 2008; Milan *et al.*, 2013). Heckmann *et al* montrent notamment qu'un traitement aigu de 24h à des concentrations allant de 20 mg/l à 80 mg/l chez *Daphnia magna* induit des modifications de l'expression de différentes enzymes impliquées dans la synthèse des eicosanoïdes et diminue leur taux de reproduction (Heckmann, R. M. Sibly, *et al.*, 2008). De manière similaire, Milan *et al* ont mis en évidence qu'une exposition de 7 jours à des concentrations allant de 100 µg/l à 1 mg/l chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* modifie la transcription des gènes impliqués dans la respiration cellulaire, le métabolisme de l'acide arachidonique, le métabolisme des eicosanoïdes mais également dans la réponse immunitaire et inflammatoire et la régulation de l'apoptose (Milan *et al.*, 2013).

Une seule étude à notre connaissance reporte une activité de l'ibuprofène chez un insecte aquatique. En étudiant l'impact des prostaglandines sur l'expression de peptides anti-microbiens chez le moustique *Anopheles albimanus*, Garcia Gil de Muñoz *et al.* mettent en évidence que l'exposition de culture cellulaires de divers types à 10 mg/l d'ibuprofène réduit la production de prostaglandine E₂ par les cellules, démontrant ainsi une potentielle activité biologique de l'ibuprofène sur les insectes aquatiques (García Gil de Muñoz *et al.*, 2008).

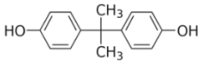
1.4.2 Bisphénol A

Le bisphénol A est un composé organique principalement utilisé comme matière première dans la fabrication des plastiques de type polycarbonate et des résines époxydes ainsi que comme révélateur dans la fabrication des papiers thermiques. Le bisphénol A entre ainsi dans la composition de très nombreux produits de consommation courante, des compact-discs aux lunettes de vue en passant par les pare-chocs de voiture, les emballages alimentaires, le mastic dentaire et les tickets de caisse. Ce composé est l'un des chimiques les plus produits au monde avec une production annuelle croissante d'environ 2,3 millions de tonnes en 2000 (Staples *et al.*, 2002) et 3,8 millions de tonnes en 2006 (Geens *et al.*, 2009).

1.4.2.1 Origine et devenir du bisphénol A dans l'environnement

La contamination des eaux de surface par le bisphénol A est majoritairement due aux effluents d'industries fabriquant ou utilisant le bisphénol A (Fürhacker *et al.*, 2000; Cousins *et al.*, 2002). Les eaux de lessivage des décharges, dans lesquelles on retrouve un grand nombre d'objets contenant du bisphénol A se dégradant avec le temps, ou les déchets abandonnés directement dans les milieux aquatiques apparaissent également être une autre source importante de contamination (Yamamoto *et al.*, 2001; Wintgens *et al.*, 2003; Crain *et al.*, 2007). Dans une moindre mesure, la contamination des populations humaines notamment via leur alimentation provoque un relargage de bisphénol A dans les eaux usées, ajoutant une source supplémentaire de rejet dans l'environnement (Fürhacker *et al.*, 2000; Crain *et al.*, 2007). La tension de vapeur du bisphénol A étant relativement faible (Tableau I.5), les sources atmosphériques de contamination de l'environnement sont négligeables. L'épuration des effluents industriels, urbains et éventuellement de décharges par les STEP est efficace, avec des taux d'épurations mesurés entre 69,2 et 93 % (Fürhacker *et al.*, 2000; Körner *et al.*, 2000; Pookpoosa *et al.*, 2015). L'efficacité d'épuration du bisphénol A dépend des procédés utilisés, avec une efficacité supérieure des procédés de traitement biologiques par rapport aux procédés chimiques (Guerra *et al.*, 2015). Bien que le bisphénol A soit plutôt efficacement épuré dans les STEP, le relargages par les déchets plastiques présents dans les eaux de surface sont des sources de bisphénol A diffuses difficilement contrôlable (Crain *et al.*, 2007).

Tableau I.5 - Caractéristiques physico-chimiques du bisphénol A.

Caractéristiques physicochimique	
Nom scientifique	2,2-bis(4-hydroxyphényl)propane
Numéro CAS	80-05-7
Structure chimique	
Poids moléculaire ¹	228,29 g/mole
Solubilité à 25°C, pH7 ¹	300 mg/L
Coefficient de partage octanol-eau, Log K _{oc} ¹	3,40
pKa (25°C) ¹	9,59 – 11,30
Tension de vapeur (Pa) ³	5,3.10 ⁻⁶
Constante de Henry (Pa/m ³ /mole) ¹	4,03.10 ⁻⁶

Sources : ¹ Cousins *et al.*, 2002

Le bisphénol A est plutôt soluble dans l'eau à pH neutre (300 mg/L à 25°C), sa solubilité augmentant dans les milieux alcalins (Staples *et al.*, 1998). Ses caractéristiques de tension de vapeur et de constante de Henry en font une molécule peu volatile, ce qui rend l'épuration des eaux de surface par évaporation négligeable. Du fait de l'hydrophobicité modérée du bisphénol A, seulement 7% du bisphénol A est retrouvé dans la phase colloïdale en suspension contre 93% dans la phase dissoute (Guerra *et al.*, 2015). Selon son coefficient de partage octanol-eau relativement faible (Log K_{ow} = 3,40), les sédiments ne devraient être que faiblement pollués par le bisphénol A, ce dernier restant plutôt en phase dissoute. Cependant, des quantités de bisphénol A plus importantes qu'attendu sont mesurées dans les sédiments (Heemken *et al.*, 2001; Cousins *et al.*, 2002; Fromme *et al.*, 2002; Crain *et al.*, 2007). Les raisons de cette différence ne sont pas encore précisément établies.

Le temps de demi-vie du bisphénol A dans les milieux aquatiques est de l'ordre de quelques jours, avec des mesures allant de 2 à 6 jours (Staples *et al.*, 1998; Cousins *et al.*, 2002). Plusieurs processus biotiques et abiotiques entrent en jeu dans la dispersion et la dégradation du bisphénol A relargué dans l'environnement incluant la biodégradation, l'adsorption aux particules colloïdales et aux sédiments et la photodégradation (Staples *et al.*, 1998). Sa dégradation rapide par les microorganismes présents dans le milieu et sa photodégradation dans une moindre mesure (Staples *et al.*, 1998) semblent cependant être la raison principale de sa faible persistance dans

l'environnement (Dorn *et al.*, 1987; Guerra *et al.*, 2015). Le bisphénol A est ainsi peu stable dans l'environnement, mais comme pour l'ibuprofène, les rejets dus à l'activité industrielle quotidienne et à la dégradation progressive des déchets au niveau des décharges et des milieux aquatiques lui confèrent une pseudo-persistance.

Les facteurs de bioconcentration estimés à partir du Log K_{ow} peu élevé du bisphénol A concluent à son faible potentiel de bioaccumulation (Staples *et al.*, 1998). Les études portant sur la bioaccumulation du bisphénol A dans les organismes aquatiques mettent en évidence une importante variabilité selon l'espèce considérée et l'étude. Alors que quelques-unes d'entre elle ont mis en évidence la présence de bisphénol A dans les organismes aquatiques, avec des facteurs de bioconcentrations très variables (Liu *et al.*, 2011; Nurulnadia *et al.*, 2014; Gust *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Casatta *et al.*, 2015), d'autres n'ont en revanche pas mis en évidence de présence de BPA dans les organismes étudiés (Huerta *et al.*, 2015; Salgueiro-González *et al.*, 2015). Park *et al.*, ont mis en évidence de manière originale la présence de quantités mesurables de bisphénol A dans les stades adultes aériens de diptères ayant passé leur stades larvaires au sein d'eaux pollués (Park *et al.*, 2009).

1.4.2.2 Contamination des eaux de surface par le bisphénol A

Malgré l'efficacité de l'épuration des effluents urbains et industriels par les STEP, des concentrations allant jusqu'à 7,6 $\mu\text{g}/\text{l}$ ont été mesurées dans les effluents de STEP en Allemagne (Tableau I.6, Höhne et Püttmann, 2008)). Les concentrations en bisphénol A dans les effluents de STEP sont néanmoins très variables. Les concentrations en aval de STEP semblent notamment dépendantes de la présence d'industries utilisant le bisphénol A dans leurs procédés (Guerra *et al.*, 2015). Une origine industrielle de la contamination des eaux de surface par le bisphénol A est notamment confirmée par le fait que le BPA soit retrouvé en plus fortes concentrations dans les STEP recevant des effluents industriels (Clark *et al.*, 1991). Une étude aux Etats-Unis a d'ailleurs mesuré jusqu'à 8 $\mu\text{g}/\text{l}$ de bisphénol A dans des effluents industriels (Clark *et al.*, 1991).

Tableau I.6- Concentrations environnementales en ibuprofène mesurées dans les effluents de STEP.

Zone étudiée	Zone d'échantillonnage	Fréquence de détection	Concentrations mesurées (ng/l)			Référence
			Moyenne	Médiane	Maximale	
Autriche	Effluents de STEP	-	1500	-	2500	(Fürhacker <i>et al.</i> , 2000)
Allemagne	Effluents de STEP	-	258	-	-	(Körner <i>et al.</i> , 2000)
Allemagne	Effluents de STEP	97 %	-	-	702	(Fromme <i>et al.</i> , 2002)
Allemagne	Effluents de STEP	15 %	456	<20	7625	(Höhne et Püttmann, 2008)
Canada	Effluents de STEP	100 %	-	150	7400	(Guerra <i>et al.</i> , 2015)
Chongqing, Chine	Effluents de STEP	-	-	-	1210,7	(Ye <i>et al.</i> , 2012)
Bangkok, Thailand	Effluents de STEP	100 %	-	-	270,5	(Pookpoosa <i>et al.</i> , 2015)
New Jersey, Etats-Unis	Effluents industriels	-	-	-	8000	(Clark <i>et al.</i> , 1991)

Tableau I.7- Concentrations environnementales en bisphénol A mesurées dans les effluents de STEP.

Zone étudiée	Zone d'échantillonnage	Fréquence de détection	Concentrations mesurées (ng/l)			Référence
			Moyenne	Médiane	Maximale	
Union européenne (122 rivières)	Eau de rivière	34 %	25	-	323	(Loos <i>et al.</i> , 2009)
Elly river, Pays de Galles	Eau de rivière	100 %	34	-	40	(Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2008)
Taff river, Pays de Galles	Eau de rivière	100 %	32	-	68	(Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2008)
Bion, France	Eau de rivière, amont de STEP	-	-	-	546,4	(Gust <i>et al.</i> , 2014)
Bourbre, France	Eau de rivière, amont de STEP	-	-	-	253,2	(Gust <i>et al.</i> , 2014)
Bourbre, France	Eau de rivière, aval de STEP	-	-	-	635,5	(Gust <i>et al.</i> , 2014)
Allemagne	Eaux de surfaces	63 %	-	-	410	(Fromme <i>et al.</i> , 2002)
Elbe, Allemagne	Eau de fleuve	100 %	119,6	-	776	(Heemken <i>et al.</i> , 2001)
Autriche	Eaux de surface	22 %	-	-	600	(Hohenblum <i>et al.</i> , 2004)
Fleuve Po, Italie	Eau de fleuve	-	302	-	-	(Viganò <i>et al.</i> , 2006)
Rivière Lambro, Italie	Eau de rivière	-	494	-	-	(Viganò <i>et al.</i> , 2006)
Minho river, Portugal	Eau de rivière	23 %	689	-	4800	(Salgueiro-González <i>et al.</i> , 2015)
New Orlean, USA	Eau de canal	100 %	-	56	158	(Boyd <i>et al.</i> , 2004)
Fleuve Mississipi, USA	Eau de fleuve	-	-	-	147,2	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)
USA	Eaux de surface	-	-	140	1200	(Kolpin <i>et al.</i> , 2002)
Lac Taihu, Chine	Eau de lac	100 %	-	-	194	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
Japan	Eau de rivière	-	-	-	900	(Kang et Kondo, 2006)

Les concentrations environnementales sont également très variables, et bien que généralement de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de nanogramme par litres, des concentrations allant jusqu'à près de 5 µg/l ont été mesurées dans la rivière Minho, au Portugal (Tableau I.7, Salgueiro-González *et al.*, 2015). Dans leur étude sur la Bourbre, une rivière française drainant une importante population et activité industrielle intense, Gust *et al.*, ont mis en évidence des concentrations importantes de bisphénol A allant de 253 ng/l à 635,5 ng/l (Gust *et al.*, 2014).

I.4.2.3 Écotoxicité du bisphénol A

D'abord étudié dans les années 1930 en tant qu'estrogène de synthèse, le bisphénol A a été abandonné au profit d'autres composés plus efficaces. Ce n'est qu'à partir des années 1950 que l'industrie chimique a exploité les propriétés chimiques du bisphénol A pour la fabrication de plastiques polycarbonates, ce qui reste encore aujourd'hui son utilisation principale (Oehlmann *et al.*, 2009). Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence le potentiel du bisphénol A à perturber le système hormonal des vertébrés, via son activité estrogénique, mais également via d'autres récepteurs hormonaux (INSERM, 2010; N'Tumba-Byn *et al.*, 2012; Tohmé *et al.*, 2014; Mathieu-Denoncourt *et al.*, 2015).

Une toxicité létale du bisphénol A est peu probable dans l'environnement, avec des doses de létalité médianes comprises entre 240 µg/l et 10 mg/l chez la daphnie (*Daphnia magna*) et de 72,6 mg/l chez le chironome (*Chironomus riparius*) (Tableau I.8, Chen *et al.*, 2002; Ha et Choi, 2008; Park et Choi, 2009). Cependant, de nombreuses études ont montré qu'une exposition chronique au bisphénol A pouvait avoir des impacts sur le développement des individus ou sur leur capacité de reproduction (Oehlmann *et al.*, 2000; Watts *et al.*, 2001; Schulte-Oehlmann *et al.*, 2001; Hahn *et al.*, 2002; Jobling *et al.*, 2004; Mu *et al.*, 2005; Schirling *et al.*, 2006; Watts *et al.*, 2003). L'impact du bisphénol A sur les arthropodes a été particulièrement étudié, avec un nombre conséquent d'études portant sur le chironome. Ces études ont notamment mis en évidence l'impact de l'exposition chronique à de faibles concentrations de bisphénol A sur les temps d'émergence des femelles à la première génération exposée, mais également de manière plus importante chez tous les adultes de la seconde génération exposée (Watts *et al.*, 2001). La mise en évidence d'impacts plus marqués après deux générations d'expositions est particulièrement intéressante, d'autant que les concentrations de bisphénol A concernées sont cohérentes avec celles mesurées dans l'environnement (Tableau I.7).

Tableau I.8 - Impacts écotoxicologiques du bisphénol A sur les invertébrés d'eaux douces.

Espèce étudiée	Embranchement	Type d'exposition	Concentrations d'exposition	Effets biologique observé	Concentrations effectives	Référence
Chironome <i>Chironomus tentans</i>	Arthropode	Aigue (24h)	8 - 80 - 800 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● réponse stress thermique : ↑ transcription HSP70 et HSC70 ● ↑ transcription hémoglobines HbA et HbB 	dès 8 µg/l 8 et 80 µg/l	(Lee <i>et al.</i> , 2006)
Chironome <i>Chironomus riparius</i>	Arthropode	Aigue (24h)	5 - 50 - 500 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● test de survie ● ↑ expression hémoglobine HbA, HbB, HbC, HbD ● ↓ oxyhémoglobine 	CI ₅₀ = 72,6 mg/l 5 à 500 µg/l selon type Hb 500 µg/l	(Ha et Choi, 2008)
Chironome <i>Chironomus riparius</i>	Arthropode	Aigue (12 à 24h)	3 - 6 - 9 - 12 mg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● ↑ mortalité larvaire ● ↑ transcription HSP70 et récepteur à ecdysone (EcR) 	dès 6 mg/l 3 mg/l	(Planelló <i>et al.</i> , 2008)
Chironome <i>Chironomus riparius</i>	Arthropode	Aigue (24 à 96h)	5 - 50 - 500 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● ↑ transcription Estrogen Related Receptor gamma (ERRγ) 	dès 5 µg/l	(Park et Kwak, 2010)
Chironome <i>Chironomus riparius</i>	Arthropode	Aigue (24h)	5 - 50 - 500 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● cassures de l'ADN ● ↓ activité cat 	dès 5 µg/l 5 et 500 µg/l	(Park et Choi, 2009)
Chironome <i>Chironomus riparius</i>	Arthropode	Cycle de vie complet	1 - 100 - 3000 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● ↓ vitellogénine chez les mâles adultes ● ↓ vitellogénine chez les femelles adultes 	dès 1 µg/l 3000 µg/l	(Hahn <i>et al.</i> , 2002)
Chironome <i>Chironomus riparius</i>	Arthropode	Cycle de vie complet (2 générations)	0,01 - 0,1 - 1 - 100 - 1000 - 10000 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● ↑ temps d'émergence des mâles de la 2^{ème} génération ● ↓ temps d'émergence des femelles de la 1^{ère} génération ● ↓ temps d'émergence des femelles de la 2^{ème} génération 	de 0,1 à 1000 µg/l de 0,01 à 100 µg/l de 0,1 à 1000 µg/l	(Watts <i>et al.</i> , 2001)
Chironome <i>Chironomus riparius</i>	Arthropode	Chronique éclosion-nymphose	0,01 - 0,1 - 1 - 10 - 100 - 1000 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● ↓ poids larvaire ● malformation des pièces buccales 	1 mg/l de 0,01 à 100 µg/l	(Watts <i>et al.</i> , 2003)
Marise aplatie <i>Marisa cornuarietis</i>	Mollusque	Cycle de vie complet	5 - 25 - 100 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● organes sexuels additionnels ● ↑ taille des glandes sexuelles accessoires ● malformations de l'oviducte ● ↑ nombre d'œufs produits hors saison ● ↑ mortalité 	dès 5 µg/l	(Oehlmann <i>et al.</i> , 2000)
Marise aplatie <i>Marisa cornuarietis</i>	Mollusque	Chronique (180 jours)	0,05 - 0,1 - 0,25 - 0,5 - 1,0 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● malformations de l'oviducte ● ↑ nombre d'œufs produits hors saison 	dès 0,1 µg/l	(Schulte-Oehlmann <i>et al.</i> , 2001)
Hydrobie des antipodes <i>Potamogyrus antipodarum</i>	Mollusque	Chronique (9 semaines)	1 - 5 - 25 - 100 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● ↑ production d'embryons 	dès 5 µg/l	(Jobling <i>et al.</i> , 2004)
Gammaré <i>Gammarus fossarum</i>	Crustacé	Chronique (34 jours)	50 - 500 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● accélération maturation des oocytes ● ↓ nombre de descendance ● ↓ expression HSP 	dès 50 µg/l	(Schirling <i>et al.</i> , 2006)
Daphnie <i>Daphnia magna</i>	Crustacé	Aigue (24h)		<ul style="list-style-type: none"> ● test de survie 	CI ₅₀ = 240 µg/l	(Park et Choi, 2009)
Daphnie <i>Daphnia magna</i>	Crustacé	Aigue (24h)	0,3 - 3 - 30 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● cassures de l'ADN ● ↓ activité CAT 	dès 3 µg/L dès 3 µg/L	(Park et Choi, 2009)
Daphnie <i>Daphnia magna</i>	Crustacé	Aigue (48h)		<ul style="list-style-type: none"> ● test de toxicité 	CI ₅₀ = 10 mg/l	(Chen <i>et al.</i> , 2002)
Daphnie <i>Daphnia magna</i>	Crustacé	Aigue (48h)		<ul style="list-style-type: none"> ● test d'immobilisation 	CE ₅₀ = 7,75 mg/l	(Brennan <i>et al.</i> , 2006)
Daphnie <i>Daphnia magna</i>	Crustacé	Chronique (21 jours)		<ul style="list-style-type: none"> ● ↑ temps entre deux mues ● perturbation développement embryonnaire ● ↓ nombre de descendants pondus 	dès 5 mg/l 10 mg/l 2,5 à 10 mg/l	(Mu <i>et al.</i> , 2005)

Ces auteurs ont également mis en évidence des malformations des pièces buccales larvaires (Watts *et al.*, 2003). Les études portant sur le chironome ont également mis en évidence l'impact du BPA sur l'expression de différents gènes, dont notamment les hémoglobines, la vitellogénine, ainsi que des récepteurs hormonaux, bien que ces observations aient été faites à de fortes doses d'exposition (Lee *et al.*, 2006; Planelló *et al.*, 2008; Ha et Choi, 2008; Park et Kwak, 2010). Il a également été montré qu'une exposition à 5 µg/l de bisphénol A durant tout le cycle de vie induisait une « superféminisation » chez la maryse aplatie (*Marisa cornuarietis*), un mollusque d'eau douce. Cette superféminisation des individus est notamment marquée par des organes sexuels additionnels, une augmentation de la taille des glandes sexuelles accessoires, des malformations de l'oviducte et une augmentation du nombre d'œufs produits en dehors des périodes de ponte (Oehlmann *et al.*, 2000). Bien qu'une concentration de 5 µg/l soit légèrement élevée par rapport aux concentrations mesurées dans l'environnement, des malformations de l'oviducte similaires ainsi qu'une augmentation du nombre d'œufs produits ont été observés par les auteurs chez des individus exposés à 100 ng/l de bisphénol A (Schulte-Oehlmann *et al.*, 2001; Oehlmann *et al.*, 2009).

Le bisphénol A est communément considéré comme ayant une activité estrogénique via sa liaison au récepteur aux estrogènes chez les vertébrés. Cependant, les estrogènes et leur récepteur ne sont pas présents chez les invertébrés, ce qui pose la question du mode d'action du bisphénol A sur ces organismes (Oehlmann *et al.*, 2009). Les mécanismes d'action du bisphénol A sur les invertébrés d'eau douce ne sont cependant pas souvent approfondis.

Mu *et al.* ont cependant mis en évidence que l'augmentation du temps entre chaque mue et les malformations embryonnaires constatées chez la daphnie suite à une exposition au bisphénol A pourrait être due à une perturbation de la signalisation des ecdystéroïdes par le bisphénol A via une influence sur la voie de signalisation de l'hormone juvénile et non pas à une compétition du BPA au niveau du récepteur de l'ecdysone (Mu *et al.*, 2005). Bien que ces observations mécanistiques constituent une base dans la compréhension des modes d'action du bisphénol A sur les invertébrés, les effets et mécanismes sont observés à des concentrations de 5 mg/l ou plus de bisphénol A, ce qui limite leur représentativité environnementale.

La contamination des eaux douces de surface par le bisphénol A est donc susceptible d'avoir des impacts à long terme sur les populations d'invertébrés aquatiques et il semble important d'établir plus précisément les modes d'actions du bisphénol A chez les invertébrés (Soin et Smagghe, 2007).

1.4.3 Benzo[a]pyrène

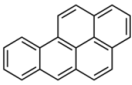
Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés organiques, constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène dont la structure moléculaire comprend au moins deux noyaux aromatiques condensés. Les HAP sont principalement d'origine pétrogénique, c'est-à-dire produits lors de la formation naturelle des énergies fossiles (pétrole et charbon) ou d'origine pyrolytique, produits lors de combustion incomplète de matières organiques telles que les matières végétales ou de combustibles fossiles (charbon, fioul...). Ceux-ci sont ainsi présents dans l'environnement de manière naturelle, mais les HAP sont également massivement produits par les activités humaines de transports ou de chauffage, causant une contamination ubiquitaire de l'environnement. Parmi les HAP, le benzo[a]pyrène a été particulièrement étudié de par son fort potentiel toxique sur les mammifères et son importante présence dans l'environnement. Contrairement à l'ibuprofène et au bisphénol A, le benzo[a]pyrène n'est pas un polluant émergent, et les problématiques liées à sa présence dans l'environnement sont connues dès la deuxième moitié du 20^{ème} siècle. Ce polluant a d'ailleurs été inclus parmi les 33 polluants prioritaires définis en 2001 par la directive cadre sur l'eau (UE, 2001).

1.4.3.1 Origine, devenir et contamination du benzo[a]pyrène dans l'environnement

Contrairement aux deux polluants précédemment présentés, benzo[a]pyrène n'est pas fabriqué volontairement par l'homme et n'a pas d'utilité industrielle en soi. En revanche, le benzo[a]pyrène étant d'origine pyrolytique, les éruptions volcaniques et les feux de forêt représentent des sources naturelles de benzo[a]pyrène dans l'environnement. Mais les principales sources de benzo[a]pyrène dans l'environnement sont liées aux activités humaines, tels que les gaz d'échappements des moteurs thermiques (diesel et essence) et les chauffages résidentiels (combustions de charbon, fioul, bois, et gaz). Le benzo[a]pyrène est ainsi émis en grande partie dans l'atmosphère, où il est majoritairement lié à la phase particulaire du milieu aérien. Le benzo[a]pyrène peut ainsi être transporté sur de grandes distances et contaminer les sols et les eaux de surface via des dépôts atmosphériques secs ou dus aux précipitations (ATDSR, 1995; Srogi, 2007; Delhomme *et al.*, 2008). Le lessivage des particules organiques du sol sur lesquelles le benzo[a]pyrène est adsorbé, ainsi que des revêtements bitumineux ou goudronnés entraîne également le transfert de ce polluant vers les milieux aquatiques (Santé Canada, 1988; Joner *et al.*, 2002). Il existe en outre des sources de rejets directs dans les eaux de surface, via le rejet de déchets pétroliers, d'huiles de moteurs ou de créosote (un produit de traitement du bois à base de goudron),

bien que d'importance secondaire dans la contamination de l'environnement aquatique par le benzo[a]pyrène (Jensen, 1984).

Tableau I.9 - Caractéristiques physico-chimiques du benzo[a]pyrène

Caractéristiques physicochimique	
Nom scientifique	benzo[a]pyrène
Numéro CAS	50-32-8
Structure chimique	
Poids moléculaire (g/mole) ¹	252,3
Solubilité à 25°C (µg/L) ¹	3,8
Coefficient de partage octanol-eau, Log K _{oc} ¹	6,06
Coefficient de partage carbone organique-eau, K _{oc} ¹	5,07.10 ⁶
Tension de vapeur (Pa) (25°C) ¹	7,3.10 ⁻⁷
Constante de Henry (Pa/m ³ /mole) ¹	4,0.10 ⁻¹²

Sources : ¹ INERIS, 2006

Le benzo[a]pyrène, qui possède 5 cycles aromatiques, fait partie des HAP à fort poids moléculaire (Tableau I.9, 252,3 g/mol). Ses 5 cycles aromatiques font du benzo[a]pyrène un composé particulièrement apolaire, peu soluble dans l'eau. La solubilité des HAPs peut néanmoins augmenter en présence de matières organiques dissoutes, comme les acides humiques (Slooff *et al.*, 1989; Pinal *et al.*, 1990; Gobas et Zhang, 1994). Les HAP sont des polluants organiques persistants, c'est-à-dire qu'ils perdurent dans l'environnement longtemps après leur introduction. Ceci est d'autant plus vrai pour les HAP de haut poids moléculaire qui, une fois adsorbés aux particules en suspension ou aux sédiments, sont moins sujets à biodégradation et photo-oxydation que ceux de faible poids moléculaire (Olivella, 2006). Plus particulièrement, le benzo[a]pyrène est stable dans les milieux aquatiques, avec un temps de demi-vie allant de 57 jours à 1,5 an (INERIS, 2006). Sa faible volatilité rend notamment l'épuration des milieux aquatiques par volatilisation négligeable, et sa structure moléculaire le rend non hydrolysable.

De par sa faible solubilité et sa forte lipophilie ($\text{Log}K_{oc} = 6,06$), le benzo(a)pyrène présent dans les milieux aquatiques est fortement adsorbé sur les matières organiques particulaires et colloïdales en suspension ou incorporé dans les sédiments (Bowman *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2004; Olivella, 2006; Turner et Rawling, 2002). La fraction du composé qui est associée aux particules dans un milieu aquatique peut atteindre 88 % (Broman *et al.*, 1991). Cependant, son fort potentiel d'adsorption aux carbones organiques ($K_{oc}=5,07.10^6$) rend la liaison du benzo[a]pyrène aux sédiments dépendant du contenu en carbone organique des sédiments considérés (Zhou et Maskaoui, 2003; Patrolecco *et al.*, 2010). L'adsorption sur les sédiments et particules en suspension entraîne une sous-estimation de la contamination des écosystèmes aquatiques lors du dosage du benzo[a]pyrène dans l'eau. Par exemple, tandis que Patrolecco *et al.* ont mesuré 25 ng/l en phase dissoute dans les eaux du Tibre, la contamination des particules en suspension dans ce site représentaient un équivalent de 103,7 ng/l (Patrolecco *et al.*, 2010). Les phénomènes de bioturbation, de remise en suspension et de désorption peuvent néanmoins remettre le benzo[a]pyrène adsorbés aux sédiments en circulation dans les eaux de surface, pouvant alors être ingérés ou absorbés par les organismes benthiques et pélagiques et ainsi représenter une source importante de contamination (Narbonne *et al.*, 1999; Bowman *et al.*, 2002; Patrolecco *et al.*, 2010; Brinkmann *et al.*, 2013). Il est ainsi délicat d'estimer l'exposition réelle des organismes aquatiques au benzo[a]pyrène.

La lipophilie élevée du benzo[a]pyrène entraîne un fort potentiel de bioaccumulation de ce polluant dans les organismes. Les organismes aquatiques peuvent absorber le benzo[a]pyrène via l'eau, les sédiments ou via leur nourriture (phase particulière en suspension ou autre organismes aquatiques) (Narbonne *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2004; Srogi, 2007; Du *et al.*, 2014). Ce polluant est ainsi retrouvé dans les organismes aquatiques sauvages (Patrolecco *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015). Il a de plus été mis en évidence en laboratoire que le crustacé d'eau douce *Asellus aquaticus* bioaccumule rapidement le benzo[a]pyrène avec un facteur de bioconcentration de plus de 30000 par rapport au milieu environnant. La dépuración de ce polluant est en outre lente et modérée une fois les individus placés en milieu propre (van Hattum B *et al.*, 1998). De même, le chironome (*Chironomus riparius*) bioaccumule rapidement le benzo[a]pyrène avec un facteur de bioconcentration par rapport au milieu de 200 (Leversee *et al.*, 1982). Le facteur de bioconcentration bien plus élevé chez l'aselle que chez le chironome peut être mis en relation avec une biotransformation du benzo[a]pyrène par les chironomes tandis que les aselles ne semblent métaboliser ce polluant que très marginalement.

Les études de contamination des milieux aquatique d'eau douce se concentrent souvent dans les concentrations en benzo[a]pyrène retrouvées dans les sédiments (Fernandes *et al.*, 1999; Yunker

et al., 2002) et peu d'études ont mesuré les concentrations de benzo[a]pyrène dans l'eau. En outre, les milieux aquatiques sont contaminés par de nombreux HAP différents simultanément, et de nombreuses études considèrent des concentrations globales en HAP, sans détailler les concentrations de chaque HAP en particulier. Néanmoins, les mesures réalisées mettent en évidence des teneurs en benzo[a]pyrène dans les eaux de surface jusqu'à 270 ng/l en Europe (Gasperi *et al.*, 2009) et jusqu'à 4,8 µg/l en Chine dans un site avec une activité portuaire et industrielle importante (Zhou et Maskaoui, 2003).

Tableau I.10 - Concentrations environnementales en benzo[a]pyrène mesurées dans les eaux douces mondiales.

Zone étudiée	Type d'échantillon	Fréquence de détection	Concentrations mesurées (ng/l)			Référence
			Moyenne	Médiane	Maximale	
Seine, France	Eau de surface	13 %	-	-	270	(Gasperi <i>et al.</i> , 2009)
Grèce	Eau de surface	-	-	-	1,7	(Manoli <i>et al.</i> , 2000)
Italie	Eau de surface	-	9	-	25,4	(Patrolecco <i>et al.</i> , 2010)
Chine	Eau de surface	-	57,0	1,9	1871,7	(Wu <i>et al.</i> , 2011)
Chine	Eau de surface	-	633	-	4799	(Zhou et Maskaoui, 2003)
Chine	Eau de surface	-	-	-	0,02	(Luo <i>et al.</i> , 2004)
Chine	Eau de surface	-	-	-	0,09	(Zhang <i>et al.</i> , 2015)
France	Eau de pluie	-	81,99	-	205,9	(Delhomme <i>et al.</i> , 2008)
Grèce	Eau de pluie	-	-	-	6,0	(Manoli <i>et al.</i> , 2000)

I.4.3.2 Impact écotoxicologique du benzo[a]pyrène

Le benzo[a]pyrène est classé par l'Union Européenne à la fois comme cancérigène et comme reprotoxique de catégorie 1B, c'est-à-dire comme une substance devant être assimilée à des substances cancérigènes ou reprotoxiques pour l'Homme (INERIS, 2006). Les impacts génotoxiques, reprotoxiques, immunotoxiques mais aussi métaboliques du benzo[a]pyrène ont également été observés chez les vertébrés aquatiques (Potter *et al.*, 1994; Reynaud et Deschaux, 2006; Corrales *et al.*, 2014; Regnault *et al.*, 2014).

Malgré le caractère ubiquiste de la contamination de l'environnement par ce polluant, les études de l'impact du benzo[a]pyrène sur les invertébrés aquatiques se sont surtout intéressées aux espèces marines et estuariennes. Les études sur les invertébrés d'eau douce sont moins fréquentes, bien que celles actuellement disponibles mettent en évidence des impacts de ce HAP à différents niveaux d'intégration biologique (Tableau I.11). Ces études ont montré des effets génotoxiques

(Atienzar et Jha, 2004; Binelli *et al.*, 2008; Webb, 2011; Sánchez-Argüello *et al.*, 2012) du benzo[a]pyrène sur différentes espèces d'invertébrés aquatique, ainsi qu'une modification de l'expression de certains gènes (Lee *et al.*, 2006; Ha et Choi, 2008, 2009; Riaz *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2013) ou du protéome (Riva *et al.*, 2011). Il a notamment été montré au sein du LECA de Grenoble que l'exposition de larves de moustiques à 1 µg/l de benzo[a]pyrène pendant 24h augmente leur tolérance aux insecticides chimiques, associé à la suractivation de la fonction de détoxification (Riaz *et al.*, 2009). Plusieurs études mettant en jeu une exposition chronique à des doses relativement faibles ont montré des modifications de paramètres liés au développement et à la reproduction des individus d'eau douce (Atienzar et Jha, 2004; Ha et Choi, 2009; Sánchez-Argüello *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2014) ou marins (Bang *et al.*, 2009). Plus particulièrement, une étude récente portant sur une exposition sédimentaire de chironomes (*Chironomus dilutus*) durant la totalité de leur cycle de vie a mis en évidence l'impact du benzo[a]pyrène sur la viabilité, la croissance, et le temps de développement des individus (Du *et al.*, 2014). Adoptant une approche originale plus fonctionnelle, Mermillod-Blondin *et al* ont montré l'impact du benzo[a]pyrène sur la fonction écologique de vers tubifex (*Tubifex tubifex*) au sein d'un mésocosme. En effet, la contamination des sédiments inhibe la bioturbation du milieu due aux vers tubifex, empêchant ainsi la stimulation de la dénitrification et des activités déshydrogénase et hydrolitique des micro-organismes, affectant ainsi une fonction écologique importante de cette espèce au sein d'un écosystème (Mermillod-Blondin *et al.*, 2013).

Les mécanismes génotoxiques du benzo[a]pyrène sont relativement bien compris. Ceux-ci sont dus à la formation d'intermédiaires électrophiles au cours du processus de détoxification, pouvant se lier de manière covalente à l'ADN et ainsi former des adduits, particulièrement au niveau des guanines et des adénines. D'autre part, le benzo[a]pyrène induit la production d'espèces réactives de l'oxygène pouvant provoquer un stress oxydant et une peroxydation lipidique contribuant également l'effet génotoxique. Les impacts génotoxiques du benzo[a]pyrène étant bien connus, ils sont souvent recherchés en première intention dans les études écotoxicologiques. Néanmoins, les HAPs sont connus depuis longtemps pour avoir la capacité de perturber la mue chez les crustacés, et pour entraîner des modifications de traits d'histoire de vie liées à une perturbation de la régulation hormonale chez le crustacé marin *Tigriopus japonicus* (Bang *et al.*, 2009). De plus, le benzo[a]pyrène est capable d'augmenter la réponse aux ecdystéroïdes dans un système de cellules sensibles à ces hormones (Oberdörster *et al.*, 1999). Le potentiel de ce polluant à perturber la signalisation hormonale chez les invertébrés pourrait donc également être pris en compte lors des études écotoxicologiques, notamment en réalisant des expositions chroniques comprenant tout le cycle de vie des organismes étudiés (Bang *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2014). Parmi les études portées à notre connaissance, seule une a étudié l'impact du benzo[a]pyrène sur la

descendance des individus exposés (Atienzar et Jha, 2004). Dans leur étude sur la daphnie, les auteurs mettent en évidence que certains dommages induits à l'ADN chez les individus exposés sont retrouvés chez la descendance non exposée. Néanmoins, les conséquences de ces impacts sur la descendance n'ont pas été évaluées par les auteurs de l'étude.

Alors qu'il a été mis en évidence à de nombreuses reprises le potentiel du benzo[a]pyrène à impacter la physiologie des organismes aquatiques, les conséquences à long terme en terme populationnel de la contamination des écosystèmes aquatiques d'eau douce restent donc peu étudiées.

Tableau I.11 - Impacts écotoxicologiques du benzo[a]pyrène sur les invertébrés

Espèce étudiée	Embranchement	Type d'exposition	Concentrations d'exposition	Effets biologique observé	Concentrations effectives	Référence
Chironome <i>Chironomus riparius</i>	Arthropode	Aigue (24h)	5 - 50 - 500 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● Test de survie ● ↑ expression hémoglobine HbA, HbB, HbC, HbD HbE 	CE ₅₀ = 31,6 mg/l 5 à 500 µg/l selon type Hb	(Ha et Choi, 2008)
Chironome <i>Chironomus tentans</i>	Arthropode	Aigue (24h)	5 - 50 - 500 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● Réponse stress thermique : ↑ transcription HSP70 et HSC70 ● ↑ transcription hémoglobines HbA et HbB 	dès 8 µg/l 8 et 80 µg/l	(Lee <i>et al.</i> , 2006)
Chironome <i>Chironomus tentans</i>	Arthropode	Aigue (24h)	10 - 100 - 1000 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● ↑ transcription CYP9A12 	dès 100 µg/l	(Nair <i>et al.</i> , 2013)
Chironome <i>Chironomus dilutus</i>	Arthropode	Cycle de vie complet	13,2 - 116 - 128 - 183 - 290 - 331 - 539 - 657 µg/g de carbone organique	<ul style="list-style-type: none"> ● ↑ létalité à 48 jours ● ↓ croissance ● ↓ taux d'émergence ● ↑ temps d'émergence 	CE ₅₀ = 56,9 µg/g CE ₅₀ = 41,1 µg/g dès 116 µg/g dès 13,2 µg/g	(Du <i>et al.</i> , 2014)
Moustique <i>Aedes aegypti</i>	Arthropode	Aigue (24h)	1 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● ↑ tolérance larvaire aux insecticides ● ↑ expression et activité des cytochromes P450 ● ↑ activité des S-tranférases 	1 µg/l	(Riaz <i>et al.</i> , 2009)
Daphnie <i>Daphnia magna</i>	Crustacé	Aigue (24h)	0,02 - 0,2 - 2 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● Test d'immobilité ● ↑ expression hémoglobine Hb1, Hb2, Hb3, Hb4 	CE ₅₀ = 29,3 µg/l 0,02 à 2 µg/l selon type Hb	(Ha et Choi, 2009)
Daphnie <i>Daphnia magna</i>	Crustacé	Chronique (21 jours)	0,02 - 0,2 - 2 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● ↓ nombre de descendants par femelle 	dès 0,02 µg/l	(Ha et Choi, 2009)
Daphnie <i>Daphnia magna</i>	Crustacé	Chronique (3 jours)	50 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● ↓ taux de survie ● ↓ nombre de descendants par femelle ● Dommages à l'ADN chez les individus exposés ● Dommages à l'ADN chez la descendance 		(Atienzar et Jha, 2004)
Crevette d'eau douce <i>Palaemonetes australis</i>	Crustacé	Chronique (14 jours)	0,01 - 0,1 - 1 mg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● ↑ activité ECOD ● ↓ 8-oxo-dG 	dès 0,01 mg/l dès 0,01 mg/l	(Webb, 2011)
Moule zébrée <i>Dreissena polymorpha</i>	Mollusque	96 à 168 h	0,1 - 2 - 10 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● Dommages à l'ADN 	dès 0,1 µg/l	(Binelli <i>et al.</i> , 2008)
Moule zébrée <i>Dreissena polymorpha</i>	Mollusque	Chronique (7 jours)	0,1 - 2 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● Modification du protéome des branchies 	dès 0,1 µg/l	(Riva <i>et al.</i> , 2011)
Physa <i>Physa acuta</i>	Mollusque	Chronique (21 jours)	5 - 10 - 20 - 40 - 50 - 100 - 1000 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● ↓ taux d'éclosion des œufs – embryotoxicité ● ↑ apoptose des cellules embryonnaires ● ↑ génotoxicité 	dès 20 µg/l dès 50 µg/l dès 5 µg/l	(Sánchez-Argüello <i>et al.</i> , 2012)
<i>Tigriopus japonicus</i>	Crustacé	Cycle de vie complet	0,1 - 1 - 10 - 30 - 100 µg/l	<ul style="list-style-type: none"> ● ↓ survie au stade larvaire nauplie ● ↓ survie au stade copépode ● ↑ temps de développement ● ↑ du taux de mâles ● ↓ du taux de femelles pondantes ● retardement de la première ponte ● ↓ taille des femelles adultes ● ↓ taille des mâles adultes 	1 et 10 µg/l 100 µg/l dès 1 µg/l 0,1 à 30 µg/l 100 µg/l 30 et 100 µg/l 100 µg/l dès 0,1 µg/l	(Bang <i>et al.</i> , 2009)

I.5 Problématique et objectifs de la thèse

Dans un contexte de pollution chronique des eaux de surface par de nombreux polluants d'origines diverses, cette thèse a pour objectif d'identifier et d'approfondir la compréhension des impacts de la pollution sur les populations d'insectes aquatiques. L'étendue et la complexité des questions biologiques abordées au cours de cette thèse ont guidé le choix d'un travail en conditions contrôlées de laboratoire, sur une espèce modèle d'insecte aquatique : le moustique *Aedes aegypti*. Notre approche est constituée de deux parties distinctes, s'intéressant à des échelles d'intégrations biologiques et temporelles différentes (Figure I.4). La démarche adoptée a été motivée par trois questions biologiques principales :

Quelles sont les conséquences de l'exposition chronique des populations d'insectes aquatiques à la pollution urbaine des eaux de surface ?

Comment évoluent les populations exposées à cette pollution durant plusieurs générations ?

Quels sont les mécanismes impliqués dans les perturbations observées ?

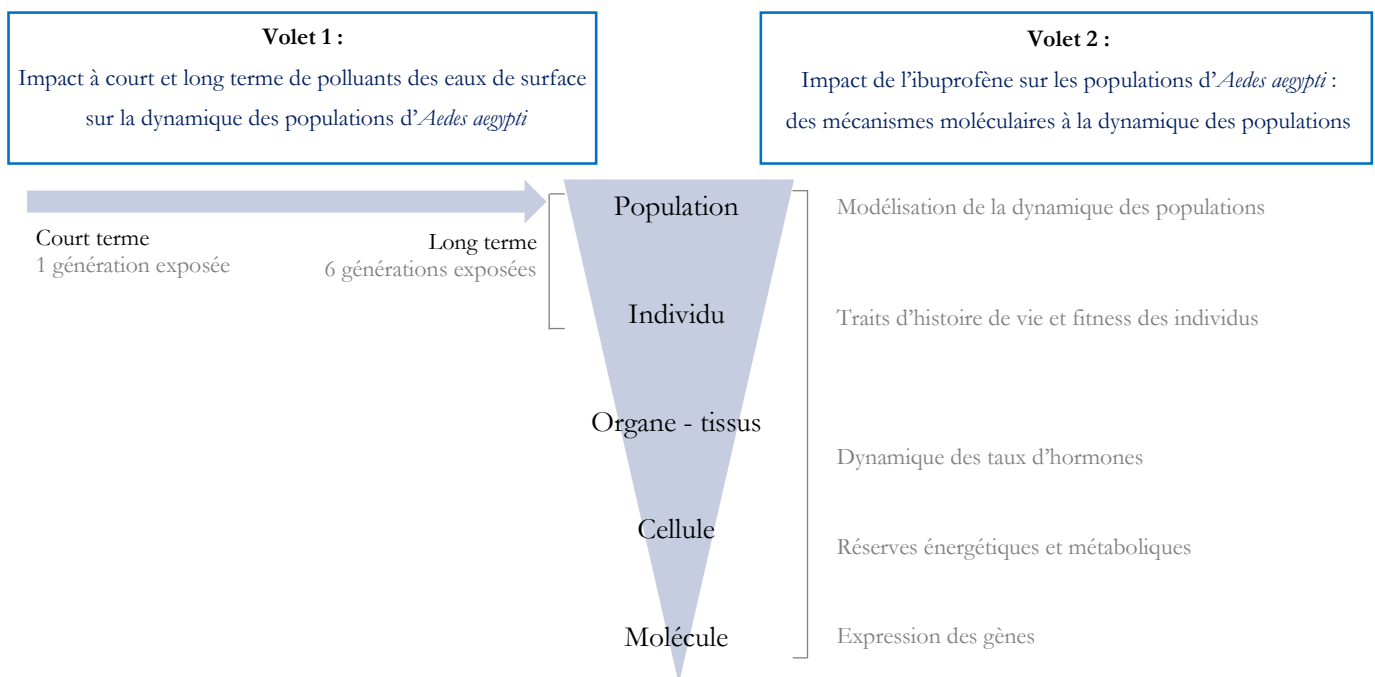


Figure I.4 - Niveaux d'intégration temporels et biologiques pris en compte dans l'évaluation de l'impact de polluants ubiquitaires des eaux de surface sur les populations de moustiques *Aedes aegypti*.

Dans la première partie de ce travail, nous avons évalué l'impact de différents polluants sur la dynamique des populations de moustiques *Aedes aegypti* à court et long terme. Ces travaux se sont concentrés sur l'ibuprofène, le bisphénol A et le benzo[a]pyrène, trois polluants détectés de manière récurrente dans les eaux de surface au niveau mondial. Une analyse bibliographique préliminaire a notamment mis en évidence le potentiel de ces trois polluants à perturber le système hormonal et métabolique des invertébrés aquatiques et plus particulièrement des insectes. De façon à étudier plus spécifiquement des perturbations hormonales et métaboliques éventuelles chez individus exposés aux polluants, nous avons décidé de nous intéresser à plusieurs traits d'histoire de vie liés au développement et à la reproduction de ces individus. Lors de l'évaluation de l'impact à **court terme**, les populations exposées à un gradient de concentrations de polluants seuls ou en mélange ont été suivies tout au long de leur cycle de vie de manière à mettre en évidence d'éventuelles modifications des traits d'histoire de vie étudiés. L'évaluation à **long terme** de l'impact des polluants a concerné l'étude des cycles de vie de populations après 6 générations d'exposition successives à la plus faible concentration de polluants seuls ou en mélange.

Le deuxième volet de la thèse s'est plus particulièrement intéressé à l'étude des mécanismes impliqués dans les modifications des traits d'histoire de vie induites par une exposition à l'ibuprofène à faible concentration. Une approche intégrant différentes échelles biologiques a été adoptée, avec l'établissement de données moléculaires, métaboliques et hormonales pouvant être mises en relation avec les modifications individuelles et populationnelles induites par l'ibuprofène mesurée lors du premier volet de la thèse. De façon à appréhender l'impact de l'ibuprofène dans sa globalité, l'approche mécanistique s'est intéressée aux phases larvaire et imaginale des individus exposés à l'ibuprofène, mais également au stade larvaire de leur descendance. Les traits d'histoire de vie mesurés au cours du volet 1 ont notamment été complétés avec l'étude de la durée de vie des imagos et à la tolérance des larves de la descendance à une privation totale de ressource alimentaire. L'impact direct de l'ibuprofène sur la physiologie des larves élevées en milieu pollué a été évalué par l'étude de leur transcriptome, grâce à une technique de séquençage massif des ARN messagers (mRNAseq). L'impact indirect d'une exposition larvaire à l'ibuprofène sur les réserves métaboliques et le statut transcriptionnel des femelles imagos et de leur descendance ont été évalués par une approche de résonance magnétique nucléaire à haute résolution en rotation à angle magique (RMN-HRMAS) et par mRNAseq respectivement. Parallèlement à cela, la dynamique hormonale et transcriptionnelle a été étudiée au cours de la maturation des ovocytes chez les femelles imagos, permettant d'évaluer une perturbation lors de cette phase clef de la reproduction chez *Aedes aegypti*.

Le travail effectué au cours de cette thèse inclut ainsi une approche globale de la réponse des populations d'insectes aux stress environnementaux induits par des polluants ubiquitaires des eaux de surface. L'originalité de notre démarche réside dans l'étude de **faibles concentrations** environnementales à **court terme** et également à **long terme**.

II. EFFETS DES POLLUANTS SUR LES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE DES POPULATIONS

II.1	Objectifs de l'étude	67
II.2	Démarche expérimentale et méthodologies adoptées.....	67
II.2.1	Conditions d'élevage en laboratoire.....	67
II.2.1.1	Exposition des populations aux polluants	69
II.2.1.2	Préparation des milieux pollués.....	70
II.2.1.3	Contrôle des concentrations de polluants présents dans les milieux au cours du temps...70	
II.2.2	Dispositif expérimental de l'étude à court terme.....	72
II.2.2.1	Etude des traits d'histoire de vie des populations	72
II.2.2.2	Tolérance des populations aux insecticides	75
II.2.3	Dispositif expérimental de l'étude à long terme	76
II.2.4	Mesure et analyse des traits d'histoire de vie	78
II.2.4.1	Temps de développement des individus.....	78
II.2.4.2	Taux de mortalité durant le développement.....	79
II.2.4.3	Sex-ratio des populations.....	79
II.2.4.4	Fécondité et fertilité des individus	79
II.2.4.5	Taille alaire des imagos.....	79
II.2.4.6	Analyse statistique des traits d'histoire de vie	80
II.2.5	Mesure et analyse de la tolérance des populations aux insecticides.....	81
II.3	Résultats.....	82
II.3.1	Concentration en polluants dans les milieux d'exposition	82
II.3.2	Impact à court terme de l'exposition aux polluants sur les traits d'histoire de vie des populations ..84	
II.3.2.1	Impact de l'ibuprofène.....	84
II.3.2.2	Impact du benzo[a]pyrène.....	87
II.3.2.3	Impact du bisphénol A	91
II.3.2.4	Impact de l'ibuprofène, du bisphénol A et du benzo[a]pyrène en mélange.....	91
II.3.3	Impact des polluants sur les traits d'histoire de vie des populations après 6 générations d'exposition..94	
II.3.3.1	Impact de l'ibuprofène.....	94
II.3.3.2	Impact du benzo[a]pyrène.....	97
II.3.3.3	Impact du bisphénol A	97

II.3.3.4	Impact de l'ibuprofène, du bisphénol A et du benzo[a]pyrène en mélange.....	101
II.3.3.5	Impact des polluants à court et long terme sur la tolérance aux insecticides.....	104
II.4	Discussion	105
II.4.1	Conséquences à court terme de l'exposition aux polluants sur le cycle de vie des individus...	105
II.4.2	Conséquence de l'exposition multigénérationnelle aux polluants.....	109
II.4.3	Impact des polluants en mélange sur le développement des individus.....	111
II.4.4	Conséquences de la contamination des milieux sur la capacité vectorielle des individus	112
II.4.5	Conclusions.....	113

II.1 Objectifs de l'étude

Ce premier volet de la thèse visait à identifier les impacts de trois polluants communs des eaux de surface, l'ibuprofène, le bisphénol A et le benzo[a]pyrène, sur les populations de de moustique *Aedes aegypti*. Ce volet cherchait d'autre part à évaluer si la présence de ces trois polluants en mélange dans le milieu modifiait les effets constatés sur les populations lors des expositions individuelles. Outre les impacts de ces environnement pollués à court terme, c'est-à-dire sur la première génération exposée, cette étude avait également pour objectif d'identifier quels pouvaient être les impacts de ces pollutions lorsque les populations y étaient soumises durant plusieurs générations successives.

De manière à révéler des modifications pouvant avoir des conséquences directes sur la dynamique des populations, les traits d'histoire de vie des populations exposées aux polluants ont été étudiés. Les traits permettant d'évaluer le potentiel de survie mais aussi de reproduction des individus ont plus particulièrement été mesurés, à commencer par le **temps de développement** et le **taux de mortalité** associé au développement des individus. Le **sex-ratio**, la **taille des imagos** émergeant des milieux contaminés, leur **fertilité** et leur **fécondité** ont également été étudiés. La capacité des individus au sein d'une population à se reproduire étant liée à leur capacité à engendrer une descendance viable, le temps de développement, le taux de mortalité associé au développement et le sex-ratio de la descendance des individus exposés aux polluants ont été mesurés. Ces mesures sur la descendance ont été réalisées en milieu propre de manière à évaluer strictement la capacité des individus exposés aux polluants à assurer leur descendance.

II.2 Démarche expérimentale et méthodologies adoptées

II.2.1 Conditions d'élevage en laboratoire

De manière à minimiser au mieux la variabilité entre les différentes expérimentations, les conditions d'élevage des populations ont été standardisées tout au long des travaux de cette thèse, que ce soit pour l'évaluation de l'impact des polluants étudiés à court terme et à long terme (Volet 1) mais aussi pour l'évaluation des mécanismes d'action de l'ibuprofène (Volet 2). Les expérimentations ont été menées sur la souche de laboratoire d'*Aedes aegypti* « Liverpool », originaire d'Afrique de l'ouest et introduite en laboratoire dans les années 1930 (Kuno, 2010). Cette souche a servi de référence au séquençage du génome d'*Aedes aegypti*, et nous a été fournie par le Dr Catherine Bourgoïn de l'institut Pasteur de Paris. Les stades aquatiques (larves et nymphes) ont été

élevés à une température de 29,5 °C (± 0.5), et soumis à un cycle artificiel jour/nuit de 16h/8h. Dès la première heure suivant l'éclosion des larves et jusqu'à l'émergence des imagos, les individus ont été élevés dans des cristallisoirs en verre à raison d'un individu par millilitre de milieu, et nourris régulièrement au cours de leur développement avec des granulés de foin broyés, selon les quantités indiquées dans le tableau II.1. Le milieu de base d'élevage des larves est simplement composé d'eau du robinet de Grenoble. En effet, cela est possible car l'eau du réseau potable fournie par le Syndicat Intercommunal des Eaux de la Région Grenobloise (SIERG) est captée directement dans les nappes souterraines d'altitude où elle est naturellement filtrée. Elle ne nécessite ainsi aucun traitement chimique préalable à la mise en circulation dans les réseaux de distribution. Les paramètres physicochimiques de cette eau ne présentent pas de variations saisonnières ou journalières (communication personnelle de la Régie des Eaux de Grenoble). Des analyses chimiques contrôlant la présence de polluants métalliques ou organiques sont disponibles sur demande auprès de la Régie des Eaux de Grenoble, et ne mettent pas en évidence de contamination de cette eau. De manière à éviter le relargage de xénobiotiques dans les milieux d'élevage, ou au contraire l'adsorption des polluants étudiés, nous avons évité au maximum le contact des milieux d'élevage avec des éléments en plastique, et favorisé au maximum l'utilisation de contenants en verre.

Tableau II.1 - Dose de nourriture apportée aux individus au cours de leur développement

Jour de culture	0	2	3	4	6	7	8	10
Dose de nourriture (mg/ individu)	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2

Les imagos ont été placés dans des cages d'élevage (Bugdorm, MegaView Science Educational Services Co, Taichung, Taiwan) moins de 12 heures après leur émergence. Les imagos ont été élevés dans des conditions d'insectarium correspondant à une température de 28°C, un taux d'humidité à 80% ainsi qu'un cycle artificiel jour/nuit de 16h/8h. Un accès illimité à l'eau et à une solution de sucrose 10 % a été permis aux imagos, leur fournissant les ressources énergétiques nécessaires au maintien des fonctions de base. La maturation et la ponte des œufs ont été déclenchées chez les femelles par la mise à disposition de repas de sang au moment voulu. Ces repas de sang ont été effectués sur des souris, maintenues en stabulation dans une animâlerie agréée (n° B 38 421 10 001) et manipulées en accord avec les normes européennes et les recommandations du comité d'éthique chargé du dossier (ComEth Grenoble - C2EA - 12).

II.2.1.1 Exposition des populations aux polluants

Les impacts de l'ibuprofène, du bisphénol A et du benzo[a]pyrène seuls ou en mélange sur les populations de moustiques *Aedes aegypti* ont été évalués à court ainsi qu'à long terme. Pour cela, des populations d'individus ont été exposés aux polluants de manière chronique, à partir de l'heure suivant l'éclosion des œufs, jusqu'à l'émergence des imagos. Chaque exposition a été effectuée dans les conditions standardisées de densité, de température et d'alimentation présentées précédemment.

L'exposition chronique des individus aux polluants a été réalisée de manière semi-dynamique, c'est-à-dire avec un remplacement du milieu par un milieu contaminé fraîchement préparé toutes les 48 heures. Lors de chaque exposition aux polluants, une population témoin provenant des mêmes lots d'œufs, exposée au solvant (éthanol), a été élevée en parallèle. Les milieux témoins complétés avec le solvant ont également été remplacés toutes les 48 heures.

Les concentrations de base d'exposition aux polluants ont été sélectionnées pour simuler une pollution importante des milieux tout en conservant une cohérence vis-à-vis des doses mesurées dans l'environnement (Tableau II.2, colonne x1). Pour le bisphénol A et l'ibuprofène, ces concentrations de base ont servi de point d'origine à des gammes de concentration dix et cent fois plus élevées (Tableau II.2, colonne x10 et x100). Dans le cas du benzo[a]pyrène, la gamme testée comprend des concentrations deux et dix fois supérieures à la concentration de base (Tableau II.2, colonne x2 et x10). Aucune concentration n'a été testée au-delà de 6 µg/l pour le benzo[a]pyrène étant donné sa limite de solubilité dans l'eau pure à 25°C (3,8 µg/l). L'impact de ces polluants en mélange a également été testé, en ajoutant au milieu les trois polluants étudiés à leur concentration de base (Tableau II.2, mélange x1), ou à leur concentration x10 (Tableau II.2, mélange x10). Ainsi, onze conditions d'exposition différentes ont été testées.

Tableau II.2 - Concentrations d'exposition aux polluants

	concentrations de base x1	x2	x10	x100
Ibuprofène	1 µg/l		10 µg/l	100 µg/l
Bisphénol A	0,4 µg/l		4 µg/l	40 µg/l
Benzo[a]pyrène	0,6 µg/l	1,2 µg/l	6 µg/l	
	Mélange x1		Mélange x10	

II.2.1.2 Préparation des milieux pollués

L'ibuprofène (98% de pureté, CAS no. 15687-27-1), le bisphénol A (>99% de pureté, CAS no. 80-05-7) et le benzo[a]pyrène (97% de pureté, CAN no. 50-32-8) ont été fournis par Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Des solutions mères d'environ 10 mg/l ont été réalisées dans de l'éthanol 96% (HPLC grade), aliquotées et stockées à l'obscurité à -20°C. Ces aliquotes ont servi à la préparation des milieux pollués tout au long des travaux de cette thèse, de nouvelles aliquotes étant utilisées à chaque préparation d'un nouveau milieu. Les milieux ont été préparés en ajoutant les volumes adéquats de solutions mères des différents polluants à de l'eau du robinet. Les quantités d'éthanol ont été ajustées dans chaque milieu pour atteindre 0,2 % d'éthanol final, dans les milieux pollués et témoins.

II.2.1.3 Contrôle des concentrations de polluants présents dans les milieux au cours du temps

Les concentrations de polluants effectivement présentes dans les milieux, et leur évolution au cours des 48 heures séparant deux changements de milieux ont été contrôlées. Pour cela, des milieux contaminés par les plus faibles concentrations de polluants (concentrations x1) fraîchement préparées ont été placés dans les mêmes contenants et les mêmes conditions de lumière et de température que les populations exposées lors de nos expérimentations. Des échantillons de 500 ml ont été prélevés après 0h, 24h et 48h de culture dans ces conditions (Figure II.1, partie gauches). De façon à évaluer l'impact de la présence de larves sur les concentrations en polluants dans les milieux contaminés, des milieux contenant une larve par millilitre ont été cultivés en parallèle, et échantillonnés après 48h de culture (Figure II.1, partie droite). Les échantillons prélevés ont été stockés à -20°C en attendant le dosage des polluants présents dans le milieu. Ces dosages ont été effectués par Rovaltain research company (Alixan, France). L'ibuprofène a été extrait des milieux par un procédé d'extraction à phase solide puis dosé par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse haute résolution (LC-HRMS/MS). Le bisphénol A et le benzo[a]pyrène ont été extraits des milieux par « extraction par barreau aimanté absorbant », basée sur l'adsorption des polluants sur un barreau aimanté absorbant Twister© (Gestel GmbH & Co. KG, Allemagne) puis dosés en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS/MS). La variabilité de l'extraction et du dosage a été établie par l'extraction et le dosage de 5 milieux de contrôle formés avec des standards analytiques en parallèle des échantillons expérimentaux. La justesse des dosages ainsi que la variabilité associée à l'extraction et au dosage sont présentés dans le tableau II.3. Le dosage des échantillons a été effectué en duplicata, et la concentration établie pour chaque milieu est basée sur la moyenne de ces deux mesures. L'évolution du pH et de la

conductivité au cours du temps a été mesurée dans ces milieux de manière à vérifier un impact éventuel de l'ajout de polluants au milieu.

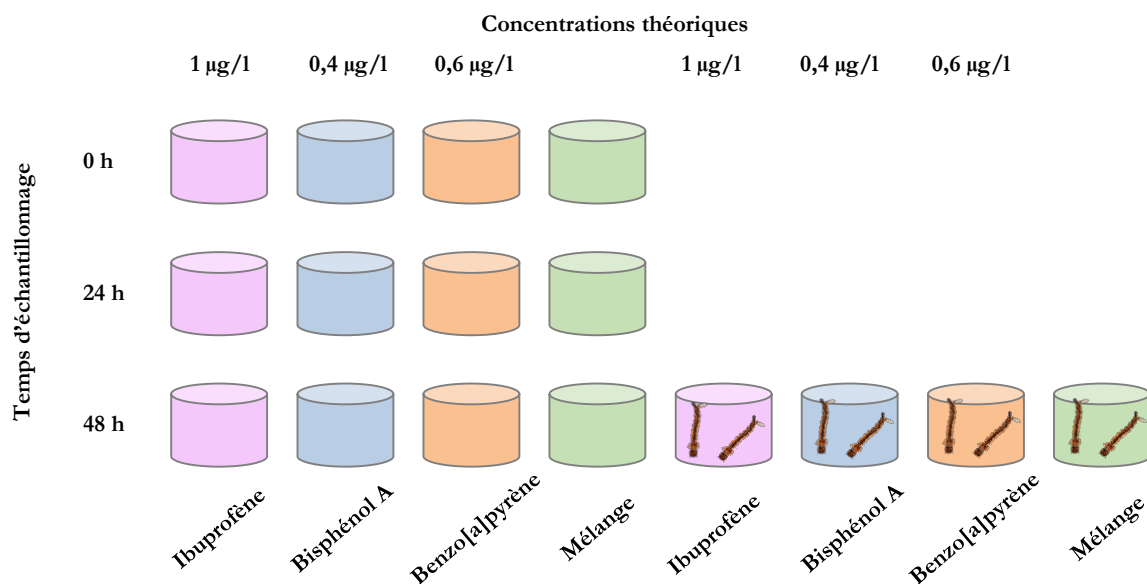


Figure II.1 - Dispositif expérimental d'échantillonnage pour la mesure des concentrations effectives de polluants dans les milieux au cours du temps.

Tableau II.3 - Variabilité de l'extraction et du dosage des polluants étudiés dans les milieux de contrôle établis avec les standards analytiques.

	Ibuprofène	Bisphénol A	Benzo[a]pyrène
Concentration en standard analytique (µg/l)	1	0,5	0,5
Concentration moyenne mesurée (µg/l) ± 2x écart-type	0,99 ± 0,07	0,52 ± 0,08	0,51 ± 0,16
Variation (% de déviation standard relative)	3,7	7,6	15,7

II.2.2 Dispositif expérimental de l'étude à court terme

II.2.2.1 Etude des traits d'histoire de vie des populations

L'évaluation de l'impact à court terme des polluants étudiés sur les populations de moustiques *Aedes aegypti* a été effectuée séparément pour les quatre types de pollutions testées (ibuprofène, bisphénol A, benzo[a]pyrène et mélange). Trois réplicats de populations de 100 larves écloses dans l'heure ont été formés pour chaque condition de polluant et de concentration testée (Figure II.2).

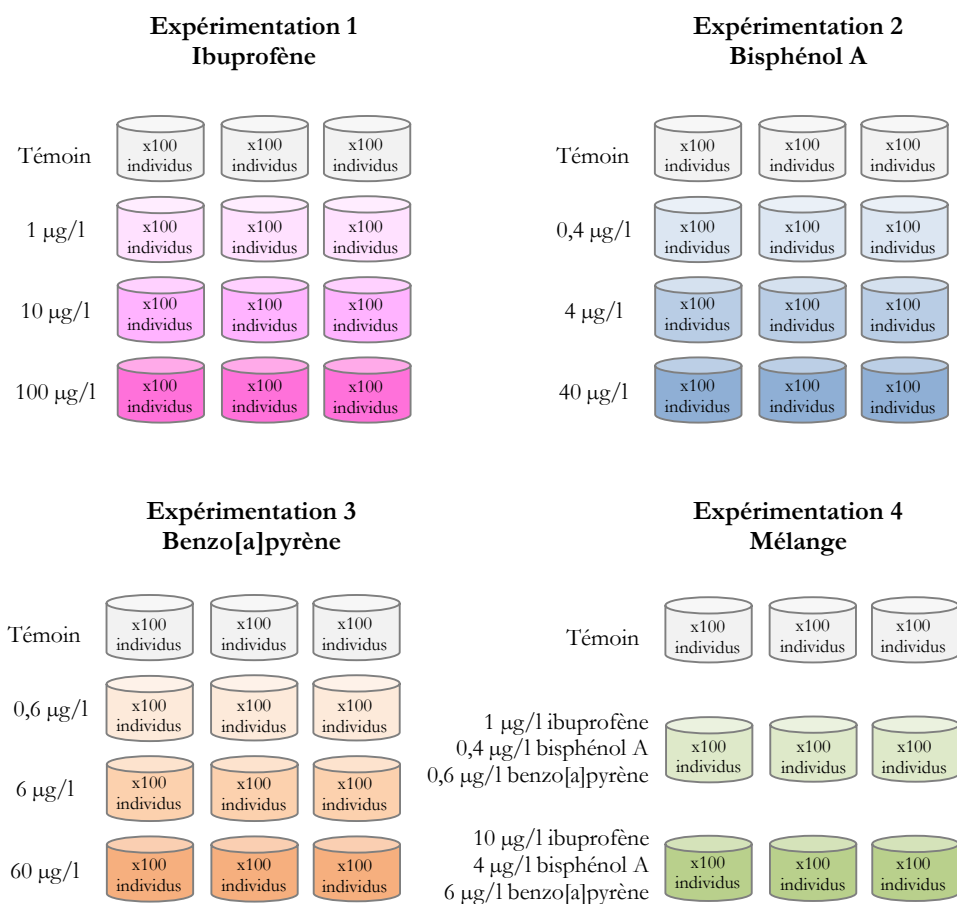
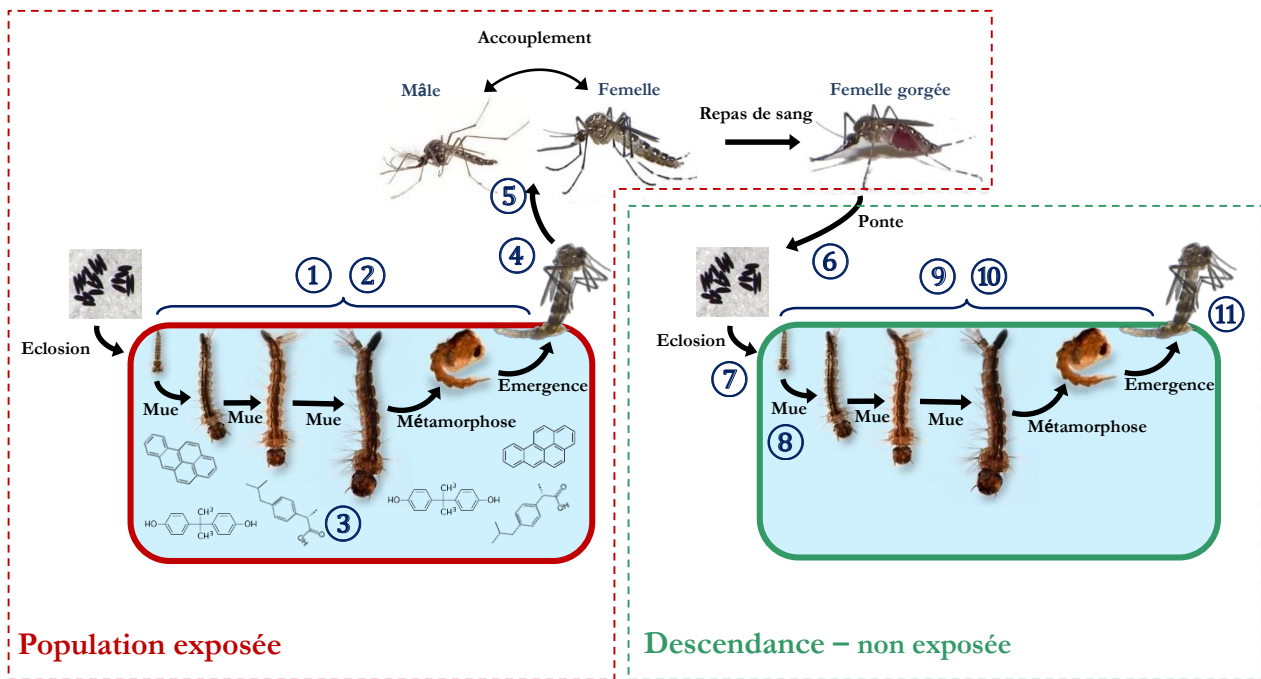


Figure II.2 - Dispositif expérimental de l'évaluation à court terme de l'impact des polluants sur les populations.



Population exposée

Descendance – non exposée

Traits mesurés

Développement des individus exposés

- ① - Temps de développement
- ② - Taux de mortalité associé au développement
- ④ - Sex-ratio
- ⑤ - Taille des imagos
- Tolérance aux stress**
- ③ - Tolérance aux insecticides

Potentiel reproductif des individus exposés

- ⑥ - Nombre d'œufs pondus
- ⑦ - Taux d'écllosion des pontes
- ⑧ - Nombre de descendance produite
- ⑨ - Temps de développement de la descendance
- ⑩ - Taux de mortalité associé au développement de la descendance
- ⑪ - Sex-ratio de la descendance

Figure II.3 - Suivi de l'impact de l'ibuprofène, du bisphénol A et du benzo[a]pyrène à court terme
 Etude du cycle de vie des individus exposés aux polluants et de leur descendance non exposée.

Les traits d'histoire de vie de ces populations exposées ont été mesurés tout au long du cycle de vie des individus de la population (Figure II.3 : encadré rouge). Les imagos émergés de ces populations exposées ont été comptés, sexés et collectés précautionneusement toutes les 10 ou 14 h alternativement jusqu'à l'émergence de la totalité des individus des populations, permettant ainsi de mesurer le temps de développement, le taux de mortalité associé au développement, la taille des imagos et le sex-ratio des populations exposées (Figure II.3 : 1-2-4). La capacité à se reproduire de ces imagos a également été évaluée par la mesure du nombre d'œufs pondus, du taux d'écllosion des pontes produites et du nombre de larves engendrées (Figure II.3 : 6-7-8). Pour cela, les imagos de chaque réplicat ont été placés dans des cages d'élevage différentes, permettant ainsi des accouplements entre mâles et femelles d'un même réplicat. Quinze jours après le début de l'expérimentation, un repas de sang a été mis à disposition des femelles durant 1h. Les femelles non gorgées ont été retirées immédiatement après, ainsi que les coupelles d'eau afin d'éviter le

déclenchement de ponte dans la cage. Trois jours après le repas de sang, 10 femelles gorgées par réplicat (c'est-à-dire 30 par condition) ont été isolées dans de petites boîtes de pétri tapissées de papier-filtre humide servant de support de ponte. Les œufs ainsi pondus ont par la suite été comptés de manière à évaluer la fertilité de chaque femelle individuellement (Figure II.3 : 6). Les papiers couverts d'œufs de chaque femelle ainsi obtenus ont été individuellement submergés dans du milieu d'éclosion de manière à provoquer une éclosion massive et rapide de plus de 95% des œufs féconds. Pour évaluer la fécondité de chaque femelle, les papiers d'œufs ont été laissés dans le milieu d'éclosion afin de comptabiliser d'éventuelles éclosions tardives, permettant ainsi de déterminer le taux d'éclosion de chaque ponte ainsi que le nombre de descendants viables à l'éclosion (Figure II.3 : 7 et 8). Après l'isolement des femelles pour les mesures de fertilité et fécondité, les imagos de la génération parentale restants ont été collectés et conservés pour réaliser les mesures de taille alaire afin d'estimer la taille des individus des différentes populations (Figure II.3 : 5), la taille des imagos étant connue pour être directement corrélée à la longueur alaire des individus (Christophers, 1960; Clements, 1992). La taille des femelles étant également corrélée à l'abondance des pontes (Christophers, 1960; Clements, 1992), les femelles isolées pour les mesures de fertilité et de fécondité ont pour leur part été collectées après la ponte et conservées individuellement afin de pouvoir établir la corrélation de la taille alaire de chaque femelle à l'abondance de leur ponte respective, de manière à maîtriser un facteur confondant potentiel.

En vue d'évaluer la viabilité et la qualité des descendance engendrées par les populations exposées, les cycles de vie de ces descendance ont été étudiés en milieu non pollué (Figure II.3 : encadré vert). Une heure après l'immersion des papiers de pontes individuels, les larves écloses ont été comptées et les descendance de chaque femelle provenant d'un même réplicat ont été regroupées en lots. Trois réplicats de 100 larves ont été isolés de chaque lot, formant ainsi 9 réplicats de descendance pour chaque condition d'exposition testées. Les réplicats de 100 larves de la descendance ont été placés en milieu non pollué, dans les mêmes conditions standards que la génération parentale. Comme chez les générations parentales, le temps de développement, le taux de mortalité associé au développement et le sex-ratio des descendants ont été mesurés (Figure II.3 : 9-10-11).

II.2.2.2 Tolérance des populations aux insecticides

L'impact de l'exposition aux plus faibles concentrations de polluants sur la tolérance des individus au stress provoqué par deux insecticides utilisés dans le contrôle des populations de moustiques a également été mesurée (Figure II.3 : 3). Cette étude a fait l'objet d'une expérimentation indépendante. Deux insecticides aux modes d'actions très différents et couramment utilisés comme larvicides dans le contrôle des populations de moustiques ont été testés : le Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*), une bactérie produisant un cristal protéique composé de plusieurs toxines et le téméphos, un insecticide chimique de la classe des organophosphorés. Pour cela, 1000 larves provenant du même lot d'œufs ont été exposées dès l'éclosion des œufs, au solvant, à l'ibuprofène (1 µg/l), au bisphénol A (0,4 µg/l), au benzo[a]pyrène (0,6 µg/l) ou au mélange des trois (Figure II.4 : partie haute).

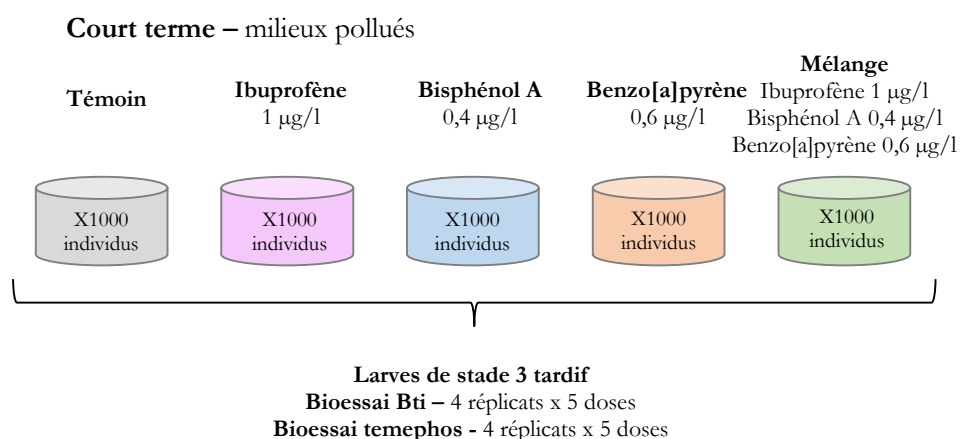


Figure II.4 - Dispositif expérimental de l'étude de la tolérance aux insecticides des populations exposées à court terme aux polluants.

II.2.3 Dispositif expérimental de l'étude à long terme

L'impact à long terme de la pollution des milieux de vie par les plus faibles concentrations d'ibuprofène (1 µg/l), de bisphénol A (0,4 µg/l) ou de benzo[a]pyrène (0,6 µg/l) seuls ou en mélange a été étudié. Pour cela, cinq souches ont été élevées en parallèles, et exposées à chaque génération aux trois polluants testés, à leur mélange ou au solvant durant 6 générations (Figure II.5), formant ainsi les populations « Ibu », « BPA », « B[a]P », « Mix » et « Témoin » (Tableau II.4).

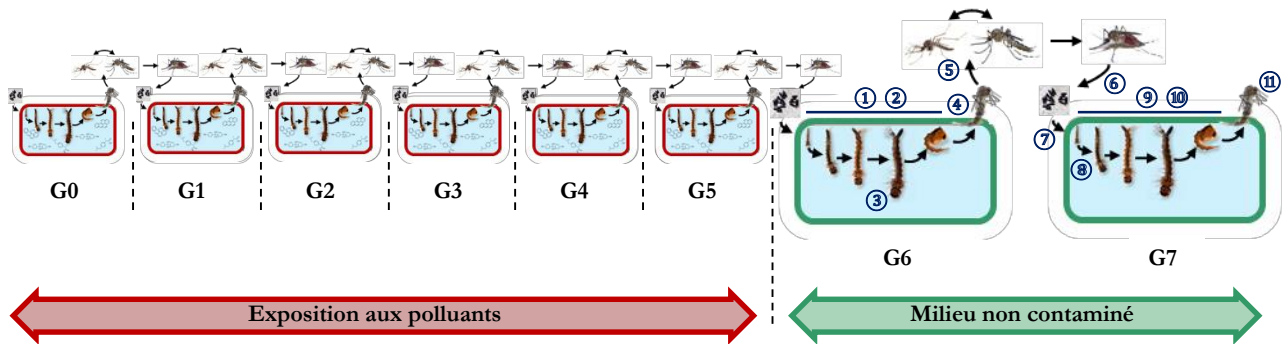


Figure II.5 - Dispositif expérimental de l'étude de l'impact à long terme de l'exposition aux polluants - Etude du cycle de vie des individus de la 6ème génération et de leur descendance, non exposés aux polluants.

Tableau II.4 - Description des populations élevées pour l'étude à long terme de l'impact des polluants

Nom de la population	Description des conditions d'élevage	Concentration d'exposition
Témoin	Exposition au solvant	Ethanol 0,2 %
Ibu	Exposition à l'ibuprofène	1 µg/l
B[a]P	Exposition au benzo[a]pyrène	0,6 µg/l
BPA	Exposition au bisphénol A	0,4 µg/l
Mix	Exposition simultanée à l'ibuprofène, au bisphénol A et au benzo[a]pyrène	ibuprofène 1 µg/l bisphénol A 0,4 µg/l benzo[a]pyrène 0,6 µg/l

A chaque génération, 1500 larves de stade 1 fraîchement écloses ont été placées dans un milieu pollué ou non selon la population, et cultivées dans les mêmes conditions standardisées que celles utilisées lors de l'étude à court terme. Les imagos quotidiennement émergés ont été transférés dans une cage d'élevage jusqu'à l'émergence du dernier individu de la population. Un repas de sang a été offert durant 1h aux femelles deux fois par semaine, et ce durant 6 semaines, lorsque les femelles commencent à mourir naturellement. Les papiers-supports d'œufs ont été collectés deux fois par semaine, séchés et stockés à température ambiante jusqu'au début de la génération suivante. Chaque génération est ainsi espacée d'environ 3 mois.

Les œufs produits par les imagos de génération 5 ont servi à réaliser l'étude des traits d'histoire de vie de ces populations exposées dans les mêmes conditions que lors de l'étude à court terme (Figure II.3). De façon à étudier l'impact héritable de cette exposition multigénérationnelle aux polluants, l'étude des cycles de vie des individus de la génération 6 et leur descendance a été faite en milieu non pollué (Figure II.5) de manière identique à l'étude à court terme.

Par ailleurs, l'impact à long terme de l'exposition chronique aux faibles doses de polluants sur la tolérance au Bti et au Téméphos a été mesuré sur des individus de la G6 des populations établies lors de l'étude à long terme. Pour cela, 1000 larves issues des pontes de la G5 des populations Témoin, Ibu, BPA, B[a]P et Mix ont été élevées en milieux propres, dans les mêmes conditions standardisées que lors de l'étude à court terme (Figure II.6).

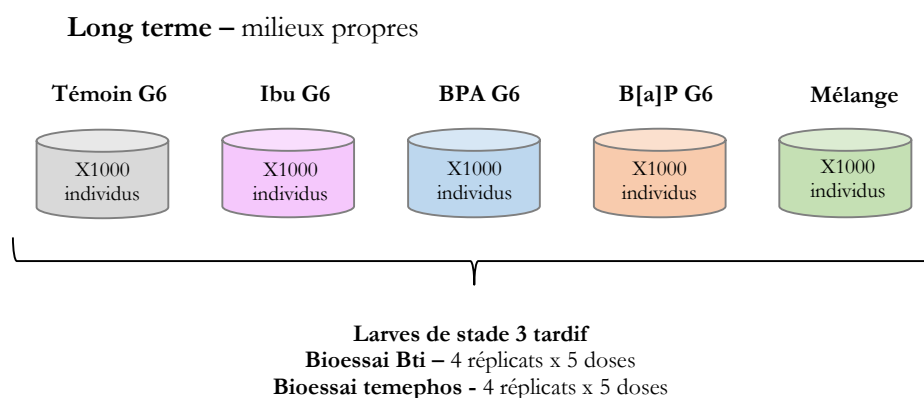


Figure II.6 - Dispositif expérimental de l'étude de la tolérance aux insecticides des populations exposées à long terme aux polluants

II.2.4 Mesure et analyse des traits d'histoire de vie

II.2.4.1 Temps de développement des individus

Le temps de développement est ici défini comme le nombre d'heures entre l'éclosion des œufs et l'émergence des imagos. Le nombre d'imagos émergés a été comptabilisé toutes les 10 ou 14 heures jusqu'à l'émergence de la totalité des individus de chaque réplikat. Les données obtenues sont ainsi basées sur au moins 250 individus pour les populations exposées et 600 individus pour leur descendance. Les courbes représentant la proportion d'individus émergés en fonction du temps ont été comparées entre les populations exposées et leurs populations témoins respectives, c'est-à-dire cultivées en parallèle, à l'aide d'un test de survie de Kaplan-Meier, permettant ainsi de tester statistiquement des différences globales entre les courbes. Afin de quantifier plus précisément les modifications du temps de développement des individus, le temps d'émergence médian **EmT₅₀** de chaque réplikat a été déterminé individuellement à partir de l'équation de la portion linéaire des courbes (figure II.7). Ces portions linéaires ont été définies à partir d'au minimum 5 points, avec un coefficient de corrélation R^2 supérieur à 0,90. Les **EmT₅₀** moyens au sein de chaque condition ont servi à comparer les temps de développement des populations soumises aux différentes conditions de pollution.

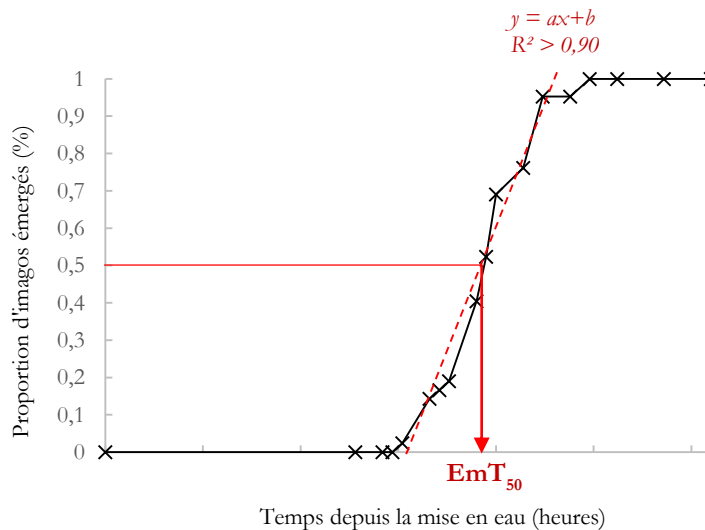


Figure II.7 - Méthode de détermination du temps de développement médian des populations observées

II.2.4.2 Taux de mortalité durant le développement

Pour chaque condition, le **taux de mortalité** durant le développement a été défini comme le pourcentage de larves n'ayant pas émergé.

II.2.4.3 Sex-ratio des populations

Les individus des populations parentales et de la descendance ont été sexés après leur émergence. Les données obtenues sont basées sur au moins 250 individus pour les populations exposées et 600 individus pour leur descendance.

II.2.4.4 Fécondité et fertilité des individus

La **fécondité** des individus est ici définie comme le nombre d'œufs pondus par chaque femelle lors de la première ponte. La **fertilité** des individus est ici définie comme le taux d'éclosion de ces pontes. Le taux d'éclosion des pontes de chaque femelle individuelle prend en compte le nombre de larves ayant éclos dans les 7 jours suivant l'immersion des papiers de pontes dans le milieu d'éclosion.

II.2.4.5 Taille alaire des imagos

A la suite des mesures de fertilité et fécondité, les individus mâles et femelles des populations parentales (G0) ont été collectés et tués par congélation à -20°C puis séchés à température ambiante durant 7 jours minimum. Les ailes gauche et droite de chaque imago ont été disséquées et montées à sec entre lame et lamelle. Les ailes ont été photographiées sous loupe binoculaire à un grossissement x25, et la taille entre l'apex de l'alule (Figure II.8, point A) et l'extrémité périphérique de la veine R3 (Figure II.8, point B) a été mesurée grâce au logiciel « Axiovision microscopy » (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Allemagne). Les mesures des ailes droites et gauches ont été moyennées pour chaque individu.

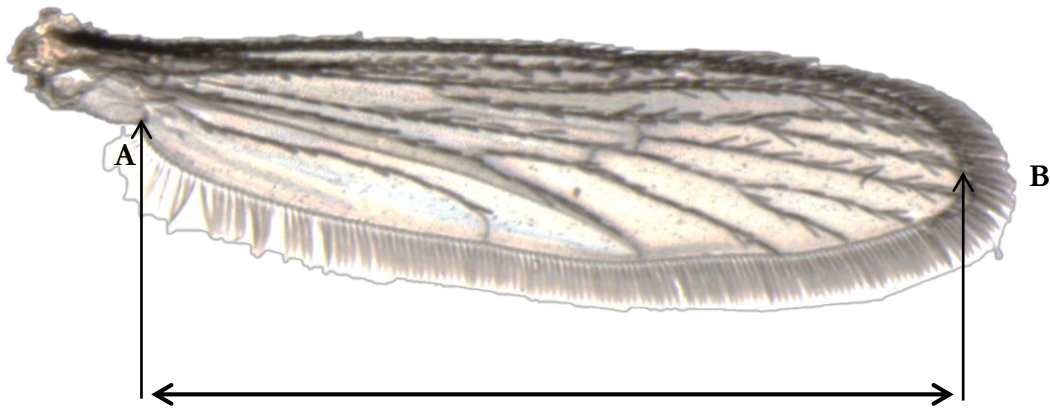


Figure II.8 - Mesure de la taille alaire entre l'apex de l'alule (A) et l'extrémité périphérique de la veine R3

II.2.4.6 Analyse statistique des traits d'histoire de vie

Durant l'étude à court terme, les paramètres mesurés dans chaque population de 100 individus ont été comparés à l'aide de statistiques multivariées au sein d'une même expérimentation, comprenant les trois concentrations du polluant testées et le témoin associé. La méthode de Holm a été utilisée pour corriger les p-valeurs issues des comparaisons multiples. Ainsi, pour évaluer l'impact des différents types d'exposition sur l'**EmT**₅₀, le nombre d'œufs par femelle et le taux d'éclosion des pontes associées, un test ANOVA a été utilisé après avoir vérifié la normalité et l'homoscédasticité des données, suivi d'un test T par condition corrigé pour les comparaisons multiples. Les longueurs alaires médianes des mâles et des femelles ont été comparées à l'aide d'un test Kruskal-Wallis. Les paramètres représentés par des proportions d'individus dans la population (taux de mortalité et pourcentage de femelles) ont été comparés à l'aide de Chi-2 d'homogénéité suivi de test post-hoc de comparaison des conditions deux à deux.

Lors de l'étude à long terme, les paramètres de chaque population « exposée » (Ibu, BPA, B[a]P et Mix) ont été comparés individuellement avec les paramètres de la population Témoin. Ainsi, des tests statistiques univariés ont été employés. L'**EmT**₅₀, le nombre d'œufs par femelle et le taux d'éclosion des pontes associées ont été comparés à l'aide d'un test de Student après avoir vérifié la normalité et l'homoscédasticité des données. Les taux de mortalité associés au développement et le pourcentage de femelles dans les populations ont été comparés à l'aide de Chi-2 d'homogénéité.

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R 3.0.3 (R Development Core Team, 2007)

II.2.5 Mesure et analyse de la tolérance des populations aux insecticides

Les bioessais ont été effectués après 4 jours de culture, avec des larves de stade 3. Lors de ce test de toxicité, des lots de 20 larves ont été placés dans des gobelets plastiques contenant 50 ml de solution d'insecticide. Chaque dose d'insecticide a été testée en quadruplicats (figure II.9). Une gamme de 5 concentrations différentes d'insecticides allant de 0 % à 100 % de mortalité a été testée pour chaque insecticide. La solution stock de téméphos (Abate, Bayer, France) a été préparée dans de l'éthanol pur, et a été diluée dans de l'eau du robinet pour des concentrations finales de 1, 6, 12, 18 et 30 $\mu\text{g}/\text{l}$. Les bioessais au bioinsecticide *Bacillus thuringiensis israelensis* ont été effectués avec des volumes de 2, 10, 20, 35, 50 μl d'une culture mère de Bti. La mortalité larvaire a été mesurée après 24h d'exposition aux insecticides et la concentration létale pour 50% des individus (CL_{50}) a été calculée avec un intervalle de confiance à 95% à l'aide du module Log-Probit du logiciel XLSTAT (Addinsoft). La comparaison de sensibilité des différentes populations à ces deux insecticides a été effectuée en comparant la CL_{50} des populations exposées aux polluants ou issues d'expositions multi-générationnelles aux populations témoins correspondantes.

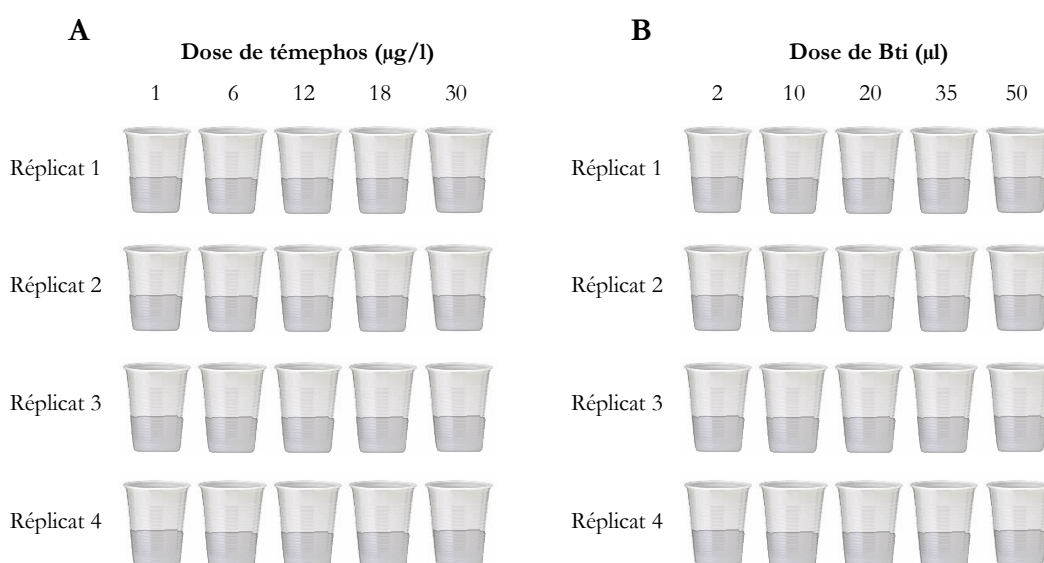


Figure II.9 - Principe et mise en place des bioessais aux larvicides téméphos (A) et Bti (B)

II.3 Résultats

II.3.1 Concentration en polluants dans les milieux d'exposition

Les mesures de concentration d'ibuprofène, de bisphénol A et de benzo[a]pyrène à 0h sont proches des concentrations théoriques attendues dans les milieux, bien que celles-ci tendent à être inférieure pour le bisphénol A (0,3 µg/l) et supérieure pour le benzo[a]pyrène (0,7 µg/l) (Tableau II.5). L'augmentation de la concentration au cours du temps constatée pour l'ibuprofène et le bisphénol A est surprenante, mais reste tout de même modérée au vu des variabilités mesurées lors de l'extraction, avec + 15,8 % entre 0 et 48h pour l'ibuprofène et + 19,4 % pour le bisphénol A. Ces valeurs différentes mesurées au cours du temps pourraient ainsi être simplement due à la variabilité expérimentale du dosage. En revanche, la concentration en benzo[a]pyrène décroît rapidement dès les 24 premières heures de culture, pour atteindre une diminution de 67 % après 48h de culture. La présence des trois polluants de manière simultanée dans le milieu ne paraît pas affecter la dynamique de la concentration des polluants au cours du temps (Tableau II.5). La présence de larves dans les milieux durant les 48h de culture n'influence pas non plus les concentrations d'ibuprofène et de bisphénol A mesurées dans les milieux après 48h. Il est en revanche impossible de conclure dans le cas du benzo[a]pyrène tant les concentrations mesurées dans le milieu sont proches de la limite de détection du dosage (Tableau II.5).

Tableau II.5 - Evolution des concentrations de polluants dans les milieux contaminés aux cours du temps. La concentration des molécules mères des polluants seuls ou en mélange a été suivie durant les 48h séparant deux changements de milieux en l'absence de toute larve ou nourriture (0h, 24h, 48h) ou en présence de larves de stade 4 (1 larve/ml). La variabilité propre à l'extraction de chaque polluant est présentée en gris, entre parenthèse

	Limite de détection (µg/l)	Concentration théorique (µg/l)	Concentrations mesurées (µg/l)			
			Temps depuis la mise en culture			
			0 h	24 h	48 h	48 h avec larves
Ibuprofène (3,7 %)	0,10	1	0,85	0,96	1,01	1,01
Ibuprofène - en mélange (3,7 %)	0,10	1	0,86	0,93	1,02	1,01
Bisphénol A (7,6 %)	0,10	0,4	0,29	0,33	0,36	0,36
Bisphénol A - en mélange (7,6 %)	0,10	0,4	0,28	0,33	0,36	0,35
Benzo[a]pyrène (15,7 %)	0,15	0,6	0,7	0,33	0,23	<0,15
Benzo[a]pyrène - en mélange (15,7 %)	0,15	0,6	0,79	0,33	0,17	<0,15

La conductivité et le pH des milieux d'exposition ont été mesurés de façon à vérifier un éventuel impact des molécules chimiques sur ces paramètres pouvant induire un facteur confondant dans notre étude (Tableau II.6). La conductivité des milieux d'élevage ne semble pas varier au cours des 48h de culture dans les milieux témoins, avec une variation maximale mesurée de $15 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Ces variations semblent légèrement plus accentuées dans les milieux pollués par l'ibuprofène ($33 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ de différence), le bisphénol A ($32 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ de différence), le benzo[a]pyrène ($31 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ de différence) et le mélange ($51 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ de différence). Ces variations de conductivité n'excèdent pas 12 % de la conductivité mesurées. Le pH évolue également au cours du temps de 0,6 unités maximum, ce qui est dans la marge de variation maximale (1,5 unités pH) acceptée par les tests chroniques OCDE établis sur la daphnie (OCDE, 2012). La présence des différents polluants n'influe pas sur le pH des milieux d'exposition.

Tableau II.6 – Evolution de la conductivité et du pH des milieux pollués au cours du temps.

	Conductivité ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)			pH		
	Temps depuis la mise en culture			Temps depuis la mise en culture		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h
Témoin	420	426	410	8,2	8,8	8,7
Ibuprofène 1 $\mu\text{g}/1$	424	422	391	8,2	8,8	8,5
Bisphénol A 0,4 $\mu\text{g}/1$	418	411	386	8,2	8,8	8,5
Benzo[a]pyrène 0,6 $\mu\text{g}/1$	426	418	385	8,2	8,8	8,5
Mélange x1	422	419	371	8,2	8,8	8,4

II.3.2 Impact à court terme de l'exposition aux polluants sur les traits d'histoire de vie des populations

II.3.2.1 Impact de l'ibuprofène

Les traits d'histoire de vie des populations élevées en milieu contaminé par 1, 10 et 100 µg/l d'ibuprofène sont présentés dans le tableau II.7. L'exposition à l'ibuprofène n'induit pas de modification du temps de développement (Figure II.10 : A, B, C), du taux de mortalité, du sex-ratio ou de la taille des individus élevés en milieu contaminé, quelle que soit la concentration testée. Alors que la fécondité et la fertilité des femelles n'apparaissent pas modifiées, la qualité de leur descendance semble affectée par l'exposition à l'ibuprofène. En effet, les individus de la descendance présentent un développement accéléré, avec temps d'émergence médian réduit de 4,8 à 6,0 % chez les mâles et de 8,1 à 9,0 % chez les femelles (Tableau II.7 ; Figure II.10 : D). Cette accélération significative du développement est confirmée lorsque l'on compare les courbes d'émergence au sein des populations témoins et exposées dans leur globalité (Figure II.10 : E, F). Cet effet n'est cependant pas dépendant de la concentration d'exposition des populations parentales, les EmT_{50} ne différant pas significativement selon la dose d'exposition des populations parentales.

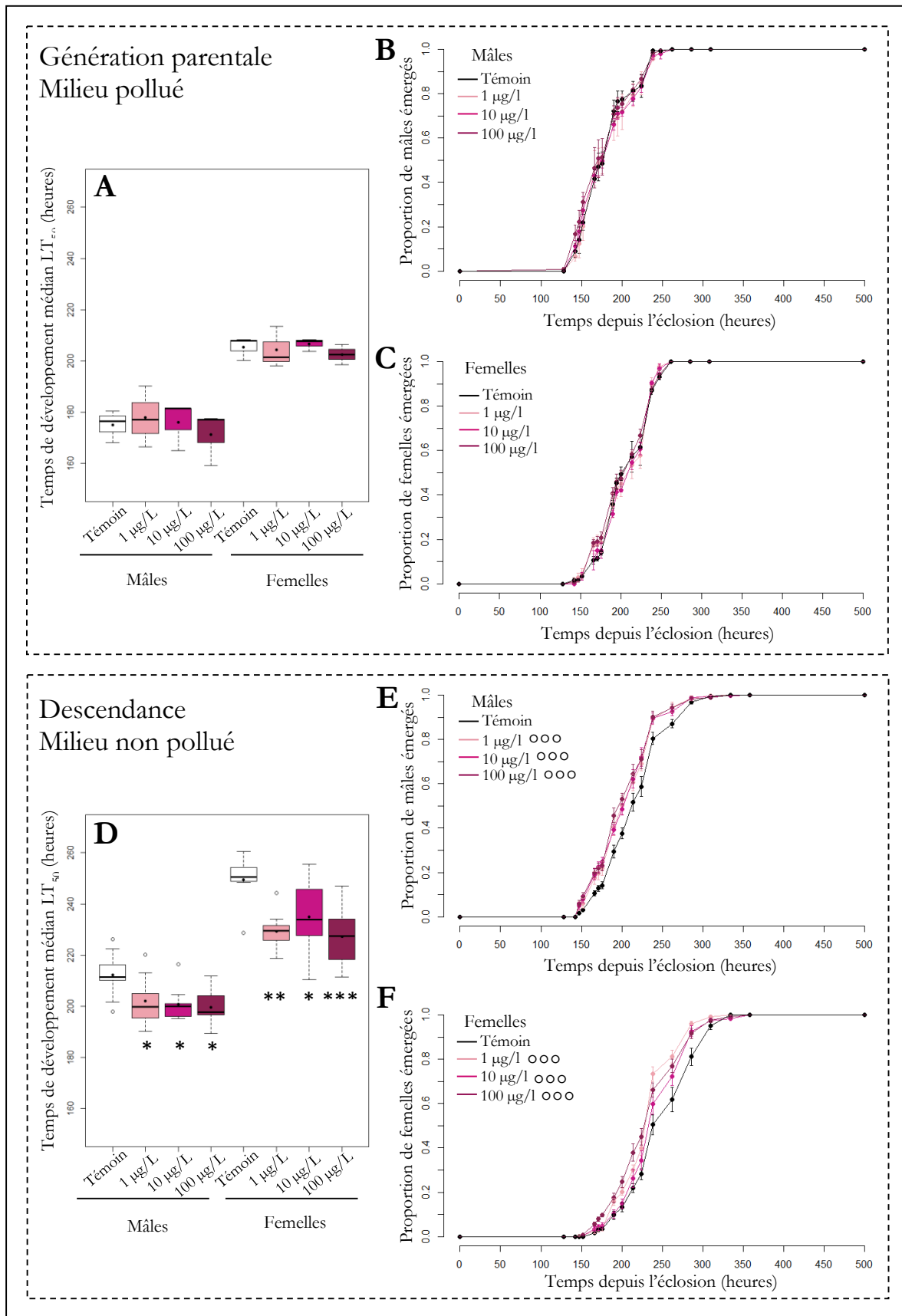


Figure II.10 - Impact à court terme de l'ibuprofène sur le temps de développement des individus exposés et leur descendance. Le temps entre l'éclosion des larves et l'émergence des imagos a été mesuré chez les individus exposés à 1, 10 ou 100 $\mu\text{g/l}$ d'ibuprofène (A, B, C) et leur descendance non exposée (D, E, F). A, D : distribution des EmT_{50} parmi les réplicats des populations étudiées. Les médianes sont représentées par les larges barres horizontales et les moyennes par les larges points noirs. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparé à la population témoin selon un test ANOVA. B, C, D, E, F : Proportion d'imagos émergés au cours du temps \pm erreur standard. \circ $p < 0,01$; $\circ\circ$ $p < 0,001$ comparé à la population Témoin selon un test de Kaplan-Meier.

Tableau II.7 - Impact de l'ibuprofène sur les traits d'histoire de vie des populations exposées et sur leur descendance non exposée. Les mesures de traits ont été effectuées sur trois réplicats de 100 individus des générations parentales et 9 réplicats de 100 individus de leur descendance. Les intervalles de confiance 95% des traits mesurés dans les différents réplicats sont présentés entre crochets.

	Génération parentale								Descendance			
	Temps d'émergence médian EmT ₅₀ (heures)		Taux de mortalité	Proportion de femelles	Taille alaire moyenne (µm)		Fécondité des femelles Nombre d'œufs pondus	Fertilité des femelles Taux d'éclosion des pontes	Temps d'émergence médian EmT ₅₀ (heures)		Taux de mortalité	Proportion de femelles
	♂	♀			♂	♀			♂	♀		
Témoin - solvant	175,0 [159,4-190,7]	205,4 [194,0-216,8]	20,2 % [15,6-24,8]	46,4 % [40,1-52,7]	1670,6 [1639,9-1701,4]	2178,78 [2128,8-2228,8]	57,4 [48,4-66,4]	74,0 % [67,8-80,1]	212,3 [205,4-219,2]	249,6 [241,8-257,3]	5,5 % [4,0-7,0]	46,7 % [43,3-50,0]
Ibuprofène 1 µg/l	178,0 [148,3-207,6]	204,3 [184,2-224,5]	16,7 % [12,4-20,9]	52,8 % [46,6-59,0]	1679,7 [1647,2- 1711,7]	2131,6 [2084,0-2179,2]	51,9 [43,8-60,0]	69,0 % [61,3-76,7]	202,0 * [194,7-209,3]	229,3 ** [223,8-234,9]	7,2 % [5,5-8,9]	50,0 % [46,6-53,4]
Ibuprofène 10 µg/l	176,0 [152,5-199,5]	206,7 [200,5-212,8]	19,0 % [14,6-23,5]	46,4 % [40,1-52,6]	1646,8 [1622,6- 1671,1]	2168,5 [2124,0-2212,9]	53,0 [45,5-60,6]	67,3 % [61,3-76,7]	200,3 * [195,9-205,9]	234,8 * [224,0-245,7]	7,4 % [5,7-9,1]	45,7 % [42,4-56,3]
Ibuprofène 100 µg/l	171,3 [145,3-197,3]	202,5 [192,6-212,4]	20,0 % [15,5-24,6]	49,1 % [42,8-55,5]	1661,9 [1638,2-1685,6]	2138,8 [2095,3-2182,2]	51,8 [44,1-59,5]	69,9 % [63,2-76,5]	199,5 * [218,6-235,8]	227,2 *** [193,6-205,5]	7,5 % [5,7-9,2]	48,0 % [44,6-51,4]

* p<0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p <0,001 selon un test de Student (EmT₅₀, Fécondité des femelles, Fertilité des femelles), un test de Wilcoxon (Taille alaire) ou un test du Chi-2 (Taux de mortalité, Proportion de femelles)

II.3.2.2 Impact du benzo[a]pyrène

La contamination des milieux par 0,6, 1,2 ou 6 µg/L de benzo[a]pyrène modifient les traits d'histoire de vie des populations parentes et de leur descendance de manière différente selon les concentrations étudiées. Les populations parentales présentent une augmentation du taux de mortalité durant le développement, avec 2 % de mortalité observés dans les populations témoins et 5,4 et 10,2 % de mortalité observés dans les populations élevées dans un milieu contaminé respectivement par 0,6 et 1,2 µg/l de benzo[a]pyrène (Tableau II.8). Étonnamment, aucune modification de la mortalité n'est observée parmi les populations parentales exposées à 6 µg/l de benzo[a]pyrène. Les imagos mâles exposés à 1,2 et 6 µg/L de benzo[a]pyrène durant leur développement sont significativement plus grands que les mâles issus des populations témoin, avec une augmentation respective de 2,7 et 4,5 % de leur taille alaire (Tableau II.8). Les mâles exposés à 0,6 µg/l de benzo[a]pyrène et les femelles issues des milieux contaminés avec les trois concentrations testées ne présentent en revanche pas de modification significative de leur taille alaire. Les sex-ratios des populations parentales exposées au benzo[a]pyrène et de leur descendance n'apparaissent pas non plus modifiés, de même que la fertilité et la fécondité des femelles exposées (Tableau II.8).

Hormis un ralentissement du développement de 15,7 heures des mâles de la génération parentale exposés à 6 µg/l de benzo[a]pyrène, représentant une diminution de 8,8 % du temps de développement par rapport aux individus témoins (Tableau II.8 ; Figure II.11 : A, B), le temps de développement des individus parentaux exposés aux trois concentrations n'est pas modifié. La descendance des populations exposées aux doses les plus faibles de benzo[a]pyrène présente néanmoins une accélération significative du développement des mâles et des femelles. En effet, les mâles issus des populations exposées à 0,6 et 1,2 µg/l de benzo[a]pyrène présentent une diminution respective du EmT_{50} de 5,5 et 5,2 % chez les mâles (Tableau X ; Figure II.11 : E) et de 5,8 et 6,4 % chez les femelles (Tableau II.8 ; Figure II.11 : D). Ces diminutions du temps de développement médian sont confirmées par la comparaison des courbes d'émergence au sein des descendance des populations témoins et exposées au benzo[a]pyrène dans leur globalité (Figure II.11 : E, F). Les accélérations du développement chez les descendance des populations exposées aux plus faibles concentrations sont associées à une nette augmentation de la mortalité durant le développement des descendance. Alors que la descendance des populations témoins présente un taux de mortalité associé au développement de 5,9 %, un taux de 13,6 % est mesuré dans la descendance des populations exposées à 0,6 µg/l et de 17,0 % dans la descendance des populations exposées à 1,2 µg/l (Tableau II.8).

Les traits de descendance des populations exposées à la plus forte concentration de benzo[a]pyrène apparaissent moins impactés, le temps de développement des mâles et le taux de mortalité durant de développement n'étant pas affectés de manière significative. Une accélération modérée du développement des femelles est cependant tout de même observée, avec une diminution de 7,1 heures du EmT_{50} , représentant 3,0 % du temps de développement médian des femelles témoin (Tableau II.8, Figure II.11, D,F).

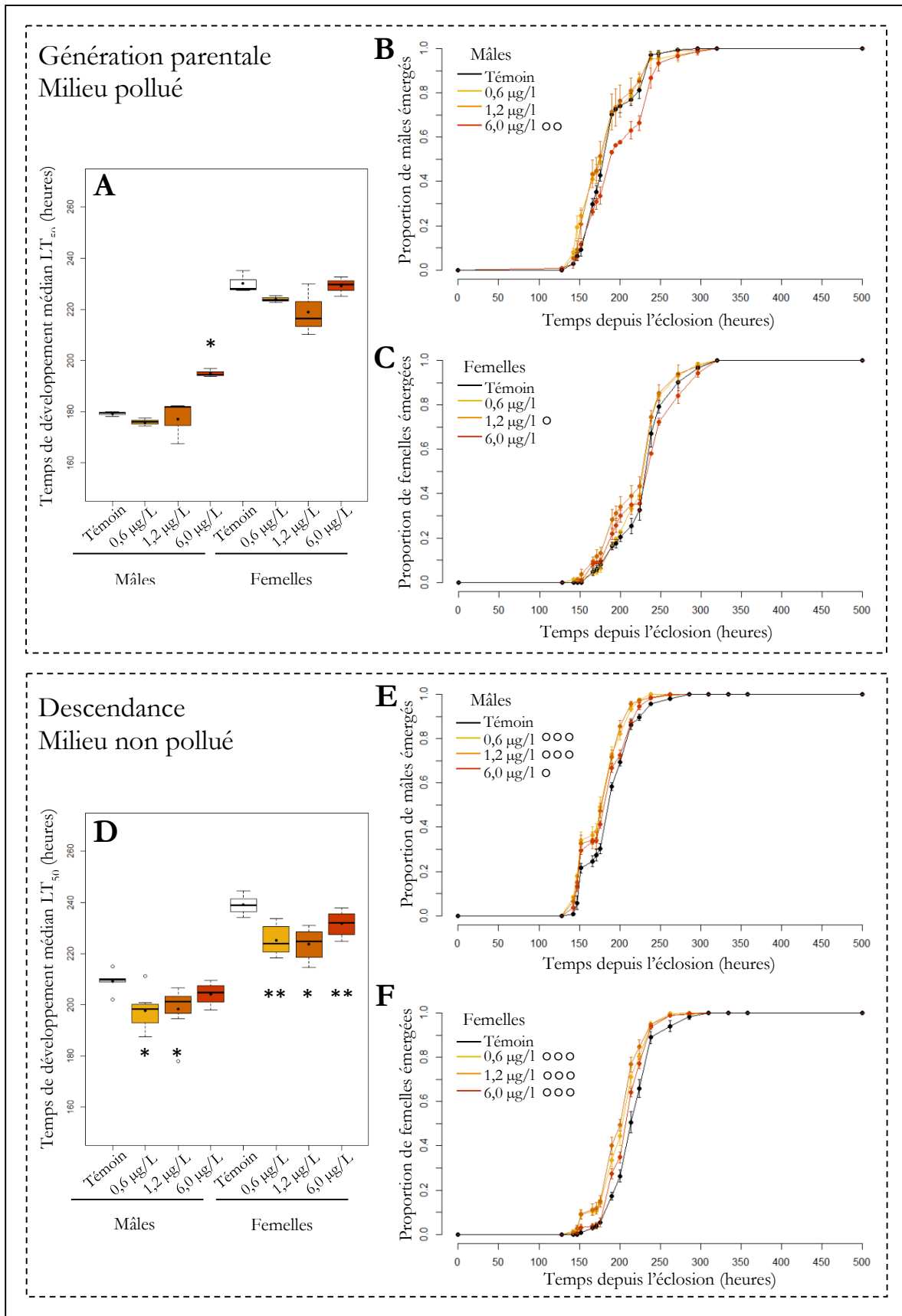


Figure II.11 - Impact à court terme du benzo[a]pyrène sur le temps de développement des individus exposés et leur descendance. Le temps entre l'éclosion des larves et l'émergence des imagos a été mesuré chez les individus exposés à 1, 10 ou 100 µg/l d'ibuprofène (A, B, C) et leur descendance non exposée (D, E, F). A, D : distribution des LT_{50} parmi les réplicats des populations étudiées. Les médianes sont représentées par les larges barres horizontales et les moyennes par les points noirs. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 comparé à la population témoin selon un test ANOVA. B, C, D, E, F : Proportion d'imagos émergés au cours du temps ± erreur standard. °° p < 0,01 ; °°° p < 0,001 comparé à la population Témoin selon un test de Kaplan-Meier.

Tableau II.8 - Impact du benzo[a]pyrène sur les traits d'histoire de vie des populations exposées et sur leur descendance non exposée. Les mesures de traits ont été effectuées sur trois réplicats de 100 individus des générations parentales et 9 réplicats de 100 individus de leur descendance. Les intervalles de confiance 95% des traits mesurés dans les différents réplicats sont présentés entre crochets.

	Génération parentale								Descendance			
	Temps d'émergence médian		Taux de mortalité	Proportion de femelles	Taille alaire moyenne (µm)		Fécondité des femelles Nombre d'œufs pondus	Fertilité des femelles Taux d'éclosion des pontes	Temps d'émergence médian		Taux de mortalité	Proportion de femelles
	EmT ₅₀ (heures)								EmT ₅₀ (heures)			
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀		
Témoin - solvant	179,3 [176,9-181,7]	230,1 [215,2-242,3]	2,0 % [0,4-3,6]	55,6 % [49,9-61,3]	1621,2 [1601,1-1641,4]	2155,11 [2126,5-2183,7]	46,5 [39,3-53,5]	76,8 % [67,8-85,7]	209,2 [203,4-214,9]	239,0 [234,0-244,1]	5,9 % [3,8-8,0]	46,9 % [42,3-51,4]
Benzo[a]pyrène 0,6 µg/l	175,9 [172,0-179,8]	223,9 [220,7-227,2]	5,4 % * [2,8-8,0]	56,7 % [51,0-62,5]	1645,4 [1623,9-1667,0]	2156,8 [2127,5-2186,2]	52,3 [45,9-58,8]	76,9 % [67,8-86,2]	197,7 * [191,7-203,6]	225,2 *** [220,4-230,0]	13,6 % *** [11,2-16,0]	46,3 % [42,6-50,0]
Benzo[a]pyrène 1,2 µg/l	177,2 [156,4-198,0]	218,8 [193,8-243,9]	10,2 % *** [6,7-13,6]	51,4 % [45,5-57,4]	1665,5 * [1642,6-1688,4]	2187,0 [2154,2-2219,9]	45,7 [36,2-55,3]	67,8 % [56,4-79,1]	198,3 * [190,9- 205,8]	223,6 *** [218,7-228,6]	17,0 % *** [14,4-19,7]	49,9 % [46,1-53,7]
Benzo[a]pyrène 6 µg/l	195,0 * [190,9-199,2]	229,2 [220,0-238,3]	3,4 % [1,3-5,4]	46,7 % [40,9-52,5]	1694,6 *** [1673,6-1715,6]	2184,5 [2146,0-2222,9]	50,1 [42,2-57,9]	80,4 % [72,3 -88,5]	203,9 [200,9-207,6]	231,9 * [228,3-235,5]	7,8 % [6,0-9,5]	53,2 % [49,8-56,6]

* p<0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p <0,001 selon un test de Student (EmT₅₀, Fécondité des femelles, Fertilité des femelles), un test de Wilcoxon (Taille alaire) ou un test du Chi-2 (Taux de mortalité, Proportion de femelles)

II.3.2.3 Impact du bisphénol A

La contamination des milieux par 0,4, 4 et 40 $\mu\text{g/l}$ de bisphénol A induit une augmentation modérée mais significative de la taille alaire des mâles de 2,0 %, 2,1% et 2,7% respectivement. Cet impact du bisphénol A n'apparaît cependant pas varier selon la concentration d'exposition. Hormis une diminution significative de 5,2 % du taux de mortalité chez la descendance des populations exposées à 4 $\mu\text{g/l}$ de bisphénol A, le temps de développement, le taux de mortalité et le sex-ratio des individus parentaux et de leur descendance n'apparaissent pas modifiés, quelle que soit la concentration testée. La fertilité et la fécondité des femelles élevées en milieu contaminé ne sont pas non plus affectées de manière significative (tableau II.9).

II.3.2.4 Impact de l'ibuprofène, du bisphénol A et du benzo[a]pyrène en mélange

L'impact de la contamination des milieux par l'ibuprofène, le bisphénol A et le benzo[a]pyrène simultanément a été étudiée dans des mélanges associant ces polluants.

La contamination du milieu d'élevage avec le mélange x1 n'induit pas de modification des traits d'histoires de vie étudiés chez populations parentes. Une légère mais significative diminution du taux de mortalité peut tout de même être observée chez leur descendance, passant de 10,7 % dans la descendance témoin à 7,1 % dans la descendance des individus exposés au mélange x1 (tableau II.10). Le profil d'impact est très différents chez les individus exposés au mélange x10, ces derniers présentant un ralentissement du développement des mâles, avec une augmentation de 8,2 % de l'EmT₅₀ ainsi qu'une légère diminution de la taille alaire des femelles de la génération parentale, avec une diminution de 1,7 % de la longueur alaire. Aucune différence significative n'a été relevée chez leur descendance (tableau II.10).

Tableau II.9 - Impact du bisphénol A sur les traits d'histoire de vie des populations exposées et sur leur descendance non exposée. Les mesures de traits ont été effectuées sur trois réplicats de 100 individus des générations parentales et 9 réplicats de 100 individus de leur descendance. Les intervalles de confiance 95% des traits mesurés dans les différents réplicats sont présentés entre crochets.

	Génération parentale								Descendance			
	Temps d'émergence médian EmT ₅₀ (heures)		Taux de mortalité	Proportion de femelles	Taille alaire moyenne (µm)		Fécondité des femelles <i>Nombre d'œufs pondus</i>	Fertilité des femelles <i>Taux d'éclosion des pontes</i>	Temps d'émergence médian EmT ₅₀ (heures)		Taux de mortalité	Proportion de femelles
	♂	♀			♂	♀			♂	♀		
Témoin - solvant	204,2 [188,1-220,4]	246,7 [221,7-271,6]	5,3 % [2,8-7,9]	45,0 % [39,2-50,8]	1665,5 [1648,6-1682,4]	2180,35 [2155,8-2204,9]	54,6 [49,7-59,5]	80,6 % [70,8-88,7]	244,2 [237,6-250,7]	285,6 [278,7-292,6]	13,7 % [11,4-15,9]	49,7 % [46,1-51,2]
Bisphénol A 0,4 µg/l	201,2 [186,6-215,7]	236,9 [208,8-265,0]	5,0 % [2,6-7,5]	41,4 % [35,7-47,2]	1702,4 ** [1683,7-1721,1]	2175,5 [2142,3-2208,7]	58,2 [52,9-63,5]	78,5 % [69,1-87,9]	238,2 [231,0-245,5]	279,7 [264,9-294,5]	14,5 % [12,2-16,8]	51,5 % [47,9-55,0]
Bisphénol A 4 µg/l	198,8 [218,9-241,0]	230,0 [218,9-241,0]	9,0 % [5,8-12,3]	46,1 % [40,2-52,0]	1699,8 * [1681,8-1717,8]	2186,1 [2152,9- 2219,3]	61,1 [58,0-64,1]	84,7 % [80,1-89,5]	246,2 [240,4-252,1]	298,2 [277,3-319,1]	8,5 % ** [6,6-10,4]	49,1 % [45,5-52,8]
Bisphénol A 40 µg/l	190,8 [155,1-226,6]	232,4 [219,7-245,1]	6,4 % [3,6-9,2]	48,3 % [42,4-54,3]	1710,8 ** [1692,5-1729,0]	2210,5 [2186,3-2234,7]	54,5 [46,7-62,3]	81,2 % [75,5-86,9]	246,5 [242,8-250,4]	290,8 [273,9-307,6]	12,6 % [10,4-14,7]	49,6 % [46,1-53,1]

* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 selon un test de Student (EmT₅₀, Fécondité des femelles, Fertilité des femelles), un test de Wilcoxon (Taille alaire) ou un test du Chi-2 (Taux de mortalité, Proportion de femelles)

Tableau II.10 - Impact de l'ibuprofène, du bisphénol A et du benzo[a]pyrène en mélange sur les traits d'histoire de vie des populations exposées et sur leur descendance non exposée. Les individus parentaux ont été exposés à 1 µg/l, 0,4 µg/l et 0,6 µg/l (Mélange x1) ou 10 µg/l, 4 µg/l et 6 µg/l (Mélange x10) d'ibuprofène, de bisphénol A et de benzo[a]pyrène respectivement. Les mesures de traits ont été effectuées sur trois réplicats de 100 individus des générations parentales et 9 réplicats de 100 individus de leur descendance. Les intervalles de confiance 95% des traits mesurés dans les différents réplicats sont présentés entre crochets.

	Génération parentale								Descendance			
	Temps d'émergence médian EmT ₅₀ (heures)		Taux de mortalité	Proportion de femelles	Taille alaire moyenne (µm)		Fécondité des femelles <i>Nombre d'œufs pondus</i>	Fertilité des femelles <i>Taux d'éclosion des pontes</i>	Temps d'émergence médian EmT ₅₀ (heures)		Taux de mortalité	Proportion de femelles
	♂	♀			♂	♀			♂	♀		
Témoin - solvant	197,0 [185,0-209,0]	239,4 [219,4-259,4]	5,7 % [3,0-8,3]	45,0 % [39,2-50,8]	1632,9 [1618,6-1647,2]	2166,1 [2142,9-2189,3]	51,0 [45,9-56,2]	76,7 % [72,5-80,9]	224,3 [218,6-230,1]	269,1 [261,3-276,8]	10,7 % [8,6-12,7]	50,8 % [47,5-54,1]
Mélange x1	200,1 [186,8-213,3]	239,8 [215,9-263,7]	7,0 % [4,2-10,0]	45,9 % [40,0-51,7]	1634,2 [1617,7-1650,7]	2148,5 [2126,7-2170,4]	52,2 [47,8-56,7]	77,3 % [68,8-85,8]	229,8 [219,2-240,5]	266,2 [263,3-269,0]	7,1 % ** [5,4-8,7]	48,0 % [44,8-51,3]
Mélange x10	213,3 * [195,3-231,2]	242,0 [204,1-279,8]	9,3 % [6,1-12,7]	49,3 % [43,7-55,0]	1638,8 [1622,0-1655,6]	2128,5 ** [2108,0-2148,9]	48,1 [41,0-55,2]	70,3 % [59,7-80,9]	221,9 [215,7-228,2]	265,27 [258,1-273,3]	10,9 % [8,8-13,0]	53,6 % [50,4-56,9]

* p<0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p <0,001 selon un test de Student (EmT₅₀, Fécondité des femelles, Fertilité des femelles), un test de Wilcoxon (Taille alaire) ou un test du Chi-2 (Taux de mortalité, Proportion de femelles)

II.3.3 Impact des polluants sur les traits d'histoire de vie des populations après 6 générations d'exposition

Les traits d'histoire de vie des populations Témoin_G6, Ibu_G6, B[a]P_G6 et Mix_G6 et de leur descendance G7 ont été étudiés en milieux propres dans les mêmes conditions que lors de l'étude à court terme. Les mesures de ces traits sont présentées dans les tableaux II.11, II.12, II.13 et II.14, conjointement avec les traits mesurés aux mêmes concentrations d'exposition lors de l'étude à court terme.

II.3.3.1 Impact de l'ibuprofène

Les individus de la population Ibu_G6 ne présentent pas de différence significative avec la population Témoin_G6 pour les différents traits mesurés dans cette étude. Cependant, chacun des traits d'histoire de vie mesurés chez les descendes de ces deux populations diffère significativement. Les individus de la descendance présentent en effet un développement accéléré, avec un EmT_{50} réduit respectivement de 4,8 % et 8,4 % chez les mâles et les femelles (Tableau II.11 ; Figure II.12 : D). Cette accélération du développement des individus de la descendance se confirme lorsque l'on compare les courbes d'émergence au sein des descendes des populations Témoins_G6 et Ibu_G6 dans leur globalité (Figure II.12 : E, F). La diminution du temps de développement est associée à une augmentation du taux de mortalité, passant de 16,2 % chez la descendance de la population Témoin_G6, à 26,4 % dans la descendance de la population Ibu_G6. De plus, une légère mais significative augmentation du pourcentage de femelles est constaté, allant de 49,9 % chez la descendance de la population Témoin_G6 à 57,5 % dans la descendance de la population Ibu_G6.

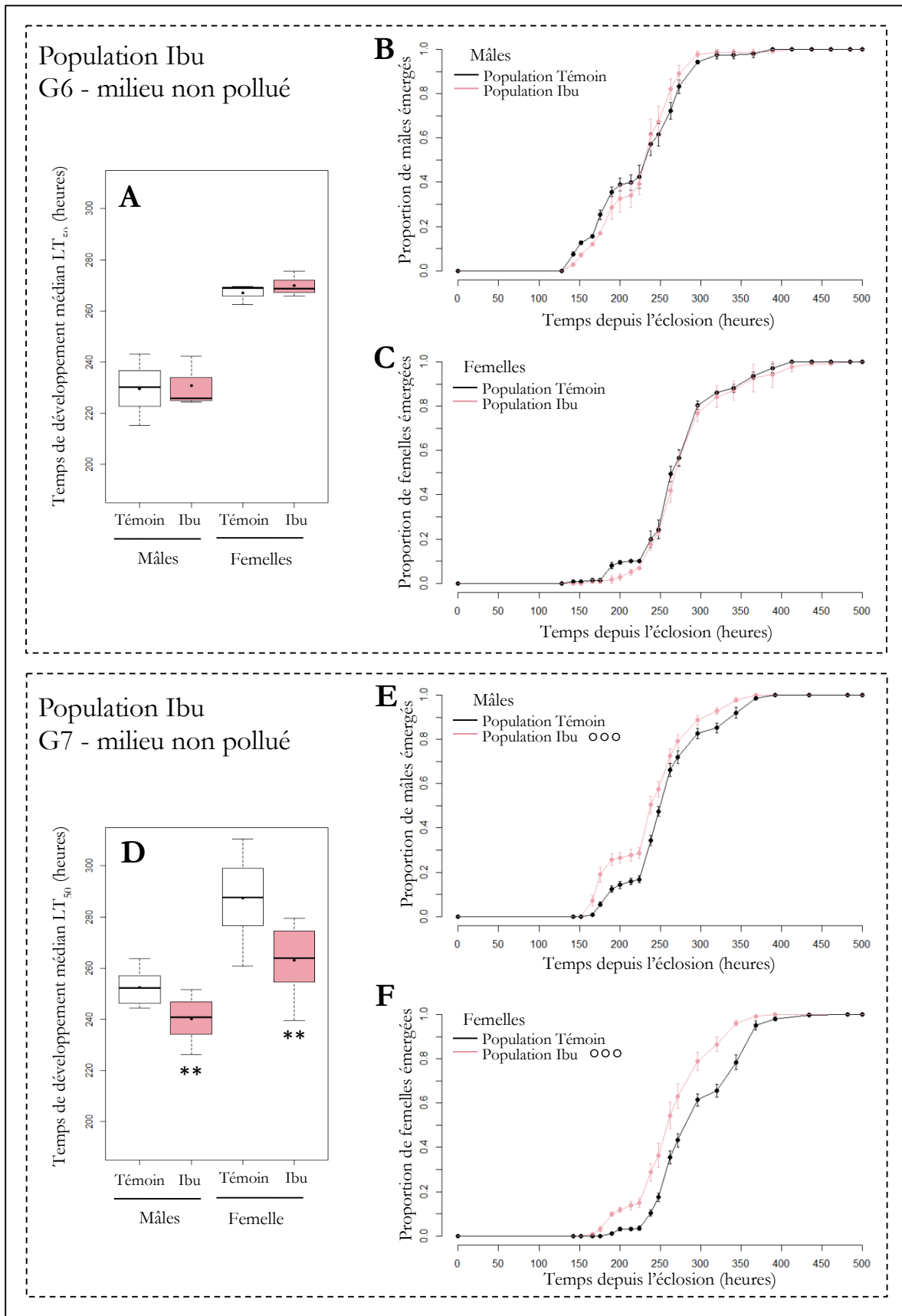


Figure II.12 - Impact à long terme de l'ibuprofène (1 µg/l) sur le temps de développement des individus. Le temps entre l'éclosion des larves et l'émergence des imagos a été mesuré chez les individus de la génération 6 (A, B, C) et leur descendance (D, E, F) dans les populations Témoin_G6 et Ibu_G6, élevées en milieu non pollué. A, D : distribution des EmT_{50} parmi les répliquats des deux populations étudiées. Les médianes sont représentées par les larges barres horizontales et les moyennes par les points noirs. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparé à la population Témoin selon un test de Student. B, C, D, E, F : Proportion d'imagos émergés au cours du temps \pm erreur standard. °° $p < 0,01$; °°° $p < 0,001$ comparé à la population Témoin selon un test de Kaplan-Meier.

Tableau II.11 - Impact de l'ibuprofène 1 µg/1 sur les traits d'histoire de vie des populations exposées durant 1 et 6 générations. Les mesures de traits ont été effectuées sur trois réplicats de 100 individus des générations parentales et 9 réplicats de 100 individus de leur descendance. Les intervalles de confiance 95% des traits mesurés dans les différents réplicats sont présentés entre crochets.

		Génération parentale					Descendance				
		Temps d'émergence médian		Taux de mortalité	Proportion de femelles	Fécondité des femelles <i>Nombre d'œufs pondus</i>	Fertilité des femelles <i>Taux d'éclosion des pontes</i>	Temps d'émergence médian		Taux de mortalité	Proportion de femelles
		EmT ₅₀ (heures)						EmT ₅₀ (heures)			
		♂	♀					♂	♀		
Exposition à court terme 1 ^{ère} génération	Témoin - solvant	175,0 [159,4-190,7]	205,4 [194,0-216,8]	20,2 % [15,6-24,8]	46,4 % [40,1-52,7]	57,4 [48,4-66,4]	74,0 % [67,8-80,1]	212,3 [205,4-219,2]	249,6 [241,8-257,3]	5,5 % [4,0-7,0]	46,7 % [43,3-50,0]
	Ibuprofène 1 µg/1	178,0 [148,3-207,6]	204,3 [184,2-224,5]	16,7 % [12,4-20,9]	52,8 % [46,6-59,0]	51,9 [43,8-60,0]	69,0 % [61,3-76,7]	202,0 * [194,7-209,3]	229,3 ** [223,8-234,9]	7,2 % [5,5-8,9]	50,0 % [46,6-53,4]
Exposition à long terme 7 ^{ème} génération	Témoin_G6	229,6 [195,0-264,2]	267,0 [257,3-276,6]	12,0 % [8,3-15,7]	49,1 % [43,1-55,2]	49,8 [45,0-54,6]	74,5 % [66,9-82,0]	252,5 [243,8-259,5]	287,5 [275,5-299,4]	16,2 % [13,8-18,6]	49,9 % [46,3-53,5]
	Ibu_G6	230,8 [206,0-255,7]	270,0 [257,5-282,5]	14,7 % [10,7-18,7]	45,0 % [38,9-51,1]	44,1 [37,5-50,7]	80,7 % [71,8-89,7]	240,2 ** [232,8-247,6]	263,1 ** [251,5-274,8]	26,4 % *** [23,3-29,4]	57,5 % ** [53,6-61,5]

* p < 0,05 ; ** p < 0,01 selon un test ANOVA (EmT₅₀, Fécondité des femelles, Fertilité des femelles), ou un test du Chi-2 suivi d'un test *post-hoc* (Taux de mortalité, Proportion de femelles).

** p < 0,01 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 selon un test de Student (EmT₅₀, Fécondité des femelles, Fertilité des femelles), ou un test du Chi-2 (Taux de mortalité, Proportion de femelles).

II.3.3.2 *Impact du benzo[a]pyrène*

La fécondité des individus de la population B[a]P_G6 présente une diminution de 12 %, (Tableau II.12). Cette diminution de la fécondité n'est pas associée à une diminution de la taille alaire des femelles échantillonnées (données non présentées). Le temps de développement, le taux de mortalité associé, le sex-ratio et la fertilité des femelles ne présentent en revanche pas de différence significatives par rapport à la population Témoin_G6. La descendance de la population B[a]P_G6 présente une accélération importante du développement, avec un EmT₅₀ réduit respectivement de 11,4 % et 13,6 % chez les mâles et les femelles (Tableau II.12 ; Figure II.13 : D). L'étude des courbes d'émergence des descendances des populations Témoins_G6 et B[a]P_G6 dans leur globalité confirme cette accélération du développement des individus de la descendance (Figure II.13 : E, F). Avec un taux de mortalité associé au développement de 16,2 % chez la descendance de la population Témoins_G6 et de 31,6 % chez la descendance de la population B[a]P_G6, une nette augmentation du taux de mortalité associé au développement est constatée. Le sex-ratio de la descendance de la population B[a]P_G6 n'est cependant pas significativement affecté.

II.3.3.3 *Impact du bisphénol A*

Aucune différence significative n'a été observée parmi les traits d'histoire de vie mesurés chez les individus de la population Témoin_G6 et BPA_G6 ou leur descendance (Tableau II.13).

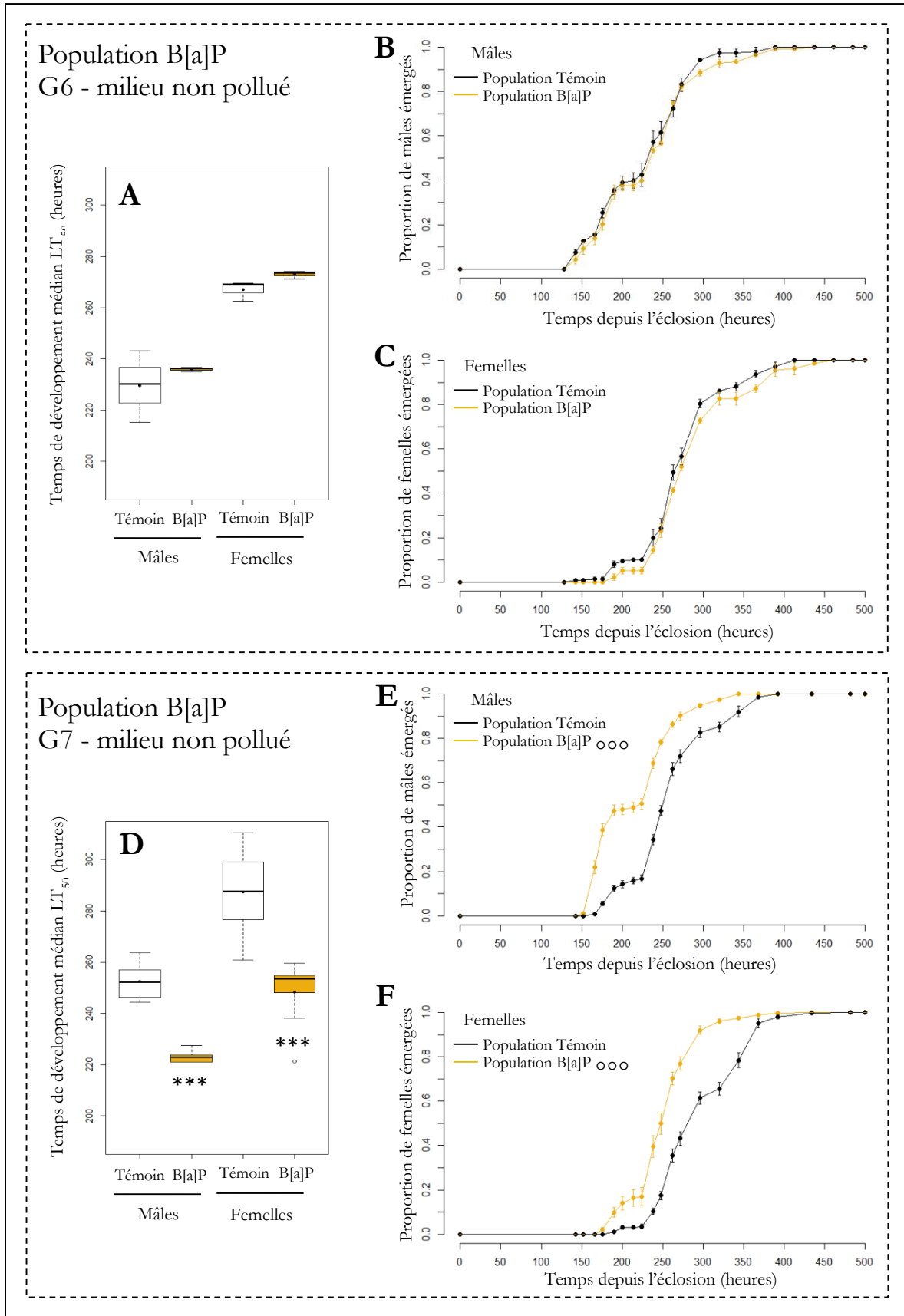


Figure II.13 - Impact à long terme du benzo[a]pyrène (0,6 µg/l) sur le temps de développement des individus. Le temps entre l'éclosion des larves et l'émergence des imagos a été mesuré chez les individus de la génération 6 (A, B, C) et leur descendance (D, E, F) dans les populations Témoin_G6 et B[a]P_G6, élevées en milieu non pollués. A, D : distribution des EmT_{50} parmi les réplicats des deux populations étudiées. Les médianes sont représentées par les larges barres horizontales et les moyennes par les points noirs. * $p < 0,05$ comparé à la population Témoin selon un test de Student. B, C, D, E, F : Proportion d'imagos émergés au cours du temps \pm erreur standard. ooo $p < 0,001$ comparé à la population Témoin selon un test de Kaplan-Meier.

Tableau II.12 - Impact de benzo[a]pyrène 0,6 µg/1 sur les traits d'histoire de vie des populations exposées durant 1 et 6 générations. Les mesures de traits ont été effectuées sur trois réplicats de 100 individus des générations parentales et 9 réplicats de 100 individus de leur descendance. Les intervalles de confiance 95% des traits mesurés dans les différents réplicats sont présentés entre crochets.

		Génération parentale					Descendance				
		Temps d'émergence médian		Taux de mortalité	Proportion de femelles	Fécondité des femelles <i>Nombre d'œufs pondus</i>	Fertilité des femelles <i>Taux d'éclosion des pontes</i>	Temps d'émergence médian		Taux de mortalité	Proportion de femelles
		EmT ₅₀ (heures)						EmT ₅₀ (heures)			
		♂	♀	♂	♀	♂	♀				
Exposition à court terme 1 ^{ère} génération	Témoin - solvant	179,3 [176,9-181,7]	230,1 [215,2-242,3]	2,0 % [0,4-3,6]	55,6 % [49,9-61,3]	46,5 [39,3-53,5]	76,8 % [67,8-85,7]	209,2 [203,4-214,9]	239,0 [234,0-244,1]	5,9 % [3,8-8,0]	46,9 % [42,3-51,4]
	Benzo[a]pyrène 0,6 µg/1	175,9 [172,0-179,8]	223,9 [220,7-227,2]	5,4 % * [2,8-8,0]	56,7 % [51,0-62,5]	52,3 [45,9-58,8]	76,9 % [67,8-86,2]	197,7 * [191,7-203,6]	225,2 *** [220,4-230,0]	13,6 % *** [11,2-16,0]	46,3 % [42,6-50,0]
* p<0,05 ; *** p < 0,001 selon un test ANOVA (EmT ₅₀ , Fécondité des femelles, Fertilité des femelles), ou un test du Chi-2 suivi d'un test <i>post-hoc</i> (Taux de mortalité, Proportion de femelles).											
Exposition à long terme 7 ^{ème} génération	Témoin_G6	229,6 [195,0-264,2]	267,0 [257,3-276,6]	12,0 % [8,3-15,7]	49,1% [43,1-55,2]	49,8 [45,0-54,6]	74,5 % [66,9-82,0]	252,5 [243,8-259,5]	287,5 [275,5-299,4]	16,2 % [13,8-18,6]	49,9 % [46,3-53,5]
	B[a]P_G6	235,9 [233,7-238,2]	273,0 [269,3-276,7]	11,7 % [8,0-15,3]	49,0% [43,0-55,0]	43,8 * [40,0-47,6]	80,4 % [72,1-88,8]	223,7 *** [221,6-225,7]	248,3 *** [239,3-257,4]	31,6 % *** [28,5-34,6]	53,4 % [49,4-57,3]

* p<0,05 ; ** p < 0,01 ;*** p < 0,001 selon un test de Student (EmT₅₀, Fécondité des femelles, Fertilité des femelles), ou un test du Chi-2 (Taux de mortalité, Proportion de femelles).

Tableau II.13 - Impact du bisphénol A 0,4 µg/l sur les traits d'histoire de vie des populations exposées durant 1 et 6 générations. Les mesures de traits ont été effectuées sur trois réplicats de 100 individus des générations parentales et 9 réplicats de 100 individus de leur descendance. Les intervalles de confiance 95% des traits mesurés dans les différents réplicats sont présentés entre crochets.

	Génération parentale						Descendance				
	Temps d'émergence médian		Taux de mortalité	Proportion de femelles	Fécondité des femelles <i>Nombre d'œufs pondus</i>	Fertilité des femelles <i>Taux d'éclosion des pontes</i>	Temps d'émergence médian		Taux de mortalité	Proportion de femelles	
	EmT ₅₀ (heures)						EmT ₅₀ (heures)				
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀			
Exposition à court terme 1 ^{ère} génération	Témoin - solvant	204,2 [188,1-220,4]	246,7 [221,7-271,6]	5,3 % [2,8-7,9]	45,0 % [39,2-50,8]	54,6 [49,7-59,5]	80,6 % [70,8-88,7]	244,2 [237,6-250,7]	285,6 [278,7-292,6]	13,7 % [11,4-15,9]	49,7 % [46,1-51,2]
	Bisphénol A 0,4 µg/l	201,2 [186,6-215,7]	236,9 [208,8-265,0]	5,0 % [2,6-7,5]	41,4 % [35,7-47,2]	58,2 [52,9-63,5]	78,5 % [69,1-87,9]	238,2 [231,0-245,5]	279,7 [264,9-294,5]	14,5 % [12,2-16,8]	51,5 % [47,9-55,0]
Exposition à long terme 7 ^{ème} génération	Témoin_G6	229,6 [195,0-264,2]	267,0 [257,3-276,6]	12,0 % [8,3-15,7]	49,1 % [43,1-55,2]	49,8 [45,0-54,6]	74,5 % [66,9-82,0]	252,5 [243,8-259,5]	287,5 [275,5-299,4]	16,2 % [13,8-18,6]	49,9 % [46,3-53,5]
	BPA_G6	226,1 [195,9-256,4]	261,3 [241,6-281,0]	14,7 % [10,7-18,7]	40,5 % [34,5-46,6]	44,2 [37,4-51,0]	72,4 % [62,5-82,3]	251,6 [232,8-247,6]	279,3 [264,8-293,8]	16,0 % [13,3-18,7]	52,1 % [48,0-56,1]

* p<0,05 selon un test ANOVA (EmT₅₀, Fécondité des femelles, Fertilité des femelles) ou un test du Chi-2 suivi d'un test *post-hoc* (Taux de mortalité, Proportion de femelles).

* p<0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p <0,001 selon un test de Student (EmT₅₀, Fécondité des femelles, Fertilité des femelles), ou un test du Chi-2 (Taux de mortalité, Proportion de femelles).

II.3.3.4 Impact de l'ibuprofène, du bisphénol A et du benzo[a]pyrène en mélange

Les individus de la population Mix_G6 ne présentent pas de traits d'histoire de vie significativement différents des individus de la population Témoin_G6. Leur descendance présente cependant une accélération du développement, avec un EmT_{50} réduit respectivement de 8,0 % et 6,4 % chez les mâles et les femelles (Tableau II.14 ; Figure II.14 : D). Cette observation est confirmée par la comparaison des courbes d'émergence dans leur ensemble (Figure II.14 : E, F). Le taux de mortalité associé au développement et le sex-ratio de la descendance de la population Mix_G6 ne présente pas de différence vis-à-vis de la descendance de la population Témoin_G6 (Tableau II.14).

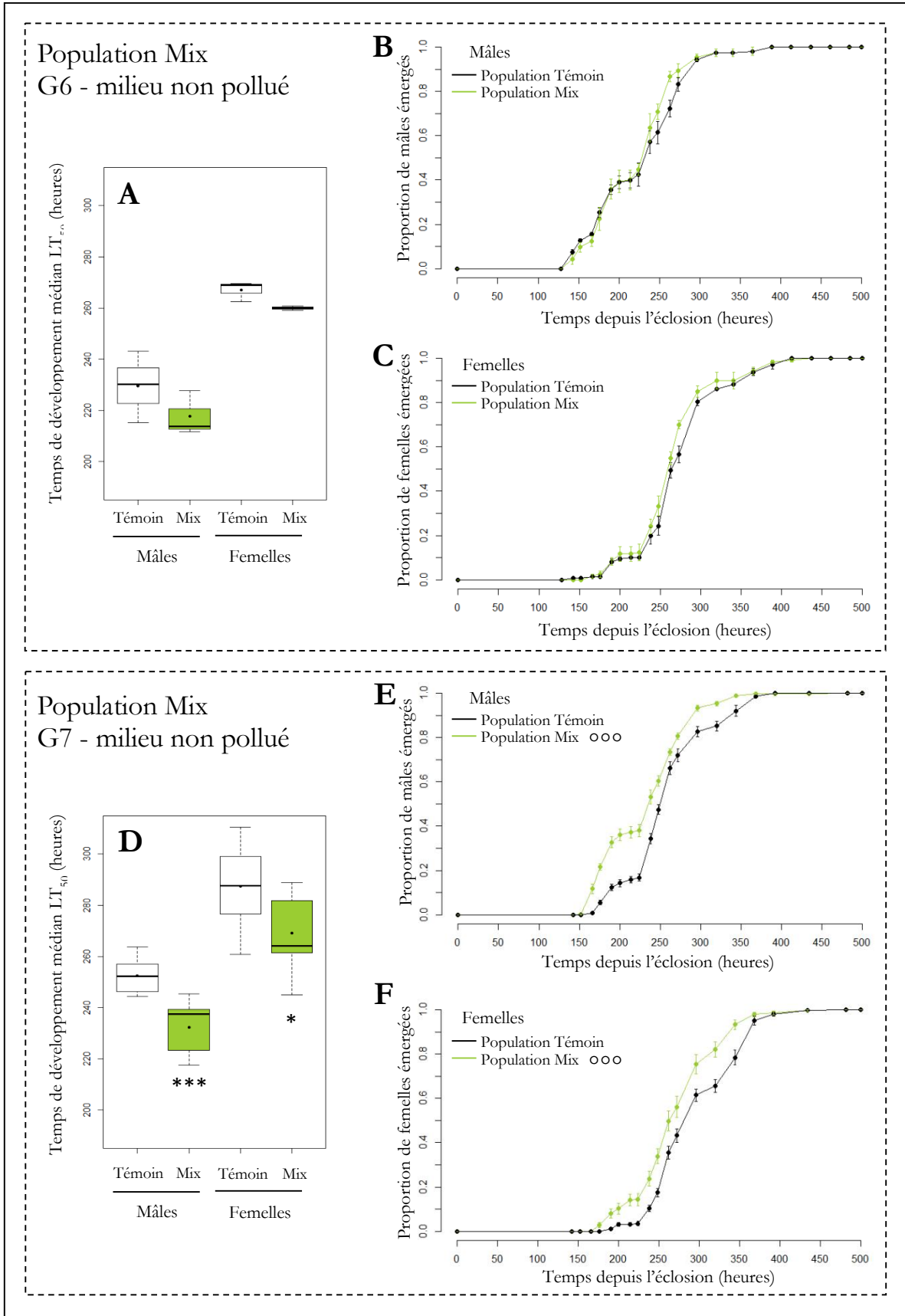


Figure II.14 - Impact à long terme du mélange de polluant aux concentrations $x1$ sur le temps de développement des individus. Le temps entre l'éclosion des larves et l'émergence des imagos a été mesuré chez les individus de la génération 6 (A, B, C) et leur descendance (D, E, F) dans les populations Témoin_G6 et Mix_G6, élevées en milieu non pollués. A, D : distribution des $EmT50$ parmi les répliquats des deux populations étudiées. Les médianes sont représentées par les larges barres horizontales et les moyennes par les points noirs. * $p < 0,05$ comparé à la population Témoin selon un test de Student. B, C, D, E, F : Proportion d'imagos émergés au cours du temps sont présentés entre crochets \pm erreur standard. ooo $p < 0,001$ comparé à la population Témoin selon un test de Kaplan-Meier.

Tableau II.14 - Impact du mélange de polluants aux concentrations x1 sur les traits d'histoire de vie des populations exposées durant 1 et 7 générations. Les mesures de traits ont été effectuées sur trois réplicats de 100 individus des générations parentales et 9 réplicats de 100 individus de leur descendance. Les intervalles de confiance 95% des traits mesurés dans les différents réplicats sont présentés entre crochets.

		Génération parentale					Descendance					
		Temps d'émergence médian EmT ₅₀ (heures)		Taux de mortalité	Proportion de femelles	Fécondité des femelles <i>Nombre d'œufs pondus</i>	Fertilité des femelles <i>Taux d'éclosion des pontes</i>	Temps d'émergence médian EmT ₅₀ (heures)		Taux de mortalité	Proportion de femelles	
		♂	♀					♂	♀			
Exposition à court terme	1 ^{ère} génération	Témoin - solvant	197,0 [185,0-209,0]	239,4 [219,4-259,4]	5,7 % [3,0-8,3]	45,0 % [39,2-50,8]	51,0 [45,9-56,2]	76,7 % [72,5-80,9]	224,3 [218,6-230,1]	269,1 [261,3-276,8]	10,7 % [8,6-12,7]	50,8 % [47,5-54,1]
	Mélange 1x	200,1 [186,8-213,3]	239,8 [215,9-263,7]	7,0 % [4,2-10,0]	45,9 % [40,0-51,7]	52,2 [47,8-56,7]	77,3 % [68,8-85,8]	229,8 [219,2-240,5]	266,2 [263,3-269,0]	7,1 % ** [5,4-8,7]	48,0 % [44,8-51,3]	
Exposition à long terme	7 ^{ème} génération	Témoin	229,6 [195,0-264,2]	267,0 [257,3-276,6]	12,0 % [8,3-15,7]	49,1 % [43,1-55,2]	49,8 [45,0-54,6]	74,5 % [66,9-82,0]	252,5 [243,8-259,5]	287,5 [275,5-299,4]	16,2 % [13,8-18,6]	49,9 % [46,3-53,5]
	Mix	217,7 [196,1-239,4]	260,0 [257,9-262,2]	11,7 % [8,0-15,3]	45,0 % [39,0-51,0]	43,7 [38,0-49,4]	79,6 % [72,3-86,6]	232,3 *** [223,8-240,8]	269,0 * [257,8-280,3]	16,6 % [14,1-19,0]	49,8 % [46,2-53,4]	

** p<0,01 selon un test ANOVA (EmT₅₀, Fécondité des femelles, Fertilité des femelles), ou un test du Chi-2 suivi d'un test *post-hoc* (Taux de mortalité, Proportion de femelles).

* p<0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 selon un test de Student (EmT₅₀, Fécondité des femelles, Fertilité des femelles), ou un test du Chi-2 (Taux de mortalité, Proportion de femelles).

II.3.3.5 Impact des polluants à court et long terme sur la tolérance aux insecticides

La tolérance des populations aux insecticides Bti et Téméphos a été évaluée suite à une exposition à court et long terme aux concentrations les plus faibles de polluants et du mélange de ceux-ci.

L'exposition à court terme aux trois polluants étudiés et au mélange de ceux-ci n'influe pas sur la tolérance des populations au Bti et au téméphos. En revanche, après 7 générations d'exposition à 1 µg/l d'ibuprofène ou à 0,6 µg/l de benzo[a]pyrène, les populations présentent une augmentation de la tolérance au Bti. En effet, alors que la LC₅₀ mesurée dans la population Témoin_G6 est de 19,5 µl, des LC₅₀ de 25,49 µl et 25,51 µl ont été mesurées chez les populations Ibu_G6 et B[a]P_G6 respectivement, représentant des ratios de résistance de de 1,34 dans ces deux populations (Tableau II.15). Les populations Ibu_G6, BaP_G6, BPA_G6 et Mix_G6 ne présentent pas de différence significative de tolérance au téméphos par rapport à la population Témoin_G6.

Tableau II.15 - Impact de l'exposition à l'ibuprofène, au benzo[a]pyrène et au bisphénol A seuls ou en mélange à court (1 génération) et long terme (6 générations) sur la tolérance des populations à l'insecticide biologique *Bacillus turingensis israelensis* (Bti) et à l'insecticide chimique Temephos. Les intervalles de confiance 95% des LC50 sont présentés entre crochets. * : Différence significative par rapport à la population témoin correspondante.

Insecticide	Exposition aux polluants	Court terme – G0		Long terme - G6	
		LC ₅₀ (IC _{95%})	RR ₅₀	LC ₅₀ (IC _{95%})	RR ₅₀
Bti	Témoin	17,70 [15,63-19,82]		19,05 [16,83-21,29]	
	Ibuprofène 1 µg/l	20,58 [18,26-22,92]	1,16	25,49 [23,17-27,83]*	1,34
	Benzo[a]pyrène 0,6 µg/l	17,29 [15,22-19,35]	0,98	25,51 [23,35-27,83]*	1,34
	Bisphénol A 0,4 µg/l	17,74 [15,48-19,99]	1,00	20,47 [18,48-22,56]	1,07
	Mélange x1	20,10 [17,97-22,31]	1,14	19,50 [17,66-21,46]	1,02
Temephos	Témoin	9,82 [9,14-10,58]		9,63 [8,74-10,53]	
	Ibuprofène 1 µg/l	10,04 [9,21-10,94]	1,02	10,50 [9,62-11,37]	1,09
	Benzo[a]pyrène 0,6 µg/l	9,36 [8,71-10,06]	0,95	10,62 [9,74-11,51]	1,10
	Bisphénol A 0,4 µg/l	9,98 [9,19-10,85]	1,02	9,73 [9,00-10,46]	1,01
	Mélange x1	9,37 [8,62-10,19]	0,95	9,10 [8,25-9,95]	0,94

II.4 Discussion

II.4.1 Conséquences à court terme de l'exposition aux polluants sur le cycle de vie des individus

Afin d'identifier les conséquences de la pollution des milieux aquatiques sur les populations de moustiques *Aedes aegypti*, les traits d'histoire de vie des individus exposés à différents milieux pollués et ceux de leur descendance ont été étudiés. Plusieurs études ont mis en évidence chez les insectes l'influence de la condition physiologique des parents, définie par exemple par la disponibilité des ressources alimentaires ou l'exposition à un polluant, sur le développement, la tolérance au stress ou la fonction reproductrice de leur descendance (Grech *et al.*, 2007; Sadd et Schmid-Hempel, 2007; Martins *et al.*, 2012; Valtonen *et al.*, 2012; Perez et Noriega, 2013). Cependant, la descendance n'est que rarement prise en compte dans les études écotoxicologiques.

L'étude globale des profils d'impact de différents milieux pollués (Tableau II.16) révèle des modifications de traits d'histoire de vie de la descendance des individus, principalement lors de la contamination des milieux par l'ibuprofène et le benzo[a]pyrène. La contamination des milieux apparaît affecter la physiologie des individus exposés, et ce, même lorsqu'aucune perturbation n'est observée à l'échelle individuelle chez les parents. Plus particulièrement, les impacts trans-générationnels observés ne sont associés à aucune modification des traits d'histoire de vie directement liés à la reproduction chez les parents, tels que la fertilité et la fécondité des femelles (Tableau II.16). Ces observations mettent en évidence l'intérêt majeur que peuvent avoir des approches trans-générationnelles dans l'évaluation de l'impact des polluants sur les organismes.

Le temps de développement des individus apparaît particulièrement impacté. Que ce soit chez les individus exposés directement ou chez leur descendance, ce trait apparaît modifié par 7 des 11 milieux contaminés testés. Ceci est probablement lié au fait que le temps de développement est un trait d'histoire de vie particulièrement plastique chez *Aedes aegypti*. Ce trait développemental est influencé par différents facteurs environnementaux naturels tels que la température, la densité larvaire, la disponibilité des ressources alimentaires et notamment les ressources métaboliques maternelles (pour revue : Couret et Benedict, 2014).

Tableau II.16 - Bilan des impacts de la contamination des milieux sur les traits d'histoire de vie. Les traits d'histoire de vie mesurés chez les individus exposés (noir) et leur descendance non exposée (violet) sont non modifiés (cercles vides), augmentés (+) ou diminués (-).

Type de contamination	Temps de développement		Taux de mortalité	Sex-ratio	Taille alaire		Fécondité	Fertilité
	♂	♀			♂	♀		
Ibuprofène 1 µg/l	○-	○-	○○	○○	○	○	○	○
Ibuprofène 10 µg/l	○-	○-	○○	○○	○	○	○	○
Ibuprofène 100 µg/l	○-	○-	○○	○○	○	○	○	○
Benzo[a]pyrène 0,6 µg/l	○-	○-	++	○○	+	○	○	○
Benzo[a]pyrène 1,2 µg/l	○-	○-	++	○○	+	○	○	○
Benzo[a]pyrène 6 µg/l	+○	○-	○○	○○	+	○	○	○
Bisphénol A 0,4 µg/l	○○	○○	○○	○○	+	○	○	○
Bisphénol A 4 µg/l	○○	○○	○-	○○	+	○	○	○
Bisphénol A 40 µg/l	○○	○○	○○	○○	+	○	○	○
Mélange 1x	○○	○○	○-	○○	○	○	○	○
Mélange 10x	+○	○○	○○	○○	○	-	○	○

L'exposition des populations à l'ibuprofène induit une accélération du développement de leur descendance, tandis que les individus directement exposés ne présentent aucune modification des traits d'histoire de vie. Ces résultats suggèrent que, bien qu'aucune conséquence de l'exposition à l'ibuprofène n'ait été observée directement, les individus exposés subissent une modification de leur potentiel reproducteur au sens large, c'est-à-dire leur capacité à engendrer une descendance similaire aux populations témoins. Cet effet de l'ibuprofène sur les populations d'*Aedes aegypti* est observé dès une concentration cohérente avec la contamination environnementale (1µg/l), bien loin des seuils de toxicité aigus établis pour ce polluant, ce qui accentue d'autant plus la portée écologique de nos observations. A notre connaissance, seule une étude a, à ce jour, mis en évidence un tel impact trans-générationnel de l'ibuprofène chez un invertébré aquatique. Cette étude, s'intéressant à l'impact de l'exposition chronique (21 jours) du planorbe caréné (*Planorbis carinatus*) a notamment décrit une réduction du taux d'éclosion de la descendance (Pounds *et al.*, 2008). Cependant, cet effet a été observé à des concentrations de l'ordre du milligramme par litre, bien supérieures aux concentrations retrouvées dans l'environnement et n'est ainsi que faiblement représentatif des impacts environnementaux de l'ibuprofène. Les impacts trans-générationnels de

l'ibuprofène ont en revanche été mis en évidence à des concentrations plus réalistes chez les poissons modèles poisson zèbre (*Danio rerio*) (Ji *et al.*, 2013) et Medaka (*Oryzias latipes*) (Han *et al.*, 2010), chez lesquels une exposition respective à l'ibuprofène de 1 µg/l durant 21 jours ou de 0,1 µg/l durant tout le cycle de vie induit un allongement du temps d'éclosion de la descendance en milieu propre. La descendance n'a néanmoins pas été observée au-delà de l'éclosion dans ces trois études. Le temps de développement des individus est un des paramètres clés de la dynamique de des populations, puisqu'il caractérise la vitesse à laquelle les individus reproducteurs sont produits au sein d'une population. Une accélération du développement des individus est ainsi associée à un avantage en terme de fitness, que ce soit chez *Aedes aegypti* (Paris *et al.*, 2011; Perez et Noriega, 2012; Martins *et al.*, 2012) ou d'autres insectes (Mensch *et al.*, 2008; Valtonen *et al.*, 2012). L'accélération du développement est notamment associée chez les insectes aquatiques à une augmentation du taux d'accroissement de la population et à la réduction du temps passé dans une phase de vie particulièrement vulnérable à la prédation. Ainsi, l'avantage développemental conféré par l'exposition parentale à l'ibuprofène pourrait avoir un impact positif sur la dynamique des populations exposées à ce polluant.

L'exposition des populations au benzo[a]pyrène induit des effets plus variés que l'ibuprofène sur les individus et leur descendance. En effet, l'exposition des populations à 0,6 ou 1,2 µg/l induit une mortalité durant le développement des individus en contact avec le milieu pollué, mais également chez leur descendance non exposée. Cet effet est cohérent avec les données de toxicité chronique disponibles dans la littérature, rapportant une létalité développementale du benzo[a]pyrène chez le chironome, la daphnie et le crustacé marin *Trigriopus japonicus* (Atienzar et Jha, 2004; Bang *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2014). Cette mortalité accrue est accompagnée dans notre étude d'une accélération du développement chez leur descendance, encore jamais décrite chez les invertébrés d'eau douce. Étonnamment, la plus forte concentration testée, 6 µg/l, induit un panel d'effets différent de celui des deux concentrations inférieures, avec l'absence de modification de la mortalité développementale des individus, et une réduction de l'impact de l'exposition parentale sur le temps de développement de la descendance. Cependant, une exposition directe à cette concentration de benzo[a]pyrène induit un retard de développement des mâles, impact qui n'est pas observé aux concentrations d'exposition inférieures. Enfin, l'exposition au benzo[a]pyrène semble avoir un impact dose-dépendant sur la taille alaire des mâles exposés, avec une tendance à l'accentuation de cet effet avec la concentration d'exposition.

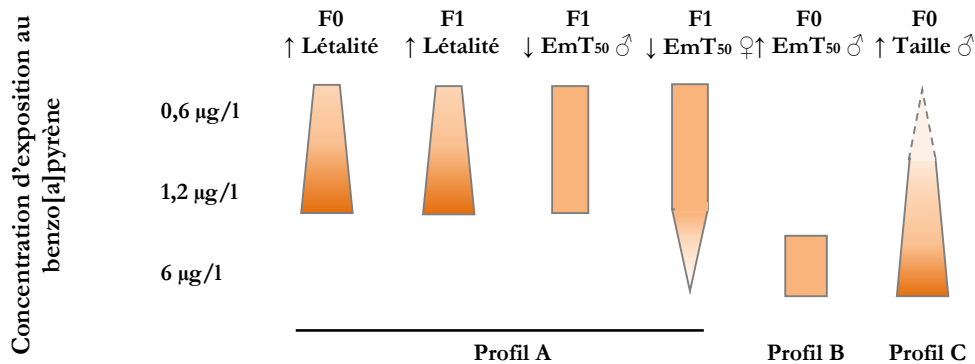


Figure II.15 – Profils d'impact du benzo[a]pyrène selon la dose d'exposition. La présence d'impacts phénotypiques pour chaque trait et concentration testée est représentée par les blocs. La largeur et l'intensité de couleur des blocs représentent l'intensité des effets observés sur les populations exposées par rapport aux populations témoins. EmT₅₀ : temps d'émergence médian.

La variation des profils d'impacts selon les concentrations testées semble indiquer que différents mécanismes d'action du benzo[a]pyrène entrent en jeu (Figure II.15). En effet, si un mécanisme provoque une cohorte de phénotypes sur un organisme, il est vraisemblable qu'une modification ou une inhibition de celui-ci affecte tous les phénotypes qui lui sont associés. Il apparaît ainsi peu probable que les mécanismes sous-jacents de la létalité développementale ou de l'accélération du développement de la descendance (Figure II.15 : profil A), soient les mêmes que ceux impliqués dans l'augmentation de la taille alaire ou dans l'allongement du développement des mâles exposés (Figure II.15 : profil B et C). De telles variations d'impacts selon les doses d'exposition ont été mises en évidence chez le crustacé marin *Trigriopus japonicus*, où les impacts sur les traits d'histoire de vie observés varient selon les concentrations d'exposition chronique au benzo[a]pyrène (Bang *et al.*, 2009). Plus particulièrement, la létalité durant les stades larvaires n'apparaît, dans cette étude, qu'aux expositions à 1 et 10 µg/l, alors que les auteurs ont testé des concentrations allant de 0,1 à 100 µg/l. L'évolution des conséquences physiologiques et individuelles peut ainsi être variable selon le trait considéré, et peut surtout ne pas être strictement croissante avec l'augmentation de la concentration d'exposition à un polluant. Ces observations mettent en lumière la nécessité d'analyser une large cohorte de traits lors des études cherchant à identifier les effets de gammes de concentration de polluants sur les organismes. Le profil d'impact complexe du benzo[a]pyrène rend difficile toute conclusion concernant l'effet de ce polluant sur la dynamique des populations d'*Aedes aegypti*. En effet, la mortalité accrue des individus exposés à 0,6 et 1,2 µg/l de benzo[a]pyrène semble être délétère d'un point de vue populationnel, diminuant le

nombre d'individus reproducteurs produits dans la population. Cependant, l'augmentation de la taille des mâles issus de ces populations exposées est souvent liée à une augmentation tant de leur longévité (Mogi *et al.*, 1996) que de leur capacité de reproduction (Ponlawat et Harrington, 2007, 2009). De même, alors que le développement de leur descendance est accéléré, augmentant la vitesse d'apparition d'individus reproducteurs dans cette descendance, la mortalité accrue durant le développement pourrait contrebalancer cet effet en réduisant le nombre de reproducteurs. Néanmoins, une mortalité modérément accrue durant le développement pourrait être avantageuse pour les individus survivants dans une espèce aussi prolifique qu'*Aedes aegypti*, en diminuant la compétition pour les ressources au sein du milieu et favorisant ainsi le développement d'individus reproducteurs plus robustes (Reiskind et Lounibos, 2009).

L'exposition des populations au bisphénol A provoque une augmentation de la taille alaire des mâles imagos, mais n'apparaît pas influencer sur les autres traits d'histoire de vie des individus. L'exposition à une concentration environnementale de bisphénol A (0,4 µg/l) semble ainsi affecter la croissance des mâles, entraînant les impacts reproductifs précédemment décrits. Or, les perturbations physiologiques sous-jacentes ne semblent pas se répercuter sur leur descendance, qui ne présente pas de développement notablement différent, hormis une surprenante réduction de la mortalité développementale chez la descendance des populations exposées à 4 µg/l de bisphénol A. Étonnamment, notre étude n'a pas révélé d'impact du bisphénol A sur le temps de développement des individus exposés ou de leur descendance. Une étude a pourtant mis en évidence un retard de développement des femelles chez les chironomes (*Chironomus riparius*) exposés à 10 ng/l de bisphénol A tout au long de leur cycle de vie (Watts *et al.*, 2001). En outre, puisque plusieurs études ont mis en évidence l'impact du bisphénol A sur différents aspects de la physiologie du chironome (Watts *et al.*, 2001, 2003; Planelló *et al.*, 2008; Park et Kwak, 2010), des effets plus marqués pouvaient être attendus dans notre étude.

II.4.2 Conséquence de l'exposition multigénérationnelle aux polluants

Différentes populations exposées durant 6 générations successives (G0 à G5) à des concentrations environnementales d'ibuprofène, de benzo[a]pyrène et de bisphénol A ont été élevées, formant ainsi les populations Témoin, Ibu, B[a]P et BPA. Le cycle de vie de ces populations a été étudié en milieu propre afin d'évaluer les conséquences à long terme d'une contamination des milieux. Les observations effectuées sur la G6 ont étonnamment mis en évidence que l'exposition des individus de la G5 n'induit pas les mêmes perturbations développementales chez leur descendance (G6) que l'exposition des individus en G0 sur leur propre descendance (G1). En effet,

aucune modification de la vitesse de développement et des taux de mortalité développementale n'a été mesurée en G6. Cependant, les femelles de la population B[a]P_G6 produisent des pontes modérément réduites, mettant en évidence un éventuel coût reproductif de l'exposition multi-générationnelle au benzo[a]pyrène. L'apparition de coûts en terme de fitness dans des populations tolérantes à un stress est particulièrement bien décrite chez *Aedes aegypti*. En effet, de nombreuses populations résistantes aux insecticides ont été étudiées en laboratoire ou dans l'environnement (Paris *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012; Brito *et al.*, 2013; Diniz *et al.*, 2014; Schechtman et Souza, 2015). Il apparaît dans notre étude que l'exposition à court terme des populations aux polluants ne provoque pas de modification de la tolérance aux deux insecticides larvaires testés. Cependant, les individus des populations Ibu_G6 et B[a]P_G6 apparaissent être plus tolérants au Bti, un insecticide d'origine biologique largement utilisé en démoustication en Europe et en Amérique du Nord. Ces observations mettent en évidence une évolution de la sensibilité et/ou de la réponse physiologique des individus des populations Ibu_G5 et B[a]P_G5 à l'exposition aux différents polluants étudiés, étant donné les répercussions développementales et physiologiques différentes sur leur descendance.

Les deuxièmes générations suivant le retour en milieu propre des populations exposées à l'ibuprofène ou au benzo[a]pyrène (Ibu_G7 et B[a]P_G7) présentent une étonnante divergence de traits vis-à-vis de la population témoin. Les individus de la population Ibu_G7 présentent en effet une accélération du développement accompagnée d'une augmentation de la mortalité développementale, ainsi qu'une distorsion du sex-ratio en faveur des femelles, qui pourrait tout simplement être dû à une mortalité plus spécifique des mâles au cours du développement. De façon similaire, les individus de la population B[a]P_G7 présente une accélération du développement et une augmentation de la mortalité développementale, mais dans des proportions supérieures aux modifications observées dans la population Ibu_G7. Il s'avère difficile de conclure quant aux conséquences populationnelles de l'exposition multigénérationnelles à l'ibuprofène et au benzo[a]pyrène, de par l'influence plutôt favorable d'une accélération du développement et défavorable d'une mortalité accrue.

De telles divergences des traits d'histoire de vie lors d'un transfert en milieu propre de populations élevées en milieu pollué durant de nombreuses générations ont été mises en évidence dans le cas de populations issues de milieux pollués aux métaux dans l'environnement et en laboratoire (Postma, Mol, *et al.*, 1995; Postma, Vankleunen, *et al.*, 1995; Shirley et Sibly, 1999; Saro *et al.*, 2012). Néanmoins, ces études mettent en évidence un coût développemental et reproductif important en milieu propre chez des populations tolérantes à un composé présentant une toxicité

relativement élevée. La situation est moins nette dans notre étude, d'une part car le benzo[a]pyrène et l'ibuprofène n'induisent pas de toxicité massive à court terme, et d'autre part car les individus des populations Ibu_G7 et B[a]P_G7 présentent des modifications de traits d'histoire de vie qui ne peuvent pas tous être directement reliés à un coût en terme populationnel. Sans parler d'adaptation ou d'acclimatation, dont l'effectivité n'est pas démontrable par nos seules expérimentations, cette divergence des populations en milieu propre pourrait être la conséquence d'une optimisation physiologique modelée au fil des générations d'exposition, compensant les impacts des polluants sur les caractéristiques phénotypiques des individus. Cependant, ces états physiologiques optimisés pour les milieux contaminés ne permettent plus les mêmes performances une fois les individus placés en milieu propres, se révélant ainsi au travers de phénotypes individuels divergeant de la population témoin.

Les individus de la population BPA_G6 et BPA_G7 ne présentent aucune modification particulière des traits d'histoire de vie étudiés. Cependant, le seul impact constaté à cette concentration à court terme est une augmentation de la taille alaire des mâles exposés, trait qui n'a pas été suivi lors de l'étude à long terme. Il pourrait ainsi être intéressant de suivre l'évolution de ce trait, en particulier après 6 générations d'exposition à ce polluant.

II.4.3 Impact des polluants en mélange sur le développement des individus

La question de l'impact des mélanges de polluants sur les organismes est régulièrement posée en écotoxicologie (Besse et Garric, 2007; Dulio *et al.*, 2009). Alors que plusieurs études ont mis en évidence une additivité voir même une synergie des effets individuels de différents polluants présents en mélange dans les milieux (Cleuvers, 2003; McCarty et Borgert, 2006; Quinn *et al.*, 2009; Gharred *et al.*, 2015), le mélange de l'ibuprofène, du benzo[a]pyrène et du bisphénol A n'apparaît pas impliquer de tels phénomènes. Au contraire, les perturbations des traits d'histoire de vie des individus exposés et de leur descendance induites par chacun des trois polluants individuellement ne sont pas retrouvées chez les populations exposées aux mélanges quelle que soit la concentration étudiée. Seul un retard du développement des mâles exposés au mélange 10x pourrait correspondre au retard induit par le benzo[a]pyrène chez les mâles exposés à 6 µg/l. Les études reportant une perte d'effets toxiques lors du mélange de polluants sont relativement rares, certainement du fait du faible taux de publication des résultats négatifs. Une étude réalisée au laboratoire a néanmoins mis en évidence un phénomène similaire en étudiant le mélange de deux HAP, le benzo[a]pyrène et le fluoranthène. Le mélange de ces deux polluants entraîne en effet la perte de la toxicité cellulaire démontrée individuellement pour chacun d'eux. Cette perte de toxicité a été mise en relation avec

l'impact respectif de chacun des deux composés sur les voies de métabolisation de l'autre (Tetreau *et al.*, 2014). Dans notre étude, l'évolution des concentrations de l'ibuprofène, du bisphénol A et du benzo[a]pyrène au cours du temps ne semble pas être affectée par la présence simultanée de ces trois polluants dans le milieu. La perte d'effets du mélange de polluant que nous observons ne semble ainsi pas due à une modification de leur dynamique au sein du milieu. Cependant, l'exposition à ces différents polluants pourrait modifier le métabolisme de chacun de ceux-ci au sein des individus, par exemple via un impact sur les voies de détoxification. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par une étude détaillée du mode d'action de chacun des polluants étudiés individuellement et/ou une étude approfondie de leur métabolisme au sein individus. Il pourrait cependant être attendu qu'une sur-activation des systèmes de détoxification durant plusieurs générations successives entraîne un coût énergétique se répercutant sur d'autres paramètres physiologiques tels que la reproduction ou le développement. Ce n'est pourtant pas ce qui est observé après 6 générations d'exposition au mélange 1x. En effet, la descendance des individus exposés en 6^{ème} génération (Mix_G6) ne se différencie pas de la descendance des individus témoins (Témoin_G6). En outre, la deuxième génération élevée en milieu propre (Mix_G7) présente une accélération du développement, excluant *de facto* l'hypothèse selon laquelle le mélange de polluants serait totalement inerte sur la physiologie des individus exposés durant de multiples générations. Il est ainsi envisageable que les effets du mélange de polluants sur la physiologie des individus exposés ne se répercutent pas sur les traits mesurés, mais que ces effets aient tout de même mené à une optimisation physiologique au cours des générations d'exposition se révélant lors du retour des populations en milieu propre.

II.4.4 Conséquences de la contamination des milieux sur la capacité vectorielle des individus

Les conséquences de l'exposition des individus à court et long terme sont délicates à établir d'un point de vue populationnel. En effet, alors que certaines perturbations induites apparaissent plutôt favorables en termes de production d'individus reproducteurs (accélération du développement, augmentation de la taille des mâles...), l'augmentation de la mortalité développementale observée suite à l'exposition à court ou long terme au benzo[a]pyrène ou à l'ibuprofène apparaît plutôt limitant en terme populationnel. Cependant, outre un modèle d'insecte aquatique, *Aedes aegypti* est avant tout un vecteur de maladies responsable de nombreuses épidémies au niveau mondial (Black *et al.*, 2002; Tolle, 2009). La piqûre des femelles imagos peuvent notamment être à l'origine de la transmission du chikungunya, de la dengue, de la fièvre jaune et du virus Zika. Dans ce contexte, une augmentation de la proportion de femelles dans les

populations telle qu'observée dans la population Ibu_G6 s'avère particulièrement problématique. La pollution des milieux a souvent été mise en évidence dans l'apparition de tolérance aux insecticides chimiques utilisés en lutte anti-vectorielle (Poupardin *et al.*, 2008; Riaz *et al.*, 2009; Poupardin *et al.*, 2012; Nkya *et al.*, 2013, 2014). Cependant, seule une étude à notre connaissance a rapporté l'impact d'un herbicide sur la tolérance au Bti, (Boyer *et al.*, 2006). L'apparition d'une tolérance accrue au Bti suite à une exposition multigénérationnelle à des concentrations environnementales d'ibuprofène ou de benzo[a]pyrène pourrait notamment se révéler problématique dans le cadre des campagnes de démoustication visant à contrôler les populations de moustiques.

II.4.5 Conclusions

L'exposition chronique de populations d'*Aedes aegypti* a mis en évidence l'influence de l'ibuprofène, du benzo[a]pyrène et dans une moindre mesure du bisphénol A sur la physiologie des individus et ce, à des concentrations cohérentes avec les mesures hautes effectuées dans l'environnement. L'étude détaillée du cycle de vie de populations exposées a révélé une importante prévalence des perturbations trans-générationnelles. L'influence de l'état métabolique des parents sur les traits d'histoire de vie de la descendance a été mise en évidence chez différents diptères (Bonduriansky et Head, 2007; Buescher *et al.*, 2013; Perez et Noriega, 2013). Il apparaît néanmoins de plus en plus que l'exposition des cellules germinales aux polluants, via l'exposition des parents, puisse affecter la physiologie de la descendance (Vandegheuchte et Janssen, 2014; Wei *et al.*, 2015; Xin *et al.*, 2015). L'étude approfondie des mécanismes impliqués dans les perturbations observées semble particulièrement importante afin de pouvoir appréhender plus en détail l'impact de la pollution des eaux de surface sur la dynamique des populations d'insectes aquatiques.

Notre étude met également en évidence l'impossibilité de prédire l'impact à long terme de l'exposition aux polluants à partir des observations effectuées à court terme, et notamment sur les seuls individus exposés. L'évolution de la réponse des populations à l'exposition aux au fil des générations pose la question des processus micro-évolutifs mis en jeu lors de l'exposition continue des populations aux polluants. Ces questions n'ont pas pu être approfondies lors de cette thèse, mais sont néanmoins particulièrement importantes afin de mieux comprendre l'impact de la pollution continue des eaux de surface sur les populations.

Enfin, ce travail met en évidence que les modifications de traits d'histoire de vie du moustique *Aedes aegypti* suite leur exposition aux polluants sont susceptible d'avoir un impact sur la dynamique de leurs populations. Il est ainsi envisageable que la contamination des milieux puisse affecter la

densité vectorielle de ces populations, ajoutant une dimension plus anthropocentrée à la problématique de la contamination des eaux de surface.

III. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE L'IMPACT TRANS-GÉNÉRATIONNEL DE L'IBUPROFÈNE

III.1	Objectifs de l'étude.....	117
III.2	Démarche expérimentale.....	117
III.3	Méthodologies adoptées.....	119
III.3.1	Élevage des populations étudiées.....	119
III.3.2	Etudes des traits d'histoire de vie.....	122
III.3.2.1	Temps de vie des imagos.....	122
III.3.2.2	Tolérance des jeunes larves de la descendance à la privation de nourriture	122
III.3.2.3	Analyse statistique des traits d'histoire de vie	123
III.3.3	Mesures des ressources métaboliques par RMN-HRMAS	123
III.3.3.1	Échantillonnage des individus	123
III.3.3.2	Acquisition des spectres RMN-HRMAS	125
III.3.3.3	Analyse des profils métaboliques	125
III.3.4	Dynamique des ecdystéroïdes au cours de la maturation des œufs.....	127
III.3.4.1	Échantillonnage et stockage des individus	127
III.3.4.2	Extraction des ecdystéroïdes totaux	127
III.3.4.3	Dosage des ecdystéroïdes.....	127
III.3.4.4	Analyse des données.....	128
III.3.5	Étude de la transcription des gènes	129
III.3.5.1	Approche transcriptomique par RNAseq.....	129
I.5.1.1	Dynamique d'expression des gènes au cours de la maturation des œufs par RT-qPCR.....	136
III.4	Résultats.....	138
III.4.1	Impacts de l'ibuprofène sur les traits d'histoire de vie des populations de moustiques....	138
III.4.1.1	Durée de vie des imagos.....	138
III.4.1.2	Survie de la descendance en condition de jeûne.....	139
III.4.2	Impact de l'ibuprofène sur les réserves métaboliques	140
III.4.2.1	Réserves métaboliques des femelles imagos exposées.....	140
III.4.2.2	Réserves métaboliques des œufs de la descendance	140
III.4.3	Impact de l'ibuprofène sur de la vitellogénèse.....	142
III.4.3.1	Dynamique des ecdystéroïdes.....	142

III.4.3.2	Dynamique transcriptionnelle des gènes de réponse aux ecdystéroïdes.....	143
III.4.4	Impact de l'ibuprofène sur le profil transcriptionnel des individus.....	144
III.4.4.1	Transcriptomique des larves de stade 4 exposées à l'ibuprofène.....	147
III.4.4.2	Transcriptomique des femelles imagos exposées	151
III.4.4.3	Transcriptome des larves de stade 1 de la descendance.....	152
III.5	Discussion.....	162
III.5.1	Impacts de l'ibuprofène sur les individus exposés	163
III.5.2	Impacts de l'ibuprofène sur les individus de la descendance non exposée	167
III.5.2.1	Modifications du métabolisme	169
III.5.2.2	Implication de la signalisation par les ecdystéroïdes dans l'accélération du développement .	170
III.5.2.3	HSF : de la réponse aux stress au développement	172
III.5.2.4	Tolérance aux stress	173
III.5.2.5	Rôle central des voies de signalisation cellulaires dans les modifications individuelles...	174
III.5.3	Origines de l'impact trans-générationnel de l'ibuprofène	178
III.5.3.1	Causes métaboliques de l'impact trans-générationnel.....	178
III.5.3.2	Causes épigénétiques de l'impact trans-générationnel.....	181
III.5.4	Conclusions.....	182

III.1 Objectifs de l'étude

Le but de ce deuxième volet de la thèse a été d'étudier les mécanismes mis en jeu dans les modifications des traits d'histoire de vie induits par une exposition à court terme à l'ibuprofène et précédemment décrits lors du premier volet de la thèse. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux mécanismes impliqués dans l'impact trans-générationnel induit par l'ibuprofène. L'aspect trans-générationnel des impacts de la contamination des milieux par l'ibuprofène a guidé une approche considérant les individus exposés dans différentes phases de leur cycle de vie mais également leur descendance. Afin d'avoir une compréhension globale des impacts de l'ibuprofène sur la physiologie des individus, nous avons adopté une approche intégrative associant l'étude de données moléculaires, métaboliques et hormonales. Bien que des effets similaires aient été observés lors d'exposition aux trois concentrations testées, nous avons choisi de réaliser cette étude mécanistique dans le cadre d'exposition à la concentration la plus faible (1 µg/L), cohérente avec les niveaux de contaminations environnementales observés.

III.2 Démarche expérimentale

L'ensemble des analyses mécanistiques ont été réalisées sur la base d'une unique session expérimentale consistant en l'élevage parallèle de quatre populations témoins et quatre populations exposées à 1 µg/l d'ibuprofène. Des individus ont été échantillonnés tout au long de cette session expérimentale, aux différents stades clés du développement étudiés, comprenant les larves de stade 4 et les imagos des populations parentales, les œufs produits par ces populations et les larves de stade 1 de la descendance. (Figure III.1). Afin d'approfondir les impacts de l'ibuprofène sur les traits d'histoire de vie des populations, le temps de vie des imagos (Figure III.1 : ③) et la survie des larves de stade 1 de la descendance en condition de jeun ont été étudiés (Figure III.1 : ⑨). Par ailleurs, de façon à appréhender l'impact de l'ibuprofène sur la mise en place des réserves métaboliques chez les femelles imagos après leur émergence et dans les œufs produits par ces femelles, une évaluation globale de ces réserves a été réalisée par RMN-HRMAS (Figure III.1 : ②, ⑦). Parallèlement à cela, les effets directs et trans-générationnels de l'ibuprofène sur l'expression génique ont été évalués par mRNAseq chez les larves de stade 4 élevées en milieu pollué, les femelles imagos matures, et les larves de stade 1 de la descendance élevées en milieu non contaminé (Figure III.1 : ①, ④, ⑧).

Chez les femelles, la prise du repas de sang déclenche la production d'ecdystéroïdes par les ovaires, avec plus particulièrement la synthèse de 20-hydroxyecdysone (20E), l'ecdystéroïde considéré le plus biologiquement actif. Cette production de 20E débute dans les 8 heures suivant le repas de sang, pour atteindre un maximum après environ 18 à 24 h. Le pic de 20E est finement régulé dans le temps, et entraîne l'expression d'une importante cohorte de gènes impliqués dans un processus appelé vitellogénèse (Bonizzoni *et al.*, 2011). La vitellogénèse est un processus clé dans la maturation des œufs, durant lequel le corps gras produit massivement les protéines précurseurs du vitellus (YPP, yolk precursor proteins) internalisées dans les oocytes, fournissant les ressources protéiques et métaboliques nécessaires au développement embryonnaire. Afin d'étudier une éventuelle perturbation de cette phase clé de la reproduction chez *Aedes aegypti* par l'ibuprofène, des femelles ont été échantillonnées à plusieurs intervalles de temps dans les 48h suivant la prise du repas de sang de façon à suivre la dynamique de la production d'ecdystéroïdes et la transcription de certains gènes clefs de la vitellogénèse (Figure III.1 : ⑤, ⑥).

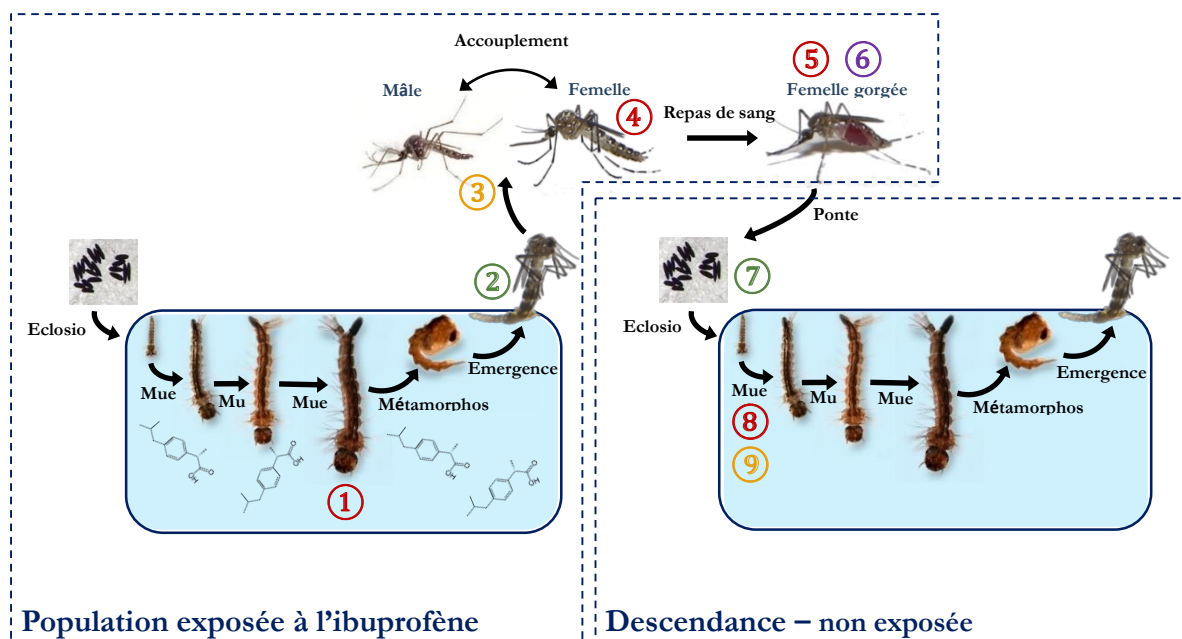


Figure III.1 - Echantillonnage des individus pour l'étude intégrative du mode d'action de l'ibuprofène

Paramètres mesurés

Temps de vie des individus

③ - Temps de vie des imagos

⑨ - Tolérance des larves de stade 1 de la descendance à la privation de nourriture

Dosage des ecdystéroïdes

⑥ - Taux d'ecdystéroïdes durant la maturation des œufs

Ressources énergétiques et métaboliques

② - Réserves métaboliques des femelles 0h post-émergence

⑦ - Réserves métaboliques des œufs de la descendance

Expression des gènes

① - Larves exposées stade 4 - séquençage haut débit des ARN

④ - Femelles exposées - séquençage haut débit des ARN

⑤ - Femelles gorgées exposées - dynamique transcriptionnelle par qPCR

⑧ - Larves de la descendance stade 1- séquençage haut débit des ARN

III.3 Méthodologies adoptées

III.3.1 Élevage des populations étudiées

Pour cette étude, quatre populations exposées à 1 µg/l d'ibuprofène et quatre populations témoins exposées au solvant seulement (éthanol) ont été élevées en parallèle dans des conditions identiques aux expérimentations menées lors du premier volet de la thèse (voir chapitre II : 2.1 et 2.2) (Figure III.2 : encadré noir). Ces différents réplicats seront dans la suite du manuscrit appelés « population-réplicat ». Un lot de 35 larves de stade 4 comprises entre 34 et 40 heures post-mue a

été échantillonné dans chaque population-réplicat au cours de l'exposition à l'ibuprofène pour effectuer l'analyse transcriptomique des individus directement exposés à l'ibuprofène. Les imagos émergés de chacune de ces populations ont été comptés et collectés deux fois par jour puis placés en cages de reproduction. Parmi les imagos émergés, des femelles et des mâles vierges ont été récupérés dans chaque population et placés en cages non mixtes afin d'évaluer le temps de vie des individus vierges. Des femelles ont également été échantillonnées dans chaque population-réplicat dans les 20 minutes après leur émergence pour l'étude des réserves métaboliques par RMN-HRMAS et à 72 heures post-émergence pour l'analyse transcriptomique par mRNAseq. Un repas de sang a été mis à disposition des femelles 15 jours après le début de l'expérimentation, et des femelles gorgées ont été échantillonnées à différents intervalles dans les 48 heures suivant le repas de sang de manière à effectuer les dosages des taux d'ecdystéroïdes par dosage enzymatique EIA (Enzymatic ImmunoAssay) et l'étude de l'expression de certains gènes clé de la vitellogénèse par RT-qPCR. Des femelles ont été collectées dans chaque population après la ponte et isolées en cage de manière à évaluer la durée de vie des femelles ayant été fertilisées et ayant déjà pondu une fois. Les œufs pondus dans les cages de reproduction ont été collectés et séchés. Après une semaine de séchage, des lots d'œufs ont été échantillonnés dans chaque ponte afin de réaliser l'évaluation des réserves métaboliques par RMN-HRMAS. Des lots d'œufs provenant de chaque population ont également été mis à éclore simultanément après une semaine de séchage. A partir de ces œufs, des premiers lots de larves écloses depuis moins de 30 minutes ont été formés et placés en milieu d'éclosion non pollué supplémenté en nourriture. Ces larves de stade 1 ont été collectées à 10 h post-éclosion pour l'analyse du transcriptome de la descendance. En parallèle, 3 lots de 20 larves écloses depuis moins de 1h ont été isolés par population. Ces lots ont été placés dans de l'eau du robinet simple sans ajout d'alimentation afin d'évaluer leur survie en condition de jeûne.

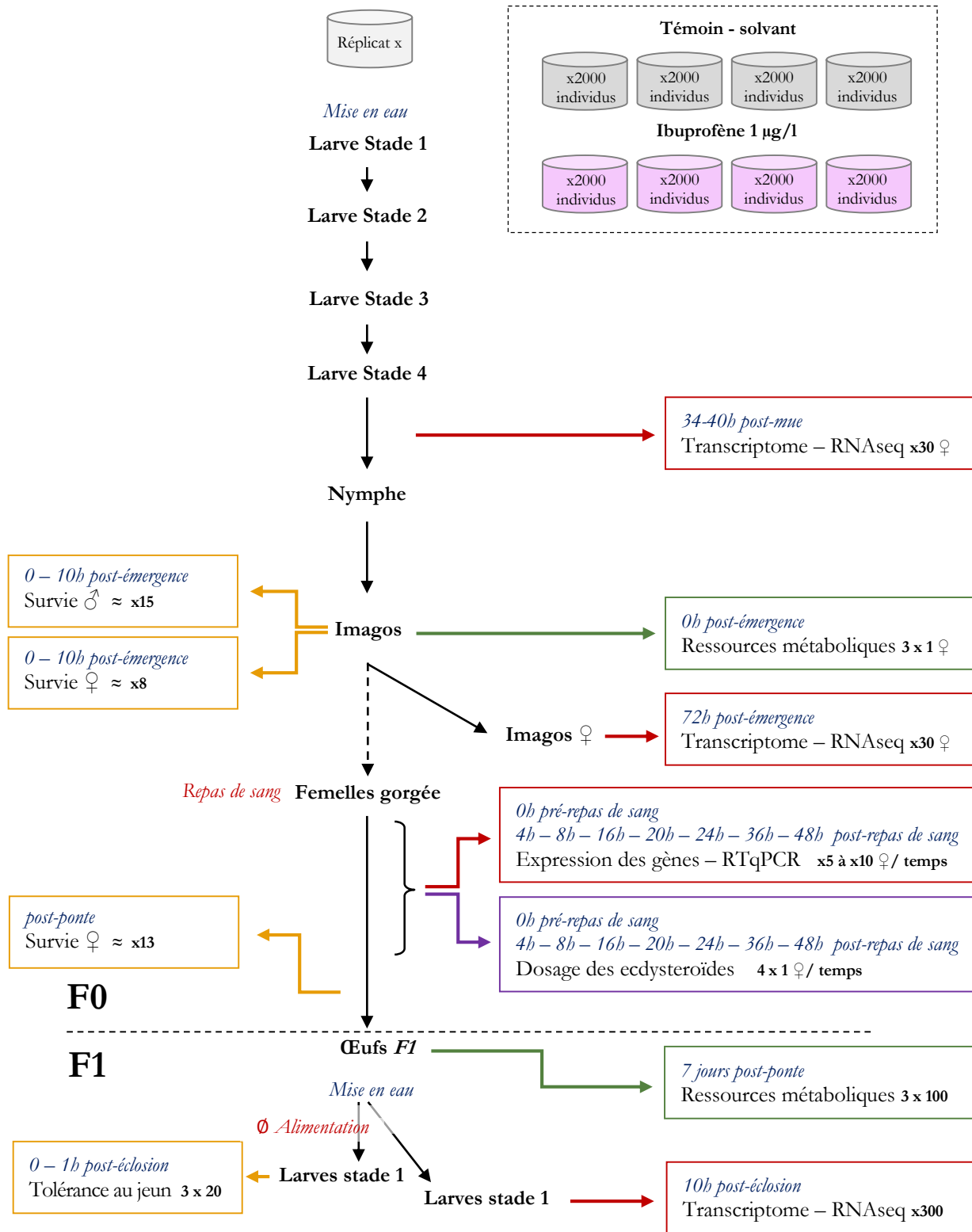


Figure III.2 - Plan d'échantillonnage des individus lors de l'étude des mécanismes impliqués dans l'impact trans-générationnel de l'ibuprofène

III.3.2 Etudes des traits d'histoire de vie

Afin d'approfondir l'étude des effets de l'ibuprofène, des mesures de traits complémentaires à celles effectuées lors de la première partie de cette thèse ont été réalisées.

III.3.2.1 Temps de vie des imagos

Le temps de vie des imagos a été évalué. Les cages de survie permettaient un accès illimité en eau et en sucrose 10 %. Le nombre d'individus morts dans chaque cage a été mesuré quotidiennement jusqu'à la mort du dernier individu survivant.

Ces temps de vie ont été évalués sur des individus vierges afin de prendre en compte la durée de vie des individus en dehors de toute interférence avec le processus de reproduction. Dans chaque population-réplicat, entre 15 et 20 mâles émergés dans un laps de temps de 10 à 12 heures et ont été placés dans 8 cages de survie selon leur population d'origine. Parallèlement, 34 et 32 femelles vierges ont respectivement été isolées des quatre populations réplicats témoin et exposés et regroupées dans une cage de survie unique par condition.

Le temps de vie des femelles ayant effectué un cycle de reproduction a également été étudié. Pour cela, entre 10 et 16 femelles provenant des cages de reproduction, ayant été soumises à un repas de sang et ayant accompli un cycle de ponte ont été récupérées et placées dans 8 cages de survie selon leur population d'origine. Les cages de reproduction ayant été formées au fur et à mesure de l'émergence des individus, ces femelles ont émergé dans un créneau de 4 jours. Le « temps depuis l'émergence » a été pris en compte à partir du jour intermédiaire de cet intervalle de temps.

III.3.2.2 Tolérance des jeunes larves de la descendance à la privation de nourriture

Les œufs de la descendance ont été mis à éclore après une semaine de séchage. Trois lots de 20 larves écloses depuis moins de 1h ont été isolés par population-réplicat, formant ainsi 12 lots par condition. Ces lots ont été placés dans de l'eau du robinet simple, sans ajout d'alimentation afin d'évaluer leur survie en condition de jeun. Au cours de cette étude, les larves réagissant au contact léger avec une pince ont été considérées comme vivantes, celles ne présentant pas de mouvement ont été considérées mortes. Les larves restant en vie ont été comptabilisées quotidiennement jusqu'à la mort de la dernière. Les restes de larves mortes ont été retirés au fur et à mesure des comptages afin d'éviter tout phénomène de nécrophagie.

III.3.2.3 *Analyse statistique des traits d'histoire de vie*

Les courbes de survie des imagos et des larves de la descendance obtenues à partir des individus issus des populations-réplicat témoin et exposées ont été comparées à l'aide d'un test de survie de Kaplan-Meier.

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R 3.0.3 (R Development Core Team, 2007).

III.3.3 *Mesures des ressources métaboliques par RMN-HRMAS*

Afin d'étudier l'impact de l'exposition à l'ibuprofène sur les ressources métaboliques des femelles imagos et de leur descendance, une approche par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) high resolution magic angle spinning (HRMAS) du proton a été adoptée. La démarche expérimentale adoptée lors de cette analyse est résumée dans la figure III.3. La RMN-HRMAS est une technique d'analyse non destructive permettant la détection simultanée des métabolites (sucres, acides aminés, lipides) d'un échantillon hétérogène, comme par exemple un morceau d'organe ou même un organisme entier (Righi *et al.*, 2010). Plus particulièrement, le principe de cette méthode est basé sur la rotation des échantillons selon un angle de $54,74^\circ$ par rapport au champ magnétique, appelé « angle magique », qui permet une amélioration de la résolution des bandes de résonances mesurées sur échantillons solides ou hétérogènes par rapport à la RMN classique. Cette technique présente l'avantage de ne nécessiter aucune extraction préalable des échantillons, évitant ainsi la variabilité et les biais dus à cette étape, et permet de travailler sur des quantités relativement faibles d'échantillons (quelques milligrammes). L'acquisition des spectres est en outre rapide, ne prenant que quelques dizaines de minutes, donnant ainsi un accès simple et rapide aux données métaboliques.

III.3.3.1 *Échantillonnage des individus*

Trois femelles imagos ont été prélevées dans chaque population-réplicat, dans les 20 minutes suivant leur émergence. Ces femelles ont été individuellement placées vivantes dans des inserts et immédiatement immergés dans de l'azote liquide avant stockage à -80°C . L'analyse des imagos porte ainsi sur 12 femelles individuelles par réplicat. De même, trois lots de 100 œufs F1 ont été récupérés après 7 jours de séchage dans les pontes F1 de chaque population-réplicat. Ces lots de 100 œufs ont été placés vivants dans des inserts et immergés dans de l'azote liquide avant stockage au -80°C .

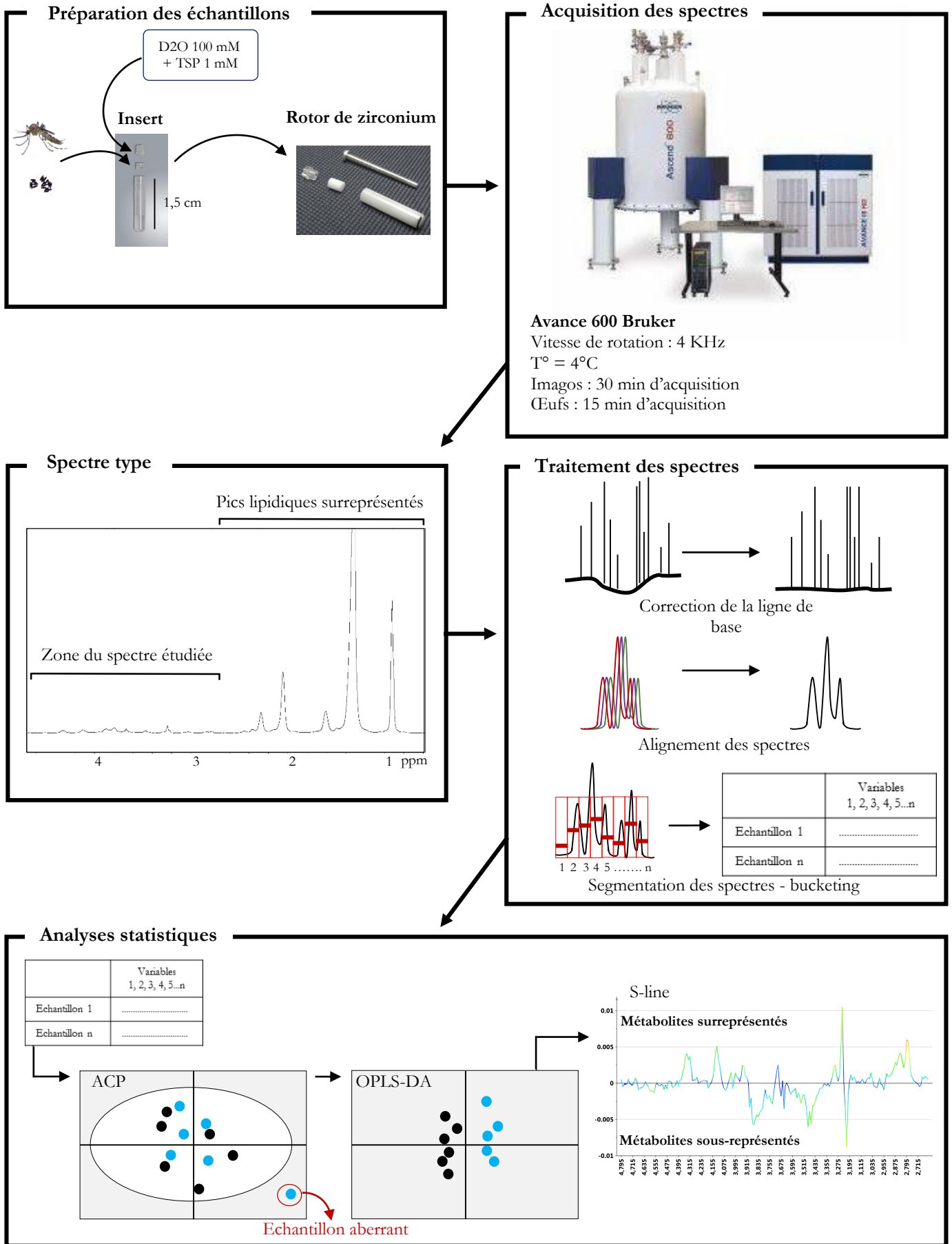


Figure III.3 - Démarche expérimentale de l'étude des ressources métaboliques dans les femelles imagos et les œufs de la descendance par RMN-HRMAS

III.3.3.2 Acquisition des spectres RMN-HRMAS

L'acquisition des spectres par RMN-HRMAS a été effectuée au sein des installations du CEA de Grenoble par le Dr Florence Fauvelle de l'Institut des Neurosciences de Grenoble, France.

Les échantillons ont été analysés par RMN-HRMAS ^1H . Juste avant l'analyse, 10 μL de tampon phosphate à base d'eau lourde (D_2O) (100 mM, pH 7), complété avec 1 mM de triméthylsilylpropionate (TSP), ont été ajoutés dans les inserts. Le TSP sert de standard interne au cours de l'analyse. Les inserts ont par la suite été insérés individuellement dans un rotor de zirconium (BrukerBiospin, Wissembourg, France) pour l'acquisition du spectre RMN ^1H . L'acquisition du spectre a été effectuée à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance III 600 (BrukerBiospin, Wissembourg, France) avec une sonde HRMAS ^1H - ^1H . Les échantillons ont été analysés avec des temps d'acquisition de 30 min pour les imagos et de 15 min pour les œufs, Durant la mesure, les échantillons ont été maintenus à une température de 4°C.

III.3.3.3 Analyse des profils métaboliques

Vingt-trois spectres correspondant à 11 femelles imagos témoins et 12 femelles imago exposées à l'ibuprofène ont été obtenus. Vingt-quatre spectres correspondant à 12 lots de 100 œufs issus des populations témoins et 12 autres issus des populations exposées à l'ibuprofène ont été réalisés. Les spectres obtenus ont été tout d'abord formatés à l'aide du logiciel TopSpin 3.1 (Bruker Biospin, Karlsruhe, Allemagne). Dans un premier temps, la ligne de base des spectres a été corrigée, puis les spectres ont été réalignés selon le signal de référence correspondant au TSP, identifié à 0 ppm.

Les pics lipidiques situés entre 0,7 et 2,7 ppm étant particulièrement larges et surreprésentés (Figure III.3), ceux-ci ont dû être mis de côté lors de l'analyse afin de ne pas entraîner une importante variabilité parasite dans notre jeu de données. Ainsi, seule la zone allant de 2,7 à 4,8 ppm a été exploitée dans nos analyses. Les pics détectés dans cette zone sur les spectres ont été assignés à des métabolites en fonction de leur déplacement chimique (mesuré en ppm), caractéristiques de liaisons carbone-hydrogènes se trouvant dans des environnements électroniques spécifiques.

Les spectres ont été divisés en petits segments, ou « buckets », avec un pas de 0,01 ppm grâce au logiciel AMIX (Bruker Biospin, Karlsruhe, Allemagne). Ces buckets sont définis par une valeur dépendant de la hauteur du signal présent dans l'intervalle de ppm considéré, normalisée par

rapport à l'amplitude totale du spectre. Les buckets ainsi générés forment pour chaque spectre une série de 217 variables quantitatives.

Les séries de buckets correspondants aux spectres d'imagos ou d'œufs ont été séparément analysés à l'aide du logiciel d'analyse statistique multivariée SIMCA V14 (UmetricsAB, Umea, Suède). Les variables obtenues ont été tout d'abord analysées à l'aide d'une analyse en composantes principales (ACP). Les différents échantillons considérés ont ainsi pu être résumés graphiquement en points uniques résumant dans un espace multidimensionnel le grand nombre de variable définissant chaque spectre, permettant ainsi de s'assurer de l'homogénéité des données et d'éliminer d'éventuels échantillons aberrants. Une régression partielle des moindres carrés orthogonale en analyse discriminante (OPLS-DA) (Bylesjö *et al.*, 2006; Westerhuis *et al.*, 2010) définie par des variables prédictives X (les buckets composant chaque spectres) et dépendantes Y (les échantillons issus de populations témoins et exposées) a été employée pour approfondir l'analyse des données. Cette analyse supervisée, c'est-à-dire prenant en compte une connaissance « à priori » des groupes étudiés, permet de mettre en évidence les variables responsables de la discrimination des groupes prédéfinis, mais aussi d'intégrer une notion de validation des résultats. En effet, cette méthode est caractérisée par les paramètres d'explication de la variabilité intra-classe R^2X et de la variabilité orthogonal interclasse R^2Y , ainsi que par l'erreur de prédiction du modèle Q^2 . Selon leurs valeurs dans le modèle considéré, ces paramètres permettent d'évaluer la validité de celui-ci. Les valeurs de R^2Y et Q^2 doivent être les plus élevées possible sur une échelle allant jusqu'à 1, la valeur de Q^2 devant toujours être inférieure à la valeur de R^2Y , sans pour autant que la différence soit de plus de 0,3 unités. Un modèle présentant des valeurs de $Q^2 > 0,5$ et de $R^2Y > 0,5$ est communément considéré valide. Les valeurs de Q^2 et de R^2Y dépendent du nombre de composantes incluses dans le modèle, défini de façon à optimiser les valeurs prédictives et explicatives orthogonale. L'OPLS-DA permet d'établir une représentation graphique nommée « S-line », un graphique mimant un spectre RMN et représentant la covariance (intensité des pics) et la corrélation (échelle colorimétrique) entre les groupes témoins et exposés définis dans l'analyse. Plus simplement, ce graphique permet de mettre en évidence de manière visuelle la contribution des différentes portions du spectre (correspondant à des métabolites) à la variabilité entre les deux groupes étudiés. Le sens des pics observés sur la S-line nous informe sur le sens des différences d'abondance du métabolite concerné entre les échantillons (les pics positifs indiquent ainsi une surabondance par rapport aux échantillons témoins et inversement) tandis que la couleur attribuée aux pics indique la contribution de ceux-ci à la variabilité entre les groupes d'échantillons : rouge pour la contribution la plus significative, avec une corrélation supérieure à 0,9 et bleu marine pour les contributions minimales, avec une corrélation inférieure à 0,1 (Figure III.3).

III.3.4 Dynamique des ecdysteroïdes au cours de la maturation des œufs

Le protocole de dosage des ecdysteroïdes ainsi que les stocks de traceur et d'anticorps anti 20-hydroxyecdysone (20E) ont été gracieusement fournis par le Dr Chantal Dauphin-Villemant.

III.3.4.1 Échantillonnage et stockage des individus

Afin de suivre l'évolution des taux d'ecdysteroïdes au cours du cycle hormonal déclenché par le repas de sang, des femelles ont été échantillonnées dans chaque population-réplicat après le repas de sang mis à disposition de manière simultanée. Dans chaque population-réplicat, quatre femelles ont été échantillonnées 30 minutes avant le repas de sang (titre hormonal de référence), et 4h, 8h, 16h, 20h, 24h, 36h et 48h après celui-ci. Entre 8 et 16 femelles témoins et autant de femelles exposées à l'ibuprofène ont ainsi été analysées pour chaque temps considéré. Les femelles ont immédiatement été placées individuellement dans des tubes contenant 250 µl de méthanol (MeOH) pro-analysis (Merk, Darmstadt, Allemagne) et conservées à -20°C.

III.3.4.2 Extraction des ecdysteroïdes totaux

Les femelles ont été broyées dans le MeOH pur ayant servi à les conserver. Suite à un passage au bain à ultrasons, puis à un culottage des débris par centrifugation, le surnageant a été récupéré. Le culot restant a été ré-extrait deux fois de suite dans 250 µL de MeOH/eau (70 :30). Les 750 µL de MeOH/eau ainsi récupérés ont été évaporés dans un speed-vac, puis repris dans 250 µL de tampon EIA (tampon phosphate pH 7,4 - 0,1M ; NaCl 23,4 g/l ; EDTA 10⁻³ M ; Albumine de sérum bovin (BSA) 0,1%).

III.3.4.3 Dosage des ecdysteroïdes

Le dosage des ecdysteroïdes a été effectué par « enzyme immunoassay » (EIA). Ce dosage est basé sur la compétition des ecdysteroïdes avec un traceur enzymatique au niveau des anticorps primaires, qui sont eux-même fixés au fond de puits par l'intermédiaire d'anticorps secondaires. L'ecdysone et la 20E contenues dans les échantillons ayant une affinité forte pour les anticorps primaires, ces molécules prendront la place du traceur au niveau des sites antigéniques, diminuant ainsi la proportion de traceur lié à l'anticorps. Les traceurs non liés sont éliminés des puits au cours de rinçages. Au contact d'ortho-phenylenediamine (OPD) et d'eau oxygénée (H₂O₂), la peroxydase liée au traceur forme un produit orangé, le ((OPD)₂H₂), détectable en spectroscopie à 450 nm.

Ainsi, plus le taux d'ecdystéroïdes contenu dans l'échantillon est élevé, moins la quantité de traceur fixé dans les puits est importante, diminuant ainsi le signal mesuré à 450 nm.

Lors de ces dosages, l'hydroxyecdysone-2-succinate couplée à la peroxidase (traceur N2) et l'anticorps anti-20E AS4919 ont été utilisés. L'anticorps AS4919 se lie à la fois à la 20E et à l'ecdysone, avec une affinité pour l'ecdysone 3,8 fois plus forte que pour la 20E. Le dosage effectué prend ainsi en compte ces deux formes de l'hormone étudiée, et est donc considéré comme un dosage des ecdystéroïdes totaux. La gamme de référence du dosage a été effectuée avec de la 20E (Sigma-Aldrich Saint-Louis, Etats-Unis) diluée dans le tampon EIA, et les résultats du dosage sont exprimés en équivalents-20E.

Les dosages ont été effectués en plaques 96 puits pour tests ELISA (Greiner Bio-One SAS, Courtaboeuf, France), dont les puits ont été préalablement coatés durant 24h à température ambiante avec l'anticorps secondaire Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG (Interchem, Paramus, Etats-Unis) et saturés à la BSA (3 g/l dans tampon EIA) au moins une nuit à 4°C. Après 5 rinçages (tampon phosphate pH 7,4 - 0,01M ; 0,05 % Tween 20), 50 µl de traceur enzymatique N2 (dilution d'utilisation 1:100000, dans tampon EIA), 50 µl d'échantillon ou de standard de gamme et 50 µl d'anticorps anti-20E (dilution d'utilisation 1:100000, dans tampon EIA) ont été ajoutés dans cet ordre dans chaque puits. Après 3h d'incubation à température ambiante, les plaques ont été rincées 5 fois comme précédemment, puis 100 µL de solution de coloration (tampon phosphate-citrate 0,1M, pH 5 ; H₂O₂ 0,012 % ; OPD 0,5 g/l) ont été ajoutés dans chaque puits. Les mesures spectrométriques ont été effectuées à 450 nm après 1h d'incubation à l'aide d'un lecteur de microplaques (Varioskan Flash, Thermoscientific, Waltham, Etats-Unis).

III.3.4.4 *Analyse des données*

Chaque échantillon a été dosé en duplicat. La quantité d'ecdystéroïde présente chez chaque femelle étudiée a été déterminée en équivalents 20E à partir de la gamme de calibration. Les quantités moyennes d'ecdystéroïde ont été comparées entre les femelles témoins et les femelles exposées séparément pour chaque temps à l'aide d'un test de Student après avoir vérifié la normalité et l'homoscédasticité des données. Le coefficient de variation inter-plaques est mesuré à 3 % à partir d'un standard interne ajouté dans chacune des plaques testées.

III.3.5 Étude de la transcription des gènes

III.3.5.1 Approche transcriptomique par RNAseq

Les transcriptomes des larves de stade 4 (L4F0), des femelles imagos de la F0 (FemF0) et des larves de stade 1 de la descendance F1 (L1F1) ont été étudiés (Figure III.4) (cf partie 3.1). Des lots de 35 larves de stade 4 de la F0 ont été échantillonnés dans les 34 à 40 heures suivant la mue des individus, et immédiatement placés dans 250µl de TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) puis stockés à -80°C. Des lots de 30 femelles imagos vierges de la F0 ayant émergé dans un intervalle de temps de 10h ont été isolés dès leur émergence et placés en cages avec un accès ad libitum à du sucrose 10 % et de l'eau durant 72h. Après 72h les femelles ont été euthanasiées instantanément dans le l'éthanol 70%, puis immédiatement immergées dans du RNAlater (Ambion, Austin, TX, USA). De même, les lots de 300 larves de la descendance F1, écloses depuis moins de 30 minutes, ont été formés et placés en milieu d'éclosion non pollué supplémenté par 20 mg de nourriture durant 10h. Les lots de 300 larves ont ensuite été immergés dans du RNAlater. Les tubes d'échantillons immergés dans du RNAlater ont tout d'abord été placés durant 24h à 4°C puis stockés à -20°C, selon les instructions du fabricant.

Les ARN totaux des lots L4F0 et des lots L1F1 ont été extraits au TRIzol, selon le protocole établi par le fabricant. Les ARN totaux des lots FemF0 ont été extraits à l'aide du kit « Absolutely RNA miniprep kit » (Agilent technologies Santa Clara, Etats-Unis. La qualité des ARN extraits a été évaluée sur BioAnalyseur 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis). Parmi les quatre échantillons d'ARN obtenus pour chaque condition d'exposition, les trois présentant le meilleur profil de qualité ont été utilisés pour le séquençage massif des ARN messagers. Les bibliothèques d'ADN complémentaires (ADNc) servant de support au séquençage ont été générées à l'aide de kits « TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit » (Illumina Inc., San-Diego, Etats-Unis), à partir de 400 ng d'ARN. Le contrôle qualité, la préparation des bibliothèques d'ADNc à partir des ARN extraits et le séquençage de ceux-ci ont été effectués en sous-traitance par l'entreprise Helixio (Groupe Hybrigenics, Saint Beauzire, France). Les échantillons FemF0 et L1F1 ont été séquencés par fragments simple-brin de 150 paires de bases. Les échantillons L4F0 ont été séquencés par fragments simple brin de 75 paires de base.

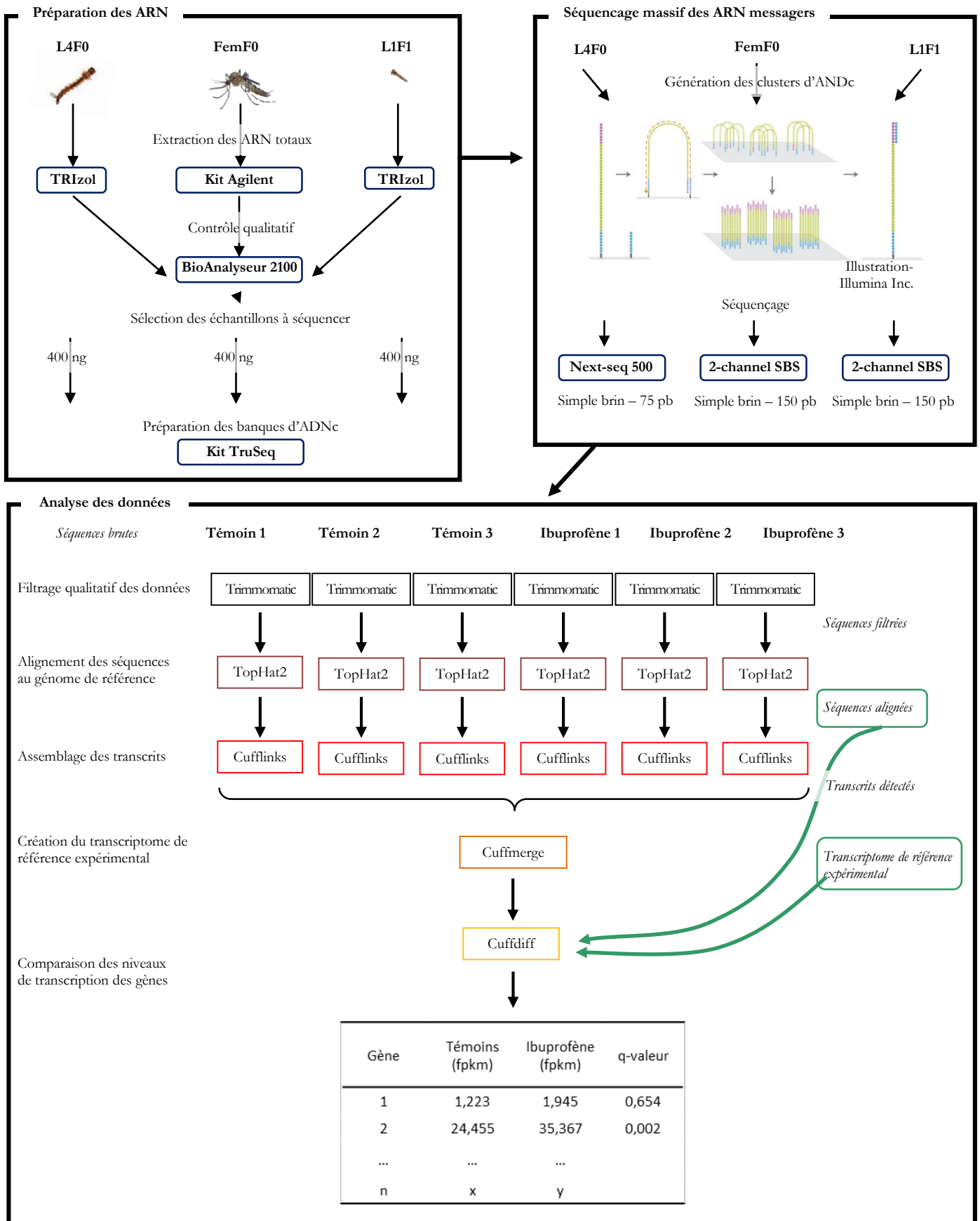


Figure III.4 - Démarche expérimentale de l'étude des transcriptomes des populations exposées à l'ibuprofène et de leur descendance. L4F0 : Larves de stade 4 de la génération parentale. FemF0 : Femelles imagos de la génération parentales. L1S1 : Larves de stade 1 de la descendance. Le séquençage a été effectué à l'aide des technologies de séquençage Illumina. Après un nettoyage des données obtenues dans les trois études par le logiciel Trimmomatic, les séquences ont été alignées sur le génome de référence à l'aide du logiciel Tophat2. L'assemblage des transcriptomes et la comparaison des niveaux de transcription des gènes dans les différents échantillons étudiés ont été effectuées à l'aide de l'ensemble de logiciels Cufflinks : Cufflinks, Cuffmerge, et Cuffdiff.

La plateforme Galaxy, implantée sur un serveur situé et géré par le Pôle Rhône-Alpes de Bioinformatique (PRABI), a été utilisée pour réaliser le traitement bioinformatique de ces données de séquençage. La technologie de séquençage Illumina génère, pour chaque base, un score de qualité, appelé score « Phred », rendant compte de la probabilité qu'une position donnée ait été incorrectement assignée (Tableau III.1)(Illumina Inc., 2011).

Tableau III.1 - Interprétation des scores de qualité Phred établis lors du séquençage

Score Phred	Probabilité de mauvaise assignation
10	1 pour 10
20	1 pour 100
30	1 pour 1000
40	1 pour 10 000
50	1 pour 100 000

Les données de séquençage brutes ont tout d'abord été filtrées selon leur qualité grâce à l'outil Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Cet algorithme, développé spécifiquement pour les données de séquençages générées par la technologie Illumina, permet d'éliminer du jeu de données les séquences ou les portions de séquences ne répondant pas aux seuils de qualité prédéfinis par l'utilisateur. Les données brutes de séquençage des trois types d'échantillons étudiés dans ce projet ont été filtrées selon les paramètres présentés dans le tableau III.2.

Tableau III.2 - Paramètres qualitatifs appliqués lors du nettoyage des données brutes de séquençage par le logiciel Trimmomatic

Paramètre qualité considéré	Echantillon	Seuil établi	Action
Phred moyen sur une fenêtre glissante de 4 paires de bases	L4F0	Phred < 15	Suppression de la séquence
	FemF0	Phred < 15	
	L1F1	Phred < 15	
Score Phred des bases en 5' et 3' considérées une par une	L4F0	Phred < 20	Suppression des bases
	FemF0	Phred < 20	
	L1F1	Phred < 20	
Taille totale du fragment résultant	L4F0	< 60 paires de bases	Suppression de la séquence
	FemF0	< 80 paires de bases	
	L1F1	< 80 paires de bases	

L'alignement des séquences filtrées sur le génome de référence, l'assemblage et la quantification du transcriptome ainsi que la comparaison des taux de transcription des gènes selon les conditions d'élevage ont été effectuée selon la démarche développée par l'équipe de Cole Trapnell (Roberts et al., 2011; Trapnell et al., 2013). Pour commencer, les séquences filtrées de chaque échantillon ont été alignées à l'aide du logiciel TopHat2 (Trapnell et al., 2009) sur la séquence du génome de référence d'*Aedes aegypti* (liverpool_scaffold_AaegL3.3, disponible sur l'URL suivante : <https://www.vectorbase.org/download/aedes-aegypti-liverpoolscaffoldsaaegl3fagz>). Le logiciel TopHat2 présente notamment l'avantage de prendre en compte les séquences potentiellement à cheval sur un site d'épissage, augmentant ainsi grandement le nombre de séquences alignées sur le génome et prises en compte dans la suite de l'analyse. Différents paramètres d'alignement ont été utilisés pour les différents stades étudiés de par la différence de taille des fragments séquencés (75 pb et 150 pb). L'objectif de notre étude étant de comparer de manière la plus précise possible l'abondance des transcrits dans les différents échantillons et non de réannoter de nouveaux transcrits potentiels, ces paramètres ont été définis de manière stringente. Les insertions et délétions n'ont notamment pas été autorisées lors de l'alignement des séquences sur le génome. La fonction « coverage search », a été appliquée pour chacun des alignements, permettant ainsi de maximiser la spécificité des alignements. Ces paramètres sont présentés dans le tableau III.3.

Tableau III.3 - Paramètres appliqués à l'alignement des séquences sur le génome de référence par TopHat2. Après avoir aligné les séquences directement sur le génome, TopHat2 cherche ensuite à rechercher des alignements de part et d'autre d'une potentielle région intronique, afin d'optimiser l'alignement des séquences.

Paramètre	L4F0	FemF0	L1F1
Nombre de différence maximum avec la séquence de référence (mésappariement, insertions, délétions)	2	4	4
Nombre de mésappariements maximum	2	4	4
Taille minimum des introns (pb)	45	45	45
Taille maximum des introns (pb)	300000	300000	300000
Nombre maximum d'alignements sur le génome ¹	1	1	1
Taille minimum de l'alignement de part et d'autre d'un potentiel site d'épissage (pb)	30	50	50
Nombre de mésappariements maximum dans les régions autour d'un site d'épissage	0	0	0

¹ Seul le meilleur alignement est pris en compte dans le fichier de sortie

Le logiciel Cufflinks utilise les alignements sur le génome générés par TopHat2 afin d'assembler les différents fragments en transcrits. Les séquences alignées ont ainsi été assemblées en transcriptomes expérimentaux pour chaque échantillon à l'aide de ce logiciel (Cufflinks 0.0.7), en utilisant le génome de référence d'*Aedes aegypti* comme carte de référence.

Les transcriptomes expérimentaux générés par Cufflinks pour chaque échantillon correspondant aux trois stades de développement étudiés ont été regroupés en trois transcriptomes de référence expérimentaux à l'aide du logiciel Cuffmerge (version 0.0.6). Ces transcriptomes de référence expérimentaux présentent l'avantage de permettre de concentrer les efforts de calcul sur les transcrits réellement observés dans nos échantillons et non sur tous les transcrits référencés chez *Aedes aegypti* lors de l'étape de comparaison de la transcription des gènes entre les échantillons.

La qualité des transcriptomes expérimentaux de référence ainsi obtenus a été évaluée à l'aide du logiciel Cuffcompare (version 0.0.6), permettant de comparer les transcriptomes expérimentaux générés par Cuffmerge au transcriptome de référence publié pour *Aedes aegypti* (Liverpool_BASEFEATURE_AaegL3.3 ; <https://www.vectorbase.org/download/aedes-aegypti-liverpoolbasefeaturesaaegl33gtfgz>). Les paramètres de qualité des transcriptomes de référence expérimentaux sont présentés dans le tableau III.4. Alors que l'assemblage des transcriptomes expérimentaux FemF0 et L1F1 correspond bien au transcriptome de référence publié pour *Aedes aegypti*, le transcriptome assemblé à partir des échantillons L4F0 présente un nombre très important de séquences ne correspondant à aucun transcrit de référence. La prise en compte de ces transcrits « artefactuels », risquant d'entraîner un bruit important lors de la comparaison des niveaux de transcription des gènes, les 21144 transcrits ne correspondant à aucun transcrit de référence ont été retirés du transcriptome expérimental des échantillons L4F0 avant de poursuivre.

Tableau III.4 - Qualité des transcriptomes expérimentaux assemblés par Cuffmerge. Les transcriptomes expérimentaux ont été comparés au transcriptome de référence d'*Aedes aegypti* à l'aide du logiciel Cuffcompare.

	L4F0	FemF0	L1F1
Nombre de transcrits détectés	48398	18866	18866
Transcrit potentiel correspondant à un transcrit de référence	17665	18666	18666
Nouvel isoforme potentiel	9588	200	200
Ne correspond à aucun transcrit de référence	21144	0	0

Les niveaux de transcription des gènes ont été calculés à partir des alignements effectués par TopHat2 et comparés statistiquement à l'aide du logiciel Cuffdiff (version 0.0.7). Les échantillons FemF0 et L1F1 ont été comparés en se basant les transcriptomes de référence expérimentaux, tandis que les échantillons L4F0 ont été comparés en se basant le transcriptome de référence publié pour *Aedes aegypti* (Liverpool_BASEFEATURE_AaegL3.3). Les niveaux de transcription des gènes sont exprimés en FPKM (Fragment Per Kilobase exon per Million), une unité de mesure correspondant au nombre de séquences par kilobase d'exon par million de séquences. Les niveaux de transcription ont été comparés gène par gène entre les trois réplicats issus des populations témoins et les trois réplicats issus des populations exposées à l'ibuprofène.

Dans la mesure où nous nous sommes intéressés à l'impact de faibles doses d'ibuprofène, et comme des perturbations de voies physiologiques finement régulées étaient plus spécifiquement recherchées, les gènes présentant un rapport de transcription supérieur à 1,2 ou inférieur à 0,8 avec une q-valeur (p-valeur corrigée) inférieure à 0,05 entre individus exposés et témoins ont été considérés comme différentiellement transcrits. Parmi les gènes différentiellement exprimés de manière significative, seuls les gènes dont le taux de transcription dépasse 0,5 FPKM parmi les deux conditions comparées ont été pris en compte dans notre interprétation, les mesures de taux plus faibles risquant d'être imprécises.

Les gènes détectés dans chacun des échantillons ont été assignés manuellement à une des classes fonctionnelles définies selon les conditions présentées dans le tableau III.5. La répartition des gènes différentiellement transcrits parmi les différentes classes établies a été comparée avec la répartition de la totalité des gènes détectés dans les échantillons à l'aide d'un test de Fisher. Ainsi, l'enrichissement de certaines de ces classes parmi les gènes différentiellement sur-transcrits ou sous-transcrits a été indépendamment étudié.

Tableau III.5 - Classes fonctionnelles établies pour l'analyse des données de transcriptomique. Les gènes détectés dans les différents RNAseq ont été assignés manuellement aux différentes classes établies.

Classe fonctionnelle	Détails
Métabolisme mitochondrial	Protéines impliquées dans la chaîne respiratoire et le cycle de Krebs
Métabolisme des lipides	Protéines impliquées dans la synthèse, la dégradation, la modification ou le transport des lipides
Métabolisme des sucres	Protéines impliquées dans la synthèse, la dégradation, la modification ou le transport des sucres
Métabolisme des acides aminés	Protéines impliquées dans la synthèse, la dégradation, la modification ou le transport des acides aminés
Métabolisme des ARN	Protéines impliquées dans la synthèse, la dégradation, la maturation ou le transport des ARNs
Métabolisme des protéines	Protéines impliquées dans la synthèse, la dégradation, la maturation ou le transport des protéines
Régulation de la transcription	Protéines impliquées dans la régulation générale ou ciblée de la transcription des gènes : facteurs et cofacteurs de transcription
Régulations des marques épigénétiques	Protéines impliquées dans l'établissement, le maintien, la modification et la suppression des marques épigénétiques sur l'ADN : méthylation de l'ADN, acétylation et méthylation des histones
Structure et dynamique de l'ADN	Protéines impliquées dans la synthèse et la réparation de l'ADN et l'organisation de la chromatine
Signalisation hormonale et neurotransmetteurs	Protéines impliquées dans la synthèse et le transport des hormones et des neurotransmetteurs et récepteurs associés à ces molécules
Détoxication	Enzymes impliquées dans les processus de détoxication de phase 1 et de phase 2
Immunité	
Kinases et phosphatases	
Transduction du signal	Protéines impliquées dans les cascades de signalisation intracellulaires et la transduction des signaux extracellulaires
Autres enzymes	Enzymes ne rentrant dans aucune des autres classes
Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes	
Structure	Protéines impliquées dans la mise en place, le maintien et la régulation de la structure cellulaire et tissulaire – cycle cellulaire
Cuticule	Protéines impliqués dans la formation de la cuticule
Autres	Protéines ne rentrant dans aucune des classes précédemment citées
Indéterminée	Protéines non caractérisées

I.5.1.1 Dynamique d'expression des gènes au cours de la maturation des œufs par RT-qPCR

Afin de suivre la transcription des gènes codant pour de différentes protéines précurseurs du vitellus (YPPs) et celles des gènes impliqués dans leur internalisation dans les oocytes au cours de la vitellogénèse, des femelles ont été échantillonnées dans chaque population-réplicat suite à un repas de sang mis à disposition de manière simultanée. Trente minutes avant le repas de sang et 4h, 8h, 16h, 20h, 24h, 36h et 48h après celui-ci, entre 5 et 10 femelles ont été échantillonnées dans chaque population-réplicats, et immédiatement placés dans 250µl de TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) puis stockés à -80°C. Les ARN totaux des différents échantillons ont été extrait au TRIzol, selon le protocole établi par le fabricant.

Après traitement à la DNase I (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis) durant 15 minutes à 20°C, 2 µg d'ARN extraits à partir des différents échantillons ont été rétrotranscrits à l'aide d'un kit SuperScript® III Reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis) selon les instructions du fabricant, produisant ainsi les ADNc utilisés lors de la qPCR.

Les qPCR ont été effectuées à partir des ADNc dilués au 1/10 grâce à un thermocycleur couplé à un spectrofluorimètre du type iCycler iQ™5 (Biorad™, Hercules, CA, USA). Toutes les réactions ont été effectuées en triplicats, à partir de 3 µl d'ADNc dilué pour un volume réactionnel final de 15 µl.

Les amorces utilisées pour la qPCR (Tableau III.6) ont été conçues à l'aide du logiciel Beacon Designer™ 5.10, excepté pour les gènes *rpl32*, *VtgR* et *LpRov* dont les amorces ont été publiées préalablement (respectivement : Bonizzoni *et al.*, 2011; Clifton et Noriega, 2012; Perez et Noriega, 2012).

Tableau III.6 - Séquences des amorces utilisées pour l'étude de la transcription des gènes par RT-qPCR

Gène	Description du gène	Référence Vectorbase	Amorce	Séquence 5'-3'
<i>rpl32</i> ¹	60S ribosomal protein L32	AAEL003396	sens anti-sens	ACAAGCTTGCCCCCAACT CCGTAACCGATGTTTGGC
	actin	AAEL001673	sens anti-sens	CGAGCACGGTATCATCAC TCATCTTCTCACGGTTAGC
<i>74EF</i>	ecdysone-induced protein 74EF	AAEL000741	sens anti-sens	ACTTGGATACGGAGATACC ATTGGCTGAGACTACTGG
<i>VtgA</i>	Vitellogenin A		sens anti-sens	ATGCACCGTCTGCCATC GTTTCGTAGTTGGAAGCTCG
<i>VtgR</i> ²	Vitellogenin receptor	AAEL007657	sens anti-sens	GCAAAATAGTGGTGCATGATCGA GGCTGTAGACCGGAGTGATAGAT
<i>Lp</i>	Lipophorin	AAEL009955	sens anti-sens	CGATGTTGAGTTGAAGGAGAAG AAGTGAGCGAGTTGGAAGG
<i>LpRov</i> ³	Ovarian Lipophorin receptor		sens anti-sens	GGTAAAACCTGCGTCATCGTCTTC GTGCAAACCTGTTAGCGAACGA

¹selon Bonizzoni *et al.*, 2011 ; ²selon Clifton et Noriega, 2012 ; ³selon Perez *et al.*, 2012

Le nombre de cycles PCR nécessaires pour que la fluorescence du fluorophore SYBR[®]Green augmente significativement par rapport au bruit de fond est appelé Ct pour *cycle threshold*. Le Ct est dépendant de la quantité initial d'ADN de l'échantillon, et a été déterminé pour chaque gène étudié dans chaque échantillon. L'analyse des données a été réalisée selon la méthode de double normalisation $\Delta\Delta Ct$, présentée dans l'équation (1), qui tient compte de l'efficacité E de la qPCR. La double normalisation permet de quantifier la transcription du gène chez les individus exposés par rapport aux individus témoins (ΔCt étant la différence de Ct entre témoins et exposés) tout en normalisant l'expression des gènes d'intérêts par deux gènes de ménage codant pour la protéine ribosomale RPL32 et l'actine.

$$\Delta\Delta Ct = \frac{(E^{\Delta Ct})_{\text{gène cible}}}{(E^{\Delta Ct})_{\text{gène de ménage}}} \quad (1)$$

III.4 Résultats

III.4.1 Impacts de l'ibuprofène sur les traits d'histoire de vie des populations de moustiques

Afin d'approfondir l'impact de l'exposition à l'ibuprofène sur les traits d'histoire de vie des populations d'*Aedes aegypti* et sur leur descendance non exposée, des paramètres complémentaires à ceux étudiés lors de la première partie de la thèse et liés à la survie des individus, ont été mesurés.

III.4.1.1 Durée de vie des imagos

Avec des courbes de survie évoluant de manière semblable dans les différentes populations, l'exposition à l'ibuprofène ne modifie pas significativement la durée de vie des femelles imago vierges (figure III.5 : A) ou ayant effectué un cycle gonotrophique (figure III.5 : B). La durée de vie des mâles imagos vierges se trouve en revanche significativement allongée (figure III.5 : C), avec 50% de survivants à 29 jours dans les populations témoins et à 38 jours dans les populations exposées à l'ibuprofène.

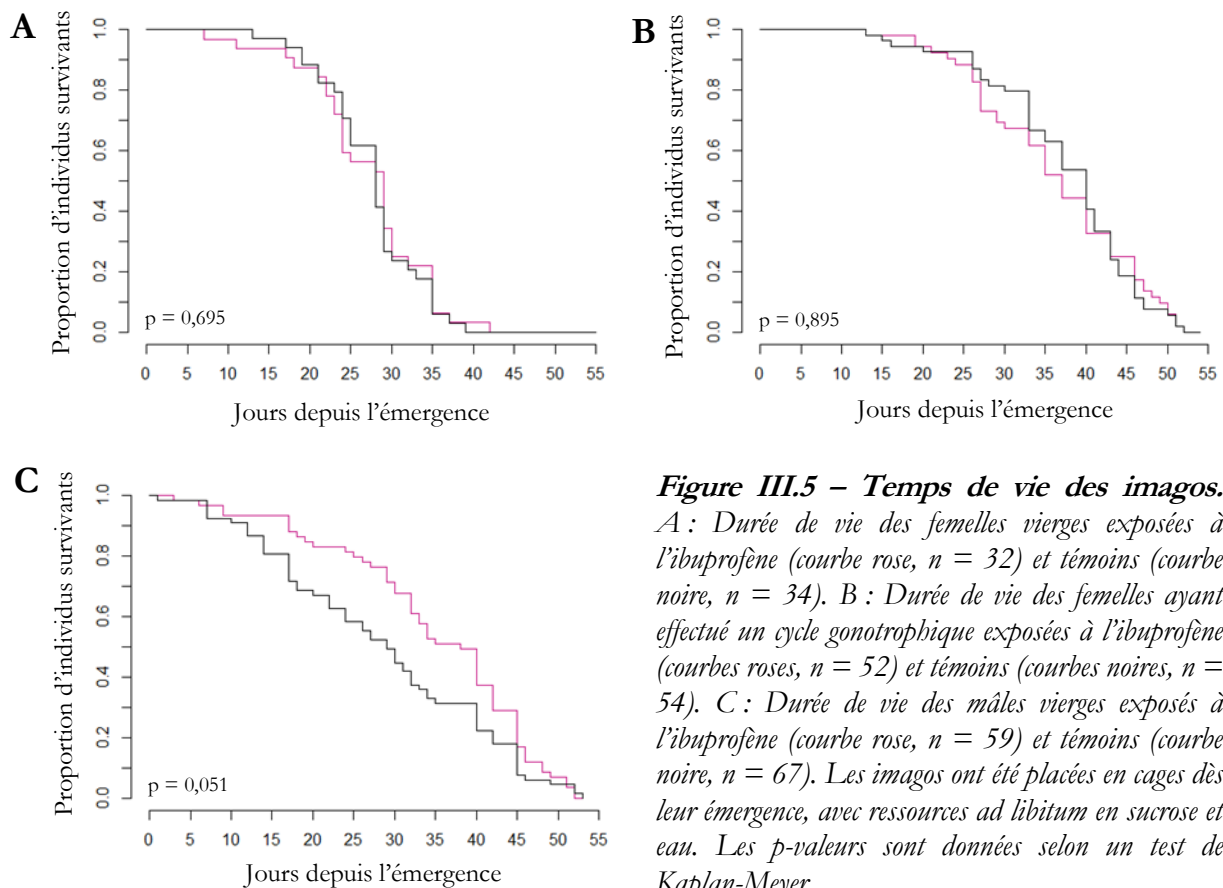


Figure III.5 – Temps de vie des imagos.

A : Durée de vie des femelles vierges exposées à l'ibuprofène (courbe rose, $n = 32$) et témoins (courbe noire, $n = 34$). B : Durée de vie des femelles ayant effectué un cycle gonotrophique exposées à l'ibuprofène (courbes roses, $n = 52$) et témoins (courbes noires, $n = 54$). C : Durée de vie des mâles vierges exposés à l'ibuprofène (courbe rose, $n = 59$) et témoins (courbe noire, $n = 67$). Les imagos ont été placées en cages dès leur émergence, avec ressources ad libitum en sucrose et eau. Les p -valeurs sont données selon un test de Kaplan-Meier.

III.4.1.2 Survie de la descendance en condition de jeûne

Le test de survie des larves nouvellement écloses en situation de privation totale de nourriture met en évidence une plus grande longévité de la descendance des populations exposées à l'ibuprofène (Figure III.6 : C). En effet, la moitié des individus issus des populations témoins ont décédés après 6 jours de jeun, tandis qu'il faut attendre 12 jours pour observer un taux de mortalité identique dans les descendants issus des populations exposées à l'ibuprofène.

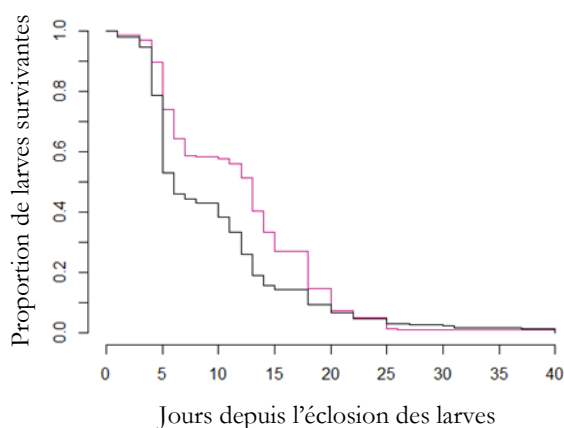


Figure III.6 - Survie des larves de la descendance en condition de privation totale de nourriture.

Les larves de la descendance des populations exposées à l'ibuprofène (courbe rose, $n=238$) ou témoins (courbe noir, $n=237$) ont été placées en milieu exempt de ressource alimentaire dès la première heure suivant leur éclosion. P-valeur = 0,038 selon un test de Kaplan-Meyer.

III.4.2 Impact de l'ibuprofène sur les réserves métaboliques

III.4.2.1 Réserves métaboliques des femelles imagos exposées

Aucune différence notable dans l'abondance des métabolites ne semble apparaître entre les femelles imagos exposées à l'ibuprofène et les femelles témoins lors de l'étude des spectres obtenus par RMN-HRMAS H^1 . En effet, l'analyse par OPLS-DA des variables issues des échantillons de femelles imagos ne permet pas de créer un modèle prédictif valide. Malgré un modèle particulièrement explicatif ($R^2X = 0,862$; $R^2Y = 0,995$), celui-ci est très peu prédictif ($Q_2 = 0,272$) malgré un nombre élevé de composantes incluses dans le modèle (7). Il apparaît ainsi que la variabilité entre les individus étudiés ne puisse pas être corrélée à l'exposition de ceux-ci ou non à l'ibuprofène.

III.4.2.2 Réserves métaboliques des œufs de la descendance

Les spectres mesurés entre 2,7 et 4,8 ppm sur les lots d'œufs de la descendance mettent en évidence de nombreux pics, souvent chevauchants, dont 11 ont pu être assignés à 7 métabolites ou types de métabolites (Figure III.7 : A). Ainsi, des pics générés par des protons situés sur les glycérols estérifiés ($n^{\circ}1$; 4,12 - 4,33 ppm), le glucose (2 ; 3,44 - 3,87 - 4,67 ppm), le sucrose (3 ; 3,67 ppm), la choline libre ($n^{\circ}6$; 3,21 ppm) et les acides gras polyinsaturés ($=CH-CH_2-CH=$, $n^{\circ}7$; 2,78 - 2,83 ppm) ont été identifiés. Un pic pouvant être attribué à la phosphocholine ou à la glycerophosphocholine a également été identifié à 3,24 ppm ($n^{\circ}5$). De plus, un pic correspondant à des lipides dont le type n'a pas pu être spécifié a été défini de 3,27 à 3,30 ppm ($n^{\circ}4$).

L'analyse par OPLS-DA des variables issues des lots d'œufs pondus par des femelles exposées ou non à l'ibuprofène permet d'établir un modèle particulièrement explicatif et prédictif. En effet, des valeurs de Q² et de R²_Y de 0,762 et 0,994 respectivement ont été déterminées en incluant 6 composantes dans le modèle. Le modèle formé est ainsi exploitable, et nous permet de générer une S-line (Figure III.7 : B). L'analyse de cette S-line indique que les œufs issus d'individus exposés à l'ibuprofène présentent un contenu en lipides plus important (Figure III.7 : n°1, 4, 7), tandis que les ressources en glucose semblent réduites (Figure III.7 : n°2). Malgré l'impossibilité de dissocier la phosphocholine et/ou la glycerophosphocholine, ces deux métabolites (Figure III.7 : n°5) apparaissent surreprésentées tandis que la choline libre (Figure III.7 : n°6) est sous-représentée dans les œufs issus des individus exposés.

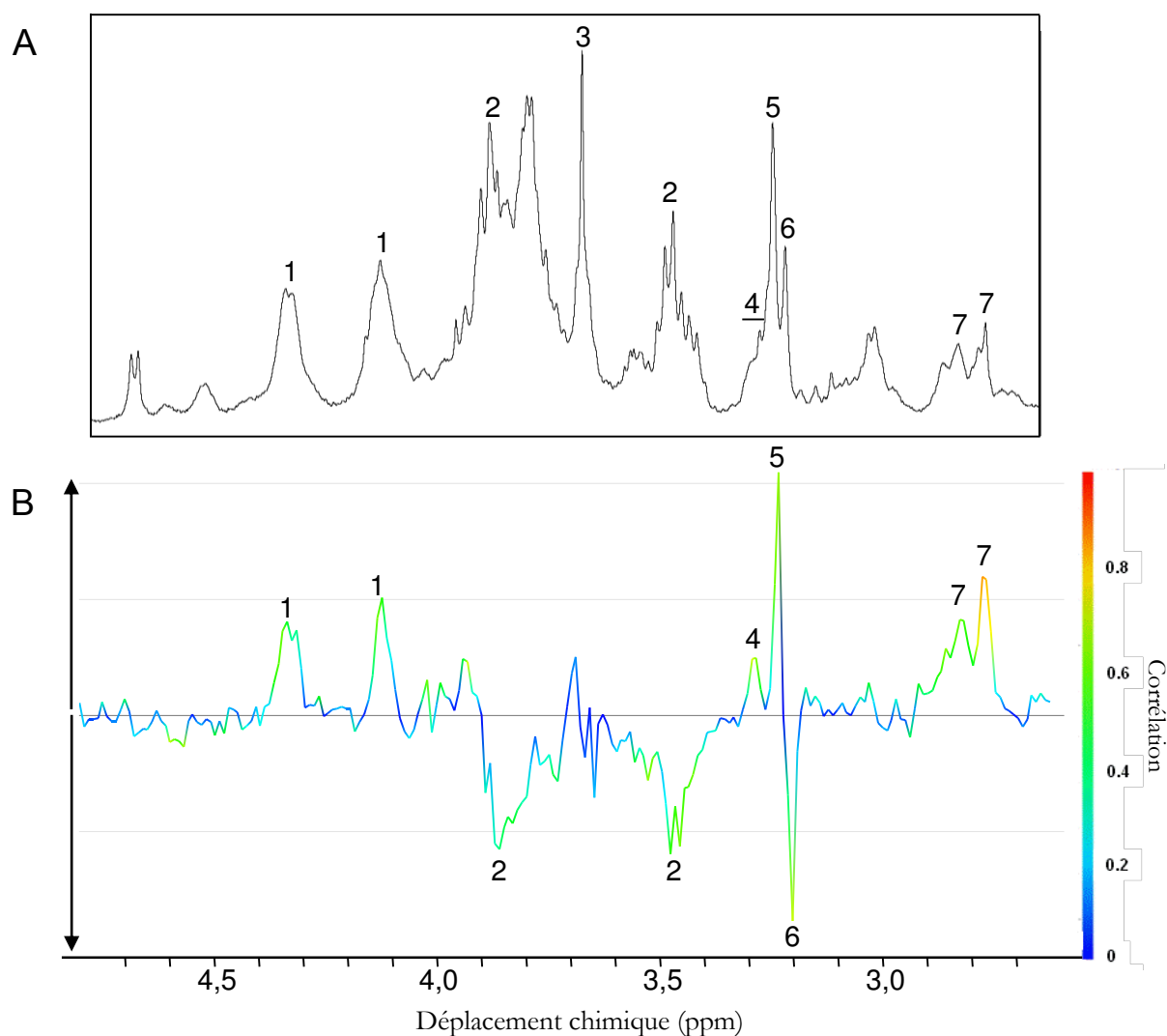


Figure III.7 - Abondance relative des réserves métaboliques dans les œufs issus de populations exposées à l'ibuprofène par rapport aux populations témoins.

A : Spectre type établi par HRMAS sur 12 lots de 100 œufs par condition. B : S-line représentant les pics les plus fortement corrélés à la variabilité entre les échantillons testés (échelle colorimétrique). Les pics positifs et négatifs indiquent respectivement une sur-abondance et une sous-abondance des métabolites relativement aux échantillons témoins. 1-Glycerol estérifié ; 2-Glucose ; 3-Sucrose ; 4-Lipides non spécifiés ; 5-Phosphocholine-Glycerophosphocholine ; 6-Choline libre ; 7-Polyinsaturation au niveau d'un acide gras.

III.4.3 Impact de l'ibuprofène sur de la vitellogénèse

III.4.3.1 Dynamique des ecdysteroïdes

Les taux d'ecdysteroïdes des femelles témoins et exposées à l'ibuprofène ont été mesurés avant le repas de sang (niveaux hormonaux de base) et 4, 8, 16, 20, 24, 36 et 48 heures après un repas de sang. Suite au repas de sang, on peut constater une augmentation progressive du taux d'ecdysteroïdes dans les femelles, partant d'environ 10 fmoles d'équivalent 20E pour atteindre des taux maxima de plus de 120 fmoles après 20 à 24 heures. Les taux d'ecdysteroïde redescendent ensuite aux niveaux de base après 36 heures. Ce profil dynamique des ecdysteroïdes est concordant avec les études précédemment menées sur ce sujet (Clements, 1992).

Les taux moyens d'ecdysteroïdes retrouvés chez les femelles exposées à l'ibuprofène ne diffèrent pas de ceux mesurés chez femelles témoins, que ce soit avant, ou 4, 8, 16, 36 et 48 heures après le repas de sang (Figure III.8). Une tendance à l'augmentation du taux moyen peut être observée 20 et 24 heures après le repas de sang, cependant, cette tendance semble être liée dans les deux cas à seulement trois individus sur 16 étudiés présentant des taux particulièrement élevés. Ainsi, l'exposition des femelles à 1 µg/l d'ibuprofène ne semble pas modifier de façon significative les taux d'ecdysteroïdes durant la vitellogénèse chez les imagos femelles.

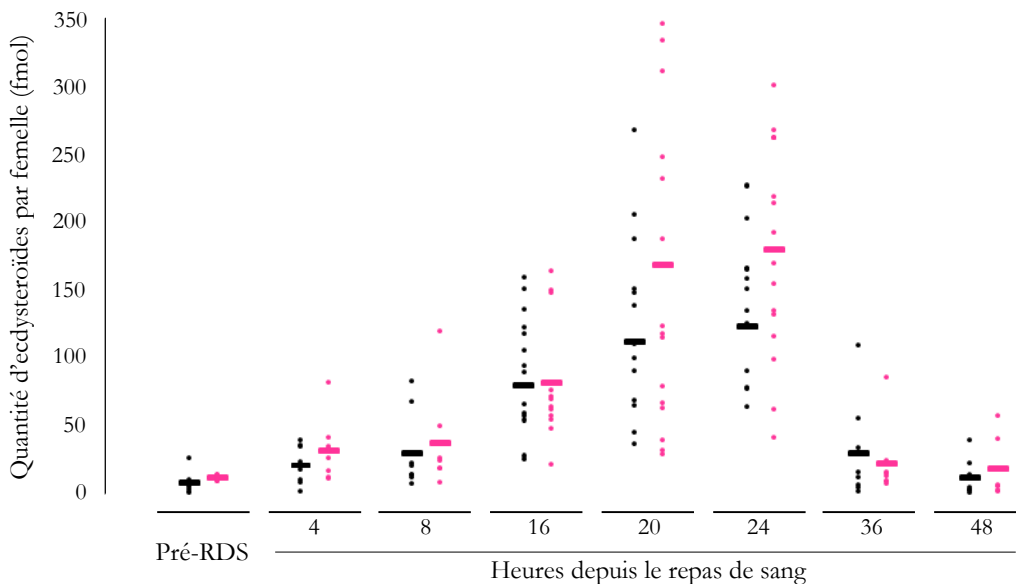


Figure III.8 – Quantités d'ecdysteroïdes produits au cours de la maturation des oocytes chez les femelles imagos exposées à l'ibuprofène (rose) et les femelles témoins (noir).

Chaque point représente le titre d'ecdysteroïdes totaux mesurés dans une femelle. Les traits horizontaux représentent la quantité d'ecdysteroïdes moyenne parmi les femelles étudiées dans chaque groupe. « Pré-RDS » : avant le repas de sang. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes dans les différents temps étudiés (test de Student).

III.4.3.2 Dynamique transcriptionnelle des gènes de réponse aux ecdystéroïdes

En même temps que l'étude des taux d'ecdystéroïdes durant la vitellogénèse, la dynamique transcriptionnelle des gènes de réponse aux ecdystéroïdes et des gènes vitellogéniques a été étudiée. Aucune différence significative des niveaux de transcription des gènes de *l'ecdysone-induced protein* (74EF), de la vitellogénine A (*vtgA*), du récepteur de la vitellogénine (*VgR*), de la lipophorine (*Lp*) ou encore du récepteur de la lipophorine (*LpRov*) n'a pu être observé entre les femelles exposées à l'ibuprofène et les femelles témoins (Figure III.9).

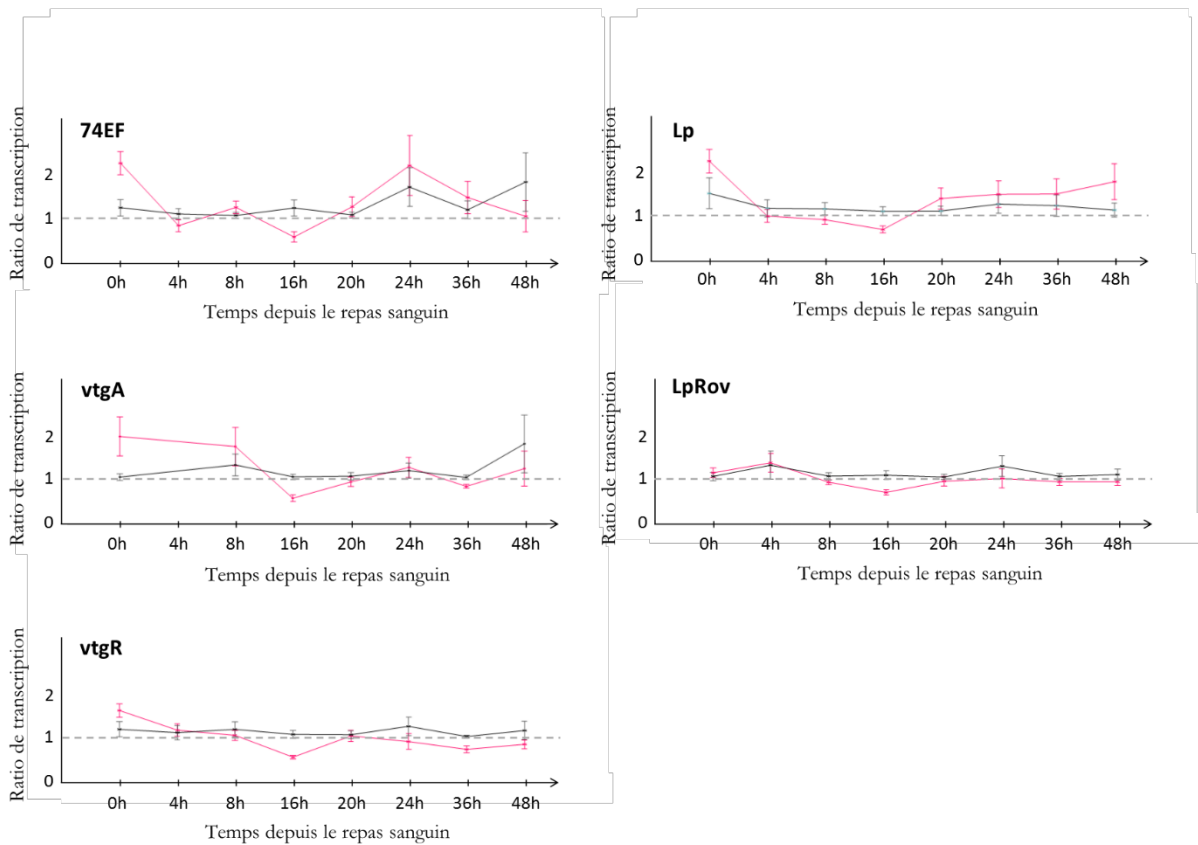


Figure III.9 - Transcription différentielle de gènes durant la vitellogénèse. La transcription des gènes impliqués dans la maturation des oocytes durant la vitellogénèse a été mesurée immédiatement (0h) et 4, 8, 16, 20, 24, 36 et 48h après le repas sanguin chez les femelles témoins (courbes noires) ou exposée à l'ibuprofène (courbes roses). Chaque point représente le ratio de transcription vis-à-vis des gènes de ménage (RPL32, Actine) \pm erreur standard 74EF : ecdysone-induced protein 74EF. *vtgA* : vitellogénine A. *vtgR* : récepteur de la vitellogénine. *Lp* : lipophorine. *LpRov* : récepteur de la lipophorine.

III.4.4 Impact de l'ibuprofène sur le profil transcriptionnel des individus

Le séquençage des transcriptomes des stades L4F0, FemF0 et L1F1 a respectivement produit en moyenne 96,7, 40,1 et 36,4 millions de séquences par échantillon. Après le filtrage qualitatif des données, entre 93 % (stades FemF0 et L1F1) et 97 % de ces séquences (stade L4F0) (Tableau III.7), ont été conservées pour la poursuite de l'analyse. Ces séquences présentent des scores de qualité par base moyen de plus de 34 dans chacun des échantillons séquencés, avec des longueurs de séquences homogènes entre les échantillons d'un même stade. L'alignement des séquences sur le génome de référence a été relativement efficace, avec 85 %, 79 % et 77 % de séquences mappées pour les stades L4F0, FemF0 et L1F1 respectivement, représentant en moyenne 82,8, 31,9 et 28,2 millions de séquences alignées à un site unique sur le génome (Tableau III.7).

L'analyse des niveaux différentiels de transcription des gènes dans les différents stades étudiés a mis en évidence une transcription différentielle de 134 gènes chez les individus de stades 4 exposés à l'ibuprofène, de 40 gènes chez les imagos femelles exposées à l'ibuprofène et de 1566 gènes chez les larves de stade 1 de la descendance non exposée (Figure III.7), représentant respectivement 1,1 %, 0,3 % et 14,8 % du nombre total de gènes détectés dans les trois études. D'autre part, alors qu'une petite majorité des gènes différentiellement transcrits chez les L4F0 sont sous-transcrits (83 gènes sur 134), une tendance inverse est observée chez les larves de la descendance L1F1 avec 1116 gènes sur-transcrits sur un total de 1566 gènes différentiellement transcrits. Aucune tendance particulière ne se dessine en revanche chez les femelles FemF0 avec à peu près autant de gènes sur-transcrits (22) que de gènes sous-transcrits (18). Les listes des gènes différentiellement transcrits ne présentent que peu de similitudes entre les différents stades, avec seulement 2 gènes différentiellement transcrits en commun entre les larves de stade 4 et les femelles imago de la F0, et 16 gènes en commun entre les larves de stade 4 de la F0 et les larves de stade 1 de la descendance. Aucun gène n'a été retrouvé différentiellement transcrit de façon concomitante dans les trois stades étudiés (Figure III.7 ; B).

Tableau III.7 - Données de séquençage et de l'alignement des séquences. L4F0 : échantillons issus des larves de stade 4 de la génération parentale. FemF0 : échantillons issus des femelles imagos de stade 4 de la génération parentale. L1F1 : échantillons issus des larves de stade 1 de la descendance.

L4F0												
	Témoin 1		Témoin 2		Témoin 4		Ibuprofène 1		Ibuprofène 2		Ibuprofène 3	
	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%
Séquences non filtrées	92584859	100	92081960	100	119188567	100	93377041	100	95407353	100	87528726	100
Filtrage qualitatif	90116256	97,3	89208289	96,9	116020012	97,3	90894834	97,3	92917067	97,4	84986735	97,1
Séquences alignées sur le génome	79217237	85,6	78310189	85,0	102332328	85,9	81954015	87,8	80079820	83,9	74812417	85,5
Score de qualité par base moyen (phred)	34,6 ± 4,3		34,4 ± 4,5		34,6 ± 4,2		34,6 ± 4,3		34,6 ± 4,3		34,4 ± 4,5	
Taille moyenne de séquence (pb) ± écart-type	75,4 ± 1,2		75,4 ± 1,2		75,4 ± 1,1		75,4 ± 1,1		74,4 ± 1,1		75,4 ± 1,2	

FemF0												
	Témoin 1		Témoin 2		Témoin 4		Ibuprofène 1		Ibuprofène 2		Ibuprofène 3	
	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%
Séquences non filtrées	40542430	100	44521580	100	42429180	100	42575836	100	36217792	100	34050532	100
Filtrage qualitatif	37925491	93,5	41599724	93,4	39668538	93,5	39778219	93,4	33739267	93,2	31783974	93,3
Séquences alignées sur le génome	32396442	79,9	35539952	79,8	33779579	79,6	34027358	79,9	28651102	79,1	27036753	79,4
Score de qualité par base moyen (phred)	34,5 ± 5,8		34,5 ± 5,8		34,6 ± 5,8		34,5 ± 5,8		34,5 ± 5,8		34,5 ± 5,8	
Taille moyenne de séquence (pb) ± écart-type	140,1 ± 16,3		138,7 ± 17,1		138,6 ± 17,9		138,6 ± 17,2		139,1 ± 16,9		138,8 ± 17,5	

L1F1												
	Témoin 1		Témoin 2		Témoin 4		Ibuprofène 1		Ibuprofène 2		Ibuprofène 3	
	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%	Nb de séquences	%
Séquences non filtrées	34046829	100	33770723	100	36285118	100	36628487	100	39654984	100	37811890	100
Filtrage qualitatif	31617746	92,9	31605815	93,6	33846763	93,3	34057658	93,0	37020533	93,4	35081246	92,8
Séquences alignées sur le génome	26452083	77,7	26372440	78,1	28283931	77,9	28112925	76,8	30722293	77,5	29249838	77,4
Score de qualité par base moyen (phred)	34,6 ± 5,8		34,5 ± 5,8		34,5 ± 5,8		34,5 ± 5,9		34,5 ± 5,9		34,5 ± 5,8	
Taille moyenne de séquence (pb) ± écart-type	137,8 ± 17,6		139,2 ± 16,9		138,4 ± 17,4		137,1 ± 18,3		138,7 ± 17,2		137,8 ± 17,7	

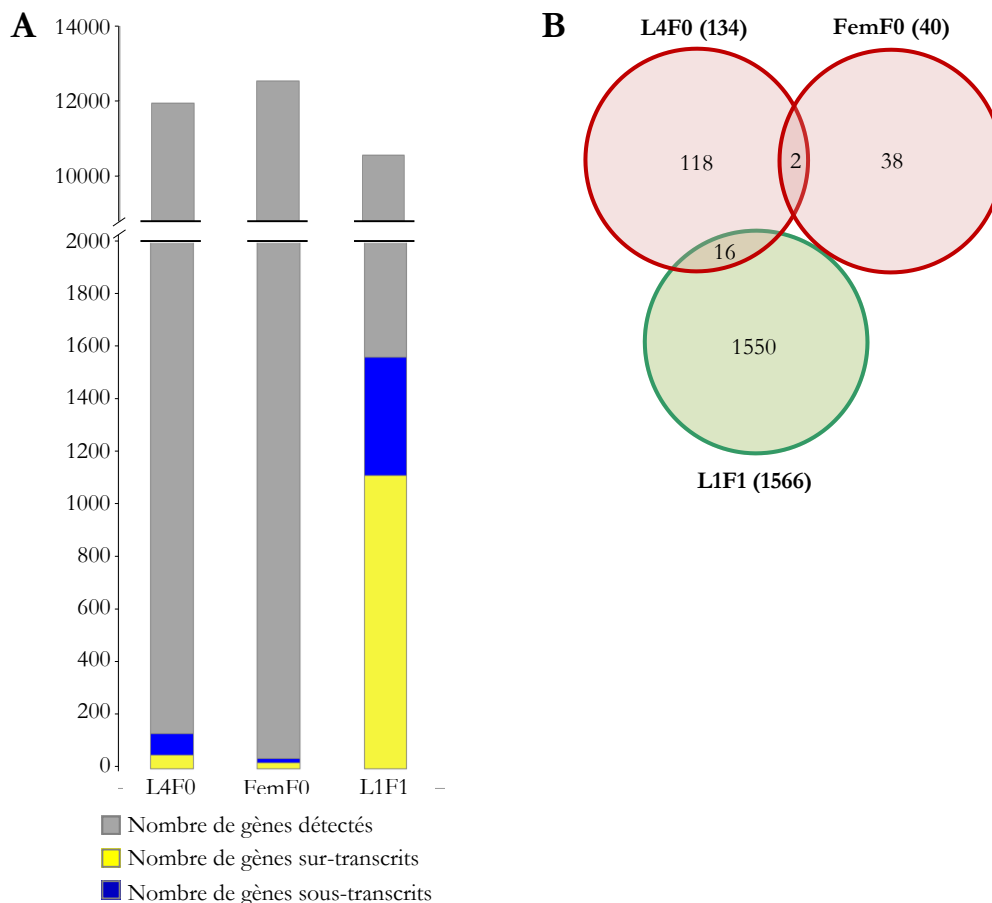


Figure III.10 - Analyse de la transcription différentielle des gènes chez les larves de stades 4 et les femelles imagos exposées à 1 µg/l d'ibuprofène, et chez les larves de stade 1 non exposées de leur descendance. A : Comparaison du nombre de gènes détectés (gris), sur-transcrits (jaune) et sous-transcrits (bleu) dans les différents stades de développement étudiés. **B :** Diagramme représentant le nombre de gène différentiellement transcrits en commun entre les différents stades étudiés.

III.4.4.1 Transcriptomique des larves de stade 4 exposées à l'ibuprofène

L'étude transcriptomique des larves de stade 4 exposées à 1 µg/l d'ibuprofène a révélé la transcription différentielle de 134 gènes, dont 51 sur-transcrits entre 1,33 et 5,02 fois, et 83 sous-transcrits entre 1,32 et 45,73 fois par rapport aux larves témoin. Le détail de la transcription différentielle des gènes est présenté dans sa totalité dans les annexes 1 et 2 de cette thèse. Parmi les 134 gènes différentiellement transcrits, 42 correspondent à des transcrits potentiels non caractérisés dans l'annotation du génome de référence d'*Aedes aegypti*. L'attribution de classes fonctionnelles aux gènes annotés a révélé l'enrichissement de certaines de ces classes parmi les gènes sur-transcrits ou sous-transcrits (Tableau III.9 et III.10). Parmi les gènes sur-transcrits, les gènes codant pour les

protéines cuticulaires (5 gènes) et des kinases et phosphatases (3 gènes) sont particulièrement représentés. Parmi les gènes sous-transcrits, une surreprésentation des gènes impliqués dans l'immunité (11 gènes), le trafic intra et extracellulaire (17 gènes) ou codants pour des kinases et phosphatases (5 gènes) est constatée. Le seul facteur de transcription dont la transcription est affectée par l'exposition à l'ibuprofène est le « *ccaat/enhancer binding protein* » (C/EBP) (AAEL002853), sous transcrit 1,62 fois.

Tableau III.8 - Enrichissement des classes fonctionnelles chez les larves exposées à l'ibuprofène. L'expression des gènes chez les larves de stade 4 provenant des populations témoins et des populations exposées à 1 µg/l d'ibuprofène a été mesurée par mRNaseq. La surreprésentation de gènes appartenant à certaines classes fonctionnelles parmi les gènes sur-transcrits et sous-transcrits a été étudiée à l'aide d'un test de Fisher.

Gènes sur-transcrits (51)

Classe	Enrichissement	<i>p</i> -valeur	Nombre de gènes impliqués
Kinases et phosphatases	x 4,45	3,33E-02	3
Cuticule	x 15,83	2,30E-05	5

Gènes sous-transcrits (83)

Classe	Enrichissement	<i>p</i> -valeur	Nombre de gènes impliqués
Immunité	x 6,16	4,29E-06	11
Kinases et phosphatases	x 4,56	5,83E-03	5
Trafic intra et extracellulaire - Chaperonnes	x3,94	7,16E-06	17
Autres	x 1,65	1,14E-03	6

Cinq gènes codant pour des protéines cuticulaires sont sur-transcrits entre 1,34 et 5,02 fois, le gène AAEL009783 étant le plus fortement sur-transcrit chez les larves exposées à l'ibuprofène (Tableau III.9). L'enrichissement des gènes de la voie des kinases/phosphatases est due à la transcription différentielle de 7 phosphatases alcalines, dont deux sont sur-transcrites 1,40 et 1,98 fois (Tableau III.9) et 5 sont sous-transcrites entre 1,65 et 8,30 fois (Tableau III.10). Ainsi, la moitié des phosphatases alcalines annotées chez *Aedes aegypti* sont différentiellement transcrites chez les larves exposées à l'ibuprofène. La surreprésentation des gènes impliqués dans le trafic intra et extracellulaire est essentiellement porté par la sous-transcription des 9 hexamérines annotées chez *Aedes aegypti*. Il est en particulier notable que, avec des sous-transcriptions allant jusqu'à 45 fois, les

hexamérines présentent la plus grande amplitude de transcription différentielle par rapport aux témoins. Au sein de cette classe fonctionnelle, 4 gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport du fer, et sous-exprimées entre 1,47 et 2,45 fois sont retrouvées : deux transferrines, codées par les gènes AAEL015458 et AAEL013990, et deux sous-unités de la ferritine codées par les gènes AAEL01039 et AAEL010393 (Tableau III.10). La surreprésentation des gènes affiliés à la classe « autres » est notamment due à la sous-transcription de quatre gènes codant pour des « Odorant binding proteins » (OBP) Vingt-trois gènes codant pour des OBP sont annotés chez *Aedes aegypti*. Les quatre gènes codant pour des OBP dont la transcription est modifiée par l'exposition à l'ibuprofène dans notre étude, OPB8, OBP18, OBP19 et OPB22, sont sous-transcrits entre 1,74 et 6,50 fois (Tableau III.10).

Tableau III.9 – Sur-transcription des gènes chez les larves de stade 4 exposées à l'ibuprofène. L'expression des gènes chez des larves de stade 4 provenant des populations témoins et des populations exposées à 1 µg/l d'ibuprofène a été mesurée par mRNAseq. Les gènes répertoriés appartiennent aux classes enrichies parmi les gènes différentiellement transcrits.

Gènes sur-transcrits				
Référence Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Statut par rapport au témoin	Classe
AAEL002191		cuticle protein, putative	+ 1,34 x	Cuticule
AAEL002241		cuticle protein, putative	+ 1,34 x	Cuticule
AAEL002211		cuticle protein, putative	+ 1,38 x	Cuticule
AAEL003242		pupal cuticle protein, putative	+ 1,40 x	Cuticule
AAEL009783		cuticle protein, putative	+ 5,02 x	Cuticule
AAEL000931		alkaline phosphatase	+ 1,40 x	Kinases et phosphatases
AAEL009077		alkaline phosphatase	+ 1,98 x	Kinases et phosphatases
AAEL014792		phosphatase and actin regulator	+ 1,74 x	Kinases et phosphatases

Tableau III.10– Sous-transcription des gènes chez les larves de stade 4 exposées à l'ibuprofène. L'expression des gènes chez des larves de stade 4 provenant des populations témoins et des populations exposées à 1 µg/l d'ibuprofène a été mesurée par mRNAseq. Les gènes répertoriés appartiennent aux classes enrichies parmi les gènes différemment transcrits.

Gènes sous-transcrits					
Référence	Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Statut par rapport au témoin	Classe
AAEL000621		<i>CECN</i>	cecropin anti-microbial peptide	- 4,23 x	Immunité
AAEL000611		<i>CECE</i>	cecropin anti-microbial peptide	- 4,37 x	Immunité
AAEL010773		<i>CLYPE10</i>	Clip-Domain Serine Protease family E, Protease homologue,	- 3,24 x	Immunité
AAEL003279			clip-domain serine protease, putative	- 3,11 x	Immunité
AAEL005641		<i>CTLGA5</i>	C-Type Lectin (CTL) - galactose binding,	- 1,91 x	Immunité
AAEL003832		<i>DEFC</i>	defensin anti-microbial peptide	- 2,01 x	Immunité
AAEL003857		<i>DEFD</i>	defensin anti-microbial peptide	- 2,27 x	Immunité
AAEL003841		<i>DEFA</i>	defensin anti-microbial peptide	- 2,83 x	Immunité
AAEL001802		<i>PPO4</i>	prophenoloxidase	- 1,70 x	Immunité
AAEL013501		<i>PPO6</i>	prophenoloxidase	- 1,35 x	Immunité
AAEL014544			macroglobulin/complement	- 2,57 x	Immunité
AAEL010396			secreted ferritin G subunit precursor, putative	- 2,45 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL010393			ferritin subunit, putative	- 2,27 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL015639			transferrin	- 1,47 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL015458			transferrin	- 1,55 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL013990			hexamerin 2 beta	- 3,53 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL008817			hexamerin 2 beta	- 5,37 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL000765			hexamerin 2 beta	- 5,20 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL013759			hexamerin 2 beta	- 7,27 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL011169			hexamerin 2 beta	- 7,31 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL013757			hexamerin 2 beta	- 7,57 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL008045			hexamerin 2 beta	- 10,99 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL013981			hexamerin 2 beta	- 45,19 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL013983			hexamerin 2 beta	- 45,73 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL004805			potassium-dependent sodium-calcium exchanger, putative	- 1,35 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL013884			synaptic vesicle protein	- 1,63 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL010884			ADP,ATP carrier protein	- 1,67 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL002541			cystinosin	- 1,43 x	Trafic intra et extracellulaire
AAEL003317			alkaline phosphatase	- 8,30 x	Kinases et phosphatases
AAEL003286			alkaline phosphatase	- 3,77 x	Kinases et phosphatases
AAEL003905			alkaline phosphatase	- 3,26 x	Kinases et phosphatases
AAEL003297			alkaline phosphatase	- 3,19 x	Kinases et phosphatases
AAEL003289			alkaline phosphatase	- 1,65 x	Kinases et phosphatases
AAEL013349		<i>l2efl</i>	lethal(2)essential for life protein	- 1,81 x	Autres
AAEL010670		<i>l2efl</i>	lethal(2)essential for life protein	- 1,81 x	Autres
AAEL004343		<i>OBP19</i>	odorant binding protein OBP19	- 6,50 x	Autres
AAEL005772		<i>OBP22</i>	odorant binding protein OBP22	- 1,74 x	Autres
AAEL001826		<i>OBP8</i>	odorant binding protein OBP8	- 1,93 x	Autres
AAEL004342		<i>OPB18</i>	odorant binding protein OBP18	- 3,77 x	Autres

III.4.4.2 *Transcriptomique des femelles imagos exposées*

La comparaison des transcriptomes des femelles imagos exposées à l'ibuprofène et des femelles témoins a mis en évidence la transcription différentielle de 40 gènes, comprenant 22 gènes sur-transcrits 1,48 à 23,92 fois et 18 gènes sous-transcrits 1,49 à 3,74 fois. Le détail de ces gènes, parmi lesquels 22 sont des gènes potentiels non caractérisés, est donnée en annexe 3 et 4 de ce manuscrit.

Parmi les gènes différentiellement sur-transcrits, 2 gènes codant pour des cecropines impliquées dans l'immunité, ainsi que trois gènes impliqués dans les processus de détoxification sont retrouvés. Alors que tous les gènes présentent des sur-transcriptions comprises entre 1,48 et 2,67 fois, le gène référencé AAEL001718 est sur-transcrit 23,92 fois. Ce gène n'est pas annoté précisément dans le transcriptome de référence d'*Aedes aegypti*, et n'est à notre connaissance pas décrit plus précisément dans d'autres études à ce jour.

Trois enzymes impliquées dans la dégradation et le clivage protéique, deux gènes codant pour des « odorant binding protein » (OBP), ainsi que 2 gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et des acides-aminés sont retrouvés sous-transcrits.

Tableau III.11 - Transcription différentielle des gènes chez les femelles imagos exposées à l'ibuprofène.
L'expression des gènes chez les femelles imagos provenant des populations témoins et des populations exposées à 1 µg/l d'ibuprofène a été mesurée par mRNAseq.

A				
Gènes sur-transcrits				
Référence Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Statut par rapport au témoin	Classe
AAEL000611	<i>CECE</i>	cecropin anti-microbial peptide	+ 2,85 x	Immunité
AAEL000627	<i>CECA</i>	cecropin anti-microbial peptide	+ infini	Immunité
AAEL002046	<i>CYP6CB1</i>	cytochrome P450	+ 1,80 x	Détoxication
AAEL014891	<i>CYP6P12</i>	cytochrome P450	+ infini	Détoxication
AAEL013640		lung carbonyl reductase	+ 1,58 x	Détoxication
AAEL013990		hexamerin 2 beta	+ 1,57 x	Trafic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL005533		synaptic vesicle protein	+ 1,76 x	Trafic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL002591	<i>OBP13</i>	odorant binding protein OBP13	+ 1,68 x	Trafic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL011009		fibrinogen and fibronectin	+ 1,65 x	Structure
B				
Gènes sous-transcrits				
Référence Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Statut par rapport au témoin	Classe
AAEL011292		protease m1 zinc metalloprotease	- 2,28 x	Métabolisme des protéines
AAEL009244		serine-type endopeptidase,	- 1,57 x	Métabolisme des protéines
AAEL007601		trypsin	- 3,57 x	Métabolisme des protéines
AAEL006109	<i>OBP23</i>	odorant binding protein OBP23	- 3,74 x	Trafic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL006106	<i>OBP26</i>	odorant binding protein OBP26	- 3,45 x	Trafic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL011518		aspartyl-tRNA synthetase	- 1,80 x	Métabolisme des acides aminés
AAEL014553		triacylglycerol lipase, pancreatic	- 1,74 x	Métabolisme des lipides
AAEL005656		myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle	- 1,54 x	Structure
AAEL004409		yellow protein, putative	- 1,82 x	Structure

III.4.4.3 Transcriptome des larves de stade 1 de la descendance

Enrichissement des classes fonctionnelles

L'étude transcriptomique des larves de stade 1 de la descendance des populations exposées à l'ibuprofène a mis en évidence un statut transcriptionnel très différent, avec 1566 gènes différentiellement transcrits, dont le détail est donné en annexe 5 et 6 de ce manuscrit. Afin d'orienter l'étude approfondie de ces transcriptomes, chacun des gènes du transcriptome des larves de stade 1 a été assigné manuellement à une des 20 classes fonctionnelles précédemment décrites (Tableau III.5). Parmi les 1566 gènes différentiellement transcrits, 691 correspondaient à des gènes

non caractérisés. L'étude des classes représentées parmi les 1116 gènes significativement sur-transcrits dans la descendance des populations exposées à l'ibuprofène a mis en évidence un enrichissement significatif de la classe correspondant à la régulation des marques épigénétiques (15 gènes impliqués) et de celle de la transcription génique (65 gènes impliqués) pouvant potentiellement expliquer les profils transcriptionnels très différents constatés entre les deux descendance étudiées. En outre, aucun des gènes impliqués dans la régulation des marques épigénétiques et seuls 3 gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels sont retrouvés parmi les gènes sous-transcrits.

Les gènes impliqués dans transduction du signal et la structure cellulaire et tissulaire sont également particulièrement représentés parmi les gènes sur-transcrits (Tableau III.12).

Tableau III.12 – Enrichissement des classes fonctionnelles chez les larves de la descendance. L'expression des gènes chez larves de stade 1 issues des populations témoins et des populations exposées à 1 µg/l d'ibuprofène a été mesurée par *mRNAseq*. La surreprésentation de gènes appartenant à certaines classes fonctionnelles parmi les gènes sur-transcrits et sous-transcrits a été étudiée à l'aide d'un test de Fisher.

Gènes sur-transcrits (1116)			
Classe	Enrichissement	<i>p</i> -valeur	Nombre de gènes impliqués
Régulation des marques épigénétiques	x 3,02	2,84E-04	15
Régulation de la transcription	x 1,70	2,49E-06	65
Transduction du signal	x 2,20	2,20E-13	99
Structure	x 1,68	1,11E-02	127

Gènes sous-transcrits (450)			
Classe	Enrichissement	<i>p</i> -valeur	Nombre de gènes impliqués
Métabolisme des lipides	x 1,64	2,93E-02	22
Métabolisme des protéines	x 1,54	8,37E-04	66
Détoxication	x 2,95	2,73E-08	35
Métabolisme mitochondrial	x 2,03	2,14E-02	11
Cuticule	x 4,95	3,19E-07	15
Autres	x 1,65	4,34E-02	10

L'étude de l'enrichissement des classes fonctionnelles ayant mis en évidence une surreprésentation (x1,68) des gènes impliqués dans la structure cellulaire et tissulaire parmi les gènes sur-exprimés, les 117 gènes concernés, surexprimés entre 1,2 et 9,2 fois, ont été plus particulièrement étudiés. Parmi ces gènes, 17 codent pour les protéines associées aux microtubules, 17 sont impliqués dans l'organisation et la structure du cytosquelette, 28 sont impliqués dans l'adhésion cellulaire et 5 codent pour des protéines de la matrice extracellulaire. D'un point de vue plus fonctionnel, 27 gènes sur-transcrits sont impliqués dans la structure, la communication et la migration neurale et 11 sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (caractérisation non exclusive).

Une surreprésentation (x 2,20) des gènes impliqués dans la signalisation cellulaire est portée par 99 gènes sur-transcrits entre 1,2 et 4,4 fois chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène. Les gènes sur-transcrits dans cette classe sont impliqués dans plusieurs voies de signalisation cellulaire, comme la voie de signalisation de l'insuline (PI3K/AKT/TOR), la voie MAPK, la voie Notch, la voie de signalisation RAS et de manière anecdotique la voie Hippo. Plus largement, de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la dynamique du cytosquelette, du trafic vésiculaire et du cycle cellulaire sont retrouvés dans cette classe.

Malgré une sur-transcription très majoritaire des gènes, 450 gènes apparaissent sous-transcrits entre 1,2 et 3,4 fois dans le transcriptome de la descendance des populations exposées à l'ibuprofène. Parmi ces gènes sous-transcrits, les voies du métabolisme mitochondrial (x 2,03), des lipides (x 1,64) et des protéines (x 1,54), ainsi que la détoxification (x 2,95 ; 35 gènes impliqués), et de la mise en place de la cuticule (x4,95 ; 15 gènes impliqués) sont significativement enrichies (Tableau III.12). Le groupe de gènes impliqués dans le métabolisme des protéines représente 66 gènes, dont 53 codent pour des protéases. Avec 11 gènes sous-transcrits dans la classe des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique, incluant la production d'ATP et le cycle de Krebs, cette classe très spécifique de protéines est significativement enrichie 2,03 fois. Le groupe de gènes sous-exprimé impliqué dans le métabolisme lipidique comprend 22 gènes, dont 11 codent pour des enzymes de dégradation des lipides, 6 codent pour des protéines impliquées dans le transport ou la synthèse de stéroïdes, 3 codent pour des enzymes de synthèse des triglycérides et 1 code

nt pour une désaturase. Par ailleurs, bien que n'étant pas particulièrement surreprésentés, 28 gènes impliqués dans le métabolisme des lipides sont tout de même surexprimés. Parmi les protéines codées par ces gènes, 9 sont impliquées dans la synthèse des triglycérides et des acides gras en général et 7 sont impliqués dans la synthèse et le transport des stéroïdes, 3 sont impliqués

dans la dégradation des triglycérides et acides gras, et 9 ont un rôle dans la signalisation cellulaire via des composés lipidiques.

Lors de l'étude des gènes inclus dans les classes enrichies, nous avons remarqué la sur-transcription de plusieurs gènes de réponse directe à la 20E ainsi que de gènes impliqués dans la réponse aux stress. Cela nous a mené à étudier plus spécifiquement la représentation de ces voies physiologiques dans le transcriptome de la descendance des populations exposées à l'ibuprofène.

Modifications de la voie de signalisation de la 20E

La fixation de la 20E à son récepteur, un hétérodimère formé de deux récepteurs nucléaires EcR et USP induit l'activation transcriptionnelle de trois « gènes précoces » ; *Br*, *E74* et *E75*, codant pour des facteurs de transcription impliqués dans la régulation des gènes cible de la 20E (Ou et King-Jones, 2013). Alors que le gène codant pour l'EcR n'est pas détecté dans notre expérimentation, la transcription du co-récepteur *USP* n'apparaît pas modifiée à l'échelle transcriptionnelle par une exposition parentale à l'ibuprofène. Cependant un cofacteur potentiel du complexe EcR-USP (Chauhan *et al.*, 2012), annoté comme « *set domain protein* » (*setd*, AAEL005378) et orthologue unique (20%) du gène « *Lost PHDs of trr* » (*lpt*), chez l'espèce *Drosophila melanogaster* est sur-transcrit 4,28 fois (Tableau III.13 ; A). Parmi les gènes de réponse aux ecdystéroïdes, 9 ont été identifiés parmi les gènes différentiellement transcrits (Tableau III.13 ; B). Huit d'entre eux apparaissent sur-transcrits entre 1,25 et 2,90 fois. Les gènes de réponse précoces *Br* et *E75* sont notamment sur-transcrits 2,48 et 1,26 fois respectivement, alors que *E74* n'est pas détecté dans notre étude. L'orthologue unique du gène « *crooked legs* » (35%) identifié chez *Drosophila melanogaster* et non annoté chez *Aedes aegypti* (AAEL005369) est retrouvé sur-transcrit 2,90 fois. Le gène *npc1* (AAEL003325), régulé par la 20E par l'intermédiaire du facteur de transcription *Br* est sur-transcrit 1,21 fois. De manière surprenante, un des deux gènes codant pour la vitellogénine (AAEL006966) détecté dans ce transcriptome apparaît sous-transcrit.

Parmi les gènes connus pour être impliqués dans la biosynthèse des ecdystéroïdes, plusieurs facteurs de transcriptions sont sur-transcrits dans notre étude. Le facteur de transcription stéroïdogène « *without children protein* » (*woc*), a été retrouvé sur-transcrit 1,42 fois (Tableau III.13 ; C). Les deux gènes codant facteur de transcription cap-n-collar (*Cnc*) (AAEL015467 et AAEL005077), impliqué dans le contrôle de l'expression des gènes stéroïdogènes chez la drosophile (Deng et Kerppola, 2013), apparaissent également sur-transcrits dans notre étude.

Tableau III.13 - Transcription différentielle des gènes impliqués dans la signalisation des ecdystéroïdes chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène. L'expression des gènes chez les larves de stade 1 de la descendance des populations témoins et des populations exposées à 1 µg/l d'ibuprofène a été mesurée par mRNAseq.

A Gènes impliqués dans la signalisation des ecdystéroïdes				
Référence Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Statut par rapport au témoin	Classe
AAEL000395	<i>USP</i>	Ultra spiracle isoform A nuclear receptor	=	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL005378	<i>setd</i>	set domain protein	+ 4,28 x	Régulations des marques épigénétiques
B Gènes régulés par la voie de signalisation des ecdystéroïdes				
Référence Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Statut par rapport au témoin	Classe
AAEL008426	<i>Br</i>	Broad-complex	+ 2,48 x	Régulation de la transcription
AAEL007397	<i>E75</i>	Ecdysone-induced protein 75B isoform A Nuclear receptor	+ 1,26 x	Régulation de la transcription
AAEL009588	<i>HR3</i>		+ 1,47 x	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL015043	<i>HR3</i>		+ 1,37 x	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL005850	<i>HR4</i>		+ 1,86 x	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL001304	<i>Ftz-f1β</i>	nuclear hormone receptor ftz-f1 beta	+ 1,37 x	Régulation de la transcription
AAEL005369		Unknown protein	+ 2,90 x	Inconnue
AAEL003325	<i>npc1</i>	Niemann-pick C1	+ 1,21 x	Métabolisme des lipides
AAEL006966	<i>Vtg</i>	Vitellogenin	- 1,26 x	Métabolisme des lipides
C Gènes de biosynthèse de la 20-hydroxyecdysone				
Référence Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Statut par rapport au témoin	Classe
AAEL004320	<i>woc</i>	Without children protein	+ 1,42 x	Régulation de la transcription
AAEL015467	<i>cnc</i>	segmentation protein cap-n-collar	+ 1,27 x	Régulation de la transcription
AAEL005077	<i>cnc</i>	segmentation protein cap-n-collar	+ 1,27 x (<i>q</i> =0,054)	Régulation de la transcription
AAEL003560		pou domain/drifter/cf-1a	+ 1,58	Régulation de la transcription
AAEL009762	<i>CYP307A1</i>	Spookier	=	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL004888	<i>CYP306a1</i>	Phantom	=	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL015655	<i>CYP302a1</i>	Disamboided	=	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL011850	<i>CYP315a1</i>	Shadow	=	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL010946	<i>CYP314a1</i>	Shade	=	Signalisation hormonale et neurotransmission

Modifications de la voie de signalisation de l'insuline

Des études ayant mis en évidence des liens entre la voie de signalisation de l'insuline et la voie de signalisation de la 20E pour la régulation du développement des insectes, la transcription des gènes impliqués dans cette voie a été étudiée plus particulièrement (Hou *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2014) (Tableau III.14 ; A, B, Figure III.11). La voie de signalisation de l'insuline régule majoritairement deux voies de signalisation : la voie de signalisation PI3K/AKT/PKB, qui aboutit à la régulation de la voie de signalisation TOR, et la voie de signalisation ERK/MAPK (Taniguchi *et al.*, 2006).

Deux des trois gènes codant pour des sous-unités de la phosphatidylinositol 3-kinase (AAEL013596, AAEL002903) sont sur-transcrits. Bien que n'étant pas pris en compte par les seuils de significativité établis, le troisième gène (AAEL000386) semble sur-transcrit 3,63 fois (q-valeur = 0,0503). Deux autres gènes majeurs impliqués dans la voie de signalisation de l'insuline, *tsc2* (AAEL007712) et *rac* (AAEL008823), l'orthologue unique du gène *akt1* (63 %) chez *Drosophila melanogaster* sont sur-transcrits. De plus, deux gènes impliqués dans la régulation de la voie de signalisation de l'insuline (Taniguchi *et al.*, 2006), *pp2a regulatory subunit b* (AAEL014042), et *fak* (AAEL004666) sont également sur-transcrits dans la descendance des populations exposées à l'ibuprofène (Tableau III.14 ; A). Le gène *tsc2* code pour une protéine régulatrice de la voie de signalisation TOR. Trois autres régulateurs de la voie TOR, *Rheb* (AAEL008179), *GPRFZ2* (AAEL006778) et l'orthologue unique du gène *happyhour* (52 %) chez *Drosophila melanogaster* sont sur-transcrits. Bien que le gène *target of rapamycin* (TOR) (AAEL000693) n'apparaisse pas différemment transcrit dans notre étude, un de ses substrats, *S6K* (AAEL018120) est sur-transcrit 2,06 fois (Tableau III.14 ; B).

Le facteur de transcription REPTOR a été mis en évidence comme étant en aval du complexe TORC1, un des deux complexes effecteurs de la voie TOR. Ce facteur de transcription serait un effecteur majeur de la réponse transcriptionnelle au stress nutritionnel en collaboration avec de co-facteur REPTOR-BP. Chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène, l'orthologue unique (33 %) du gène *reptor* chez *Drosophila melanogaster*, référencé dans Vectorbase par le numéro d'accès AAEL009171, est sur-transcrit tandis que la transcription de l'orthologue unique (64 %) du gène *reptor-bp* (AAEL007444) n'est pas modifiée. L'activité transcriptionnelle de REPTOR est régulée par les protéines PP2A (AAEL014042) et 14-3-3 (AAEL011116), codées par des gènes tous deux sur-transcrits.

Les gènes *shc* (AAEL008739), *sos* (AAEL012071), *ras* (AAEL012071), les deux gènes *erk1/2* (AAEL007958, AAEL013939) et le gène *mnk* (AAEL004704) sont sur-transcrits de 1,24 à 2,77 fois (Tableau III.14 ; C). Ces gènes codent des protéines impliquées dans la voie de signalisation ERK/MAPK qui est située en aval de la voie de l'insuline, via l'interaction du complexe GRB2-SOS avec les « Insulin Receptor Substrate » (IRS) (Virkamäki *et al.*, 1999).

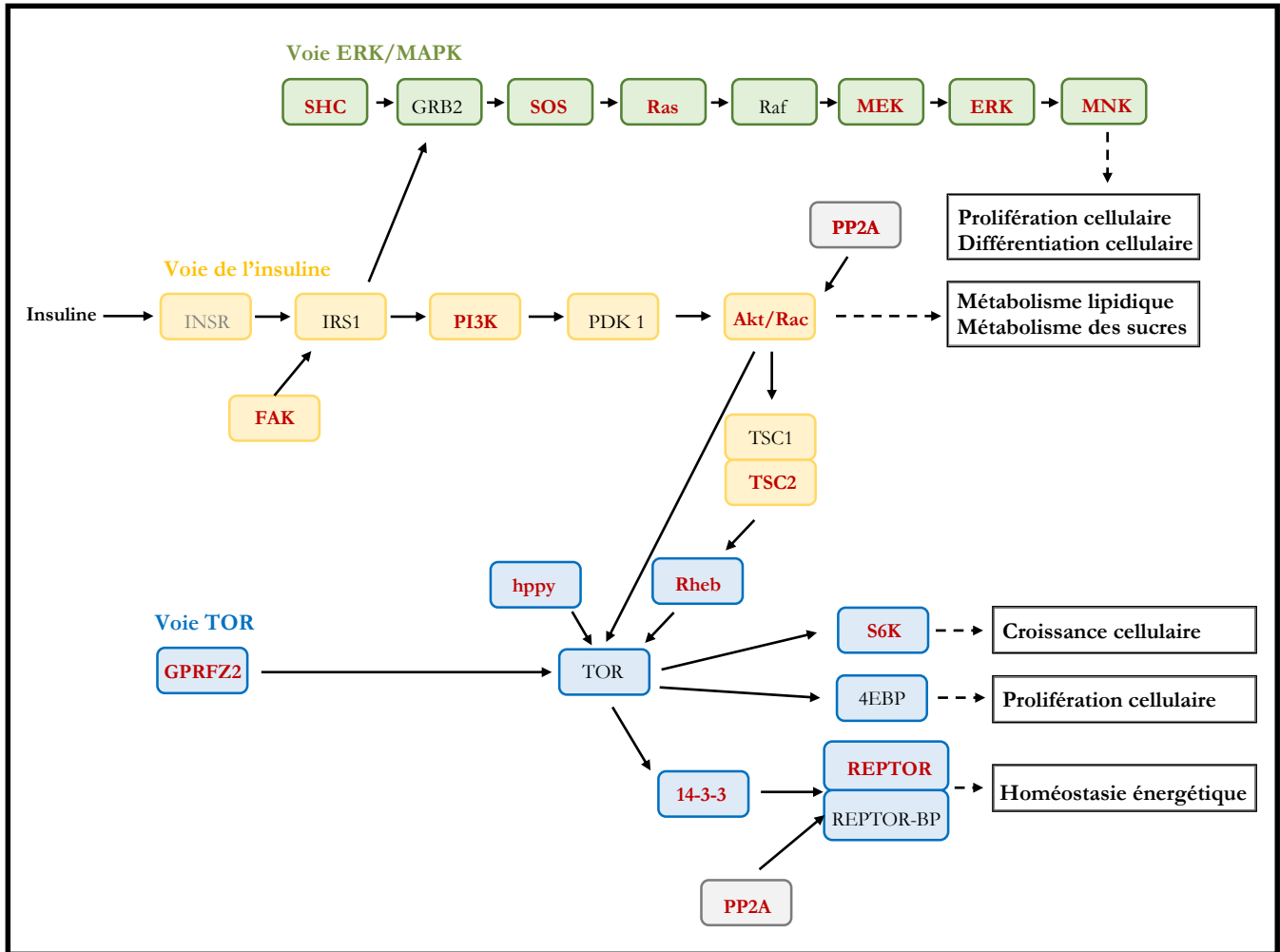


Figure III.11 – Sur-transcription des gènes impliqués dans les voies de signalisation cellulaire chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène. Les gènes sur-transcrits chez les larves de stade 1 de la descendance des populations exposées à 1µg/l d'ibuprofène sont représentés en rouges. Les gènes en gris n'ont pas été détectés dans notre étude. Les voies sont représentées selon le Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Tiebe *et al.* 2015 et Tanigushi *et al.* 2006. Abréviations : **Voie ERK/MAPK** - SHC : Src homology 2 domain containing, GRB2 : growth factor receptor-bound protein, SOS : son of sevenless, MEK : mitogen activated protein kinase kinase, ERK : mitogen-activated protein kinase, MNK : MAP kinase interacting serine/threonine kinase. **Voie de l'insuline** - INSR : récepteur à l'insuline, IRS1 : insulin receptor substrate 1, PI3K : phosphoinositide-inositol 3 kinase, PDK1 : 3-phosphoinositide dependent protein kinase, Akt/Rac : Rac serine/threonine kinase, TSC1 : Tuberous sclerosis complexe 1, TSC2 : Tuberous sclerosis complexe 2, FAK : focal adhesion kinase. **Voie TOR** - hppy : happyhour, Rheb : GPRFZ2 : Fizzled 2, TOR : target of rapamycin, S6K : ribosomal protein S6 kinase, 4EBP : eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein., REPTOR-BP : rector binding protein.

Tableau III.14 - Transcription différentielle des gènes impliqués dans les voies de signalisation cellulaires chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène. L'expression des gènes chez les larves de stade 1 de la descendance des populations témoins et des populations exposées à 1 µg/l d'ibuprofène a été mesurée par mRNAseq.

A Gènes liés à la voie de signalisation de l'insuline				
Référence Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Statut par rapport au témoin	Classe
AAEL013596		phosphatidylinositol 3-kinase regulator subunit	+ 1,70 x	Kinases et phosphatases
AAEL002903		phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha, beta, delta	+ 2,78 x	Kinases et phosphatases
AAEL000386		phosphatidylinositol 3-kinase, drosophila	+ 3,63 x (<i>q</i> =0,0503)	Kinases et phosphatases
AAEL008823	<i>rac</i>	rac serine/threonine kinase	+ 1,87 x	Transduction du signal
AAEL007712	<i>tsc2</i>	Tuberous sclerosis complexe 2	+ 1,64 x	Transduction du signal
AAEL014042	<i>pp2a</i>	protéin phosphatase pp2a regulatory subunit b	+ 1,30 x	Transduction du signal
AAEL004666	<i>Fak</i>	Focal adhesion kinase	+ 1,31 x	Structure
B Gènes liés à la signalisation de TOR				
Référence Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Statut par rapport au témoin	Classe
Régulateurs de la signalisation de la voie TOR				
AAEL008179		Rheb	+ 1,28 x	Transduction du signal
AAEL017338		unknown putative protein	+ 1,64 x	Indéterminée
AAEL007712		Tuberous sclerosis complexe2	+ 1,26 x	Transduction du signal
AAEL006778	<i>GPRFZ2</i>	GPCR Frizzled/Smoothed Family	+ 1,48 x	Signalisation hormonale et neurotransmission
TOR et ses substrats				
AAEL000693	<i>TOR</i>	Target of rapamycine	=	Transduction du signal
AAEL018120	<i>S6K</i>	RPS6-p70-protein kinase	+ 2,06 x	Transduction du signal
AAEL001864	<i>4E-BP</i>	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein	=	Métabolisme des protéines
Gènes impliqués dans la signalisation par TORC1				
AAEL009171		unknown putative protein	+ 1,38 x	Indéterminée
AAEL007444		unknown putative protein	=	Indéterminée
AAEL011116		14-3-3	+ 1,31 x	Autres
AAEL014042	<i>pp2a</i>	protein phosphatase pp2a regulatory subunit b	+ 1,30 x	Transduction du signal
C Gènes liés à la signalisation MAPK				
Référence Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Statut par rapport au témoin	Classe
AAEL008739	<i>shc</i>	shc transforming protein	+ 1,24 x	Transduction du signal
AAEL012071	<i>sos</i>	son of sevenless	+ 2,05 x	Transduction du signal
AAEL012071	<i>ras</i>	ras	+ 1,70 x	Transduction du signal
AAEL007958	<i>erk1/2</i>	extracellular signal-regulated kinase 1 and 2	+ 2,05 x	Transduction du signal
AAEL013939	<i>erk1/2</i>	extracellular signal-regulated kinase 1 and 2	+ 2,03 x	Transduction du signal
AAEL004704	<i>mnk</i>	map kinase-interacting serine/threonine kinase	+ 2,77 x	Transduction du signal

Expression des gènes de réponse aux stress

L'étude des gènes différentiellement transcrits appartenant à la classe des régulateurs transcriptionnels a révélé la légère sur-transcription de 1,23 fois du gène codant pour le « *heat shock transcription factor* » (*hsf*). Ce facteur de transcription est à l'origine de l'activation de la transcription des gènes de réponse aux stress, ce qui nous a menés à étudier plus en détail la cascade d'activation des gènes de réponse aux stress (Tableau III.15).

Chez la drosophile, l'activité transcriptionnelle de HSF en condition de stress est régulée par des modifications post-traductionnelles (acétylations, sumoylations). La déacétylase codée par le gène *sir2*, qui est surexprimée 1,43 fois dans notre étude est notamment responsable de l'activation de HSF en condition de stress nutritionnel (Ankar et Sistonen, 2011). L'expression des protéines de stress « heat-shock protein » (HSP) en condition de stress nécessite le recrutement du complexe P-TEFb en amont des gènes. Ce complexe est impliqué dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des HSP (Ankar et Sistonen, 2011). P-TEFb est un hétérodimère composé de sous-unités codé par les gènes *Cdk9* (AAEL013002), non impacté dans notre étude, et *cyclin T* (AAEL004839), surexprimé 1,54 fois dans la descendance des populations exposées à l'ibuprofène. Le remodelage de la chromatine nécessaire à l'activation de la transcription de *hsp70* est dû au recrutement du complexe FACT, qui facilite la transcription de la chromatine en modifiant la conformation des histones H2A et H2B, ainsi que la chaperonne d'histone Spt6 (Ankar et Sistonen, 2011). Alors que les sous-unités composant le complexe FACT ne sont pas impactées dans notre étude, l'orthologue unique de *spt6* (55 %) chez *Drosophila melanogaster*, annoté comme « suppressor of ty » (AAEL006956) chez *Aedes aegypti* est sur-transcrit (Tableau III.15). On constate en outre une sur-transcription de 6 gènes codant pour des HSP ou des protéines associées.

D'autre part, le facteur de transcription cap-n-collar (Cnc), l'orthologue de NRF2 chez les mammifères, en plus d'être impliqué dans le contrôle de la signalisation par l'ecdysone, est également connu pour être impliqué dans la mise en place de la réponse aux stress oxydatif et dans la réponse aux xénobiotiques (Pitoniak et Bohmann, 2015.). Les deux gènes codant pour ce facteur de transcription sont tous deux sur-transcrits 1,27 fois (Tableau III.15).

Tableau III.15 - Transcription différentielle des gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'insuline chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène. L'expression des gènes chez les larves de stade 1 de la descendance des populations témoins et des populations exposées à 1 µg/l d'ibuprofène a été mesurée par mRNAseq.

Gènes impliqués dans la réponse aux stress				
Référence Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Statut par rapport au témoin	Classe
Gènes impliqués dans l'activation de la transcription des hsp				
AAEL010319	<i>hsf</i>	heat shock transcription factor	+ 1,23 x	Régulation de la transcription
AAEL006655	<i>Sir2</i>	Sirtuin 2	+ 1,43 x	Régulations des marques épigénétiques
AAEL004839		cyclin t	+ 1,54 x	Structure
AAEL013002	<i>cdk9</i>	Cyclin dependant kinase 9	=	Kinases et phosphatases
AAEL006956		suppressor of ty	+ 1,22 x	Régulation de la transcription
Heat-shock protéines				
AAEL017975	<i>HSP70Ba</i>		+ 2,71 x	Trafic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL017980	<i>HSP70Ab'</i>		+ 2,39 x	Trafic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL017976	<i>HSP70Bb</i>		+ 2,37 x	Trafic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL011704		heat shock protein	+ 1,36 x	Trafic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL010948		heat shock protein 70 (hsp70)-interacting protein	+ 1,29 x	Trafic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL004148		heat shock protein 70 (hsp70)-interacting protein	+ 1,19 x	Trafic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL003588		DNA-J/hsp40	+ 1,33 x	Trafic intra et extracellulaire - Chaperonnes
Gènes de réponse au stress oxydatif et chimique				
AAEL015467	<i>cnc</i>	segmentation protein cap-n-collar	+ 1,27 x	Régulation de la transcription
AAEL005077	<i>cnc</i>	segmentation protein cap-n-collar	+ 1,27 x (<i>q</i> =0,054)	Régulation de la transcription

III.5 Discussion

Les études mécanistiques sont communément effectuées lors de stress aigus, dus à l'exposition à de fortes concentrations d'un xénobiotique par exemple. A l'occasion cette thèse, nous avons choisi de nous intéresser à l'étude de l'impact de polluants à des concentrations cohérentes avec les dosages environnementaux. Par conséquent, les mécanismes impliqués dans les perturbations mises en évidence ont été étudiés à ces mêmes concentrations. Suite à l'exposition de populations à 1 µg/l d'ibuprofène, la modification des traits d'histoire de vie observée chez la descendance non exposée nous a conduit à étudier les mécanismes impliqués dans cet effet trans-générationnel.

De façon tout à fait intéressante, les résultats obtenus lors de cette étude mécanistique confirment les observations faites lors de l'étude des traits d'histoire décrits dans la première partie de cette thèse (Chapitre II). En effet, que ce soit dans les études complémentaires des traits d'histoire de vie ou dans celle des mécanismes impliqués (métabolisme, titres hormonaux, transcription des gènes), les modifications induites sur les individus exposés directement à l'ibuprofène sont modérées, tandis que d'importantes modifications sont observées chez leur descendance. L'élément le plus marquant à ce propos est l'étude transcriptomique des individus exposés et de leur descendance. Alors que seulement 1 % des gènes apparaissent différemment transcrits chez les individus directement exposés à l'ibuprofène, leur descendance présente une large modification de leur profil transcriptionnel, avec près de 15 % des gènes différemment transcrits. De plus, les variations de niveaux transcriptionnels présentent une plus grande amplitude chez les larves exposées de la génération F0 (jusqu'à 45 fois par rapport aux témoins) comparativement aux niveaux transcriptionnels détectés chez les larves de la descendance chez qui seuls 12 % des gènes impactés sont différemment transcrits plus de 2 fois, avec un maximum de 11 fois par rapport aux témoins. Cette observation met en exergue le fait que l'amplitude de la variation transcriptionnelle n'est pas nécessairement associée à un fort phénotype à l'échelle individuelle, et que de faibles mais nombreuses variations peuvent au contraire être à l'origine de modifications marquées du développement des individus, ce qui avait déjà été remarqué auparavant (Barata *et al.*, 2000).

III.5.1 Impacts de l'ibuprofène sur les individus exposés

L'exposition à l'ibuprofène entraîne une réduction drastique de la transcription des gènes codant pour les hexamérines chez les larves de stade 4. Ces protéines, codées par 9 gènes différents chez *Aedes aegypti*, sont des protéines de stockage, impliquées dans la redistribution d'acides aminés lors de la métamorphose des individus chez les insectes holométaboles. En effet, la nymphe ne s'alimentant pas, le déroulement de la métamorphose repose uniquement sur les ressources accumulées lors des stades larvaires. Les hexamérines sont synthétisées dans le corps gras, très majoritairement durant le quatrième stade larvaire, et libérées dans l'hémolymphe. Peu après la nymphose, les hexamérines sont ré-internalisées dans le corps gras, où elles sont stockées et protéolysées au cours du développement nymphal, fournissant ainsi les ressources en acides aminés nécessaires au développement du futur imago (Haunerland, 1996; Zakharkin *et al.*, 2001). Le facteur C/EBP est le seul facteur de transcription qui a été identifié comme différentiellement transcrit chez les larves exposées à l'ibuprofène. De manière intéressante, un site de liaison à ce facteur a été mis en évidence en amont d'un des gènes codant pour une hexamérine chez *Aedes atropalpus* (Zakharkin *et al.*, 2001), mettant ainsi en évidence un potentiel lien entre la sous-transcription de C/EBP et la sous-transcription des hexamérines.

Chez *Aedes aegypti*, la biosynthèse protéique ayant lieu durant le quatrième stade larvaire contribue pour entre 70 et 88 % de la quantité totale de protéines atteintes au moment de la métamorphose nymphale (Timmermann et Briegel, 1999). Une telle réduction de la transcription des hexamérines chez ces larves devrait alors probablement avoir d'importantes conséquences sur les réserves protéiques chez les nymphes et les imagos. Une étude chez *Aedes aegypti* a d'ailleurs mis en évidence une légère augmentation de la durée de vie chez les femelles imagos lorsque celles-ci ont été soumises à une restriction alimentaire durant leur développement larvaire (Joy *et al.*, 2010). Cette augmentation de la durée de vie est mise en relation par les auteurs de l'étude avec une diminution des ressources en protéines dans les imagos. Ainsi, l'allongement de la durée de vie constatée chez les mâles imagos dans notre étude pourrait refléter la baisse des réserves protéiques chez ceux-ci, bien que cet impact phénotypique semble modéré en regard de la réduction massive de la transcription des hexamérines lors d'une phase clé de la mise en place des réserves protéiques. Cet allongement de la durée de vie n'a pourtant pas été retrouvé chez les femelles imagos. L'établissement des ressources métaboliques durant le quatrième stade larvaire chez *Aedes aegypti* suit des dynamiques différentes chez les mâles et les femelles (Timmermann et Briegel, 1999). De plus, Korochkina *et al.* ont mis en évidence des dynamiques temporelles différentes entre les mâles et les femelles dans l'internalisation des hexamérines. Les auteurs ont de plus rapporté une

internalisation plus importante des hexamérines riches en méthionines chez les femelles, mettant ainsi en évidence les différences entre sexes existantes chez *Aedes aegypti* vis-à-vis de la gestion des ressources en acides aminés (Korochkina *et al.*, 1997). D'autre part, la séquence de liaison au facteur de transcription C/EBP a été montrée comme faisant partie d'un complexe de régulation définissant l'expression d'une hexamérine spécifiquement chez les femelles d'*Aedes atropalpus* (Zakharkin *et al.*, 2001). Ces différences métaboliques et leur régulation pourraient expliquer que seule la durée de vie des mâles soit affectée par l'exposition à l'ibuprofène.

Cependant, l'implication d'une chute des réserves protéiques dans l'allongement de la durée de vie des mâles est invérifiable à partir des mesures métaboliques effectuées par HRMAS, qui ne permettent pas d'évaluer les ressources en acides aminés. D'autre part, nous nous sommes concentrés dans notre étude sur l'état métabolique et transcriptomique des femelles imagos, ce qui est limitant étant donné le caractère sexe-spécifique de cette perturbation. Une étude plus détaillée des ressources protéiques présentes chez les femelles et les mâles est à envisager pour confirmer cette hypothèse.

L'analyse transcriptomique des larves de stade 4 a également révélé une sous-transcription particulière des gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Venant appuyer une diminution des voies immunitaires, le rôle de plusieurs gènes sous-transcrits n'appartenant pas à cette classe a été mis en évidence.

Cinq odorant binding protein (OBP) sont notamment sous-transcrits. Les OBP sont de petites protéines de transport ayant été décrites dans un premier temps comme impliquées dans les processus d'olfaction (Fan *et al.*, 2011). Cependant, plusieurs études ont également mis en évidence d'autres fonctions physiologiques potentielles pour ces protéines. En effet, en plus de son expression dans les organes sensoriels des imagos, OBP22 est également produite dans le système reproducteur mâle chez *Aedes aegypti*. OBP22 est d'ailleurs transféré au sein des spermathèques de la femelle au cours de l'accouplement, indiquant une fonction potentielle de cette protéine dans la reproduction chez cette espèce (Li *et al.*, 2008). De même, l'expression de OBP45 au sein des ovaires de femelles *Aedes aegypti* au cours de la vitellogénèse semble indiquer un rôle de cette protéine dans la maturation des œufs (Costa-da-Silva *et al.*, 2013). En outre, deux études portant sur la réponse immunitaire de la drosophile ont mis en évidence une implication potentielle de certaines OBP dans la réponse immunitaire à une infection fongique, bactérienne ou virale (Levy *et al.*, 2004).

De même, notre étude a révélé la sous-transcription des gènes codant pour des ferritines et des transferrines, des protéines principalement synthétisées au sein du corps gras et impliquées

dans le transport et la distribution du fer (Zhou *et al.*, 2009; Geiser et Winzerling, 2012), mais également dans la réponse immunitaire chez les insectes (Levy *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2009; Geiser et Winzerling, 2012).

L'activité anti-inflammatoire de l'ibuprofène chez les mammifères est due à l'inhibition de l'activité des cyclooxygénases, enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des eicosanoïdes et notamment dans la biosynthèse des prostaglandines à partir d'acide arachidonique. Les prostaglandines sont impliquées dans différents processus physiologiques chez les insectes, comme la reproduction ou la physiologie du transport ionique, mais aussi dans la réponse immunitaire aux infections. Cette action des eicosanoïdes et des prostaglandines sur la réponse immunitaire passe notamment par l'induction de la production de peptides antimicrobiens ou l'induction des prophénoloxydases (Stanley, 2006, 2011). L'impact de l'inhibition de la biosynthèse des eicosanoïdes par différents inhibiteurs a été étudié chez différents modèles d'insectes comme la teigne (*Galleria mellonella*) et la guêpe parasitoïde (*Pimpla turionellae*). Quelle que soit l'espèce étudiée, une perturbation de la réponse immunitaire en condition de "challenge" a été mise en évidence, sans pour autant perturber de manière visible la morphologie et la survie des individus ni leur traits d'histoire de vie (Büyükgüzel *et al.*, 2007; Durmuş *et al.*, 2008). Ainsi, l'inhibition de la transcription de gènes impliqués dans la réponse immunitaire chez les larves exposées à l'ibuprofène apparaît tout à fait cohérente avec les mécanismes d'action anti-inflammatoire de ce composé pharmaceutique.

De même que pour les hexamérines, des sites de liaison du facteur de transcription C/EBP ont été identifiés en amont d'un gène codant pour la ferritine chez *Aedes aegypti* (Pham *et al.*, 2003), ainsi que dans la région promoteur du gène codant pour la transferrine chez la souris (*mus musculus*) (Theisen *et al.*, 1993). La liaison du facteur C/EBP en amont des gènes codants pour des défensines a en outre été mise en évidence chez *Aedes aegypti*, liaison qui pourrait vraisemblablement être étendue à de nombreux autres peptides antimicrobiens (Meredith *et al.*, 2006). C/EBP étant supposé être un activateur de la transcription de ce gène, il est envisageable que la sous-transcription des gènes impliqués dans la réponse immunitaire chez les larves exposées à l'ibuprofène soit au moins en partie due à une diminution de l'expression de ce facteur (Figure III.12).

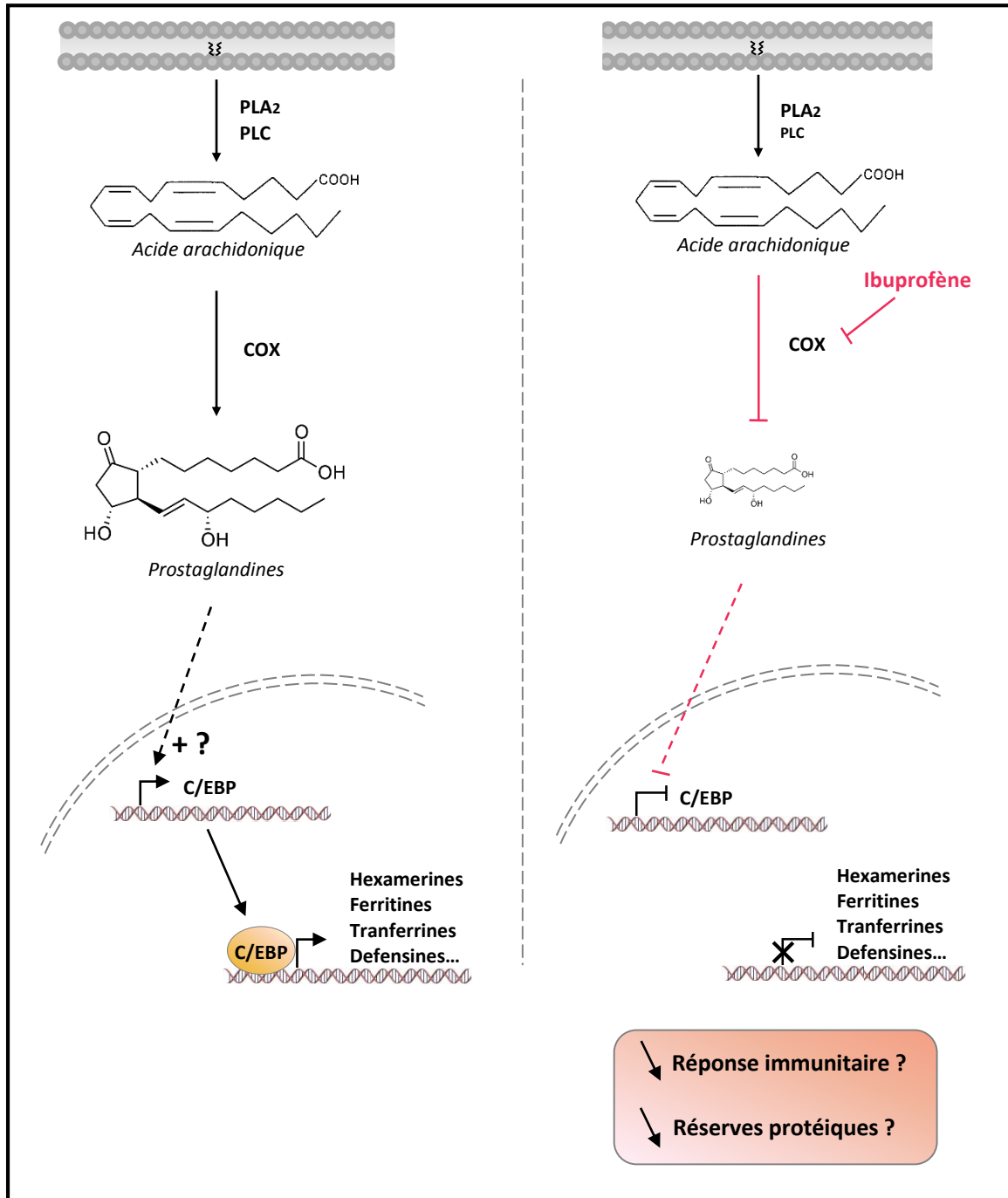


Figure III.12 - Perturbations potentielles de la physiologie des larves d'*Aedes aegypti* par l'ibuprofène.

A : En conditions normale de développement, les phospholipides et le diacylglycérol membranaires sont clivés par la phospholipase A2 (**PLA2**) et la phospholipase C (**PLC**) respectivement, libérant de l'acide arachidonique dans le cytosol. L'acide arachidonique est converti en différentes prostaglandines par les cyclo-oxygénases 1 et 2 (**COX**). Ces prostaglandines régulent la physiologie cellulaire à différents niveaux, potentiellement via la régulation de l'expression du facteur de transcription CCAAT/enhancer binding protein (**C/EBP**). Ce facteur de transcription se fixe dans les régions promoteurs des gènes impliqués dans le stockage des réserves protéiques (hexamérines) et la réponse immunitaire (defensines, ferritines et transferrines notamment). **B :** L'ibuprofène inhibe l'activité des **COX**, réduisant ainsi les quantités de prostaglandines produites. Cette réduction provoque une réduction de l'expression de **C/EBP**, réduisant ainsi la transactivation de l'expression des gènes régulés par ce facteur de transcription. L'ibuprofène aboutit ainsi à la réduction de la mise en place des réserves protéiques et de la réponse immunitaire chez les larves de stade 4.

Une étude portant sur les mécanismes impliqués dans les perturbations induites par de fortes doses d'ibuprofène chez *Daphnia magna* avait déjà mis en évidence une similarité entre le mode d'action de l'ibuprofène chez les vertébrés et chez ce modèle de crustacé. Alors que seule la sous-transcription de trois gènes impliqués dans la réponse immunitaire est mentionnée, les auteurs de cette étude se concentrent principalement sur la perturbation de quelques gènes de la voie de biosynthèse des eicosanoïdes qu'ils mettent en lien avec une perturbation de l'oogénèse (Heckmann *et al.*, 2008).

Dans notre étude, ni l'étude transcriptomique, ni les mesures métaboliques, ni l'étude de la vitellogénèse du point de vue hormonal et transcriptionnel n'a révélé d'éléments pouvant suggérer une perturbation de la fonction reproductrice chez les femelles imagos. A l'échelle transcriptomique notamment, alors que seuls quelques gènes sont différentiellement transcrits, aucune corrélation avec les observations réalisées chez les larves de stade 4 ne peut être faite, et rien ne peut laisser penser à une perturbation d'une voie physiologique quelconque ou à une baisse des ressources protéiques, qui pourrait pourtant être attendue étant donné les observations faites chez les larves de stade 4. L'étude des métabolites par HRMAS n'a pas non plus apporté d'élément en faveur d'une perturbation métabolique chez ces femelles. Cette approche, trop limitée à l'étude de certains métabolites n'a pas permis d'évaluer les ressources protéiques des femelles. La prise du repas de sang chez *Aedes aegypti* entraîne de larges modifications physiologiques chez les femelles. Cela implique une régulation hormonale et transcriptionnelle fine aboutissant à l'internalisation dans les oocytes des ressources nécessaires au développement des embryons, et définissant plus largement le développement de la descendance (Clements, 1992). Cette dynamique physiologique n'apparaît pas non plus modifiée par une exposition larvaire à l'ibuprofène, dénotant ainsi avec les observations faites chez la daphnie, mettant en évidence une perturbation du potentiel reproducteur de celles-ci suite à une exposition à de fortes doses d'ibuprofène (Heckmann *et al.*, 2008).

III.5.2 Impacts de l'ibuprofène sur les individus de la descendance non exposée

Lors du premier volet de la thèse, nous avons mis en évidence une accélération du développement de la descendance des populations exposées à 1 µg/l d'ibuprofène durant une génération. Les expérimentations menées lors de ce deuxième volet ont mis en évidence une meilleure tolérance des jeunes larves de la descendance à une privation totale de nourriture, associée à une augmentation des réserves lipidiques et une diminution des réserves en glucose. Outre ces modifications phénotypiques et métaboliques, l'étude du transcriptome de cette descendance

durant le 1^{er} stade larvaire a révélé une importante modification de la transcription de nombreux gènes. Un bilan des observations principal est fait dans la figure III.13.

Ces importantes différences transcriptionnelles sont probablement liées à la sur-transcription de plusieurs gènes impliqués dans la régulation de la transcription et des marques épigénétiques. Associé à cela, la sur-transcription d'un grand nombre de gènes codant pour des protéines prenant part aux voies de signalisation cellulaires principales a été constatée. Ces voies de signalisation sont connues pour être impliquées dans la régulation de nombreux processus développementaux et physiologiques comme la différenciation, la prolifération et la croissance cellulaire ou le métabolisme en fonction de différents stimuli et signaux extracellulaires (Taniguchi *et al.*, 2006). La question des conséquences à l'échelle individuelles d'une telle sur-transcription se pose avec un sens particulier dans le cas des voies de signalisation. En effet, outre la limitation habituelle de la quantification des ARN messagers ne permettant pas de rendre compte des quantités de protéines effectivement produites à partir de ceux-ci, l'état des modifications post-traductionnel ne peut pas être préjugé à partir des données transcriptomiques. Cet état post-traductionnel est cependant fondamental dans la définition de l'influence des voies de signalisation sur la physiologie cellulaire, et il est ainsi délicat d'établir un lien direct entre des observations transcriptionnelles et des phénotypes observés à des échelles biologiques supérieures. Il est malgré cela possible, sans connaître l'état d'activation des voies de signalisation concernées, de faire l'hypothèse que la surreprésentation des effecteurs de celles-ci entraîne un potentiel de signalisation plus important au sein de la cellule, causant une amplification du signal dans le cas où ces voies seraient activées. Cette amplification de la signalisation impliquée la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire est associée à la sur-transcription des gènes codant pour des protéines impliquées dans la mise en place des structures cellulaires et tissulaires (protéines du cytosquelette et de la matrice extracellulaire), pouvant être à l'origine d'une plus forte production des éléments structurels nécessaires à la formation de nouvelles cellules et tissus. Une approche protéomique complémentaire apparaît cependant indispensable afin de rendre de compte de la fonctionnalité et du niveau d'activation réel de ces voies.

En cherchant à identifier les gènes et processus physiologiques à l'origine des variations de la vitesse développementale chez la drosophile, Mensch *et al.* ont étudié 107 lignées mutantes de drosophiles présentant une modification du temps de développement. L'étude des gènes mutés dans chacune de ces lignées a mené à l'établissement d'une liste de gènes potentiellement impliqués, ainsi que des termes GO (Gene Ontology) associés. Les fonctions associées à une accélération du développement concernent notamment le développement des structures anatomiques, la régulation

des processus biologiques, les processus de développement cellulaires, la communication cellulaire, la biogénèse et l'organisation des composants cellulaires, et la prolifération cellulaire (Mensch *et al.*, 2008). Les classes fonctionnelles enrichies parmi les gènes sur-transcrits chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène semblent ainsi cohérentes avec l'augmentation de la vitesse du développement constaté chez les larves.

III.5.2.1 Modifications du métabolisme

Une étude des réserves métaboliques a été effectuée dans les œufs à l'issue du développement embryonnaire, durant la phase de quiescence. Cette étude a révélé une surreprésentation des ressources lipidiques, et notamment une surreprésentation du glycérol estérifié constituant les triglycérides ainsi que des lipides polyinsaturés et de la phosphatidylcholine et/ou la glycerophosphocholine. Parallèlement à cela, une diminution des ressources en glucose a été observée.

Ces résultats semblent cohérents avec les observations réalisées à l'échelle transcriptomique chez les jeunes larves, qui mettent en évidence une sous-transcription particulièrement importante des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, dont la moitié codant pour des enzymes impliquées dans leur dégradation. Bien que n'étant pas particulièrement surreprésentés, 28 gènes impliqués dans le métabolisme des lipides sont tout de même surexprimés. Parmi les protéines codées par ces gènes, 9 sont impliquées dans la synthèse des triglycérides et des acides gras en général et 7 sont impliqués dans la synthèse et le transport des stéroïdes. Plus particulièrement, une sur-transcription du gène codant pour l'Acétyl-CoA carboxylase (AAEL006307) est observée. Cette enzyme dont l'activité catalytique se trouve à l'interface entre le métabolisme des sucres et des acides gras, favorise la synthèse lipidique par rapport au métabolisme du sucre en catalysant la première étape de la synthèse des acides gras. Le gène codant pour la Lipine (AAEL005175) figure également parmi les gènes sur-transcrits. Cette protéine est une phosphatidate phosphatase dont l'activité aboutit à la production de diacylglycérol, un intermédiaire lipidique servant à la synthèse des triglycérides, mais également à la synthèse des phosphoglycérides comme la phosphatidylcholine (Harris et Finck, 2011; Ugrankar *et al.*, 2011). Par ailleurs, hormis 1 transporteur de sucre, les 13 gènes impliqués dans le métabolisme des sucres dont la transcription est modifiée dans notre étude sont sous-transcrits.

Ainsi, il semblerait que, au moins au niveau transcriptionnel, les voies métaboliques soient orientées vers la mise en place de réserves lipidiques et de structure plutôt que vers le métabolisme du sucre, ce qui apparaît cohérent avec les observations métaboliques faites sur les œufs (Figure

III.13, encadré vert). Cependant, les réserves en lipides, sucres et protéines sont particulièrement dynamiques, et dépendent à très court terme de l'activité motrice et alimentaire de la larve (Timmermann et Briegel, 1999), et il est donc délicat d'inférer un état physiologique général aux stades larvaires à partir d'une mesure métabolique unique.

III.5.2.2 Implication de la signalisation par les ecdystéroïdes dans l'accélération du développement

Outre ces constatations générales, l'étude plus précise du transcriptome de la descendance a mis en évidence une augmentation des transcrits de gènes impliqués dans la signalisation par la 20E, comme l'orthologue du co-facteur Lpt (AAEL005378) et *cap'n'collar* (CnC, AAEL015467 ; AAEL005077).

Le gène *lpt* est en effet connu chez les insectes pour être nécessaire à l'activation transcriptionnelle dépendante de l'ecdysone en s'associant au complexe EcR-USP (Chauhan *et al.*, 2012). Les deux gènes codant pour la protéine CnC chez *Aedes aegypti* apparaissent sur-transcrits. Le facteur de transcription CnC est connu chez la drosophile pour son rôle dans la réponse aux stress oxydant (Sykiotis et Bohmann, 2008), et plus particulièrement à la réponse aux xénobiotiques chez les insectes (Misra *et al.*, 2011). Des auteurs ont cependant également mis en évidence le rôle primordial de CnC dans le développement chez la drosophile (Veraksa *et al.*, 2000; Sykiotis et Bohmann, 2008). Une étude a notamment mis en évidence de façon particulièrement intéressante l'implication de CnC dans l'activation de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la 20E, ainsi que dans l'expression des gènes de réponse précoce à la 20E (Deng et Kerppola, 2013). La transcription des gènes *E75* et *Br* apparaît notamment fortement réduite lors de l'inactivation de CnC chez la drosophile (Deng et Kerppola, 2013).

L'augmentation de la transcription des gènes impliqués dans la signalisation par la 20E apparaît effectivement mener à une sur-activation de cette voie hormonale, étant donné l'augmentation du nombre de transcrits codés par des gènes de réponse aux ecdystéroïdes (*Br*, *E75*, *HR3*, *HR4*, *Ftz-f1 β* et *crooked legs*). Le gène *Br*, sur-transcrit chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène code pour un facteur de transcription dont l'activité transcriptionnelle joue un rôle clef dans la signalisation de la 20E au cours du développement et de l'oogenèse (Chen *et al.*, 2004; Ou et King-Jones, 2013). Parmi les nombreux gènes régulés par ce facteur de transcription, le gène *npc1* a été plus particulièrement décrit (Xiang *et al.*, 2010). Ce gène code pour une protéine de transport des stéroïdes régulant une large diversité de processus développementaux et métaboliques, dont notamment la biosynthèse des ecdystéroïdes et l'homéostasie des stérols de manière générale. *npc1* (AAEL003325) est sur-transcrit 1,21 fois chez la descendance des

populations exposées à l'ibuprofène, associant ainsi la sur-transcription d'un facteur de transcription avec celle d'une de ses cibles directe, validant ainsi les constatations transcriptionnelles d'un point de vue fonctionnel. Le seul gène étant connu pour être régulé directement par la 20E retrouvé sous-transcrit dans notre étude est un des gènes codant pour la vitellogénine (AAEL006966). Les raisons pouvant expliquer la sous-transcription de ce gène ne sont pas identifiées. La vitellogénine est en effet classiquement considérée comme l'aboutissement ultime de la signalisation par l'ecdysone, notamment chez les imagos. Cependant, alors que seuls deux des six gènes codant pour cette protéine sont transcrits, qui plus est dans des proportions peu élevées (environ 20 FPKM), il semble que les larves de stade 1 ne soient pas en phase de production forte de vitellogénine. Les gènes codant pour la vitellogénine sont finement régulés par plusieurs facteurs et voies de signalisation (Hansen *et al.*, 2014; Martín *et al.*, 2001), et un déséquilibre dans ces différents facteurs pourrait avoir abouti à la sous-transcription de ces gènes chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène.

L'implication de l'ecdysone dans le contrôle du rythme des mues et métamorphoses au cours du développement larvaire et nymphal chez les insectes est décrite depuis longtemps, notamment chez *Aedes aegypti* (Clements, 1992; Margam *et al.*, 2006). La voie de signalisation de l'ecdysone a de plus été liée au temps de développement dans plusieurs études chez la drosophile (Mensch *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2014; Cranna et Quinn, 2009). La voie par laquelle l'ecdysone influe sur le cycle cellulaire est notamment bien détaillée chez cet insecte (Cranna et Quinn, 2009). La liaison de la 20E à son récepteur EcR-USP induit l'activation de la transcription du gène *cro1*, qui provoque une diminution des transcrits issus du gène *wingless (wg)*. Cette inhibition de Wg favorise notamment un passage des cellules en phase mitotique (phase M) via l'augmentation de l'expression du gène *string (stg)*, qui induit l'entrée en phase M via l'activation du complexe cdk1/cyclineB (Cranna et Quinn, 2009). Dans notre analyse, l'orthologue unique de *cro1* chez *Aedes aegypti* (AAEL005369) est sur-transcrit 2,9 fois, tandis que *Cdc25*, orthologue (50%) unique de *stg* est surexprimé 1,34 fois. De plus deux cyclines B sont annotées chez *Aedes aegypti* : la cycline b (AAEL010094) est sur-transcrite 1,25 fois et cycline b3 (AAEL009572) 1,47 fois.

L'augmentation de la signalisation par l'ecdysone semble ainsi pouvoir expliquer l'accélération du développement observée chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène.

Ainsi, il se dessine chez les larves issues d'individus exposés un état favorable à l'action de l'ecdysone. D'une part, les co-facteurs impliqués dans l'activation transcriptionnelle des gènes cibles du récepteur EcR-USP décrits plus tôt sont sur-transcrits. D'autre part, parmi les gènes impliqués

dans la régulation des marques épigénétiques surexprimés, l'orthologue unique (37 %) de *nejire* chez la drosophile, AAEL017391, est sur-transcrit 2,02 fois. L'acetyl-transferase codée par ce gène est impliquée chez la drosophile dans l'acétylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 23 en amont des gènes de réponse à l'ecdysone, régulant ainsi leur expression (Bodai *et al.*, 2012).

L'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la 20E est régulée par différents facteurs de transcription, permettant ainsi de définir le rythme des cycles hormonaux définissant le développement des larves. Parmi ces régulateurs, les facteurs de transcription Cnc et Drifter (AAEL003560), sur-transcrits dans notre étude, sont notamment connus pour activer l'expression des gènes stéroïdogènes (Deng et Kerppola, 2013; Cheng *et al.*, 2014), bien qu'aucune sur-transcription de ces gènes stéroïdogènes n'ait été constatée. De plus, les larves de la descendance présentent une sur-transcription du facteur de transcription Woc (AAEL004320), connu pour être impliqué dans l'activation de l'expression de la cholesterol7,8-dehydrogenase, qui représente la première étape de l'ecdystéroïdogénèse (Warren *et al.*, 2001). La fonction de transport des stérols par la protéine NPC1 a par ailleurs été montrée comme indispensable à la mise à disposition du cholestérol au niveau des cellules ecdysteroïdogènes (Fluegel *et al.*, 2006).

III.5.2.3 HSF : de la réponse aux stress au développement

Outre une augmentation de la signalisation de l'ecdysone, l'étude de transcriptomique de la descendance a mis en évidence une sur-transcription basale des plusieurs gènes impliqués dans la réponse au stress.

Parmi ces gènes, la sur-transcription du gène codant pour le Heat Shock Factor (HSF) a particulièrement retenu notre attention. En effet, le facteur de transcription HSF est responsable de la réponse aux stress protéotoxiques. En cas de stress, HSF dirige l'activation de la transcription des protéines de stress HSP selon un mécanisme étudié avec précision chez la drosophile. L'activation de la transcription des HSPs est notamment coordonnée par le complexe P-TEFb, dont la fixation aux promoteurs des HSP suite à un choc thermique induit l'activation de l'ARN polymérase II postée sous forme inactive au niveau de ces promoteurs (Ankar et Sistonen, 2011). Un des deux gènes du complexe régulateur de cette polymérase, la cycline t (AAEL004839) est sur-transcrite, tandis que la transcription de l'autre sous-unité, CDK9, n'est pas modifiée. Parallèlement à cela, l'activation de la transcription des HSP nécessite le remodelage de la chromatine par le complexe FACT associée à la chaperonne d'histone Spt6 (Ankar et Sistonen, 2011). L'orthologue unique (55%) de Spt6 chez *Aedes aegypti* (*suppressor of Ty*, AAEL006956) est sur-transcrit dans notre étude. Ainsi, l'augmentation de l'expression basale des HSPs constatée chez la descendance issue

des populations exposées à l'ibuprofène pourrait ainsi être due à la sur-expression de plusieurs facteurs impliqués dans l'activation de leur transcription.

En dehors de toute situation de stress, HSF et les HSPs ont également une fonction dans le développement, notamment chez la drosophile et les mammifères (Jedlicka *et al.*, 1997; Anckar et Sistonen, 2011). Le rôle constitutif de HSF a également été mis en évidence au niveau des glandes accessoires mâles chez le moustique *Anopheles gambia* (Dottorini *et al.*, 2013). Contrairement à *Aedes aegypti*, chez lequel une unique isoforme de HSF est exprimée, 3 isoformes sont détectées chez *Anopheles gambiae*. Les conséquences de l'extinction des différentes isoformes de HSF sur le transcriptome des glandes accessoires ont été étudiées, permettant ainsi d'établir une liste de gènes régulés constitutivement par HSF. Parmi les 727 gènes identifiés comme étant régulés directement ou indirectement par HSF, 72 orthologues sont différentiellement transcrits chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène.

Ainsi, l'activité de HSF apparaît bien plus large que la réponse aux stress pour laquelle ce facteur de transcription a été principalement étudié. La sur-expression de HSF pourrait en outre ainsi être en partie à l'origine des différences détectées dans le transcriptome des larves issues des populations exposées.

III.5.2.4 Tolérance aux stress

L'augmentation de l'expression basale de deux facteurs de transcription particulièrement impliqués dans la réponse au stress, HSF et Cnc, ainsi que de plusieurs HSP chez les larves issues de populations exposées à l'ibuprofène pourraient définir une meilleure réactivité de ces larves face aux stress auxquels elles pourraient être soumises.

Nous avons notamment observé une meilleure tolérance des larves de la descendance des populations exposées à l'ibuprofène à la privation totale de nourriture. L'importance des ressources lipidiques en condition de jeûne a été mis en évidence chez *Aedes aegypti* durant les stades larvaires (Timmermann et Briegel, 1999) et adultes (Briegel, 1990). Ces ressources sont en effet les premières à être métabolisées en cas de privation de nourriture, que ce soit chez *Drosophila melanogaster* ou chez *Aedes aegypti* (David *et al.*, 1975; Briegel, 1990; Kamoshida *et al.*, 2012).

Chez la drosophile imago, le jeûne tend à induire la transcription de gènes impliqués dans la croissance et les processus de maintenance et de synthèse protéique tandis que les peptidases, les protéines de transport, de défense, d'immunité ainsi que des protéines cuticulaires apparaissent sous-transcrites (Harbison *et al.*, 2005). Ce profil ressemble fortement aux observations réalisées

dans notre étude parmi les classes fonctionnelles enrichies par les gènes différentiellement transcrits. Ainsi, les larves de la descendance des individus exposés à l'ibuprofène pourraient être favorisées lors d'un jeûne, celles-ci présentant un état physiologique basal plus favorable à cette situation stressante.

Au-delà de cette considération globale, notre étude transcriptionnelle a mis en évidence la sur-transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse aux stress nutritionnels. C'est notamment le cas du gène AAEL006655, codant pour la protéine Sir2, une *histone déacétylase* jouant un rôle important dans l'extinction des gènes, la réparation de l'ADN et le vieillissement. Plus particulièrement, Sir2 joue un rôle dans la réponse au statut nutritionnel et énergétique de l'organisme chez la drosophile, via la régulation de la mobilisation des réserves lipidiques et du métabolisme des lipides, étant ainsi crucial pour la survie en situation de jeûne (Banerjee *et al.*, 2012). Les observations faites chez les mammifères tendent à montrer que l'action de Sir2 pourrait notamment passer par une action sur différents facteurs de transcription impliqués dans la réponse aux stress, dont HSF, permettant ainsi d'adapter la régulation transcriptionnelle aux conditions métaboliques de l'organisme (Anckar et Sistonen, 2011). L'orthologue unique (47%) de l'*histone deacetylase* HDAC4 chez *Aedes aegypti* (AAEL002528) est également sur-transcrit dans notre étude. L'activité de l'histone deacetylase HDAC4 a été impliquée dans la mise en place chez la drosophile de la régulation du métabolisme lipidique en cas de diminution des ressources alimentaires, aboutissant à une diminution du stockage des lipides (Choi *et al.*, 2015). La lipine, dont l'activité *phosphatidate phosphatase* a précédemment été mise en relation avec les modifications des réserves lipidiques, semble également être impliquée dans la régulation de l'expression de certains gènes via son interaction avec des facteurs de transcription (Harris et Finck, 2011). Le rôle de cette activité transcriptionnelle a notamment été mise en évidence dans l'activation de gènes d'oxydation des acides-gras en condition de jeûne, permettant ainsi l'adaptation du métabolisme des organismes à la diminution des ressources énergétiques (Ugrankar *et al.*, 2011).

Le profil transcriptionnel des larves issues des populations exposées apparaît ainsi étonnamment favorable à une réaction adaptée en cas de réduction des ressources alimentaires. Ces résultats sont particulièrement intéressants à la lumière de la meilleure tolérance de ces larves à la privation totale de nourriture observée au cours de notre étude.

III.5.2.5 Rôle central des voies de signalisation cellulaires dans les modifications individuelles

De nombreux gènes codants pour les protéines impliquées dans les voies de signalisation de l'insuline, TOR et MAPK, et en particulier PI3K, Ras et Rac/Akt sont sur-transcrits chez la

descendance des populations exposées à l'ibuprofène. Plusieurs études ont démontré l'implication des protéines de signalisation PI3K et Ras dans la régulation des voies de contrôle de la croissance dans les drosophiles et mammifères. La surexpression de la forme activée de l'un ou l'autre de ces gènes induit une nymphose précoce des individus, mettant ainsi en évidence l'implication de ces protéines de signalisation dans la détermination du temps de développement des individus (Caldwell *et al.*, 2005; Mensch *et al.*, 2008; Cranna et Quinn, 2009). Deng *et al.* ont de plus avancé l'hypothèse que cette action de Ras sur le temps de nymphose des individus pourrait être médiée par l'activation transcriptionnelle des gènes de biosynthèse de la 20E par CnC. L'activation constitutive de Ras n'apparaît pas impliquer une surexpression de CnC, mais plutôt une régulation de l'interaction de CnC avec la chromatine et de son activité transcriptionnelle (Deng, 2014). Les mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de CnC par Ras ne sont cependant pas connus chez la drosophile. La voie de signalisation TOR est également impliquée dans la régulation de l'expression des gènes de biosynthèse des ecdystéroïdes et des gènes de réponse à la 20E dont le rôle est fondamental durant le développement et lors de la vitellogénèse. En effet, l'activation de la voie TOR par les acides aminés apportés par le repas de sang participe à l'activation transcriptionnelle des protéines composant le vitellus (YPP) chez *Aedes aegypti* (Gulia-Nuss *et al.*, 2011; Roy et Raikhel, 2011; Hansen *et al.*, 2014; Weng et Shiao, 2015). Cette activation est notamment dépendante du récepteur trans-membranaire Frizzled 2 (AAEL006778), sur-transcrit dans notre étude (Weng et Shiao, 2015).

Les voies de signalisation de l'insuline et TOR sont toutes deux régulées par les conditions nutritionnelles et énergétiques de l'organisme. L'interconnexion entre les voies de signalisation de l'insuline et TOR est ainsi impliquée dans la définition du temps de développement chez les insectes en fonction des ressources alimentaires disponibles dans le milieu et dans l'organisme, via l'action de ces voies sur la signalisation de l'ecdysone (Colombani *et al.*, 2003; Layalle *et al.*, 2008; Danielsen *et al.*, 2013). L'étude des métabolites présents dans les œufs une semaine après la ponte a révélé une déstabilisation des ressources en lipides et en glucose dans les œufs pondus par les femelles exposées à l'ibuprofène. Ces différences d'abondance en lipides et sucres pourraient entraîner des niveaux d'activation différents des voies de signalisations vis-à-vis des larves issues de population témoins, aboutissant à une régulation différente des cycles hormonaux définissant la vitesse de développement des larves. Néanmoins, la variation des ressources métaboliques observées par HRMAS pourrait également n'être qu'une conséquence d'une activité modifiée des voies de signalisation, via leur contrôle des voies métaboliques et énergétiques (Figure III.13). En outre, les ressources en protéines ont une importance particulière dans la régulation de la vitesse de développement (Clements, 1992; Danielsen *et al.*, 2013), et il serait ainsi intéressant de déterminer

précisément les quantités relatives en sucres, lipides et protéines présentes au cours des différents stades de développement, ce que ne permet pas notre analyse par HRMAS.

D'autre part, les voies de signalisation de l'insuline et TOR sont sensibles aux situations de stress nutritionnel, et aboutissent à la mise en place de processus de réponse et protection face à ce stress (Saltiel et Kahn, 2001; Colombani *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2014; Tiebe *et al.*, 2015). Le complexe effecteur de la voie TOR, TORC1 a été reporté comme impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire en réponse aux signaux nutritionnels durant les stades larvaires chez la drosophile et est particulièrement impliqué dans la signalisation dépendant de l'état nutritionnel et énergétique cellulaire (Zinke *et al.*, 2002; Danielsen *et al.*, 2013). Chez la drosophile, Tiebe *et al.* ont décrit le facteur de transcription REPTOR comme étant un effecteur de TORC1, et un effecteur majeur de la réponse transcriptionnelle au stress nutritionnel en collaboration avec REPTOR-BP. L'inactivation du complexe REPTOR par TORC1 en situation nutritionnelles normales implique la protéine 14-3-3. La baisse des ressources nutritionnelles va activer ce complexe de manière dépendante à la protéine PP2A, induisant sa migration dans le noyau où son association au co-facteur REPTOR-B permettra sa fixation aux gènes cibles, activant ainsi leur transcription. REPTOR et REPTOR-BP jouent ainsi un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie énergétique et favorisent la survie des individus en condition de restriction alimentaire (Tiebe *et al.*, 2015). En dehors du co-facteur REPTOR-BP, tous les gènes codant pour les protéines impliquées dans cette réponse à la baisse de ressources nutritionnelles sont sur-transcrits dans notre étude. Si la sur-transcription de ces différents gènes a pour conséquence une réelle surexpression de ceux-ci, les larves pourraient présenter un plus fort potentiel de réponse en condition de privation alimentaire via cette voie de signalisation. Il est ainsi possible que la sur-représentation de cette voie soit impliquée dans la meilleure tolérance à la privation de nourriture constatée chez les larves issues des populations exposées à l'ibuprofène.

La modification de l'expression de nombreux régulateurs de la transcription et de l'épigénome semblent ainsi définir un état physiologique différent à l'origine des modifications phénotypiques observées chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène.

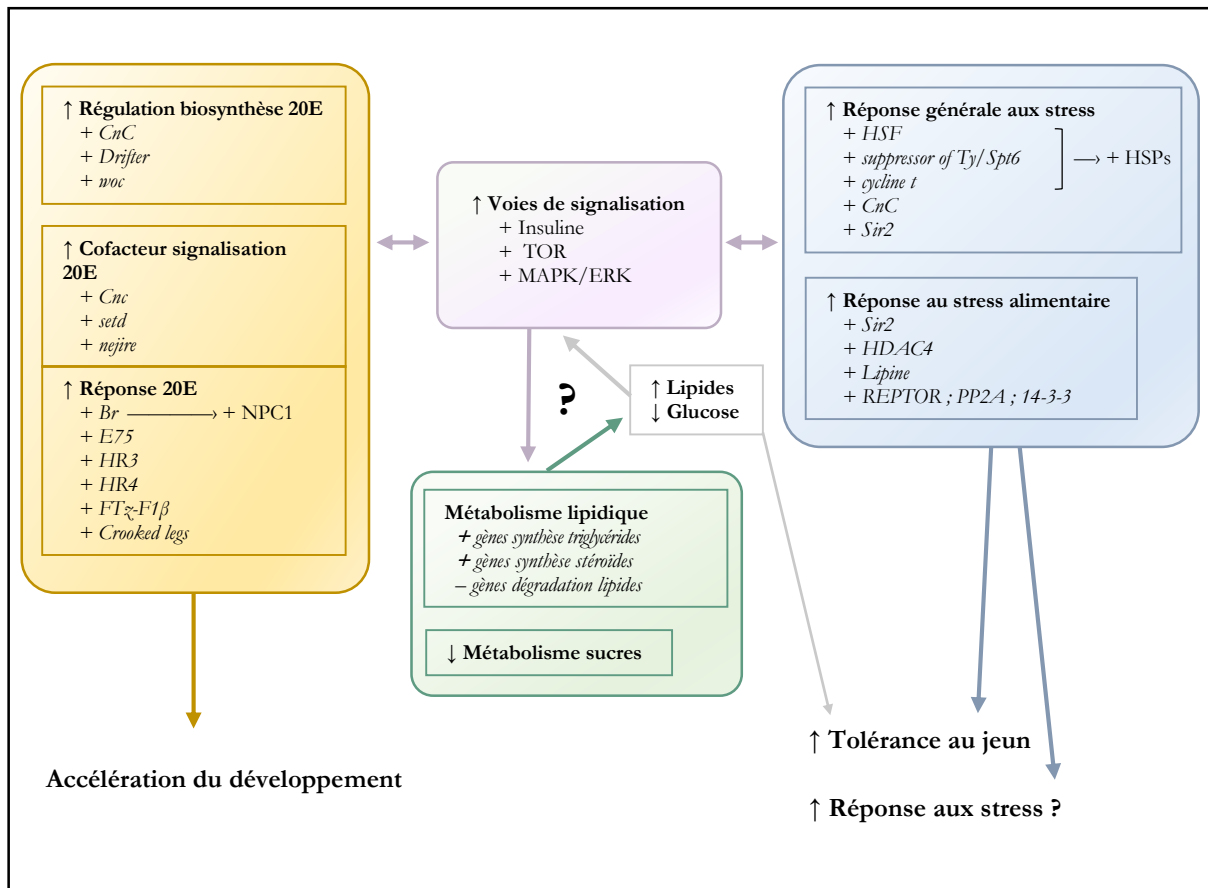


Figure III.13 - Conséquences de l'exposition à l'ibuprofène sur la physiologie de la descendance. L'exposition parentale à 1 µg/L d'ibuprofène induit un état physiologique divergeant chez les larves de la descendance. Les voies de signalisation cellulaire (encadré mauve), dont la transcription est accrue, jouent un rôle central dans le contrôle du développement et la réponse au stress via leur interaction avec la voie de signalisation de l'ecdysone (20E) (encadré ocre), le métabolisme (encadré vert) et les mécanismes de réponse aux stress (encadré bleu). L'amplification de la transcription de gènes clés participant à ces trois processus physiologiques abouti à une accélération du développement des individus, une meilleure survie en condition de jeûne et une réactivité probablement accrue face aux stress de manière générale. Il apparaît un fort lien entre la sur-transcription des voies de signalisation cellulaire, les variations transcriptionnelles de gènes impliqués dans le métabolisme, l'accroissement des ressources lipidiques et la réduction du glucose. Néanmoins, il est impossible à partir de nos données de déterminer où se trouve le début que la boucle ainsi formée. Abréviations – **CnC**: Cap'n'collar. **woc**: without children. **setd**: set domain protein. **Br**: broad-complex. **E75**: ecdysone inducible protein E75. **HR3** et **4**: hormone receptor 3 et 4. **FTz-f1β**: ftz transcription factor 1. **HSF**: heat shock factor. **HSPs**: heat shock proteins. **Sir2**: silent information regulator 2. **HDAC4**: histone déacetylase 4. **PP2A**: protein phosphatase 2A.

III.5.3 Origines de l'impact trans-générationnel de l'ibuprofène

L'étude de l'état transcriptomique et métabolique de la descendance des populations exposées à l'ibuprofène permettent de comprendre l'origine hormonale et métabolique des modifications de traits d'histoire de vie constatée chez cette descendance. Cependant, les causes de telles différences physiologiques chez des individus n'ayant pas été en contact direct avec le polluant restent floues. En effet, les quelques modifications physiologiques observées chez les individus exposés ne fournissent pas d'explication évidente à de telles différences, et ne permet pas de comprendre comment la perturbation induite par l'exposition à l'ibuprofène est transmise des parents à la descendance. Il est avéré que certains polluants, très liposolubles, peuvent être internalisés dans les œufs chez les organismes exposés et ainsi contaminer directement la descendance. Cependant, ce phénomène est peu probable dans notre cas, étant donné la faible lipophilie de l'ibuprofène dans les organismes. Les études s'étant intéressées à la transmission trans-générationnelle de perturbations induites par différents types de stress mettent majoritairement en évidence deux mécanismes : une modification des ressources métaboliques investies par les individus dans la production de la descendance ou une modification des marques épigénétiques héréditaires régulant l'expression du génome (Bonduriansky et Head, 2007; Valtonen *et al.*, 2012; Buescher *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2015; Xin *et al.*, 2015).

III.5.3.1 Causes métaboliques de l'impact trans-générationnel

L'impact de l'état métabolique des individus sur leur reproduction et sur le développement de leur descendance a notamment été mis en évidence chez *Aedes aegypti* (Clifton et Noriega, 2012; Perez et Noriega, 2013), ainsi que chez plusieurs autres insectes (Bonduriansky et Head, 2007; Valtonen *et al.*, 2012; Buescher *et al.*, 2013; Matzkin *et al.*, 2013). Chez *Aedes aegypti*, la maturation des œufs consiste essentiellement en l'internalisation dans ces derniers d'une importante quantité de ressources métaboliques (lipides, sucres, acides aminés) mais également de différents facteurs fonctionnels permettant le développement précoce de l'embryon (ARNm, machinerie de traduction, ressources immunitaires ...) (Anderson et Spielman, 1971; Briegel *et al.*, 2003). En effet, le développement précoce de l'embryon repose en un premier temps sur les protéines et les ARN messagers maternels. Après quelques heures de développement, les ARNm et les protéines maternelles sont dégradés et le génome propre de l'embryon commence à s'exprimer (Biedler *et al.*, 2012). Ainsi, l'état métabolique et transcriptionnel de la femelle peut fortement influencer sur le développement de la descendance selon les éléments qui lui seront transmis lors de l'oogenèse.

L'hypothèse d'une origine métabolique de l'impact transgénérationnel de l'ibuprofène apparaît crédible, étant donné les variations de ressources métaboliques présentes dans les œufs. Les voies de signalisation cellulaires étant sensibles aux ressources métaboliques présentes dans l'organisme (Layalle *et al.*, 2008; Roy et Raikhel, 2011; Weber-Boyvat *et al.*, 2013), un stock initial différent pourrait modifier l'expression des voies de signalisation, entraînant ainsi les modifications physiologiques observées chez la descendance via une régulation transcriptionnelle différente de nombreux gènes. Néanmoins, le dosage ayant été effectué dans les œufs à la fin du développement embryonnaire, ces différences peuvent également refléter une gestion différente d'un pool de ressources à l'origine identiques lors de l'embryogénèse.

En effet, les voies de signalisation cellulaires sont largement impliquées dans la régulation des voies métaboliques cellulaires. Alors que les voies de signalisation sont activées différemment en fonction des ressources métaboliques, celle-ci régulent les voies métaboliques des lipides et des sucres. Il est ainsi impossible à partir de nos données de déterminer si une activation différentielle des voies est à l'origine de la modification des ressources métaboliques ou si au contraire, les ressources métaboliques différentes dès la formation de l'œuf sont à l'origine de l'activation différentielle des voies de signalisation cellulaire. En outre, les mesures effectuées par HRMAS ne permettent l'identification que de peu de métabolites, et surtout ne permettent pas une quantification des variations observées. Il paraît intéressant d'approfondir cette question, notamment en dosant de manière quantifiable les ressources métaboliques présentes dans les œufs immédiatement après la ponte, afin de les comparer avec les ressources restantes après l'embryogénèse.

Les femelles imagos exposées à l'ibuprofène ne présentent aucune modification particulière des traits d'histoire de vie liés à leur développement ou la leur reproduction au sens strict du terme (c'est-à-dire, sans prendre en compte la « qualité » de la descendance produite). De même, le transcriptome de base et les ressources métaboliques en sucres et lipides n'apparaissent pas modifiées de façon notable chez ces femelles. Cependant, le transcriptome des femelles a été étudié lors de la phase de quiescence reproductive. Celui-ci ne met pas en évidence de perturbation des processus physiologiques basaux durant cette période (métabolisme énergétique, immunité, détoxification ...). Cela ne permet pas d'évaluer la fonction reproductive de ces femelles, celles-ci n'étant pas active dans cette période. Le pic d'ecdysone induit par le repas de sang est un régulateur majeur de la dynamique d'expression des protéines permettant l'internalisation des ressources, incluant de nombreux transporteurs et récepteurs. Ainsi, la réponse transcriptionnelle de nombreux gènes à ce signal hormonal constitue un élément clé de la maturation des œufs et du développement

de la descendance (Chen *et al.*, 2004; Bonizzoni *et al.*, 2011). La dynamique de production de 20E suite au repas de sang et la réponse transcriptionnelle de cinq protéines caractéristiques de la vitellogénèse associées à ce pic d'hormones n'apparaissent cependant pas modifiées chez les femelles exposées. Les différentes observations faites chez les femelles adultes exposées rendent peu vraisemblable une origine métabolique maternelle dans les perturbations observées chez la descendance des populations exposées à l'ibuprofène. Il est cependant délicat de conclure car le dosage des ressources métaboliques par HRMAS ne permet pas d'évaluer les ressources protéiques présentes chez les femelles imagos, alors que la sous-transcription massive des hexamérines chez les larves exposées à l'ibuprofène pourrait induire une réduction de ces ressources. Les études d'impact de l'état métabolique des femelles sur leur potentiel reproductif et leur descendance concerne plutôt les ressources en sucres et lipides (Bonduriansky et Head, 2007; Valtonen *et al.*, 2012; Buescher *et al.*, 2013; Matzkin *et al.*, 2013; Clifton et Noriega, 2012; Perez et Noriega, 2013), et les conséquences d'une réduction des ressources protéiques sur les descendances produites n'ont, à notre connaissance, pas été étudiées chez les insectes. Nous ne pouvons cependant pas exclure une implication des réserves protéiques dans l'établissement des ressources métaboliques dans les œufs, et un dosage protéique permettrait de vérifier cette hypothèse.

L'impact de l'exposition à l'ibuprofène n'a pas été étudié chez les mâles imagos. N'étant pas les vecteurs directs des maladies, les mâles et leur physiologie ne sont en effet que rarement étudiés chez les moustiques, et leur rôle dans la reproduction est souvent négligé. Cependant, les mâles imagos sont les seuls chez qui une modification d'un trait d'histoire de vie a été détectée dans notre étude. De plus, l'implication de l'état physiologique des mâles dans les modifications trans-générationnelles est de plus en plus abordé dans les récentes études (Bonduriansky et Head, 2007; Xin *et al.*, 2015). Chez les insectes, l'implication des mâles dans les impacts trans-générationnels est notamment susceptible d'être lié aux « cadeaux nuptiaux » (*nuptial gifts*) faits à la femelle lors de l'accouplement. En effet, l'accouplement permet non seulement le transfert des spermatozoïdes mais également d'une cohorte de protéines, phéromones et hormones via le liquide séminal, susceptible d'avoir un impact sur la physiologie maternelle et de la descendance. De tels transferts ont d'ailleurs été mis en évidence chez une autre espèce de moustiques, *Anopheles gambiae* (Pondeville *et al.*, 2008; Dottorini *et al.*, 2013). D'autre part, l'implication des mâles dans la physiologie de la descendance a été mise en évidence chez *Aedes aegypti*, chez qui la convergence des rythmes séquentiels de battements d'ailes du mâle et de la femelle lors de l'accouplement influence le succès reproducteur des mâles de la descendance (Cator et Harrington, 2011). Il est ainsi impossible d'exclure que l'impact trans-générationnel de l'ibuprofène soit dû dans notre étude

à des modifications physiologiques chez les mâles, et une étude plus approfondie de leurs ressources métaboliques ainsi que de leur physiologie apparaît nécessaire.

III.5.3.2 Causes épigénétiques de l'impact trans-générationnel

L'étude du transcriptome des larves de la descendance a révélé la sur-transcription de plusieurs gènes impliqués dans la régulation des profils épigénétiques suite à une exposition parentale à l'ibuprofène. Les mécanismes épigénétiques permettent l'établissement d'un profil d'expression de gènes propre à chaque type cellulaire à partir d'un même génome. Les mécanismes épigénétiques apparaissent également être impliqués dans la modification des profils transcriptionnels en réponse aux conditions environnementales (température, ressources alimentaires...), induisant ainsi des phénotypes différents à l'échelle individuelle. Trois types de mécanismes sont impliqués dans la régulation épigénétique : (1) la méthylation de l'ADN, impliquant l'ajout d'un groupement méthyle à l'extrémité 5' des cytosines au sein des dinucléotides CpG ; (2) la méthylation et l'acétylation des histones, qui selon leur nature et leur position sur les histones définissent une situation plus ou moins favorable à la transcription des gènes ; (3) la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes par des ARN non codants (siRNA, microRNA et piRNA). Ainsi, la sur-transcription de la machinerie épigénétiques observée chez la descendance participe vraisemblablement au profil transcriptionnel particulier observé chez ces larves.

D'ailleurs, de plus en plus d'études s'intéressent à l'impact des polluants sur la régulation épigénétique de l'expression des gènes, et à l'aspect transmissible de tels effets aux générations suivantes. Des modifications épigénétiques ont été mises en évidence lors de l'exposition à différents perturbateurs endocriniens (Casati *et al.*, 2015; Xin *et al.*, 2015) ou à d'autres types de perturbations physiologiques parentales chez les invertébrés autant que les mammifères (Wei *et al.*, 2015). Très récemment, une étude chez le moustique *Aedes albopictus* a notamment mis en évidence des modifications épigénétiques induites chez les descendances F1 et F2 par une exposition parentale à un fongicide et un phytoestrogène (Oppold *et al.*, 2015).

Alors que tout au long de ce manuscrit, le terme de « descendance non exposée » a été employé, celui-ci est en réalité erroné. Effectivement, les individus de la descendance F1 étudiés n'ont pas été exposés au polluant en tant qu'individus, mais ils l'ont été indirectement en tant que cellules germinales. Ainsi, des modifications épigénétiques peuvent avoir été induites au sein de ces lignées germinales. L'étude du transcriptome des larves de stade 4 exposées à l'ibuprofène n'a pas révélé de modification dans l'expression des protéines de mise en place et de maintenance des

marques épigénétiques. Cependant, une modification de l'activité de ces protéines n'implique pas forcément une modification de leur expression. En outre, le développement des lignées germinales et des tissus gonadiques sont l'objet de mécanismes de régulation épigénétiques précis (pour exemple : Cherry et Matunis, 2010; Clough *et al.*, 2014; Lee et Spradling, 2014; McEachern *et al.*, 2014) et les perturbations induites par l'ibuprofène peuvent être spécifique de ces cellules, ne permettant pas de détecter des variations lors de l'étude du transcriptome des organismes entiers.

La méthylation de l'ADN, rend la chromatine peu accessible aux machineries de transcription, limitant ainsi l'expression des régions méthylées. La descendance des populations exposées à l'ibuprofène présente une sur-activation transcriptionnelle globale, avec 10 % des gènes exprimés sur-transcrits et seulement 4 % sous-transcrits, qui pourrait être causé par une diminution du taux de méthylation du génome induisant le profil transcriptionnel très différent observé chez la descendance. Il est tout à fait intéressant de noter que chez la souris, l'impact d'une alimentation pauvre en protéines durant la gestation diminue la méthylation de l'ADN au niveau de certains loci bien spécifiques chez leur progéniture, modifications persistantes sur au moins deux générations (Burdge *et al.*, 2007). Bien que les physiologies des mammifères et des insectes soit relativement éloignées, les mécanismes de régulation épigénétiques apparaissent bien conservés entre ces deux taxons, rendant les comparaisons possibles (Mukherjee *et al.*, 2015). Cela met en évidence la sensibilité de la machinerie épigénétique aux ressources alimentaires, et plus particulièrement protéiques, chez les parents. Ainsi, une diminution de la synthèse d'héxamérines chez les larves de stade 4 pourrait induire une diminution des ressources protéiques chez la nymphe, aboutissant à une modification de la méthylation de l'ADN au niveau des gamètes. Ces variations de méthylation pourraient alors définir le profil transcriptionnel très différent constaté chez leur descendance, et ce dès le développement embryonnaire des individus, entraînant les modifications des traits d'histoire de vie et de la tolérance aux stress constatées au cours de cette étude.

Il serait ainsi particulièrement important, afin de valider cette hypothèse, de confirmer une diminution des réserves protéiques présentes à la fin de développement larvaire (lors d'une exposition à l'ibuprofène), ainsi que de mesurer le taux de méthylation du génome des individus exposés et de leur descendance afin de valider une diminution globale de ces marques épigénétique chez la descendance.

III.5.4 Conclusions

L'étude mécanistique visant à identifier l'impact de l'ibuprofène sur les individus exposés a mis en évidence une diminution potentielle de la réponse immunitaire, associée à une probable

diminution des réserves protéiques chez ces individus aux stades larvaires. Étonnamment, l'exposition à l'ibuprofène n'apparaît pas induire de stress chez ces individus. Cette diminution des ressources en protéines pourrait être associée, d'une part à une internalisation différente des ressources métaboliques au sein des œufs de la descendance, plus probablement via un effet paternel et d'autre part à une modification des profils de méthylation de l'ADN au niveau des gamètes, induisant une modification du profil transcriptionnel chez la descendance. Ce profil transcriptionnel définit un état physiologique différent chez cette descendance, via notamment la potentialisation de la signalisation hormonale par l'ecdysone ainsi qu'une surreprésentation des mécanismes de réponse aux stress, aboutissant à un développement plus rapide et à une meilleure tolérance de cette descendance aux périodes de jeun.

IV. SYNTHÈSE GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

IV.1	Rappel des objectifs de la thèse	187
IV.2	Rappel des principaux résultats.....	187
IV.2.1	Conséquences de l'exposition aux polluants à court terme	187
IV.2.2	Conséquences de l'exposition multigénérationnelle aux polluants	188
IV.2.3	Mécanismes impliqués dans les effets trans-générationnels de l'ibuprofène.....	189
IV.3	Perspectives de la thèse	190
IV.3.1	Validation des mécanismes impliqués dans les effets trans-générationnels de l'ibuprofène....	190
IV.3.2	Spécificité de l'impact trans-générationnel de l'ibuprofène	191
IV.3.3	Conséquences de l'exposition aux polluants sur la dynamique des populations	192
IV.3.4	Conséquences de l'exposition aux polluants sur la tolérance aux stress secondaires	194
IV.3.5	Conséquence de l'exposition aux polluants sur le potentiel vectoriel des populations	195
IV.3.6	L'espèce <i>Aedes aegypti</i> est-elle un bon modèle en écotoxicologie ?	197
IV.4	Conclusion finale.....	198

IV.1 Rappel des objectifs de la thèse

Les écosystèmes aquatiques d'eau douce sont contaminés par une importante diversité de polluants souvent liés aux activités anthropiques. Alors que de nombreuses études mettent en évidence le potentiel de différents polluants à perturber la physiologie des organismes aquatiques à fortes concentrations, les études s'intéressant aux perturbations entraînées par de faibles concentrations durant tout le cycle de vie des organismes sont plus rares. Or les études de ce type, plus cohérentes avec les conditions d'exposition dans l'environnement, sont indispensables pour mieux appréhender les conséquences de la pollution des eaux de surface sur les écosystèmes aquatiques. L'objectif de cette thèse était de faire évoluer la compréhension des effets de l'exposition des populations d'insectes aquatiques à de faibles doses de polluants. Afin d'avoir une vision globale, une démarche intégrative a été adoptée, prenant en compte différents niveaux d'organisation biologique depuis les mécanismes moléculaires jusqu'à la dynamique des populations. L'originalité principale de ce projet résidait dans l'utilisation d'un modèle d'insecte aquatique très répandu en laboratoire et cependant jamais encore utilisé en écotoxicologie : le moustique *Aedes aegypti*. Son élevage aisé en conditions contrôlées ainsi que les importantes connaissances génomiques, physiologiques et écologiques en font notamment un modèle de choix pour l'exploration des mécanismes impliqués tant dans les perturbations induites par les polluants que la compréhension des conséquences écologiques liées.

Notre travail s'est plus particulièrement intéressé aux effets de trois polluants de natures et d'origine différente : l'ibuprofène, le benzo[a]pyrène et le bisphénol A. L'exposition chronique de populations d'*Aedes aegypti* à ces polluants a mis en évidence l'influence de l'ibuprofène, du benzo[a]pyrène et dans une moindre mesure du bisphénol A sur la physiologie des individus et ce, à des concentrations cohérentes avec les niveaux de contamination retrouvés dans l'environnement. Seules les conséquences des polluants à ces faibles concentrations seront discutées ci-après.

IV.2 Rappel des principaux résultats

IV.2.1 Conséquences de l'exposition aux polluants à court terme

Le benzo[a]pyrène apparaît avoir les conséquences les plus importantes à l'échelle individuelle. En effet, une exposition à court terme (G0) induit une augmentation de la mortalité

des individus, ainsi qu'un accroissement de la taille des mâles imagos. La descendance des individus exposés (G1) est également affectée, avec une accélération du développement accompagnée d'une augmentation de la mortalité des individus durant le développement.

L'ibuprofène provoque une accélération du développement chez la descendance des individus exposés (G1), mettant en évidence une action de l'ibuprofène sur la physiologie des individus exposés, même si celle-ci ne se répercute pas à l'échelle phénotypique sur les traits d'histoire de vie mesurés.

Enfin, le bisphenol A apparaît avoir un impact bien différent des deux autres polluants. En effet, alors que l'exposition des individus à ce polluant provoque une augmentation de la taille des mâles imagos (G0), aucune conséquence n'apparaît chez leur descendance G1.

IV.2.2 Conséquences de l'exposition multigénérationnelle aux polluants

L'exposition de populations à de faibles concentrations d'ibuprofène et de benzo[a]pyrène durant six générations successives montre une évolution des impacts de ces deux polluants. L'exposition parentale (G5) n'apparaît en effet plus modifier la vitesse de développement ni le taux de mortalité durant le développement de leur descendance élevée en milieu propre (G6). Cependant, cette descendance apparaît plus tolérante au Bti, un insecticide d'origine bactérienne largement utilisé dans le contrôle des populations de moustiques.

De façon surprenante, le fait de transférer ces populations en milieu propre durant deux générations (G6 et G7) entraîne une divergence importante des traits d'histoire par rapport à ceux de la population Témoin à la génération G7. Les individus issus d'une exposition multigénérationnelle au benzo[a]pyrène présentent une importante accélération du développement, accompagnée d'une augmentation de la mortalité. Ces effets sont aussi retrouvés chez les individus issus de l'exposition multigénérationnelle à l'ibuprofène, accompagné d'une augmentation de la proportion de femelles dans la population.

Ces observations sont intéressantes, car elles mettent en évidence l'impossibilité de prévoir les conséquences de l'exposition aux polluants sur la physiologie des organismes après plusieurs générations d'exposition successive. Les études portant sur les conséquences d'expositions multigénérationnelles à différents types de polluants en laboratoire et dans le milieu mettent en évidence la mise en place de phénomènes micro-évolutifs menant à une sensibilité atténuée de ces populations aux polluants en question (Lamichhane *et al.*, 2014; Neuparth *et al.*, 2014; Vigneron *et al.*, 2015, 2015). Il ressort de ces études que l'évolution de la sensibilité des populations peut soit

impliquer des variations génétiques entraînant une adaptation des populations, soit une acclimatation des individus, mettant en jeu des modifications plastiques non-génétiques. Les effets maternels, par l'intermédiaire de transferts métaboliques à la descendance et la plasticité épigénétique héritable apparaissent notamment avoir une part importante dans ces processus d'acclimatation. Cependant, nos observations ne permettent pas de rendre compte de la dynamique des traits d'histoire de vie au fil des générations, ni de comprendre les phénomènes micro-évolutifs sous-jacents.

Pour approfondir ces aspects il serait intéressant de suivre génération après génération l'évolution de chacun des traits d'histoire de vie sur plusieurs populations-réplicat, afin de contrôler les effets de la dérive génétique et de confirmer la spécificité de l'évolution de ces traits vis-à-vis de l'exposition à un polluant donné. Afin d'évaluer quel phénomène micro-évolutif entre l'adaptation et l'acclimatation entre en jeu dans ces populations, il serait intéressant d'étudier le nombre de générations en milieu propre nécessaires pour que les traits d'histoire de vie modifiés retrouvent les valeurs des populations témoins.

IV.2.3 Mécanismes impliqués dans les effets trans-générationnels de l'ibuprofène

L'étude détaillée du cycle de vie des individus exposés aux polluants et de leur descendance a mis en évidence l'importance des conséquences trans-générationnelles de ces expositions. Cela nous a mené à essayer de comprendre l'origine de la perturbation de la descendance dans le cas de l'ibuprofène.

L'approche intégrative adoptée a révélé chez les larves exposées un mécanisme d'action similaire au mécanisme pharmacologique de ce médicament sur les vertébrés. L'action de l'ibuprofène semble aboutir à une diminution du potentiel immunitaire des larves exposées, associée à une probable diminution des réserves protéiques. Cependant, les perturbations transcriptionnelles observées chez les larves exposées ne semblent pas se répercuter de manière importante chez les femelles imagos, que ce soit sur les plans transcriptionnel, métabolique, hormonal ou individuel. L'état physiologique des mâles imagos exposés n'a pas été plus précisément étudié, cependant, la durée de vie de ces mâles apparaît allongée par l'exposition à l'ibuprofène. La descendance des individus exposés présente un profil transcriptionnel divergeant, définissant un état physiologique différent chez cette descendance. Elle présente notamment une potentialisation de la signalisation hormonale par l'ecdysone ainsi qu'une sur-transcription basale des mécanismes de réponse aux stress, aboutissant à un développement plus rapide et à une meilleure tolérance de cette descendance au jeûne.

La probable diminution des réserves protéiques constatée à l'échelle transcriptionnelle chez les individus exposés reste à confirmer. Cependant, cette diminution pourrait être à l'origine de l'impact trans-générationnel de l'ibuprofène via deux mécanismes distincts. D'une part, cela pourrait provoquer une internalisation différente des ressources métaboliques au sein des œufs de la descendance (voir partie III.5.1 ; Bonduriansky et Head, 2007; Valtonen *et al.*, 2012; Buescher *et al.*, 2013; Matzkin *et al.*, 2013; Clifton et Noriega, 2012; Perez et Noriega, 2013). D'autre part, la diminution des ressources protéiques pourrait mener à une modification des profils de méthylation de l'ADN au niveau des cellules germinales (voir partie III.5.2 ; Burdge *et al.*, 2007).

IV.3 Perspectives de la thèse

Nos travaux mettent ainsi en évidence l'intérêt de prendre en compte la totalité du cycle de vie des individus dans le cadre d'études écotoxicologiques. Il apparaît notamment pertinent d'inclure l'observation de la descendance des individus exposés, tant dans les études d'impacts à l'échelle individuelle que dans les études mécanistiques. En effet, sans l'inclusion de la descendance dans notre étude, nous aurions notamment pu conclure à une absence d'effet de l'ibuprofène, alors que les études mécanistiques approfondies effectuées par la suite ont confirmé d'importantes modifications transcriptomiques et physiologiques chez les individus exposés à l'ibuprofène et leur descendance.

IV.3.1 Validation des mécanismes impliqués dans les effets trans-générationnels de l'ibuprofène

L'étude intégrative de l'état physiologique des individus exposés à l'ibuprofène a mené à l'identification de deux mécanismes potentiels pouvant expliquer les modifications trans-générationnelles constatées au niveau transcriptomique, métabolique et individuel chez la descendance. La première hypothèse, basée sur un mécanisme métabolique, suggère que la diminution potentielle des réserves protéiques chez les imagos, et notamment chez les mâles, affecte les ressources métaboliques intégrées dans les œufs au moment de l'oogenèse, affectant ainsi l'état transcriptionnel et la physiologie des individus par l'intermédiaire des voies de signalisation cellulaires. La deuxième hypothèse suggère qu'une modification de l'épigénome au niveau des cellules germinales exposées à l'ibuprofène soit à l'origine du profil transcriptionnel très différent observé chez la descendance, définissant ainsi un état métabolique et physiologique différent chez la descendance.

Des expérimentations complémentaires vont être menées dans un futur proche afin de départager ces deux hypothèses. Premièrement, l'impact de l'ibuprofène sur les ressources métaboliques, et plus particulièrement les protéines, va être vérifié chez les individus exposés, mâles et femelles. Ces mesures métaboliques vont également être effectuées dans les œufs immédiatement après la ponte et à la fin du développement embryonnaire. Cette première étape devrait pouvoir confirmer ou non la présence de ressources métaboliques différentes dans les œufs de la descendance exposées dès leur ponte, avant toute activation du métabolisme propre de l'embryon (Vital *et al.*, 2010) et éventuellement d'en établir l'origine maternelle ou paternelle, permettant par la même occasion d'établir la validité ou non de la première hypothèse.

La méthylation de l'ADN apparaît être la marque épigénétique principale impliquée dans l'héritabilité trans-générationnelle. La présence dans une région promotrice d'un gène a pu être associée à une inhibition de la transcription chez *Aedes aegypti* (Ye *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2015). Plus spécifiquement, une étude chez l'espèce proche *Aedes albopictus* a très récemment mis en évidence des variations héritable durant plusieurs générations du taux de méthylation du génome des individus suite à l'exposition d'individus à différents polluants (Wei *et al.*, 2015). Ainsi, l'étude des variations du taux de méthylation globale du génome apparaît pouvoir apporter des premiers éléments de réponse permettant de confirmer ou d'infirmer la deuxième hypothèse établie. Ainsi, parallèlement aux mesures métaboliques, des individus exposés (F0) et leur descendance (F1) vont être échantillonnés aux stades larvaire et imaginal afin de mesurer la méthylation globale de leur génome. De plus, le caractère héritable des modifications épigénétiques implique que les phénotypes observés chez la descendance non exposée F1 devraient être au moins retrouvés dans la génération F2 (Vandegheuchte et Janssen, 2014). La tolérance au jeûne des jeunes larves F2 va ainsi être mesurée, et le taux de méthylation du génome sera également mesuré chez ces larves.

IV.3.2 Spécificité de l'impact trans-générationnel de l'ibuprofène

Les études trans-générationnelles font émerger des interrogations sur la spécificité des perturbations induites par les polluants sur la descendance des individus exposés. En effet, il a été démontré à plusieurs reprises chez différents organismes, et notamment chez les moustiques, que des variations dans l'habitat des individus parentaux (baisse des ressources alimentaires, prédation, modification de température...) favorisent potentiellement la survie de leur descendance à ces mêmes variations environnementales par le biais de la plasticité reproductive parentale (Grech *et al.*, 2007; Donelson et Munday, 2015; Shikano *et al.*, 2015). Cette influence parentale pourrait notamment contribuer à l'optimisation de la fitness de la descendance face à un milieu

variable et potentiellement défavorable (Plaistow *et al.*, 2006; Otti et Sadd, 2008; Donelan et Trussell, 2015; Shikano *et al.*, 2015). Ainsi, les impacts trans-générationnels constatés suite à une exposition à un polluant peut à la fois relever du mode d'action spécifique du composé chimique sur l'organisme, mais également de la plasticité reproductive de l'individu lui-même face à un milieu potentiellement stressant. Cette question apparaît particulièrement pertinente au vu des impacts trans-générationnels de l'ibuprofène. En effet, le développement plus rapide des individus de la descendance, leur meilleure tolérance au jeûne ainsi que la sur-transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse aux stress semblent préparer la descendance à un milieu potentiellement défavorable. Cela pose la question de la spécificité des mécanismes impliqués dans ces impacts trans-générationnels. Sont-ils la conséquence directe de l'action de l'ibuprofène sur les cellules germinales, ou bien sont-ils le reflet d'une stratégie reproductive visant à préparer la descendance à un milieu contaminé ?

Il apparaît important de répondre à cette question dans la mesure où l'étude approfondie des mécanismes d'action des polluants vise en partie à extrapoler les impacts de ce polluant à d'autres espèces. Alors que des mécanismes affectant des voies physiologiques conservées pourront être extrapolés à d'autres organismes, il est délicat de prévoir comment chaque espèce va réagir face à ce mécanisme et comment les individus de chaque espèce pourront optimiser la survie de leur descendance.

Cette problématique à laquelle nous sommes confrontés est vraisemblablement commune à toute évaluation des conséquences trans-générationnelles de l'exposition à des polluants. Ces phénomènes devraient ainsi toujours être pris en compte lors de l'exploration des mécanismes de transmission trans-générationnels des perturbations.

IV.3.3 Conséquences de l'exposition aux polluants sur la dynamique des populations

Nos études montrent que de faibles doses de polluants induisent des modifications des traits d'histoire de vie des individus pouvant potentiellement affecter les populations à plus ou moins long terme. Afin de vérifier les conséquences de ces modifications en terme populationnel, les traits d'histoire de vie mesurés chez les populations exposées servent actuellement de base à la modélisation de la dynamique de ces populations en collaboration avec Arnaud Chaumot, chercheur à l'IRSTEA de Lyon. Pour cela, un modèle populationnel de référence, adapté à nos conditions d'élevage précises, a été établi à partir des connaissances en termes de cycle de vie décrites dans la bibliographie et des données précises récoltées au cours de cette thèse sur des

populations témoins. La cohérence de notre modèle de référence avec un modèle très récemment publié par d'autres auteurs chez *Aedes aegypti* a été confirmée (Simoy *et al.*, 2015). Les variations des traits d'histoire de vie mesurées suite à l'exposition des populations à l'ibuprofène et au benzo[a]pyrène à court terme (G1) et à long terme (G7) ont été implémenté dans ce modèle de référence, afin d'évaluer les conséquences de ces modifications sur la dynamique de la population.

Les résultats préliminaires obtenus grâce à cette approche mettent en évidence des conséquences relativement faibles de l'exposition à l'ibuprofène et au benzo[a]pyrène sur le **taux journalier d'accroissement de la population**. En effet, le taux d'accroissement quotidien des quatre populations étudiées apparaît augmenté de seulement 1 %, passant de 1,25 à 1,26 dans les populations G1 exposées et de 1,22 à 1,23 dans les populations G7. L'accélération du développement constatée dans les populations Ibu_G7 et B[a]P_G7 apparaît notamment contrebalancée par l'augmentation de la mortalité constatée dans ces populations. En d'autres termes, une augmentation journalière de 1 % de l'accroissement de la population correspond à un accroissement majoré de 23 % après trois semaines, soit la durée approximative séparant l'éclosion d'un individu de sa première ponte à 30 °C. Les conséquences en terme populationnel de l'ibuprofène et du benzo[a]pyrène apparaissent ainsi modérées, mais non négligeables étant donné le cycle de vie particulièrement court et prolifique d'*Aedes aegypti*.

Des études ont déjà montré des répercussions peu significatives de modifications de traits d'histoire de vie sur la dynamique globale des populations (Widarto *et al.*, 2007; Pedersen *et al.*, 2009). L'absence de répercussion populationnelle s'explique dans ces études par la perturbation de traits peu déterminant en terme d'influence sur la dynamique des populations. Ces études mettent notamment en évidence que tous les traits d'histoire de vie n'ont pas la même influence à l'échelle populationnelles, un paramètre appelé « élasticité » en modélisation.

La répercussion relativement modérée des effets mesurés au niveau individuel sur les populations pourrait poser question quant à la pertinence écologique des perturbations entraînées par de faibles doses des polluants étudiés. Il apparaît intéressant pour répondre à cette question d'établir une évaluation approfondie de l'élasticité des différents traits d'histoire de vie définissant le cycle de vie des populations d'*Aedes aegypti*. Les observations préliminaires effectuées à cet esient montrent que seule une augmentation de mortalité particulièrement massive est susceptible d'affecter la dynamique de ces populations. Une étude plus approfondie reste nécessaire, mais il apparaît ainsi que la robustesse peu commune de leur cycle de vie rend les populations d'*Aedes aegypti* particulièrement peu sensibles à des perturbations environnementales fines telles que celles potentiellement entraînées par la pollution des eaux de surface.

L'exposition multigénérationnelle à l'ibuprofène et au benzo[a]pyrène a mis en évidence le développement d'une tolérance accrue à l'insecticide Bti. Les conséquences de la tolérance différente des populations Témoin_G6, Ibu_G6 et B[a]P_G6 au Bti sur le taux d'accroissement journalier de ces populations a été modélisé à partir du modèle de référence établi, en fonction de la dose de Bti utilisé (Figure IV.1). Bien que ces résultats nécessitent encore une optimisation vis-à-vis de leur implémentation au sein du modèle, ils mettent en évidence que l'impact de traitements au Bti sur le **taux journalier d'accroissement de la population** est atténués dans les populations Ibu_G6 et B[a]P_G6. Ainsi, les expositions multigénérationnelles à l'ibuprofène et au benzo[a]pyrène ont effectivement le potentiel de compromettre les stratégies de lutte anti-vectorielles visant à réduire la prolifération des populations de moustiques dans l'environnement.

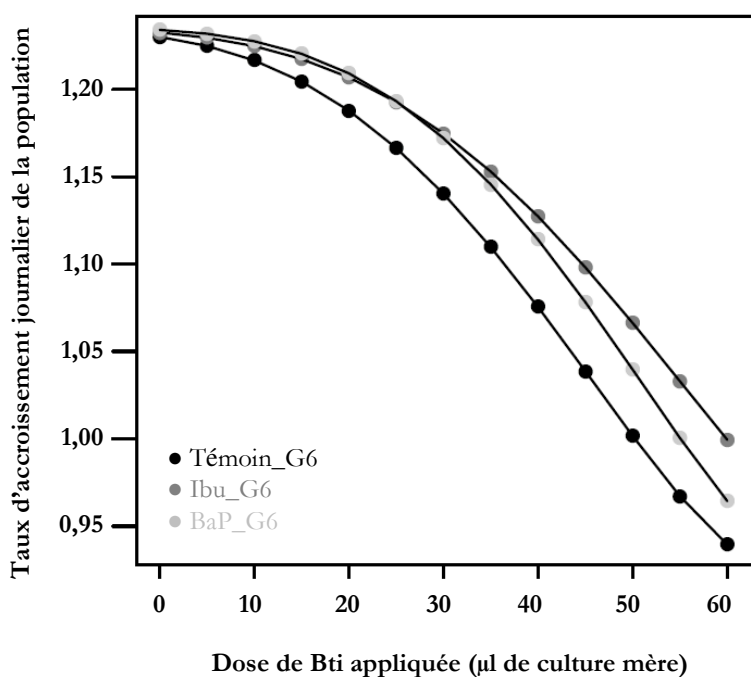


Figure IV.1 - Résultats préliminaires de l'évolution du taux d'accroissement de la population en fonction des doses de Bti utilisées. L'évolution du taux d'accroissement journalier de la population a été modélisée pour la population Témoin_G6, Ibu_G6 et B[a]P_G6 à partir des bioessais au Bti effectués sur ces populations.

IV.3.4 Conséquences de l'exposition aux polluants sur la tolérance aux stress secondaires

La plupart des traits pris en compte dans nos études ont été suivis en conditions stables et optimales de développement. Cependant, dans l'environnement les organismes sont soumis à de

nombreuses variations et stress pouvant également affecter ces traits d'histoire de vie. Parmi les facteurs pouvant influencer sur les traits d'histoire de vie des individus, on peut citer l'exposition à un xénobiotique, à un parasite ou un pathogènes, la prédation, la limitation des ressources alimentaires ou les variations des paramètres abiotiques (température, pH, salinité...). Il a été d'autre part été mis en évidence à plusieurs reprises que l'exposition à un stress pouvait influencer la sensibilité à un stress secondaire chez différents invertébrés (Morley, 2010; Tassou et Schulz, 2012; Koehler *et al.*, 2012; Alexander *et al.*, 2013; Piggott *et al.*, 2015), et plus particulièrement chez *Aedes aegypti* (Muturi *et al.*, 2011, 2012; Muturi, 2013). Des phénomènes de « trade-off », c'est-à-dire de compromis dans l'allocation des ressources entre différents processus physiologiques sont par ailleurs souvent décrit chez les souches d'insectes résistants à des insecticides (Ericsson *et al.*, 2009; Després *et al.*, 2014; Gordon *et al.*, 2015). Il est ainsi envisageable que face au stress modéré induit par l'exposition aux polluants, des phénomènes de compensation visent à favoriser les fonctions physiologiques de base (développement et reproduction) au détriment d'autres fonctions secondaires comme l'immunité ou la réponse aux stress. Notre étude ayant mis en évidence des perturbations physiologiques suites à l'exposition à l'ibuprofène, au bisphénol A et au benzo[a]pyrène, il serait intéressant d'approfondir les conséquences de ces perturbations en prenant en compte la réaction des individus exposés et de leur descendance face à des facteurs de stress secondaires. Cette perspective est particulièrement confortée par les observations faites lors du deuxième volet de cette thèse, montrant une sous-transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire chez les individus exposés à l'ibuprofène, ce qui pourrait affecter leur réponse face des stress biotiques. De plus, la sur-transcription de nombreux gènes de réponse aux stress et la sous-transcription de gènes de détoxification constatée chez les larves de leur descendance pourraient également influencer la réaction de cette descendance à des variations dans leur environnement, qu'il serait intéressant de confirmer à l'échelle individuelle.

IV.3.5 Conséquence de l'exposition aux polluants sur le potentiel vectoriel des populations

Le moustique *Aedes aegypti* est le vecteur de plusieurs virus transmissibles à l'Homme comme les virus de la dengue, du chikungunya, de la fièvre jaune et de Zika. Plus largement, les moustiques en général peuvent être infectés par différents virus et parasites pouvant être parfois transmis l'Homme lors du repas de sang. La dynamique des populations de moustiques est ainsi liée à l'apparition de nombreux épisodes épidémiques à travers le monde. L'évolution de la capacité vectorielle des moustiques, ainsi que l'efficacité des méthodes de lutte anti-vectorielle visant à la

régulation des populations constituent ainsi des enjeux humains, sanitaires, économiques et écologiques majeurs (Lounibos, 2002).

La compétence vectorielle des individus est dépendante de leur propre infection par le virus ou le parasite considéré. Plusieurs études ont mis en évidence l'influence des conditions environnementales dans la sensibilité des individus à l'infection par un pathogène (Alto *et al.*, 2008; Westbrook *et al.*, 2010; Muturi et Alto, 2011; Muturi *et al.*, 2012; Carrington *et al.*, 2013; Moller-Jacobs *et al.*, 2014). Parmi ces études, plusieurs ont notamment mis en évidence l'importance de l'état de la fonction immunitaire (Carvalho-Leandro *et al.*, 2012; Sim *et al.*, 2013; Buckner *et al.*, 2015). Nos travaux ayant mis en évidence le potentiel des trois polluants à perturber la physiologie des individus, ces perturbations pourraient tout à fait affecter la capacité vectorielle des individus. Plus particulièrement, l'étude approfondie des mécanismes d'action de l'ibuprofène a révélé une diminution probable du potentiel immunitaire des individus exposés au stade larvaire. Alors que des variations du potentiel immunitaire larvaire ont été impliquées dans la transmission verticale (des parents à la descendance) du virus de la dengue chez *Aedes aegypti* (Buckner *et al.*, 2015), il apparaît possible que l'ibuprofène puisse affecter la capacité vectorielle des individus.

La limitation des épidémies dues aux maladies transmises par les moustiques repose actuellement essentiellement sur le contrôle des populations de vecteurs à l'aide de traitements insecticides. Tandis que de nombreuses études rapportent une résistance de plus en plus forte des populations naturelles aux insecticides chimiques, l'utilisation du Bti, un insecticide d'origine bactérienne dit « biologique » apparaît actuellement comme une alternative importante à ces insecticides chimiques. De façon tout à fait inattendue, les modifications transcriptionnelles mises en évidence chez les larves exposées à l'ibuprofène présentent de nombreuses similitudes avec les profils mis en évidence chez une population d'*Aedes aegypti* rendue résistante au Bti par le biais de sélections en laboratoire (Paris *et al.*, 2012; Després *et al.*, 2014). Ces études ont en effet révélé une sous-transcription des gènes impliqués dans la réponse immunitaire, accompagnée d'une sur-transcription des gènes participant à la mise en place de la cuticule. Plus particulièrement, une étude encore non publiée portant sur le profil transcriptionnel de larves pré-exposées à des doses sub-létales de Bti met entre autre en évidence la perturbation de la transcription des mêmes hexamérines et phosphatases alcalines chez ces larves (communication personnelle de R. Stalinski) que celles observées chez les larves exposées à l'ibuprofène.

Considérant le fait que les populations exposées à l'ibuprofène durant plusieurs générations successives développent une tolérance accrue au Bti, il apparaît d'un intérêt tout particulier d'approfondir la comparaison des profils transcriptionnels établis dans nos différentes études. Cela

pourrait d'une part apporter des pistes de réflexion quant aux mécanismes impliqués dans l'apparition de tolérance et de résistance au Bti chez les individus, mais également apporter des éléments inédits concernant les conséquences potentielles de la pollution des milieux aquatiques sur l'efficacité de la lutte anti-vectorielle « biologique ». En effet, alors que la pollution des eaux de surfaces par différents types de polluants est connue pour influencer la tolérance et la résistance des populations de moustiques aux insecticides chimiques, seule une étude a jusqu'à présent mis en évidence le rôle d'un polluant sur la tolérance des populations au Bti (Boyer *et al.*, 2006).

Ainsi, les observations effectuées au cours de ces travaux apportent de nouvelles perspectives quant aux conséquences de la pollution des eaux de surface sur la lutte anti-vectorielle.

IV.3.6 L'espèce *Aedes aegypti* est-elle un bon modèle en écotoxicologie ?

Le moustique *Aedes aegypti* présente de nombreux avantages potentiels dans le cadre d'études écotoxicologiques, détaillés dans l'introduction de cette thèse (partie I.3.3). Les connaissances de ce modèle, notamment sur le plan génomique et fonctionnel, nous ont permis une étude particulièrement détaillée des origines moléculaires des phénotypes observés à l'échelle individuelle. De plus, la connaissance approfondie de son cycle de vie pourra vraisemblablement nous permettre dans un futur proche d'extrapoler les modifications constatés sur les individus à l'échelle populationnelle. Ainsi, ce modèle nous a permis d'accomplir en grande partie un des objectifs de ce travail de thèse, qui était de faire le lien entre des perturbations moléculaires et les conséquences populationnelles associées, permettant une identification globale des conséquences de la pollution des eaux de surfaces. Notamment, l'identification d'une réduction potentielle de la réponse immunitaire et de la mise en place des réserves protéiques suite à une exposition chronique à l'ibuprofène pourrait constituer un point de départ relativement simple à mettre en œuvre pour la recherche d'impacts similaire chez d'autres espèces d'insectes aquatiques.

Cependant, le cycle de vie particulièrement prolifique et robuste de cette espèce rend la dynamique des populations particulièrement peu sensible à des modifications fines de traits d'histoire de vie entraînées par les polluants, et seule une augmentation de mortalité particulièrement massive est susceptible d'affecter la dynamique de la population (*Communication personnelle du Dr A. Chaumot*). En outre, la plasticité reproductive et phénotypique toute particulière de cette espèce ainsi que sa capacité d'adaptation (Lounibos, 2002; Powell et Tabachnick, 2013), mises en évidence lors de l'exposition multigénérationnelle aux polluants, apparaît être peu représentative des autres espèces d'insectes aquatiques, et rend particulièrement hasardeuse

l'extrapolation des observations individuelles et populationnelles à d'autres espèces d'insectes aquatiques.

Ainsi, alors que le moustique *Aedes aegypti* apparaît particulièrement propice aux études intégratives allant de l'échelle moléculaire à l'échelle populationnelle, la pertinence de cette espèce en tant que modèle d'insecte aquatique dans l'évaluation des risques écotoxicologiques semble plus modérée.

IV.4 Conclusion finale

Ce travail de thèse a mis en évidence l'intérêt de la prise en compte du cycle de vie de la descendance dans l'évaluation des risques écotoxicologiques. L'approche intégrative adoptée, alliant l'étude de mécanismes moléculaires à la modélisation de la dynamique des populations démontre en outre la faisabilité et l'intérêt de ce type d'étude dans l'identification et la compréhension des conséquences de la pollution des eaux de surface sur les populations d'organismes aquatiques.

D'autre part, les travaux effectués au cours de cette thèse apportent des débuts de réponse quant aux conséquences de la contamination des milieux sur les populations de moustiques. Ces travaux soulèvent des perspectives intéressantes tant en écotoxicologie classique que dans le cadre plus appliqué de la lutte anti-vectorielle. En effet, de plus en plus d'auteurs suggèrent une part importante des mécanismes épigénétiques dans les processus micro-évolutifs à l'origine de l'acclimatation des populations aux conditions environnementales sur le long terme (pour exemple : Danchin et Pocheville, 2014; Liu *et al.*, 2015). La démonstration de la mise en jeu de mécanismes épigénétiques dans l'impact trans-générationnel de l'ibuprofène permettrait de porter un regard nouveau sur les mécanismes micro-évolutifs à l'œuvre lors de l'exposition multigénérationnelle d'organismes aquatiques à ce polluant, et plus largement sur le potentiel de la pollution des eaux de surface à influencer les processus micro-évolutifs chez les populations d'organismes aquatiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

AFSSA. Hierarchisation des residus de medicaments d'interet pour l'analyse des ressources et des eaux traitées. AFSSA; 2008.

Van Aggelen G, Ankley GT, Baldwin WS, Bearden DW, Benson WH, Chipman JK, et al. Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements, and future outlook. *Environ. Health Perspect.* 2010; 118: 1–5.

Aguirre-Martínez GV, DelValls AT, Laura Martín-Díaz M. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015; 120: 142–154.

Alexander AC, Luis AT, Culp JM, Baird DJ, Cessna AJ. Can nutrients mask community responses to insecticide mixtures? *Ecotoxicology* 2013; 22: 1085–1100.

Almeida SJ de, Martins Ferreira RP, Eiras ÁE, Obermayr RP, Geier M. Multi-agent modeling and simulation of an *Aedes aegypti* mosquito population. *Environ. Model. Softw.* 2010; 25: 1490–1507.

Alto BW, Lounibos LP, Mores CN, Reiskind MH. Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. *Proc. Biol. Sci.* 2008; 275: 463–471.

Anckar J, Sistonen L. Regulation of HSF1 Function in the Heat Stress Response: Implications in Aging and Disease. *Annu. Rev. Biochem.* 2011; 80: 1089–1115.

Anderson WA, Spielman A. Permeability of the ovarian follicle of *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Cell Biol.* 1971; 50: 201–221.

Andreozzi R, Raffaele M, Nicklas P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 2003; 50: 1319–1330.

Andres null, Ribeyre null, Boudou null. Effects of Temperature and Exposure Duration on Transfer of Cadmium Between Naturally Contaminated Sediments and Burrowing Mayfly Nymphs (*Hexagenia rigida*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1998; 35: 295–301.

Ankley GT, Brooks BW, Huggett DB, Sumpter JP. Repeating history: pharmaceuticals in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 2007; 41: 8211–8217.

Ashton D, Hilton M, Thomas KV. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* 2004; 333: 167–184.

ATDSR. Toxicological Profile: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). 1995

Atienzar FA, Jha AN. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 2004; 552: 125–140.

B

Banerjee KK, Ayyub C, Sengupta S, Kolthur-Seetharam U. dSir2 deficiency in the fatbody, but not muscles, affects systemic insulin signaling, fat mobilization and starvation survival in flies. *Aging* 2012; 4: 206–223.

Bang HW, Lee W, Kwak I-S. Detecting points as developmental delay based on the life-history development and urosome deformity of the harpacticoid copepod, *Tigriopus japonicus sensu lato*, following exposure to benzo(a)pyrene. *Chemosphere* 2009; 76: 1435–1439.

Barata C, Baird DJ, Miñarro A, Soares AMV. Do genotype responses always converge from lethal to nonlethal toxicant exposure levels? Hypothesis tested using clones of *Daphnia magna* straus. *Environ. Toxicol. Chem.* 2000; 19: 2314–2322.

Barata C, Medina M, Telfer T, Baird DJ. Determining demographic effects of cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa*: stage-specific short tests versus life-table tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2002; 43: 373–378.

Barata C, Porte C, Baird DJ. Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in invertebrates. A review. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 2004; 13: 511–517.

Beaudouin R, Dias V, Bonzom JM, Péry A. Individual-based model of *Chironomus riparius* population dynamics over several generations to explore adaptation following exposure to uranium-spiked sediments. *Ecotoxicology* 2012; 21: 1225–1239.

Bendz D, Paxéus NA, Ginn TR, Loge FJ. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.* 2005; 122: 195–204.

Besse J-P, Garric J. Médicaments à usage humain: risque d'exposition et effets sur les milieux récepteurs. Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à dans les eaux de surface continentales. *Médicaments à usage humain: risque d'exposition et effets sur les milieux récepteurs*. Lyon: Agence de l'Eau R.M.C; 2007.

Besse J-P, Garric J. Human pharmaceuticals in surface waters. *Toxicol. Lett.* 2008; 176: 104–123.

Biedler JK, Hu W, Tae H, Tu Z. Identification of Early Zygotic Genes in the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* and Discovery of a Motif Involved in Early Zygotic Genome Activation. *PLoS ONE* 2012a; 7: e33933.

Binelli A, Riva C, Cogni D, Provini A. Assessment of the genotoxic potential of benzo(a)pyrene and pp'-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2008; 649: 135–145.

Black WC, Bennett KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernández-Salas I, de Lourdes Muñoz M, et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch. Med. Res.* 2002; 33: 379–388.

Bodai L, Zsindely N, Gáspár R, Kristó I, Komonyi O, Boros IM. Ecdysone induced gene expression is associated with acetylation of histone H3 lysine 23 in *Drosophila melanogaster*. *PloS One* 2012; 7: e40565.

Boleda MR, Galceran MT, Ventura F. Validation and uncertainty estimation of a multiresidue method for pharmaceuticals in surface and treated waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2013; 1286: 146–158.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2014; 30: 2114–2120.

Bonada N, Prat N, Resh VH, Statzner B. Developments in aquatic insect biomonitoring: a comparative analysis of recent approaches. *Annu. Rev. Entomol.* 2006; 51: 495–523.

- Bonduriansky R, Head M. Maternal and paternal condition effects on offspring phenotype in *Telostylinus angusticollis* (Diptera: Neriidae). *J. Evol. Biol.* 2007; 20: 2379–2388.
- Bonizzoni M, Dunn WA, Campbell CL, Olson KE, Dimon MT, Marinotti O, et al. RNA-seq analyses of blood-induced changes in gene expression in the mosquito vector species, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* 2011; 12: 82.
- Bonneton F, Laudet V. Evolution of Nuclear Receptors in Insects. In: *Insect endocrinology*. London: 2012.
- Bouvier M, Durand F, Guillet R. Médicament et Environnement - La régulation du médicament vis-à-vis du risque environnemental. Conseil Général de l'Environnement et du développement durable; 2010.
- Bowman JC, Zhou JL, Readman JW. Sorption and desorption of benzo(a)pyrene in aquatic systems. *J. Environ. Monit.* 2002; 4: 761–766.
- Boyd GR, Palmeri JM, Zhang S, Grimm DA. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. *Sci. Total Environ.* 2004; 333: 137–148.
- Boyer S, Sérandour J, Lempérière G, Raveton M, Ravanel P. Do herbicide treatments reduce the sensitivity of mosquito larvae to insecticides? *Chemosphere* 2006; 65: 721–724.
- Brennan SJ, Brougham CA, Roche JJ, Fogarty AM. Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 2006; 64: 49–55.
- Briegel H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 1990; 36: 165–172.
- Briegel H, Gut T, Lea AO. Sequential deposition of yolk components during oogenesis in an insect, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Insect Physiol.* 2003; 49: 249–260.
- Brinkmann M, Hudjetz S, Kammann U, Hennig M, Kuckelkorn J, Chinoraks M, et al. How flood events affect rainbow trout: Evidence of a biomarker cascade in rainbow trout after exposure to PAH contaminated sediment suspensions. *Aquat. Toxicol.* 2013; 128-129: 13–24.
- Brito LP, Linss JGB, Lima-Camara TN, Belinato TA, Peixoto AA, Lima JBP, et al. Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PloS One* 2013; 8: e60878.
- Broman D, Naef C, Rolff C, Zebuehr Y. Occurrence and dynamics of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and polycyclic aromatic hydrocarbons in the mixed surface layer of remote coastal and offshore waters of the Baltic. *Environ. Sci. Technol.* 1991; 25: 1850–1864.
- Brozinski J-M, Lahti M, Meierjohann A, Oikari A, Kronberg L. The Anti-Inflammatory Drugs Diclofenac, Naproxen and Ibuprofen are found in the Bile of Wild Fish Caught Downstream of a Wastewater Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.* 2013; 47: 342–348.
- Buckner EA, Alto BW, Philip Lounibos L. Larval Temperature-Food Effects on Adult Mosquito Infection and Vertical Transmission of Dengue-1 Virus. *J. Med. Entomol.* 2015
- Buescher JL, Musselman LP, Wilson CA, Lang T, Keleher M, Baranski TJ, et al. Evidence for transgenerational metabolic programming in *Drosophila*. *Dis. Model. Mech.* 2013; 6: 1123–1132.
- Bui VH. Contribution à l'étude de la présence et du devenir des résidus de médicaments dans les compartiments aquatiques. 2014

Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br. J. Nutr.* 2007; 97: 1036–1046.

Buser H-R, Poiger T, Müller MD. Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 1999; 33: 2529–2535.

Büyükgüzel E, Tunaz H, Stanley D, Büyükgüzel K. Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. *J. Insect Physiol.* 2007; 53: 99–105.

Bylesjö M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J. Chemom.* 2006; 20: 341–351.

C

Caldwell PE, Walkiewicz M, Stern M. Ras activity in the *Drosophila* prothoracic gland regulates body size and developmental rate via ecdysone release. *Curr. Biol.* 2005; 15: 1785–1795.

Carballa M, Omil F, Lema JM, Llompart M, García-Jares C, Rodríguez I, et al. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 2004; 38: 2918–2926.

Carrington LB, Seifert SN, Armijos MV, Lambrechts L, Scott TW. Reduction of *Aedes aegypti* vector competence for dengue virus under large temperature fluctuations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013; 88: 689–697.

Carvalho-Leandro D, Ayres CFJ, Guedes DRD, Suesdek L, Melo-Santos M a. V, Oliveira CF, et al. Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. *Acta Trop.* 2012; 124: 113–119.

Casati L, Sendra R, Sibilía V, Celotti F. Endocrine disrupters: the new players able to affect the epigenome. *Front. Cell Dev. Biol.* 2015; 3: 37.

Casatta N, Mascolo G, Roscioli C, Viganò L. Tracing endocrine disrupting chemicals in a coastal lagoon (Sacca di Goro, Italy): Sediment contamination and bioaccumulation in Manila clams. *Sci. Total Environ.* 2015; 511: 214–222.

Cator LJ, Harrington LC. The harmonic convergence of fathers predicts the mating success of sons in *Aedes aegypti*. *Anim. Behav.* 2011; 82: 627–633.

Charles S, Billoir E, Lopes C, Chaumot A. Matrix population models as relevant modeling tools in ecotoxicology. In: *Ecotoxicology Modeling*. Boston, MA: Springer US; 2009.

Charlier C, Michaux C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur. J. Med. Chem.* 2003; 38: 645–659.

Chauhan C, Zrally CB, Parilla M, Diaz MO, Dingwall AK. Histone recognition and nuclear receptor co-activator functions of *Drosophila* cara mitad, a homolog of the N-terminal portion of mammalian MLL2 and MLL3. *Dev. Camb. Engl.* 2012; 139: 1997–2008.

Cheng C, Ko A, Chaieb L, Koyama T, Sarwar P, Mirth CK, et al. The POU factor ventral veins lacking/Drifter directs the timing of metamorphosis through ecdysteroid and juvenile hormone signaling. *PLoS Genet.* 2014; 10: e1004425.

- Chen L, Zhu J, Sun G, Raikhel AS. The early gene Broad is involved in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Mol. Endocrinol.* 2004; 33: 743–761.
- Chen M-Y, Ike M, Fujita M. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environ. Toxicol.* 2002; 17: 80–86.
- Cherry CM, Matunis EL. Epigenetic regulation of stem cell maintenance in the *Drosophila* testis via the nucleosome-remodeling factor NURF. *Cell Stem Cell* 2010; 6: 557–567.
- Choi S, Lim D-S, Chung J. Feeding and Fasting Signals Converge on the LKB1-SIK3 Pathway to Regulate Lipid Metabolism in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 2015; 11: e1005263.
- Christophers R. *Aedes Aegypti (L.) The Yellow Fever Mosquito: Its Life History, Bionomics and Structure.* Cambridge: Cambridge University Press; 1960.
- Clark LB, Rosen RT, Hartman TG, Alaimo LH, Louis JB, Hertz C, et al. Determination of Nonregulated Pollutants in Three New Jersey Publicly Owned Treatment Works (POTWs). *Res. J. Water Pollut. Control Fed.* 1991; 63: 104–113.
- Clements AN. *The Biology of Mosquitoes: Sensory Reception and Behaviour.* Wallingford u.a.: CABI Publishing; 1999.
- Clements AN. *The Biology of Mosquitoes: Development, nutrition, and reproduction.* Chapman & Hall; 1992.
- Cleuvers M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 2003; 142: 185–194.
- Clifton ME, Noriega FG. The fate of follicles after a blood meal is dependent on previtellogenic nutrition and juvenile hormone in *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 2012; 58: 1007–1019.
- Clough E, Tedeschi T, Hazelrigg T. Epigenetic regulation of oogenesis and germ stem cell maintenance by the *Drosophila* histone methyltransferase Eggless/dSetDB1. *Dev. Biol.* 2014; 388: 181–191.
- Coast GM, Schooley DA. Toward a consensus nomenclature for insect neuropeptides and peptide hormones. *Peptides* 2011; 32: 620–631.
- Colborn T, Saal FS vom, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 1993; 101: 378–384.
- Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, Radimerski T, Montagne J, Léopold P. A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell* 2003; 114: 739–749.
- Comeau F, Surette C, Brun GL, Losier R. The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. *Sci. Total Environ.* 2008; 396: 132–146.
- Contardo-Jara V, Lorenz C, Pflugmacher S, Nützmann G, Kloas W, Wiegand C. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 2011; 105: 428–437.
- Corrales J, Thornton C, White M, Willett KL. Multigenerational effects of benzo[a]pyrene exposure on survival and developmental deformities in zebrafish larvae. *Aquat. Toxicol.* 2014; 148: 16–26.
- Costa-da-Silva AL, Kojin BB, Marinotti O, James AA, Capurro ML. Expression and accumulation of the two-domain odorant-binding protein AegOBP45 in the ovaries of blood-fed *Aedes aegypti*. *Parasit. Vectors* 2013; 6: 364.

Couret J, Benedict MQ. A meta-analysis of the factors influencing development rate variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *BMC Ecol.* 2014; 14: 3.

Couret J, Dotson E, Benedict MQ. Temperature, Larval Diet, and Density Effects on Development Rate and Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS ONE* 2014; 9: e87468.

Cousins IT, Staples CA, Klečka GM, Mackay D. A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 2002; 8: 1107–1135.

Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, Jobling S, Laufer H, LeBlanc GA, et al. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reprod. Toxicol.* 2007; 24: 225–239.

Cranna N, Quinn L. Impact of steroid hormone signals on *Drosophila* cell cycle during development. *Cell Div.* 2009; 4: 3.

Cruz J, Sieglaff DH, Arensburger P, Atkinson PW, Raikhel AS. Nuclear receptors in the mosquito *Aedes aegypti*: Annotation, hormonal regulation and expression profiling. *FEBS J.* 2009; 276: 1233–1254.

D

Dai L, Adams ME. Ecdysis triggering hormone signaling in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2009; 162: 43–51.

Danchin E, Pocheville A. Inheritance is where physiology meets evolution. *J. Physiol.-Lond.* 2014; 592: 2307–2317.

Danielsen ET, Moeller ME, Rewitz KF. Chapter Two - Nutrient Signaling and Developmental Timing of Maturation. In: O'Connor AER and MB, editor(s). *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press; 2013. p. 37–67.

David J, Cohet Y, Fouillet P. [Resistance to starvation in insects: importance of the amount of lipid reserves in adult *Drosophila melanogaster*]. *Comptes Rendus Hebd. Séances Académie Sci. Sér. Sci. Nat.* 1975; 280: 2571–2574.

Davies SA, Cabrero P, Overend G, Aitchison L, Sebastian S, Terhzaz S, et al. Cell signalling mechanisms for insect stress tolerance. *J. Exp. Biol.* 2014; 217: 119–128.

Delhomme O, Rieb E, Millet M. Polycyclic aromatic hydrocarbons analyzed in rainwater collected on two sites in east of France (Strasbourg and Erstein). *Polycycl. Aromat. Compd.* 2008; 28: 472–485.

Deng H. Multiple roles of Nrf2-Keap1 signaling: regulation of development and xenobiotic response using distinct mechanisms. *Fly (Austin)* 2014; 8: 7–12.

Deng H, Kerppola TK. Regulation of *Drosophila* metamorphosis by xenobiotic response regulators. *PLoS Genet.* 2013; 9: e1003263.

Després L, Stalinski R, Faucon F, Navratil V, Viari A, Paris M, et al. Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in *Aedes aegypti* mosquito. *Biol. Lett.* 2014; 10: 20140716.

Dijkstra K-DB, Monaghan MT, Pauls SU. Freshwater biodiversity and aquatic insect diversification. *Annu. Rev. Entomol.* 2014; 59: 143–163.

Diniz MMC de SL, Henriques AD da S, Leandro R da S, Aguiar DL, Beserra EB. Resistance of *Aedes aegypti* to temephos and adaptive disadvantages. *Rev. Saúde Pública* 2014; 48: 775–782.

Donelan SC, Trussell GC. Parental effects enhance risk tolerance and performance in offspring. *Ecology* 2015; 96: 2049–2055.

Donelson JM, Munday PL. Transgenerational plasticity mitigates the impact of global warming to offspring sex ratios. *Glob. Change Biol.* 2015; 21: 2954–2962.

Dorn PB, Chou C-S, Gentempo JJ. Degradation of bisphenol A in natural waters. *Chemosphere* 1987; 16: 1501–1507.

Dottorini T, Persampieri T, Palladino P, Baker DA, Spaccapelo R, Senin N, et al. Regulation of *Anopheles gambiae* male accessory gland genes influences postmating response in female. *FASEB J.* 2013; 27: 86–97.

Duan Y-P, Meng X-Z, Wen Z-H, Ke R-H, Chen L. Multi-phase partitioning, ecological risk and fate of acidic pharmaceuticals in a wastewater receiving river: The role of colloids. *Sci. Total Environ.* 2013; 447: 267–273.

Du J, Li Y, Huang ZC, You J. Chronic Toxicity Thresholds for Sediment-Associated Benzo[a]pyrene in the Midge (*Chironomus dilutus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2014; 66: 370–378.

Dulio V, Morin A, Staub P. Les substances émergentes dans l'environnement - Note de synthèse sur l'état de l'art concernant les produits pharmaceutiques, les cosmétiques et les produits d'hygiène corporelle. ONEMA - INERIS; 2009.

Durmuş Y, Büyükgüzel E, Terzi B, Tunaz H, Stanley D, Büyükgüzel K. Eicosanoids mediate melanotic nodulation reactions to viral infection in larvae of the parasitic wasp, *Pimpla turionellae*. *J. Insect Physiol.* 2008; 54: 17–24.

E

Ericson H, Thorsén G, Kumblad L. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquat. Toxicol.* 2010; 99: 223–231.

Ericsson JD, Janmaat AF, Lowenberger C, Myers JH. Is decreased generalized immunity a cost of Bt resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*? *J. Invertebr. Pathol.* 2009; 100: 61–67.

Escher BI, Hermens JLM. Modes of Action in Ecotoxicology: Their Role in Body Burdens, Species Sensitivity, QSARs, and Mixture Effects. *Environ. Sci. Technol.* 2002; 36: 4201–4217.

F

Fabbri R, Montagna M, Balbi T, Raffo E, Palumbo F, Canesi L. Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 2014; 99: 1–8.

Fan J, Francis F, Liu Y, Chen JL, Cheng DF. An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. *Genet. Mol. Res. GMR* 2011; 10: 3056–3069.

Fent K, Weston A, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 2006; 76: 122–159.

Fernandes MB, Sicre M-A, Broyelle I, Lorre A, Pont D. Contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in French and European rivers. *Hydrobiologia* 1999; 410: 343–348.

Fick J, Lindberg RH, Parkkonen J, Arvidsson B, Tysklind M, Larsson DGJ. Therapeutic levels of levonorgestrel detected in blood plasma of fish: results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents. *Environ. Sci. Technol.* 2010; 44: 2661–2666.

Flippin JL, Huggett D, Foran CM. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* 2007; 81: 73–78.

Fluegel ML, Parker TJ, Pallanck LJ. Mutations of a *Drosophila* NPC1 gene confer sterol and ecdysone metabolic defects. *Genetics* 2006; 172: 185–196.

Fromme H, Küchler T, Otto T, Pilz K, Müller J, Wenzel A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 2002; 36: 1429–1438.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001; 294: 1871–1875.

Fürhacker M, Scharf S, Weber H. Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere* 2000; 41: 751–756.

G

Gagliardi BS, Long SM, Pettigrove VJ, Hoffmann AA. The Parthenogenetic Cosmopolitan Chironomid, *Paratanytarsus grimmii*, as a New Standard Test Species for Ecotoxicology: Culturing Methodology and Sensitivity to Aqueous Pollutants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2015.

García Gil de Muñoz FL, Martínez-Barnette J, Lanz-Mendoza H, Rodríguez MH, Hernández-Hernández FC. Prostaglandin E2 modulates the expression of antimicrobial peptides in the fat body and midgut of *Anopheles albimanus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2008; 68: 14–25.

Gasperi J, Garnaud S, Rocher V, Moilleron R. Priority pollutants in surface waters and settleable particles within a densely urbanised area: Case study of Paris (France). *Sci. Total Environ.* 2009; 407: 2900–2908.

Geens T, Roosens L, Neels H, Covaci A. Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere* 2009; 76: 755–760.

Van Der Geest HG, Soppe WJ, Greve GD, Krono A, Kraak MHS. Combined effects of lowered oxygen and toxicants (copper and diazinon) on the mayfly *Ephoron virgo*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2002; 21: 431–436.

Geiser DL, Winzerling JJ. Insect transferrins: multifunctional proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1820: 437–451.

Gharred T, Ezzine IK, Naija A, Bouali RR, Jebali J. Assessment of toxic interactions between deltamethrin and copper on the fertility and developmental events in the Mediterranean sea urchin, *Paracentrotus lividus*. *Environ. Monit. Assess.* 2015; 187

Gobas FAPC, Zhang X. Interactions of organic chemicals with particulate and dissolved organic matter in the aquatic environment. In: *Bioavailability: Physical, Chemical, and Biological Interactions*. CRC Press; 1994.

Gonzalez-Rey M, Bebianno MJ. Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2012; 33: 361–371.

Gordon JR, Potter MF, Haynes KF. Insecticide resistance in the bed bug comes with a cost. *Sci. Rep.* 2015; 5: 10807.

Grech K, Maung LA, Read AF. The effect of parental rearing conditions on offspring life history in *Anopheles stephensi*. *Malar. J.* 2007; 6: 130.

Gros M, Petrović M, Barceló D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 2006; 70: 678–690.

Guerra P, Kim M, Teslic S, Alae M, Smyth SA. Bisphenol-A removal in various wastewater treatment processes: Operational conditions, mass balance, and optimization. *J. Environ. Manage.* 2015; 152: 192–200.

Gulia-Nuss M, Robertson AE, Brown MR, Strand MR. Insulin-Like Peptides and the Target of Rapamycin Pathway Coordinately Regulate Blood Digestion and Egg Maturation in the Mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS ONE* 2011; 6: e20401.

Gust M, Gagné F, Berlioz-Barbier A, Besse JP, Buronfosse T, Tournier M, et al. Caged mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) as an integrated field biomonitoring tool: Exposure assessment and reprotoxic effects of water column contamination. *Water Res.* 2014; 54: 222–236.

H

Hahn T, Schenk K, Schulz R. Environmental chemicals with known endocrine potential affect yolk protein content in the aquatic insect *Chironomus riparius*. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 2002; 120: 525–528.

Ha M-H, Choi J. Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): A potential biomarker for ecotoxicity monitoring. *Chemosphere* 2008; 71: 1928–1936.

Ha M-H, Choi J. Effects of Environmental Contaminants on Hemoglobin Gene Expression in *Daphnia magna*: A Potential Biomarker for Freshwater Quality Monitoring. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2009; 57: 330–337.

Han S, Choi K, Kim J, Ji K, Kim S, Ahn B, et al. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat. Toxicol.* 2010; 98: 256–264.

Hansen IA, Attardo GM, Rodriguez SD, Drake LL. Four-way regulation of mosquito yolk protein precursor genes by juvenile hormone-, ecdysone-, nutrient-, and insulin-like peptide signaling pathways. *Front. Physiol.* 2014; 5

Harbison ST, Chang S, Kamdar KP, Mackay TF. Quantitative genomics of starvation stress resistance in *Drosophila*. *Genome Biol.* 2005; 6: R36.

Harker BW, Behura SK, deBruyn BS, Lovin DD, Mori A, Romero-Severson J, et al. Stage-specific transcription during development of *Aedes aegypti*. *BMC Dev. Biol.* 2013; 13: 29.

Harris TE, Finck BN. Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 2011; 22: 226–233.

Hartig JH, Zarull MA, Ciborowski JJH, Gannon JE, Wilke E, Norwood G, et al. Long-term ecosystem monitoring and assessment of the Detroit River and Western Lake Erie. *Environ. Monit. Assess.* 2009; 158: 87–104.

van Hattum B, Pons, Montañés. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Freshwater Isopods and Field-Partitioning Between Abiotic Phases. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1998; 35: 257–267.

Haunerland NH. Insect storage proteins: gene families and receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1996; 26: 755–765.

Hayashi Y, Heckmann L-H, Callaghan A, Sibly RM. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. *Ecotoxicology* 2008; 17: 246–251.

Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 2002; 131: 5–17.

Heckmann L, Callaghan A, Hooper H, Connon R, Hutchinson T, Maund S, et al. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicol. Lett.* 2007; 172: 137–145.

Heckmann L-H, Sibly RM, Connon R, Hooper HL, Hutchinson TH, Maund SJ, et al. Systems biology meets stress ecology: linking molecular and organismal stress responses in *Daphnia magna*. *Genome Biol.* 2008; 9: R40.

Heckmann L-H, Sibly R, Timmermans MJ, Callaghan A. Outlining eicosanoid biosynthesis in the crustacean *Daphnia*. *Front. Zool.* 2008; 5: 11.

Heemken OP, Reincke H, Stachel B, Theobald N. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere* 2001; 45: 245–259.

Helinski MEH, Harrington LC. Male mating history and body size influence female fecundity and longevity of the dengue vector *Aedes aegypti*. *J. Med. Entomol.* 2011; 48: 202–211.

Helinski MEH, Valerio L, Facchinelli L, Scott TW, Ramsey J, Harrington LC. Evidence of Polyandry for *Aedes aegypti* in Semifield Enclosures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2012; 86: 635–641.

Hernando MD, Mezcuca M, Fernández-Alba AR, Barceló D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 2006; 69: 334–342.

Hohenblum P, Gans O, Moche W, Scharf S, Lorbeer G. Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. *Sci. Total Environ.* 2004; 333: 185–193.

Höhne C, Püttmann W. Occurrence and temporal variations of the xenoestrogens bisphenol A, 4-tert-octylphenol, and tech. 4-nonylphenol in two German wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2008; 15: 405–416.

Hotchkiss AK, Rider CV, Blystone CR, Wilson VS, Hartig PC, Ankley GT, et al. Fifteen Years after ‘Wingspread’--Environmental Endocrine Disrupters and Human and Wildlife Health: Where We are Today and Where We Need to Go. *Toxicol. Sci.* 2008; 105: 235–259.

Hou L, Cai M-J, Liu W, Song Q, Zhao X-F. Small GTPase Rab4b participates in the gene transcription of 20-hydroxyecdysone and insulin pathways to regulate glycogen level and metamorphosis. *Dev. Biol.* 2012; 371: 13–22.

Huerta B, Jakimska A, Llorca M, Ruhí A, Margoutidis G, Acuña V, et al. Development of an extraction and purification method for the determination of multi-class pharmaceuticals and endocrine disruptors in freshwater invertebrates. *Talanta* 2015; 132: 373–381.

Hutchinson TH. Small is useful in endocrine disrupter assessment—four key recommendations for aquatic invertebrate research. *Ecotoxicology* 2007; 16: 231–238.

I

Illumina Inc. Quality scores for Nexy-Generation Sequencing - Assessing sequencing accuracy using Phred quality scoring [Internet]. 2011 - Available from: http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf

INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : Le benzo(a)pyrène. INERIS; 2006.

INERIS. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Ibuprofène [Internet]. INERIS; 2012. Available from: <http://rsde.ineris.fr/>

INSERM. Bisphénol A : Effets sur la reproduction. INSERM; 2010.

Inza B, Rouleau C, Tjälve H, Ribeyre F, Campbell PG, Pelletier E, et al. Fine-scale tissue distribution of cadmium, inorganic mercury, and methylmercury in nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* studied by whole-body autoradiography. *Environ. Res.* 2001; 85: 265–271.

Islas-Flores H, Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, García-Medina S, Neri-Cruz N, Dublán-García O. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2014; 21: 5157–5166.

J

Jarvis AL, Bernot MJ, Bernot RJ. The effects of the pharmaceutical carbamazepine on life history characteristics of flat-headed mayflies (Heptageniidae) and aquatic resource interactions. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 2014; 23: 1701–1712.

Jedlicka P, Mortin MA, Wu C. Multiple functions of *Drosophila* heat shock transcription factor in vivo. *EMBO J.* 1997; 16: 2452–2462.

Jensen K. Benz(a)pyrene input and occurrence in a marine area affected by refinery effluent. *Water. Air. Soil Pollut.* 1984; 22: 57–65.

Ji K, Liu X, Lee S, Kang S, Kho Y, Giesy JP, et al. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. *J. Hazard. Mater.* 2013; 254-255: 242–251.

Jin S, Yang F, Liao T, Hui Y, Wen S, Xu Y. Enhanced effects by mixtures of three estrogenic compounds at environmentally relevant levels on development of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2012; 33: 277–283.

Jobling S, Casey D, Rogers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, et al. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 2004; 66: 207–222.

Joner EJ, Corgié SC, Amellal N, Leyval C. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 2002; 34: 859–864.

Joy TK, Arik AJ, Corby-Harris V, Johnson AA, Riehle MA. The impact of larval and adult dietary restriction on lifespan, reproduction and growth in the mosquito *Aedes aegypti*. *Exp. Gerontol.* 2010; 45: 685–690.

K

Kamoshida Y, Fujiyama-Nakamura S, Kimura S, Suzuki E, Lim J, Shiozaki-Sato Y, et al. Ecdysone receptor (EcR) suppresses lipid accumulation in the *Drosophila* fat body via transcription control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 421: 203–207.

Kang JH, Kondo F. Bisphenol A in the Surface Water and Freshwater Snail Collected from Rivers Around a Secure Landfill. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2006; 76: 113–118.

Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res.* 2008; 42: 3498–3518.

Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 1996; 104 Suppl 4: 715–740.

Kim J-W, Ishibashi H, Yamauchi R, Ichikawa N, Takao Y, Hirano M, et al. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *J. Toxicol. Sci.* 2009; 34: 227–232.

Kim KS, Funk DH, Buchwalter DB. Dietary (periphyton) and aqueous Zn bioaccumulation dynamics in the mayfly *Centropilum triangulifer*. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 2012; 21: 2288–2296.

King-Jones K, Thummel CS. Nuclear receptors — a perspective from *Drosophila*. *Nat. Rev. Genet.* 2005; 6: 311–323.

Koehler A, Pirk CWW, Nicolson SW. Simultaneous stressors: Interactive effects of an immune challenge and dietary toxin can be detrimental to honeybees. *J. Insect Physiol.* 2012; 58: 918–923.

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 2002; 36: 1202–1211.

Körner W, Bolz U, Süssmuth W, Hiller G, Schuller W, Hanf V, et al. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* 2000; 40: 1131–1142.

Korochkina SE, Gordadze AV, Zakharkin SO, Benes H. Differential accumulation and tissue distribution of mosquito hexamerins during metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1997; 27: 813–824.

Kramer VJ, Etterson MA, Hecker M, Murphy CA, Roesijadi G, Spade DJ, et al. Adverse outcome pathways and ecological risk assessment: Bridging to population-level effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 2011; 30: 64–76.

Kuno G. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J. Med. Entomol.* 2010; 47: 957–971.

L

Lamichhane K, Garcia SN, Huggett DB, Deangelis DL, La Point TW. Exposures to a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), sertraline hydrochloride, over multiple generations: changes in life history traits in *Ceriodaphnia dubia*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014; 101: 124–130.

Lam MW, Young CJ, Brain RA, Johnson DJ, Hanson MA, Wilson CJ, et al. Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 2004; 23: 1431–1440.

De Lange HJ, Noordoven W, Murk AJ, Lürling M, Peeters ETHM. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 2006; 78: 209–216.

Layalle S, Arquier N, Léopold P. The TOR Pathway Couples Nutrition and Developmental Timing in *Drosophila*. *Dev. Cell* 2008; 15: 568–577.

Lee M-C, Spradling AC. The progenitor state is maintained by lysine-specific demethylase 1-mediated epigenetic plasticity during *Drosophila* follicle cell development. *Genes Dev.* 2014; 28: 2739–2749.

Lee S-M, Lee S-B, Park C-H, Choi J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* 2006; 65: 1074–1081.

Leversee GJ, Giesy JP, Landrum PF, Gerould S, Bowling JW, Fannin TE, et al. Kinetics and biotransformation of benzo (a) pyrene in *Chironomus riparius*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1982; 11: 25–31.

Levy F, Rabel D, Charlet M, Bulet P, Hoffmann JA, Ehret-Sabatier L. Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of *Drosophila*. *Biochimie* 2004; 86: 607–616.

Lilley TM, Ruokolainen L, Pikkarainen A, Laine VN, Kilpimaa J, Rantala MJ, et al. Impact of Tributyltin on Immune Response and Life History Traits of *Chironomus riparius*: Single and Multigeneration Effects and Recovery from Pollution. *Environ. Sci. Technol.* 2012; 46: 7382–7389.

Lin AY-C, Reinhard M. Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 2005; 24: 1303–1309.

Lin AY-C, Yu T-H, Lin C-F. Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere* 2008; 74: 131–141.

Li S, Picimbon J-F, Ji S, Kan Y, Chuanling Q, Zhou J-J, et al. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 372: 464–468.

Liu J, Lu G, Xie Z, Zhang Z, Li S, Yan Z. Occurrence, bioaccumulation and risk assessment of lipophilic pharmaceutically active compounds in the downstream rivers of sewage treatment plants. *Sci. Total Environ.* 2015; 511: 54–62.

Liu J, Wang R, Huang B, Lin C, Wang Y, Pan X. Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 2011; 159: 2815–2822.

Liu S, Sun K, Jiang T, Feng J. Natural epigenetic variation in bats and its role in evolution. *J. Exp. Biol.* 2015; 218: 100–106.

Loos R, Gawlik BM, Locoro G, Rimaviciute E, Contini S, Bidoglio G. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* 2009; 157: 561–568.

Lord CC. Modeling and biological control of mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2007; 23: 252–264.

Lounibos LP. Invasions by insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 2002; 47: 233–266.

Luo X, Mai B, Yang Q, Fu J, Sheng G, Wang Z. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides in water columns from the Pearl River and the Macao harbor in the Pearl River Delta in South China. *Mar. Pollut. Bull.* 2004; 48: 1102–1115.

Lu X, Reible DD, Fleegeer JW. Relative importance of ingested sediment versus pore water as uptake routes for PAHs to the deposit-feeding oligochaete *Ilyodrilus templetoni*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2004; 47: 207–214.

M

le Maire A, Bourguet W, Balaguer P. A structural view of nuclear hormone receptor: endocrine disruptor interactions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010; 67: 1219–1237.

Mane-Padros D, Cruz J, Cheng A, Raikhel AS. A Critical Role of the Nuclear Receptor HR3 in Regulation of Gonadotrophic Cycles of the Mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS ONE* 2012; 7: e45019.

Manoli E, Samara C, Konstantinou I, Albanis T. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bulk precipitation and surface waters of Northern Greece. *Chemosphere* 2000; 41: 1845–1855.

Margam VM, Gelman DB, Palli SR. Ecdysteroid titers and developmental expression of ecdysteroid-regulated genes during metamorphosis of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Insect Physiol.* 2006; 52: 558–568.

Martin BT, Jager T, Nisbet RM, Preuss TG, Hammers-Wirtz M, Grimm V. Extrapolating ecotoxicological effects from individuals to populations: a generic approach based on Dynamic Energy Budget theory and individual-based modeling. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 2013; 22: 574–583.

Martín D, Piulachs MD, Raikhel AS. A novel GATA factor transcriptionally represses yolk protein precursor genes in the mosquito *Aedes aegypti* via interaction with the CtBP corepressor. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21: 164–174.

Martins AJ, Ribeiro CD e M, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D, Lima JBP. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PloS One* 2012; 7: e31889.

Mathieu-Denoncourt J, Wallace SJ, de Solla SR, Langlois VS. Plasticizer endocrine disruption: Highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mammalian aquatic species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2015; 219: 74–88.

Matozzo V, Rova S, Marin MG. The nonsteroidal anti-inflammatory drug, ibuprofen, affects the immune parameters in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Mar. Environ. Res.* 2012; 79: 116–121.

Matzkin LM, Johnson S, Paight C, Markow TA. Preadult parental diet affects offspring development and metabolism in *Drosophila melanogaster*. *PloS One* 2013; 8: e59530.

- McCarty LS, Borgert CJ. Review of the toxicity of chemical mixtures: Theory, policy, and regulatory practice. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 2006; 45: 119–143.
- McEachern LA, Bartlett NJ, Lloyd VK. Endogenously imprinted genes in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Genet. Genomics* MGG 2014; 289: 653–673.
- Mensch J, Lavagnino N, Carreira V, Massaldi A, Hasson E, Fanara J. Identifying candidate genes affecting developmental time in *Drosophila melanogaster*: pervasive pleiotropy and gene-by-environment interaction. *BMC Dev. Biol.* 2008; 8: 78.
- Meredith JM, Munks RJJ, Grail W, Hurd H, Eggleston P, Lehane MJ. A novel association between clustered NF-kappaB and C/EBP binding sites is required for immune regulation of mosquito Defensin genes. *Insect Mol. Biol.* 2006; 15: 393–401.
- Mermillod-Blondin F, Foulquier A, Gilbert F, Navel S, Montuelle B, Bellvert F, et al. Benzo(a)pyrene inhibits the role of the bioturbator *Tubifex tubifex* in river sediment biogeochemistry. *Sci. Total Environ.* 2013; 450-451: 230–241.
- Merritt RW, Wallace JB. Aquatic habitats. In: Resh VH, Carde RT, editor(s). *Encyclopedia of Insects*. San Diego, CA: 2003. p. 489–492.
- Metcalfe CD, Koenig BG, Bennie DT, Servos M, Ternes TA, Hirsch R. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 2003; 22: 2872–2880.
- Miège C, Choubert JM, Ribeiro L, Eusèbe M, Coquery M. Removal efficiency of pharmaceuticals and personal care products with varying wastewater treatment processes and operating conditions - conception of a database and first results. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 2008; 57: 49–56.
- Milan M, Pauletto M, Patarnello T, Bargelloni L, Marin MG, Matozzo V. Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. *Aquat. Toxicol.* 2013; 126: 17–29.
- Misra JR, Horner MA, Lam G, Thummel CS. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. *Genes Dev.* 2011; 25: 1796–1806.
- Mogi M, Miyagi I, Abadi K, Syafruddin null. Inter- and intraspecific variation in resistance to desiccation by adult *Aedes* (*Stegomyia*) spp. (*Diptera*: *Culicidae*) from Indonesia. *J. Med. Entomol.* 1996; 33: 53–57.
- Moller-Jacobs LL, Murdock CC, Thomas MB. Capacity of mosquitoes to transmit malaria depends on larval environment. *Parasit. Vectors* 2014; 7: 593.
- Morley NJ. Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. *Aquat. Toxicol.* 2010; 96: 27–36.
- Mukherjee K, Twyman RM, Vilcinskas A. Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2015; 118: 69–78.
- Muturi EJ. Larval rearing temperature influences the effect of malathion on *Aedes aegypti* life history traits and immune responses. *Chemosphere* 2013; 92: 1111–1116.
- Muturi EJ, Alto BW. Larval environmental temperature and insecticide exposure alter *Aedes aegypti* competence for arboviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* 2011; 11: 1157–1163.
- Muturi EJ, Blackshear M, Montgomery A. Temperature and density-dependent effects of larval environment on *Aedes aegypti* competence for an alphavirus. *J. Vector Ecol.* 2012; 37: 154–161.

Muturi EJ, Kim C-H, Alto BW, Berenbaum MR, Schuler MA. Larval environmental stress alters *Aedes aegypti* competence for Sindbis virus: Environmental stress increases vector competence. *Trop. Med. Int. Health* 2011; 16: 955–964.

Mu X, Rider CV, Hwang GS, Hoy H, LeBlanc GA. Covert signal disruption : anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signalling pathways. *Environ. Toxicol. Chem.* 2005; 24: 146.

N

Nair PMG, Park SY, Choi J. Characterization and expression of cytochrome p450 cDNA (CYP9AT2) in *Chironomus riparius* fourth instar larvae exposed to multiple xenobiotics. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2013; 36: 1133–1140.

Nallani GC, Paulos PM, Constantine LA, Venables BJ, Huggett DB. Bioconcentration of ibuprofen in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere* 2011; 84: 1371–1377.

Narbonne JF, Djomo JE, Ribera D, Ferrier V, Garrigues P. Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1999; 42: 1–8.

Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 2007; 316: 1718–1723.

Neuparth T, Martins C, Santos CB de L, Costa MH, Martins I, Costa PM, et al. Hypocholesterolaemic pharmaceutical simvastatin disrupts reproduction and population growth of the amphipod *Gammarus locusta* at the ng/L range. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 2014; 155: 337–347.

Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, David J-P. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2013; 43: 407–416.

Nkya TE, Poupardin R, Laporte F, Akhouayri I, Mosha F, Magesa S, et al. Impact of agriculture on the selection of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a multigenerational study in controlled conditions. *Parasit. Vectors* 2014; 7: 480.

Nowak C, Jost D, Vogt C, Oetken M, Schwenk K, Oehlmann J. Consequences of inbreeding and reduced genetic variation on tolerance to cadmium stress in the midge *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 2007; 85: 278–284.

Nowak C, Vogt C, Diogo JB, Schwenk K. Genetic impoverishment in laboratory cultures of the test organism *Chironomus riparius*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2007; 26: 1018.

Nowak C, Vogt C, Oehlmann J, Pfenninger M, Schwenk K, Streit B, et al. Impact of genetic diversity and inbreeding on the life-history of *Chironomus* midges over consecutive generations. *Chemosphere* 2012; 88: 988–993.

Nowak C, Vogt C, Pfenninger M, Schwenk K, Oehlmann J, Streit B, et al. Rapid genetic erosion in pollutant-exposed experimental chironomid populations. *Environ. Pollut.* 2009; 157: 881–886.

N’Tumba-Byn T, Moison D, Lacroix M, Lecureuil C, Lesage L, Prud’homme SM, et al. Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PLoS One* 2012; 7: e51579.

Nurulnadia MY, Koyama J, Uno S, Kito A, Kokushi E, Bacolod ET, et al. Accumulation of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in the polychaete *Paraprionospio* sp. from the Yodo River mouth, Osaka Bay, Japan. *Environ. Monit. Assess.* 2014; 186: 1453–1463.

O

Oberdörster E, Cottam DM, Wilmot FA, Milner MJ, McLachlan JA. Interaction of PAHs and PCBs with ecdysone-dependent gene expression and cell proliferation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999; 160: 101–108.

OCDE. Guidance document on the validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationships [(Q)SAR] models. OECD; 2007.

OCDE. Oecd guidelines for the testing of chemicals - Test No. 315 - Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2008.

OCDE. Oecd guidelines for the testing of chemicals - Test No. 233 - Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2010.

OCDE. Oecd guidelines for the testing of chemicals - Test No. 235 - *Chironomus* sp., essai d'immobilisation immédiate. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2011

OCDE. New and emerging water pollutants arising from agriculture. OCDE; 2012. a.

OCDE. Oecd guidelines for the testing of chemicals - Test No. 211 - *Daphnia magna*, essai de reproduction. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2012. b.

Odin M, Ribeyre F, Boudou A. Cadmium and methylmercury bioaccumulation by nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* from the water column and sediment. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 1995; 2: 145–152.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Kloas W, Jagnytsch O, Lutz I, Kusk KO, et al. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2009; 364: 2047–2062.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 2000; 9: 383–397.

Olivella MÀ. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater and surface waters of Lake Maggiore, a subalpine lake in Northern Italy. *Chemosphere* 2006; 63: 116–131.

Oppold A, Kreß A, Vanden Bussche J, Diogo JB, Kuch U, Oehlmann J, et al. Epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015; 122: 45–53.

Ormerod SJ, Durance I, Terrier A, Swanson AM. Priority wetland invertebrates as conservation surrogates. *Conserv. Biol. J. Soc. Conserv. Biol.* 2010; 24: 573–582.

Otti O, Sadd BM. Parental guidance? Trans-generational influences on offspring life history in mosquitoes. *Trends Parasitol.* 2008; 24: 197–199.

Ou Q, King-Jones K. What goes up must come down: transcription factors have their say in making ecdysone pulses. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2013; 103: 35–71.

Overturf MD, Overturf CL, Baxter D, Hala DN, Constantine L, Venables B, et al. Early life-stage toxicity of eight pharmaceuticals to the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2012; 62: 455–464.

P

Padmanabha H, Correa F, Legros M, Nijhout HF, Lord C, Lounibos LP. An eco-physiological model of the impact of temperature on *Aedes aegypti* life history traits. *J. Insect Physiol.* 2012; 58: 1597–1608.

Padrós J, Pelletier E, Ribeiro CO. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003; 192: 45–55.

Pailler J-Y, Krein A, Pfister L, Hoffmann L, Guignard C. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Sci. Total Environ.* 2009; 407: 4736–4743.

Pal A, Gin KY-H, Lin AY-C, Reinhard M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci. Total Environ.* 2010; 408: 6062–6069.

Paris M, David J-P, Despres L. Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 2011; 20: 1184–1194.

Paris M, Melodelima C, Coissac E, Tetreau G, Reynaud S, David J-P, et al. Transcription profiling of resistance to Bti toxins in the mosquito *Aedes aegypti* using next-generation sequencing. *J. Invertebr. Pathol.* 2012; 109: 201–208.

Park KJ, Müller CT, Markman S, Swincow-Hall O, Pascoe D, Buchanan KL. Detection of endocrine disrupting chemicals in aerial invertebrates at sewage treatment works. *Chemosphere* 2009; 77: 1459–1464.

Park K, Kwak I-S. Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere* 2010; 79: 934–941.

Park S-Y, Choi J. Genotoxic Effects of Nonylphenol and Bisphenol A Exposure in Aquatic Biomonitoring Species: Freshwater Crustacean, *Daphnia magna*, and Aquatic Midge, *Chironomus riparius*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2009; 83: 463–468.

Parolini M, Binelli A, Provini A. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2011; 74: 1586–1594.

Parr LB, Mason CF. Long-term trends in water quality and their impact on macroinvertebrate assemblages in eutrophic lowland rivers. *Water Res.* 2003; 37: 2969–2979.

Pascoe D, Carroll K, Karntanut W, Watts MM. Toxicity of 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A to the freshwater Cnidarian *Hydra vulgaris*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2002; 43: 56–63.

Pascoe D, Karntanut W, Müller CT. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere* 2003; 51: 521–528.

Patrolecco L, Ademollo N, Capri S, Pagnotta R, Polesello S. Occurrence of priority hazardous PAHs in water, suspended particulate matter, sediment and common eels (*Anguilla anguilla*) in the urban stretch of the River Tiber (Italy). *Chemosphere* 2010; 81: 1386–1392.

- Pedersen S, Selck H, Salvito D, Forbes V. Effects of the polycyclic musk HHCB on individual- and population-level endpoints in *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2009; 72: 1190–1199.
- Perez MH, Noriega FG. *Aedes aegypti* pharate 1st instar quiescence affects larval fitness and metal tolerance. *J. Insect Physiol.* 2012; 58: 824–829.
- Perez MH, Noriega FG. *Aedes aegypti* pharate 1st instar quiescence: A case for anticipatory reproductive plasticity. *J. Insect Physiol.* 2013; 59: 318–324.
- Perrodin Y, Christine B, Sylvie B, Alain D, Jean-Luc B-K, Cécile C-O, et al. A priori assessment of ecotoxicological risks linked to building a hospital. *Chemosphere* 2013; 90: 1037–1046.
- Pham DQ-D, Shaffer JJ, Chavez CA, Douglass PL. Identification and mapping of the promoter for the gene encoding the ferritin heavy-chain homologue of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2003; 33: 51–62.
- Piggott JJ, Townsend CR, Matthaei CD. Climate warming and agricultural stressors interact to determine stream macroinvertebrate community dynamics. *Glob. Change Biol.* 2015; 21: 1887–1906.
- Pinal R, Rao PSC, Lee LS, Cline PV, Yalkowsky SH. Cosolvency of partially miscible organic solvents on the solubility of hydrophobic organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 1990; 24: 639–647.
- Pitoniak A, Bohmann D. Mechanisms and functions of Nrf2 signaling in *Drosophila*. *Free Radic. Biol. Med.* 2015, 88: 302-313.
- Plaistow SJ, Lapsley CT, Benton TG. Context-dependent intergenerational effects: The interaction between past and present environments and its effect on population dynamics. *Am. Nat.* 2006; 167: 206–215.
- Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 2008; 71: 1870–1876.
- Pondeville E, Maria A, Jacques J-C, Bourgooin C, Dauphin-Villemant C. *Anopheles gambiae* males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-hydroxyecdysone to females during mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; 105: 19631–19636.
- Ponlawat A, Harrington LC. Age and body size influence male sperm capacity of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 2007; 44: 422–426.
- Ponlawat A, Harrington LC. Factors associated with male mating success of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 80: 395–400.
- Pookpoosa I, Jindal R, Morknoy D, Tantrakarnapa K. Occurrence and efficacy of bisphenol A (BPA) treatment in selected municipal wastewater treatment plants, Bangkok, Thailand. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 2015; 72: 463–471.
- Postma J, Mol S, Larsen H, Admiraal W. Life-Cycle Changes and Zinc Shortage in Cadmium-Tolerant Midges, *Chironomus-Riparius* (diptera), Reared in the Absence of Cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 1995; 14: 117–122.
- Postma J, Vankleunen A, Admiraal W. Alterations in Life-History Traits of *Chironomus-Riparius* (diptera) Obtained from Metal-Contaminated Rivers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1995; 29: 469–475.
- Potter D, Clarius TM, Wright AS, Watson WP. Molecular dosimetry of DNA adducts in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to benzo(a)pyrene by different routes. *Arch. Toxicol.* 1994; 69: 1–7.

Pounds N, Maclean S, Webley M, Pascoe D, Hutchinson T. Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2008; 70: 47–52.

Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David J-P. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2008; 38: 540–551.

Poupardin R, Riaz MA, Jones CM, Chandor-Proust A, Reynaud S, David J-P. Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 2012; 114-115: 49–57.

Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2013; 108: 11–17.

Ptitsyn AA, Reyes-Solis G, Saavedra-Rodriguez K, Betz J, Suchman EL, Carlson JO, et al. Rhythms and synchronization patterns in gene expression in the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics* 2011; 12: 153.

Q

Quinn B, Gagné F, Blaise C. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Sci. Total Environ.* 2008a; 389: 306–314.

Quinn B, Gagné F, Blaise C. The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Sci. Total Environ.* 2008b; 402: 62–69.

Quinn B, Gagne F, Blaise C. Evaluation of the acute, chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Sci. Total Environ.* 2009; 407: 1072–1079.

R

Ramade F. *Introduction à l'écotoxicologie : fondements et applications*. Paris: Tec & Doc Lavoisier; 2007.

Regnault C, Worms IAM, Oger-Desfeux C, MelodeLima C, Veyrenc S, Bayle M-L, et al. Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. *BMC Genomics* 2014; 15: 666.

Reiskind MH, Lounibos LP. Effects of intraspecific larval competition on adult longevity in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Med. Vet. Entomol.* 2009; 23: 62–68.

Reis M, Páscoa I, Rocha H, Aguiar B, Vieira CP, Vieira J. Genes Belonging to the Insulin and Ecdysone Signaling Pathways Can Contribute to Developmental Time, Lifespan and Abdominal Size Variation in *Drosophila americana*. *PLoS ONE* 2014; 9: e86690.

Reynaud S, Deschaux P. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquat. Toxicol.* 2006; 77: 229–238.

Riaz MA, Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, David J-P. Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics☆. *Aquat. Toxicol.* 2009; 93: 61–69.

Ricciardi A, Rasmussen JB. Extinction Rates of North American Freshwater Fauna. *Conserv. Biol.* 1999; 13: 1220–1222.

Richardson ML, Bowron JM. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J. Pharm. Pharmacol.* 1985; 37: 1–12.

Righi V, Apidianakis Y, Mintzopoulos D, Astrakas L, Rahme LG, Tzika AA. In vivo high-resolution magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy of *Drosophila melanogaster* at 14.1 T shows trauma in aging and in innate immune-deficiency is linked to reduced insulin signaling. *Int. J. Mol. Med.* 2010; 26: 175–184.

Riva C, Binelli A, Rusconi F, Colombo G, Pedriali A, Zippel R, et al. A proteomic study using zebra mussels (*D. polymorpha*) exposed to benzo(a)pyrene: The role of gender and exposure concentrations. *Aquat. Toxicol.* 2011; 104: 14–22.

Rivera-Perez C, Nouzova M, Lamboglia I, Noriega FG. Metabolic analysis reveals changes in the mevalonate and juvenile hormone synthesis pathways linked to the mosquito reproductive physiology. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2014; 51: 1–9.

Roberts A, Trapnell C, Donaghey J, Rinn JL, Pachter L. Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias. *Genome Biol.* 2011; 12: R22.

Roberts PH, Thomas KV. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci. Total Environ.* 2006; 356: 143–153.

Rowley AF. Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *J. Exp. Biol.* 2005; 208: 3–14.

Roy SG, Raikhel AS. The small GTPase Rheb is a key component linking amino acid signaling and TOR in the nutritional pathway that controls mosquito egg development. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2011; 41: 62–69.

S

Sadd BM, Schmid-Hempel P. Facultative but persistent trans-generational immunity via the mother's eggs in bumblebees. *Curr. Biol. CB* 2007; 17: R1046–1047.

Sæther B-E, Engen S. The concept of fitness in fluctuating environments. *Trends Ecol. Evol.* 2015; 30: 273–281.

Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, et al. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 2000; 287: 1770–1774.

Salgueiro-González N, Turnes-Carou I, Besada V, Muniategui-Lorenzo S, López-Mahía P, Prada-Rodríguez D. Occurrence, distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting compounds in water, sediment and biota samples from a European river basin. *Sci. Total Environ.* 2015; 529: 121–130.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799–806.

Sánchez-Argüello P, Aparicio N, Fernández C. Linking embryo toxicity with genotoxic responses in the freshwater snail *Physa acuta*: Single exposure to benzo(a)pyrene, fluoxetine, bisphenol A, vinclozolin and exposure to binary mixtures with benzo(a)pyrene. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2012; 80: 152–160.

Santé Canada. Le benzo[a]pyrène. Santé Canada; 1988.

Santos JL, Aparicio I, Callejón M, Alonso E. Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *J. Hazard. Mater.* 2009; 164: 1509–1516.

Saouter E, Ribeyre F, Boudou A, Maury-Brachet R. *Hexagenia rigida* (ephemeroptera) as a biological model in aquatic ecotoxicology: experimental studies on mercury transfers from sediment. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 1991; 69: 51–67.

Sarigiannis DA, Hansen U. Considering the cumulative risk of mixtures of chemicals - a challenge for policy makers. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* 2012; 11 Suppl 1: S18.

Saro L, Lopes I, Martins N, Ribeiro R. Testing hypotheses on the resistance to metals by *Daphnia longispina*: differential acclimation, endpoints association, and fitness costs. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 2012; 31: 909–915.

Schechtman H, Souza MO. Costly Inheritance and the Persistence of Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* Populations. *PLoS One* 2015; 10: e0123961.

Scheytt T, Mersmann P, Lindstädt R, Heberer T. Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments. *Chemosphere* 2005; 60: 245–253.

Schirling M, Jungmann D, Ladewig V, Ludwichowski K-U, Nagel R, Köhler H-R, et al. Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 2006; 15: 143–156.

Schnell S, Kawano A, Porte C, Lee LEJ, Bols NC. Effects of ibuprofen on the viability and proliferation of rainbow trout liver cell lines and potential problems and interactions in effects assessment. *Environ. Toxicol.* 2009; 24: 157–165.

Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Casey D, Duft M, Markert B, Oehlmann J. Ostrogenartige Wirkungen von Bisphenol A auf Vorderkiemenschnecken (Mollusca: Gastropoda: Prosobranchia). *UWSF—Z Umweltchem Ökotox* 2001; 13: 319–333.

Seiler JP. Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology--can the two be connected? *Toxicol. Lett.* 2002; 131: 105–115.

Shikano I, Oak MC, Halpert-Scanderbeg O, Cory JS. Trade-offs between transgenerational transfer of nutritional stress tolerance and immune priming. *Funct. Ecol.* 2015; 29: 1156–1164.

Shirley MDF, Sibly RM. Genetic basis of a between-environment trade-off involving resistance to cadmium in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 1999; 53: 826–836.

Simoy MI, Simoy MV, Canziani GA. The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. *Ecol. Model.* 2015; 314: 100–110.

Sim S, Jupatanakul N, Ramirez JL, Kang S, Romero-Vivas CM, Mohammed H, et al. Transcriptomic profiling of diverse *Aedes aegypti* strains reveals increased basal-level immune activation in dengue virus-refractory populations and identifies novel virus-vector molecular interactions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7: e2295.

Slooff W, Janus J., Matthijsen AJC., Montizaan G., Ros. Integrated criteria document. PAHs. Bilthoven, Pays Bas: National Institute of Public Health and Environmental Protection; 1989.

Smith JL, Boyer GL, Mills E, Schulz KL. Toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, to multiple life stages of the burrowing mayfly, *Hexagenia*, and possible implications for recruitment. *Environ. Toxicol.* 2008; 23: 499–506.

Smith WA, Lamattina A, Collins M. Insulin signaling pathways in lepidopteran ecdysone secretion. *Front. Physiol.* 2014; 5: 19.

Soin T, Smagghe G. Endocrine disruption in aquatic insects: a review. *Ecotoxicology* 2007; 16: 83–93.

Srogi K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environ. Chem. Lett.* 2007; 5: 169–195.

Stanley D. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annu. Rev. Entomol.* 2006a; 51: 25–44.

Stanley D. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: Biological Significance. *Annu. Rev. Entomol.* 2006b; 51: 25–44.

Stanley D. Eicosanoids: progress towards manipulating insect immunity. *J. Appl. Entomol.* 2011; 135: 534–545.

Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 1998; 36: 2149–2173.

Staples CA, Woodburn K, Caspers N, Hall AT, Klečka GM. A Weight of Evidence Approach to the Aquatic Hazard Assessment of Bisphenol A. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* 2002; 8: 1083–1105.

Stefani F, Rusconi M, Valsecchi S, Marziali L. Evolutionary ecotoxicology of perfluoralkyl substances (PFASs) inferred from multigenerational exposure: A case study with *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Aquat. Toxicol.* 2014; 156: 41–51.

Stoks R, Córdoba-Aguilar A. Evolutionary Ecology of Odonata: A Complex Life Cycle Perspective. *Annu. Rev. Entomol.* 2012; 57: 249–265.

Strayer DL, Dudgeon D. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *J. North Am. Benthol. Soc.* 2010; 29: 344–358.

Strode C, Wondji CS, David J-P, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, et al. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2008; 38: 113–123.

Stumpf M, Ternes TA, Wilken RD, Rodrigues SV, Baumann W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ.* 1999; 225: 135–141.

Sykiotis GP, Bohmann D. Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell* 2008; 14: 76–85.

T

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006; 7: 85–96.

Tassou KT, Schulz R. Combined effects of temperature and pyriproxyfen stress in a full life-cycle test with *Chironomus riparius* (Insecta). *Environ. Toxicol. Chem.* 2012; 31: 2384–2390.

- Telang A, Peterson B, Frame L, Baker E, Brown MR. Analysis of molecular markers for metamorphic competency and their response to starvation or feeding in the mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Insect Physiol.* 2010; 56: 1925–1934.
- Tetreau G, Chandor-Proust A, Faucon F, Stalinski R, Akhouayri I, Prud'homme SM, et al. UV light and urban pollution: bad cocktail for mosquitoes? *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 2014; 146: 52–60.
- Theisen M, Behringer RR, Cadd GG, Brinster RL, McKnight GS. A C/EBP-binding site in the transferrin promoter is essential for expression in the liver but not the brain of transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 7666–7676.
- Tiebe M, Lutz M, De La Garza A, Buechling T, Boutros M, Teleman AA. REPTOR and REPTOR-BP Regulate Organismal Metabolism and Transcription Downstream of TORC1. *Dev. Cell* 2015; 33: 272–284.
- Timmermann SE, Briegel H. Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 1999; 45: 461–470.
- Tixier C, Singer HP, Oellers S, Müller SR. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 2003; 37: 1061–1068.
- Togola A. Présence et devenir des substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques [Internet]. Bordeaux 1; 2006. [cite le 2015 Sep 19] Available from: <http://www.theses.fr/2006BOR13314>
- Togola A, Budzinski H. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 2008; 1177: 150–158.
- Tohmé M, Prud'homme SM, Boulahtouf A, Samarut E, Brunet F, Bernard L, et al. Estrogen-related receptor γ is an in vivo receptor of bisphenol A. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2014; 28: 3124–3133.
- Tolle MA. Mosquito-borne Diseases. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* 2009; 39: 97–140.
- Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL, Pachter L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31: 46–53.
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 2009; 25: 1105–1111.
- Turner A, Rawling MC. Sorption of benzo [a] pyrene to sediment contaminated by acid mine drainage: contrasting particle concentration-dependencies in river water and seawater. *Water Res.* 2002; 36: 2011–2019.

U

- UE. Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. 2000.
- UE. Décision n° 2455/2001/CE du Parlement européen et du Conseil du 20 novembre 2001 établissant la liste des substances prioritaires dans le domaine de l'eau et modifiant la directive 2000/60/CE. 2001.
- Ugrankar R, Liu Y, Provaznik J, Schmitt S, Lehmann M. Lipin is a central regulator of adipose tissue development and function in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 2011; 31: 1646–1656.

V

Valtonen TM, Kangassalo K, Pölkki M, Rantala MJ. Transgenerational effects of parental larval diet on offspring development time, adult body size and pathogen resistance in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 2012; 7: e31611.

Vandeghechuchte MB, Janssen CR. Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2014; 764-765: 36–45.

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee D-H, et al. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr. Rev.* 2012; 33: 378–455.

Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr. Rev.* 2009; 30: 75–95.

Veraksa A, McGinnis N, Li X, Mohler J, McGinnis W. Cap ‘n’ collar B cooperates with a small Maf subunit to specify pharyngeal development and suppress deformed homeotic function in the *Drosophila* head. *Dev. Camb. Engl.* 2000; 127: 4023–4037.

VIDAL. Vidal : Le Dictionnaire. 91e édition 2015. Issy-les-Moulineaux: Vidal; 2015.

Vieno NM, Tuhkanen T, Kronberg L. Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. *Environ. Sci. Technol.* 2005; 39: 8220–8226.

Viganò L, Mandich A, Benfenati E, Bertolotti R, Bottero S, Porazzi E, et al. Investigating the Estrogenic Risk Along the River Po and Its Intermediate Section. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2006; 51: 641–651.

Vigeneron A, Geffard O, Coquery M, François A, Quéau H, Chaumot A. Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a *Gammarus fossarum* population inhabiting a low-level contaminated stream. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 2015; 24: 1239–1249.

Vigeneron A, Geffard O, Quéau H, Chaumot A. Mothers and not genes determine inherited differences in cadmium sensitivities within unexposed populations of the freshwater crustacean *Gammarus fossarum*. *Evol. Appl.* 2015: n/a–n/a.

Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR. Protein–protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 931–943.

Vital W, Rezende GL, Abreu L, Moraes J, Lemos FJA, Vaz I da S, et al. Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. *BMC Dev. Biol.* 2010; 10: 25.

Vörösmarty CJ, McIntyre PB, Gessner MO, Dudgeon D, Prusevich A, Green P, et al. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 2010; 467: 555–561.

W

Wang J, Gardinali PR. Uptake and depuration of pharmaceuticals in reclaimed water by mosquito fish (*Gambusia holbrooki*): A worst-case, multiple-exposure scenario: Uptake and depuration of pharmaceuticals by mosquito fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 2013; 32: 1752–1758.

- Wang Y, Wang Q, Hu L, Lu G, Li Y. Occurrence of estrogens in water, sediment and biota and their ecological risk in Northern Taihu Lake in China. *Environ. Geochem. Health* 2015; 37: 147–156.
- Warren JT, Wismar J, Subrahmanyam B, Gilbert LI. Woc (without children) gene control of ecdysone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001; 181: 1–14.
- Watts MM, Pascoe D, Carroll K. Chronic exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 2001; 55: 113–124.
- Watts MM, Pascoe D, Carroll K. Exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and bisphenol A--effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2003; 54: 207–215.
- Webb D. Freshwater shrimp (*Palaemonetes australis*) as a potential bioindicator of crustacean health. *Environ. Monit. Assess.* 2011; 178: 537–544.
- Weber-Boyvat M, Zhong W, Yan D, Olkkonen VM. Oxysterol-binding proteins: Functions in cell regulation beyond lipid metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 2013; 86: 89–95.
- Wei Y, Schatten H, Sun Q-Y. Environmental epigenetic inheritance through gametes and implications for human reproduction. *Hum. Reprod. Update* 2015; 21: 194–208.
- Weng S-C, Shiao S-H. Frizzled 2 is a key component in the regulation of TOR signaling-mediated egg production in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2015; 61: 17–24.
- Westbrook CJ, Reiskind MH, Pesko KN, Greene KE, Lounibos LP. Larval environmental temperature and the susceptibility of *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) to Chikungunya virus. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* 2010; 10: 241–247.
- Westerhuis JA, van Velzen EJJ, Hoefsloot HCJ, Smilde AK. Multivariate paired data analysis: multilevel PLSDA versus OPLSDA. *Metabolomics* 2010; 6: 119–128.
- WHO. State of the science of endocrine disrupting chemicals. Inter-Organization programme for the sound management of chemicals; 2012.
- Widarto TH, Krogh PH, Forbes VE. Nonylphenol stimulates fecundity but not population growth rate (λ) of *Folsomia candida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2007; 67: 369–377.
- Winkler M, Lawrence JR, Neu TR. Selective degradation of ibuprofen and clofibric acid in two model river biofilm systems. *Water Res.* 2001; 35: 3197–3205.
- Wintgens T, Gallenkemper M, Melin T. Occurrence and removal of endocrine disrupters in landfill leachate treatment plants. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 2003; 48: 127–134.
- Wu B, Zhang R, Cheng S-P, Ford T, Li A-M, Zhang X-X. Risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic ecosystems. *Ecotoxicology* 2011; 20: 1124–1130.

X

- Xiang Y, Liu Z, Huang X. br regulates the expression of the ecdysone biosynthesis gene *npc1*. *Dev. Biol.* 2010; 344: 800–808.

Xin F, Susiarjo M, Bartolomei MS. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? [Internet]. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015[cited 2015 Oct 20] Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952115001056>

Y

Yamamoto H, Nakamura Y, Moriguchi S, Nakamura Y, Honda Y, Tamura I, et al. Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water Res.* 2009; 43: 351–362.

Yamamoto T, Yasuhara A, Shiraishi H, Nakasugi O. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere* 2001; 42: 415–418.

Yaméogo L, Abban EK, Elouard JM, Traore K, Calamari D. Effects of permethrin as *Simulium* larvicide on non-target aquatic fauna in an African river. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 1993; 2: 157–174.

Ye X, Guo X, Cui X, Zhang X, Zhang H, Wang MK, et al. Occurrence and removal of endocrine-disrupting chemicals in wastewater treatment plants in the Three Gorges Reservoir area, Chongqing, China. *J. Environ. Monit. JEM* 2012; 14: 2204–2211.

Ye YH, Woolfit M, Huttley GA, Rancès E, Caragata EP, Popovici J, et al. Infection with a Virulent Strain of *Wolbachia* Disrupts Genome Wide-Patterns of Cytosine Methylation in the Mosquito *Aedes aegypti*. *PloS One* 2013; 8: e66482.

Yunker MB, Macdonald RW, Vingarzan R, Mitchell RH, Goyette D, Sylvestre S. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem.* 2002; 33: 489–515.

Z

Zakharkin SO, Headley VV, Kumar NK, Buck NA, Wheeler DE, Benes H. Female-specific expression of a hexamerin gene in larvae of an autogenous mosquito. *Eur. J. Biochem. FEBS* 2001; 268: 5713–5722.

Zambrano E, Guzmán C, Rodríguez-González GL, Durand-Carbajal M, Nathanielsz PW. Fetal programming of sexual development and reproductive function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2014; 382: 538–549.

Zanluca C, de Melo VCA, Mosimann ALP, Santos GIV Dos, Santos CND Dos, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2015; 110: 569–572.

Zenker A, Cicero MR, Prestinaci F, Bottoni P, Carere M. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *J. Environ. Manage.* 2014; 133: 378–387.

Zenobio JE, Sanchez BC, Archuleta LC, Sepulveda MS. Effects of triclocarban, N,N-diethyl-metaltoluamide, and a mixture of pharmaceuticals and personal care products on fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 2014; 33: 910–919.

Zhang G, Pan Z, Wang X, Mo X, Li X. Distribution and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the food web of Nansi Lake, China. *Environ. Monit. Assess.* 2015; 187

Zhang S, Zhang Q, Darisaw S, Ehie O, Wang G. Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. *Chemosphere* 2007; 66: 1057–1069.

Zhou G, Velasquez LS, Geiser DL, Mayo JJ, Winzerling JJ. Differential regulation of transferrin 1 and 2 in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2009; 39: 234–244.

Zhou JL, Maskaoui K. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and surface sediments from Daya Bay, China. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 2003; 121: 269–281.

Zinke I, Schütz CS, Katzenberger JD, Bauer M, Pankratz MJ. Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J.* 2002; 21: 6162–6173.

Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 2005; 122: 205–209.

De Zwart D, Posthuma L. Complex mixture toxicity for single and multiple species: proposed methodologies. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 2005; 24: 2665–2676.

ANNEXE 1

ANNEXE 1 - L4FO – Gènes sous-transcrits (1/2)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL000105		beta-alanine synthase, putative	2,65	0,007	Métabolisme des acides aminés
AAEL011130		alcohol dehydrogenase	1,87	0,007	Détoxication
AAEL011944	<i>CCEAE30</i>	carboxy/choline esterase Alpha Esterase	1,55	0,007	Détoxication
AAEL003079		glucosyl/glucuronosyl transferases	6,26	0,007	Détoxication
AAEL002309	<i>TPX4</i>	Thioredoxin Peroxidase,	1,44	0,007	Détoxication
AAEL008575		regulator of chromosome condensation	1,32	0,042	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL006044	<i>CYP325Q1</i>	cytochrome P450 (CYP325Q1)	1,44	0,035	Signalisation hormonale et neurotransmetteurs
AAEL006259	<i>GPROP2</i>	long wavelength sensitive opsin	3,53	0,007	Signalisation hormonale et neurotransmetteurs
AAEL000611	<i>CECE</i>	cecropin anti-microbial peptide	4,37	0,007	Immunité
AAEL000621	<i>CECN</i>	cecropin anti-microbial peptide	4,23	0,007	Immunité
AAEL010773	<i>CLIFE1</i>	Clip-Domain Serine Protease family E, Protease homologue,	3,24	0,007	Immunité
AAEL003279		clip-domain serine protease, putative	3,11	0,007	Immunité
AAEL005641	<i>CTLGA5</i>	C-Type Lectin (CTL) - galactose binding,	1,91	0,007	Immunité
AAEL003841	<i>DEFA</i>	defensin anti-microbial peptide	2,83	0,007	Immunité
AAEL003857	<i>DEFD</i>	defensin anti-microbial peptide	2,27	0,007	Immunité
AAEL003832	<i>DEFC</i>	defensin anti-microbial peptide	2,01	0,007	Immunité
AAEL001802		macroglobulin/complement	1,70	0,007	Immunité
AAEL014544	<i>PPO6</i>	prophenoxidase	2,57	0,007	Immunité
AAEL013501	<i>PPO4</i>	prophenoxidase	1,35	0,042	Immunité
AAEL010884		ADP,ATP carrier protein	1,67	0,007	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL002541		cystinosin	1,43	0,028	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL013983		hexamerin 2 beta	45,73	0,007	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL013981		hexamerin 2 beta	45,19	0,007	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL008045		hexamerin 2 beta	10,99	0,007	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL013757		hexamerin 2 beta	7,57	0,007	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL011169		hexamerin 2 beta	7,31	0,007	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL013759		hexamerin 2 beta	7,27	0,007	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL000765		hexamerin 2 beta	5,60	0,007	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL008817		hexamerin 2 beta	5,37	0,007	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL013990		hexamerin 2 beta	3,53	0,007	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL004805		potassium-dependent sodium-calcium exchanger, putative	1,35	0,035	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes

ANNEXE 1 - L4F0 – Gènes sous-transcrits (2/2)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL013884		synaptic vesicle protein	1,63	0,017	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL010393		ferritin subunit, putative	2,27	0,007	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL010396		secreted ferritin G subunit precursor, putative	2,45	0,007	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL015458		transferrin	1,55	0,007	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL015639		transferrin	1,47	0,017	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL003317		alkaline phosphatase	8,30	0,007	Kinases et phosphatases
AAEL003286		alkaline phosphatase	3,77	0,007	Kinases et phosphatases
AAEL003905		alkaline phosphatase	3,26	0,007	Kinases et phosphatases
AAEL003297		alkaline phosphatase	3,19	0,007	Kinases et phosphatases
AAEL003289		alkaline phosphatase	1,65	0,007	Kinases et phosphatases
AAEL008789		apolipoprotein-III, putative	1,67	0,007	Métabolisme des lipides
AAEL002237		fatty acid synthase	20,04	0,007	Métabolisme des lipides
AAEL006027		lipase	1,44	0,049	Métabolisme des lipides
AAEL000828		vitellogenin, putative	1,55	0,023	Métabolisme des lipides
AAEL001697		adenylate cyclase, putative	2,35	0,007	Autres enzymes
AAEL013349	<i>l2gl</i>	lethal(2)essential for life protein	1,81	0,007	Autres
AAEL010670	<i>l2gl</i>	lethal(2)essential for life protein	1,81	0,007	Autres
AAEL004342	<i>OPB18</i>	odorant binding protein OBP18	3,77	0,012	Autres
AAEL004343	<i>OBP19</i>	odorant binding protein OBP19	6,50	0,007	Autres
AAEL005772	<i>OBP22</i>	odorant binding protein OBP22	1,74	0,007	Autres
AAEL001826	<i>OBP8</i>	odorant binding protein OBP8	1,93	0,007	Autres
AAEL011167		cathepsin 1	1,41	0,007	Métabolisme des protéines
AAEL002655		matrix metalloproteinase	4,41	0,007	Métabolisme des protéines
AAEL002699	<i>SRPN7</i>	Serine Protease Inhibitor (serpin) likely cleavage at R/S,	1,57	0,007	Métabolisme des protéines
AAEL010139		serine protease, putative	2,19	0,007	Métabolisme des protéines
AAEL007938		serine-type endopeptidase,	1,38	0,012	Métabolisme des protéines
AAEL003716		ribonuclease UK114, putative	1,44	0,035	Métabolisme des ARN
AAEL014668		ankyrin 2,3/unc44	1,36	0,032	Structure
AAEL002853		ccaat/enhancer binding protein	1,62	0,007	Régulation de la transcription
AAEL017380		unknown putative protein	16,10	0,007	Indéterminée
AAEL008598		unknown putative protein	8,42	0,007	Indéterminée
AAEL017384		unknown putative protein	3,76	0,007	Indéterminée
AAEL001650		unknown putative protein	2,72	0,007	Indéterminée
AAEL014990		unknown putative protein	2,71	0,007	Indéterminée
AAEL005971		unknown putative protein	2,65	0,007	Indéterminée
AAEL017144		unknown putative protein	2,27	0,007	Indéterminée
AAEL006672		unknown putative protein	2,17	0,007	Indéterminée
AAEL008050		unknown putative protein	2,16	0,007	Indéterminée
AAEL005178		unknown putative protein	2,13	0,007	Indéterminée
AAEL007611		unknown putative protein	1,99	0,007	Indéterminée
AAEL017309		unknown putative protein	1,82	0,007	Indéterminée
AAEL009899		unknown putative protein	1,67	0,007	Indéterminée
AAEL015657		unknown putative protein	1,62	0,007	Indéterminée
AAEL013781		unknown putative protein	1,60	0,007	Indéterminée
AAEL006890		unknown putative protein	1,58	0,007	Indéterminée
AAEL003190		unknown putative protein	1,51	0,007	Indéterminée

ANNEXE 1 - L4F0 – Gènes sous-transcrits (3/3)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q- valeur	Classe
AAEL007464		unknown putative protein	1,50	0,039	Indéterminée
AAEL014852		unknown putative protein	1,49	0,007	Indéterminée
AAEL012309		unknown putative protein	1,49	0,039	Indéterminée
AAEL007758		unknown putative protein	1,45	0,035	Indéterminée
AAEL008259		unknown putative protein	1,36	0,032	Indéterminée
AAEL011298		unknown putative protein	1,36	0,023	Indéterminée

ANNEXE 2

ANNEXE 2 - L4F0 – Gènes sur-transcrits (1/2)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL008715		AAA ATPase	2,98	0,007	Métabolisme respiratoire
AAEL002191		cuticle protein, putative	1,34	0,035	Cuticule
AAEL002241		cuticle protein, putative	1,34	0,035	Cuticule
AAEL002211		cuticle protein, putative	1,38	0,007	Cuticule
AAEL009783		cuticle protein, putative	5,02	0,007	Cuticule
AAEL003242		pupal cuticle protein, putative	1,40	0,012	Cuticule
AAEL005380	<i>CYP4H28</i>	cytochrome P450 (CYP4H28)	1,35	0,032	Détoxication
AAEL015354		oxidase/oxidase	1,69	0,007	Détoxication
AAEL017410	<i>GPRGRP2_2</i>	GPCR Gastrin/Bombesin Family	+ infini	0,007	Signalisation hormonale et neurotransmetteurs
AAEL005561	<i>pma3</i>	plasma membrane calcium-transporting ATPase 3	1,33	0,046	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL013801		sulphate transporter	1,46	0,023	Trafic intra et extracellulaire – Chaperonnes
AAEL000931		alkaline phosphatase	1,40	0,042	Kinases et phosphatases
AAEL009077		alkaline phosphatase	1,98	0,007	Kinases et phosphatases
AAEL014792		phosphatase and actin regulator	1,74	0,007	Kinases et phosphatases
AAEL003742		glucosylceramidase	1,37	0,028	Métabolisme des lipides
AAEL012297		sterol desaturase	1,49	0,007	Métabolisme des lipides
AAEL002522		adenosine deaminase acting on RNA (adar)-2	1,38	0,046	Autres enzymes
AAEL009022		adenylate cyclase type	1,47	0,012	Autres enzymes
AAEL010204		dihydropyrimidine dehydrogenase	1,61	0,007	Autres enzymes
AAEL003508		serine-pyruvate aminotransferase	1,36	0,049	Autres enzymes
AAEL013352	<i>l2efl</i>	lethal(2)essential for life protein	1,40	0,035	Autres
AAEL011230		chymotrypsin, putative	1,75	0,007	Métabolisme des protéines
AAEL009721		paraplegin	1,45	0,012	Métabolisme des protéines
AAEL012589		prolylcarboxypeptidase, putative	2,56	0,032	Métabolisme des protéines
AAEL013427		serine protease, putative	2,33	0,032	Métabolisme des protéines
AAEL008781		serine-type endopeptidase,	2,27	0,049	Métabolisme des protéines
AAEL011975		ubiquitin specific protease	1,40	0,007	Métabolisme des protéines
AAEL004704		map kinase-interacting serine/threonine kinase	1,33	0,046	Transduction du signal
AAEL002565		titin	1,46	0,007	Structure
AAEL005324		titin	1,51	0,007	Structure
AAEL005317		titin (connectin)	1,37	0,007	Structure
AAEL013892		wiskott-aldrich syndrome protein	1,41	0,012	Structure
AAEL008717		unknown putative protein	1,35	0,042	Indéterminée
AAEL010757		unknown putative protein	1,37	0,017	Indéterminée
AAEL004197		unknown putative protein	1,39	0,035	Indéterminée
AAEL008298		unknown putative protein	1,40	0,012	Indéterminée
AAEL014693		unknown putative protein	1,41	0,017	Indéterminée
AAEL008885		unknown putative protein	1,42	0,007	Indéterminée
AAEL013303		unknown putative protein	1,44	0,007	Indéterminée
AAEL017140		unknown putative protein	1,47	0,007	Indéterminée
AAEL010187		unknown putative protein	1,47	0,007	Indéterminée
AAEL017570		unknown putative protein	1,50	0,007	Indéterminée
AAEL001814		unknown putative protein	1,51	0,012	Indéterminée

ANNEXE 2 - L4F0 – Gènes sur-transcrits (2/2)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q- valeur	Classe
AAEL017034		unknown putative protein	1,52	0,007	Indéterminée
AAEL007648		unknown putative protein	1,57	0,007	Indéterminée
AAEL006084		unknown putative protein	1,68	0,049	Indéterminée
AAEL017154		unknown putative protein	1,81	0,007	Indéterminée
AAEL004798		unknown putative protein	1,97	0,007	Indéterminée
AAEL002495		unknown putative protein	2,08	0,007	Indéterminée
AAEL014938		unknown putative protein	2,15	0,007	Indéterminée
AAEL015331		unknown putative protein	2,59	0,007	Indéterminée

ANNEXE 3

ANNEXE 3 - FemFO – Gènes sur-transcrits					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL002046	<i>CYP6CB1</i>	cytochrome P450	1,80	0,018	Détoxication
AAEL014891	<i>CYP6P12</i>	cytochrome P450	+ infini	0,018	Détoxication
AAEL013640		lung carbonyl reductase	1,58	0,033	Détoxication
AAEL000611	<i>CECE</i>	cecropin anti-microbial peptide	2,85	0,018	Immunité
AAEL000627	<i>CECA</i>	cecropin anti-microbial peptide	+ infini	0,018	Immunité
AAEL013990		hexamerin 2 beta	1,57	0,018	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL005533		synaptic vesicle protein	1,76	0,018	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL002591	<i>OBP13</i>	odorant binding protein OBP13	1,68	0,018	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL011009		fibrinogen and fibronectin	1,65	0,018	Structure
AAEL003467		unknown putative protein	1,48	0,033	Indéterminée
AAEL000316		unknown putative protein	1,52	0,047	Indéterminée
AAEL009181		unknown putative protein	1,53	0,018	Indéterminée
AAEL017571		unknown putative protein	1,54	0,047	Indéterminée
AAEL011476		unknown putative protein	1,55	0,018	Indéterminée
AAEL012357		unknown putative protein	1,55	0,018	Indéterminée
AAEL014855		unknown putative protein	1,60	0,018	Indéterminée
AAEL010529		unknown putative protein	1,64	0,018	Indéterminée
AAEL002917		unknown putative protein	1,67	0,018	Indéterminée
AAEL012534		unknown putative protein	1,71	0,018	Indéterminée
AAEL002920		unknown putative protein	1,94	0,018	Indéterminée
AAEL002467		unknown putative protein	2,67	0,018	Indéterminée
AAEL001718		unknown putative protein	23,92	0,018	Indéterminée

ANNEXE 4

ANNEXE 4 - FemF0 – Gènes sous-transcrits					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL011518		aspartyl-tRNA synthetase	1,80	0,018	Métabolisme des acides aminés
AAEL014553		triacylglycerol lipase, pancreatic	1,74	0,018	Métabolisme des lipides
AAEL006109	<i>OBP23</i>	odorant binding protein OBP23	3,74	0,018	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL006106	<i>OBP26</i>	odorant binding protein OBP26	3,45	0,018	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL011292		protease m1 zinc metalloprotease	2,28	0,018	Métabolisme des protéines
AAEL009244		serine-type endopeptidase,	1,57	0,018	Métabolisme des protéines
AAEL007601		trypsin	3,57	0,018	Métabolisme des protéines
AAEL005656		myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle	1,54	0,033	Structure
AAEL004409		yellow protein, putative	1,82	0,018	Structure
AAEL003843		unknown putative protein	3,13	0,018	Indéterminée
AAEL007592		unknown putative protein	2,48	0,018	Indéterminée
AAEL012214		unknown putative protein	2,41	0,018	Indéterminée
AAEL001392		unknown putative protein	2,16	0,018	Indéterminée
AAEL006971		unknown putative protein	1,95	0,018	Indéterminée
AAEL005318		unknown putative protein	1,82	0,018	Indéterminée
AAEL005332		unknown putative protein	1,53	0,018	Indéterminée
AAEL012613		unknown putative protein	1,49	0,033	Indéterminée
AAEL017090		unknown putative protein	- infini	0,018	Indéterminée

ANNEXE 5

ANNEXE 5 - L1F1 – Gènes sous-transcrits (1/10)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL011206		aminoacylase, putative	1,22	0,049	Métabolisme des acides aminés
AAEL010514		aminoacyl-tRNA synthetase auxiliary protein, 43kD, putative	1,55	0,007	Métabolisme des acides aminés
AAEL006834		glutamate semialdehyde dehydrogenase	1,45	0,001	Métabolisme des acides aminés
AAEL010008		crotonobetainyl-CoA-hydratase, putative	1,22	0,026	Métabolisme mitochondrial
AAEL014944		cytochrome c oxidase polypeptide	1,22	0,025	Métabolisme mitochondrial
AAEL018662,AAEL018664,AAEL018667,AAEL018668,AAEL018669,AAEL018671		Gènes mitochondriaux	1,75	0,001	Métabolisme mitochondrial
AAEL000314		malate dehydrogenase	1,36	0,010	Métabolisme mitochondrial
AAEL005538		mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase B16.6 subunit, putative	1,27	0,013	Métabolisme mitochondrial
AAEL005693		mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase B16.6 subunit, putative	1,25	0,014	Métabolisme mitochondrial
AAEL000138		NADH dehydrogenase, putative	1,23	0,028	Métabolisme mitochondrial
AAEL013043		NADH dehydrogenase, putative	1,50	0,014	Métabolisme mitochondrial
AAEL010230		NADH:ubiquinone dehydrogenase, putative	1,22	0,027	Métabolisme mitochondrial
AAEL000766		ubiquinol cytochrome C oxidoreductase-subunit 6.4kD-subunit, putative	1,26	0,037	Métabolisme mitochondrial
AAEL012113		vacuolar ATP synthase proteolipid subunit	1,20	0,042	Métabolisme mitochondrial
AAEL004095		aldo-keto reductase	1,44	0,037	Métabolisme des sucres
AAEL000642		alpha-amylase	1,43	0,008	Métabolisme des sucres
AAEL008452		alpha-amylase	1,37	0,022	Métabolisme des sucres
AAEL004374		alpha-glucosidase II, alpha-subunit, putative	1,37	0,001	Métabolisme des sucres
AAEL009951		dimeric dihydrodiol dehydrogenase	1,40	0,001	Métabolisme des sucres
AAEL004002		glucose dehydrogenase	1,21	0,037	Métabolisme des sucres
AAEL012994		glucose-6-phosphate isomerase	1,21	0,037	Métabolisme des sucres
AAEL006273		maltose phosphorylase	1,77	0,001	Métabolisme des sucres
AAEL002331		mannose-6-phosphate isomerase	1,43	0,003	Métabolisme des sucres
AAEL014865		pyruvate dehydrogenase	1,24	0,023	Métabolisme des sucres
AAEL011686		starch branching enzyme ii	1,34	0,050	Métabolisme des sucres
AAEL001092		udp-glucose pyrophosphatase	1,26	0,032	Métabolisme des sucres
AAEL008983		adult Protéines cuticulaires protein, putative	1,94	0,001	Protéines cuticulaires
AAEL014982		adult Protéines cuticulaires protein, putative	1,96	0,001	Protéines cuticulaires
AAEL002959		brain chitinase and chia	1,33	0,030	Protéines cuticulaires
AAEL002969		brain chitinase and chia	1,59	0,006	Protéines cuticulaires
AAEL004897		brain chitinase and chia	1,26	0,011	Protéines cuticulaires
AAEL010963		brain chitinase and chia	1,44	0,002	Protéines cuticulaires
AAEL012370		brain chitinase and chia	1,31	0,005	Protéines cuticulaires
AAEL005684		chitinase	1,31	0,032	Protéines cuticulaires
AAEL008765		Protéines cuticulaires protein, putative	1,26	0,008	Protéines cuticulaires
AAEL001735		pupal Protéines cuticulaires protein 78E, putative	1,91	0,001	Protéines cuticulaires
AAEL001743		pupal Protéines cuticulaires protein 78E, putative	2,38	0,001	Protéines cuticulaires
AAEL008866		pupal Protéines cuticulaires protein 78E, putative	1,24	0,035	Protéines cuticulaires
AAEL000085		pupal Protéines cuticulaires protein, putative	2,25	0,001	Protéines cuticulaires
AAEL007739		pupal Protéines cuticulaires protein, putative	1,60	0,001	Protéines cuticulaires
AAEL008285		pupal Protéines cuticulaires protein, putative	1,55	0,009	Protéines cuticulaires
AAEL012457		alcohol dehydrogenase	1,42	0,001	Détoxication
AAEL015034		alcohol dehydrogenase	1,57	0,004	Détoxication

ANNEXE 5 - L1F1 – Gènes sous-transcrits (2/10)					
Numéro d'accession Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL015578		alpha-esterase	1,27	0,037	Détoxication
AAEL011269		ATP-binding cassette transporter	1,45	0,001	Détoxication
AAEL003181	<i>CCEAE3C</i>	Carboxy/choline esterase Alpha Esterase	1,54	0,001	Détoxication
AAEL003201	<i>CCEAE5C</i>	Carboxy/choline esterase Alpha Esterase	1,30	0,002	Détoxication
AAEL013407	<i>CAT1</i>	catalase	1,25	0,008	Détoxication
AAEL002085	<i>CYP4H31</i>	cytochrome P450 (CYP4H31)	1,30	0,037	Détoxication
AAEL013554	<i>CYP4J14</i>	cytochrome P450 (CYP4J14)	1,39	0,031	Détoxication
AAEL014617	<i>CYP9J28</i>	cytochrome P450 (CYP9J28)	1,39	0,014	Détoxication
AAEL006802	<i>CYP9J22</i>	cytochrome P450	1,40	0,018	Détoxication
AAEL006811	<i>CYP9J8</i>	cytochrome P450	1,34	0,045	Détoxication
AAEL007473	<i>CYP6AH1</i>	cytochrome P450	1,26	0,023	Détoxication
AAEL007815	<i>CYP4D24</i>	cytochrome P450	1,28	0,030	Détoxication
AAEL009124	<i>CYP6N12</i>	cytochrome P450	1,52	0,001	Détoxication
AAEL009128	<i>CYP6M6</i>	cytochrome P450	1,30	0,029	Détoxication
AAEL014607	<i>CYP9J27</i>	cytochrome P450	1,38	0,001	Détoxication
AAEL014609	<i>CYP9J26</i>	cytochrome P450	1,32	0,003	Détoxication
AAEL014684	<i>CYP6F3</i>	cytochrome P450	1,49	0,010	Détoxication
AAEL014893	<i>CYP6BB2</i>	cytochrome P450	1,89	0,001	Détoxication
AAEL011314		epoxide hydrolase	1,20	0,047	Détoxication
AAEL001586		glucosyl/glucuronosyl transferases	1,28	0,011	Détoxication
AAEL011937		glucosyl/glucuronosyl transferases	1,26	0,020	Détoxication
AAEL008397	<i>GPXH2</i>	glutathione peroxidase	1,37	0,045	Détoxication
AAEL001061	<i>GSTD1</i>	glutathione S-transferase (GSTD1)	1,38	0,001	Détoxication
AAEL001078	<i>GSTD2</i>	glutathione S-transferase (GSTD2)	1,51	0,009	Détoxication
AAEL010500	<i>GSTX2</i>	glutathione transferase	1,29	0,005	Détoxication
AAEL011741	<i>GSTS1</i>	glutathione transferase	1,37	0,001	Détoxication
AAEL017085	<i>GSTO1</i>	glutathione transferase	1,21	0,044	Détoxication
AAEL006014	<i>HPX1</i>	heme peroxidase	1,31	0,013	Détoxication
AAEL002957		lactoylglutathione lyase	1,32	0,001	Détoxication
AAEL012189		multidrug resistance protein 1 (ATP-binding cassette C1)	1,49	0,030	Détoxication
AAEL005416		oxidase/peroxidase	1,29	0,003	Détoxication
AAEL009351		thioredoxin, putative	1,27	0,006	Détoxication
AAEL000494		histone H2A	1,93	0,038	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL006748		ss-DNA binding protein 12RNP2 precursor, putative	1,21	0,042	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL014594	<i>CYP31A1</i>	cytochrome P450	1,23	0,026	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL010951	<i>GAD</i>	glutamate decarboxylase	1,35	0,018	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL000364		glycine cleavage system h protein	1,41	0,005	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL013324		high affinity nuclear juvenile hormone binding protein, putative	3,19	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL012680		juvenile hormone-inducible protein, putative	1,32	0,002	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL018197		putative alpha-methyl dopa hypersensitive protein	1,66	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL005718	<i>CLIPA3</i>	Clip-Domain Serine Protease family A. Protease homologue	1,39	0,046	Immunité
AAEL015109	<i>CLIPD1</i>	Clip-Domain Serine Protease family D.	1,98	0,001	Immunité
AAEL004540	<i>CLIPC6</i>	Clip-Domain Serine Protease family C.	1,36	0,026	Immunité
AAEL013566		C-Type lectin (CTL) - galactose binding	2,17	0,001	Immunité
AAEL011078	<i>CTLGA1</i>	C-Type Lectin (CTL) - galactose binding.	1,65	0,001	Immunité
AAEL013853	<i>CTLGA2</i>	C-Type Lectin (CTL) - galactose binding.	1,53	0,001	Immunité
AAEL018265	<i>CTL9</i>	C-Type lectin (CTL)	1,52	0,001	Immunité
AAEL009670	<i>LYSC9</i>	C-Type Lysozyme (Lys-D).	1,59	0,001	Immunité
AAEL009176	<i>GNBPB3</i>	Gram-Negative Binding Protein (GNBP) or Beta-1 3-Glucan Binding Protein (BGBP).	1,27	0,007	Immunité
AAEL010129	<i>LRIM11</i>	leucine-rich immune protein (Short)	1,30	0,004	Immunité
AAEL002949		Osiris, putative	1,96	0,001	Immunité

ANNEXE 5 - L1F1 – Gènes sous-transcrits (3/10)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL007897	<i>SPZ4</i>	spaetzle-like cytokine	1,26	0,009	Immunité
AAEL011429		clathrin coat adaptor ap3 medium chain	1,24	0,049	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL006560		cop-coated vesicle membrane protein P24	1,26	0,006	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL005779		CRAL/TRIO domain-containing protein	1,23	0,020	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL010027		CRAL/TRIO domain-containing protein	1,25	0,021	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL009214		diazepam binding inhibitor, putative	1,23	0,015	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL005056		electron transfer flavoprotein beta-subunit	1,28	0,003	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL006109	<i>OBP23</i>	odorant binding protein OBP23	1,19	0,043	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL006106	<i>OBP26</i>	odorant binding protein OBP26	1,23	0,017	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL002618	<i>OBP65</i>	odorant binding protein OBP65	1,47	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL015484		mitochondrial oxodicarboxylate carrier	1,49	0,016	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL015583		molybdopterin synthase sulfur carrier subunit	2,32	0,012	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL012240		protein transport protein sec13	1,28	0,003	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL010032		translocon-associated protein, beta subunit precursor (trap-beta) (signal sequence receptor beta subunit)	1,22	0,021	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL005605		adenylsulphate kinase	1,27	0,024	Kinases et phosphatases
AAEL003289		alkaline phosphatase	1,38	0,023	Kinases et phosphatases
AAEL003905		alkaline phosphatase	1,29	0,008	Kinases et phosphatases
AAEL011468		protein kinase C inhibitor, putative	1,29	0,038	Kinases et phosphatases
AAEL008006		3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	1,44	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL002658		AMP dependent ligase	1,23	0,034	Métabolisme des lipides
AAEL002668		AMP dependent ligase	1,53	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL007972		apolipoprotein D, putative	1,42	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL009566		apolipoprotein D, putative	1,27	0,006	Métabolisme des lipides
AAEL013574		apolipoprotein D, putative	1,29	0,026	Métabolisme des lipides
AAEL005981	<i>SCRB16</i>	Class B Scavenger Receptor (CD36 domain).	1,28	0,020	Métabolisme des lipides
AAEL007213		delta(9)-desaturase, putative	1,22	0,041	Métabolisme des lipides
AAEL008878		diacylglycerol o-acyltransferase	1,28	0,015	Métabolisme des lipides
AAEL013844		diazepam binding inhibitor, putative	1,20	0,046	Métabolisme des lipides
AAEL006980		lipase	1,24	0,024	Métabolisme des lipides
AAEL007051		lipase	1,97	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL007063		lipase	1,26	0,004	Métabolisme des lipides
AAEL007068		lipase	1,24	0,024	Métabolisme des lipides
AAEL007070		lipase	1,21	0,044	Métabolisme des lipides
AAEL011008		lipase	1,40	0,003	Métabolisme des lipides
AAEL012344		lipase 1 precursor	1,48	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL015038		palmitoyl-protein thioesterase	1,49	0,015	Métabolisme des lipides
AAEL005957	<i>plb1</i>	phospholipase b	1,62	0,007	Métabolisme des lipides
AAEL009111		sphingomyelin phosphodiesterase	1,26	0,005	Métabolisme des lipides
AAEL009634		steroid dehydrogenase	1,20	0,044	Métabolisme des lipides
AAEL006966	<i>vgt</i>	vitellogenin, putative	1,26	0,035	Métabolisme des lipides
AAEL014045		allantoicase	1,29	0,011	Autres enzymes
AAEL015308	<i>SCRAL1</i>	Class A Scavenger Receptor (SRCR domain) with Lysyl Oxidase domain.	1,42	0,010	Autres enzymes
AAEL009629		endoU protein, putative	1,33	0,001	Autres enzymes
AAEL009462		hydroxyacylglutathione hydrolase	1,30	0,017	Autres enzymes
AAEL006144		isopentenyl-diphosphate delta isomerase	1,26	0,022	Autres enzymes
AAEL008701		myoinositol oxygenase	1,39	0,003	Autres enzymes

ANNEXE 5 - L1F1 – Gènes sous-transcrits (4/10)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL000111		nitrilase, putative	1,42	0,015	Autres enzymes
AAEL007669		oxidoreductase	1,43	0,001	Autres enzymes
AAEL007549		phosphatidylethanolamine-binding protein	1,36	0,001	Autres enzymes
AAEL011263		phosphatidylethanolamine-binding protein	1,36	0,004	Autres enzymes
AAEL012666		phosphatidylethanolamine-binding protein	1,24	0,026	Autres enzymes
AAEL015260		phosphatidylethanolamine-binding protein, putative	1,27	0,044	Autres enzymes
AAEL014936		sarcosine dehydrogenase	1,36	0,001	Autres enzymes
AAEL001427		short-chain dehydrogenase	1,41	0,005	Autres enzymes
AAEL006224		short-chain dehydrogenase	1,26	0,013	Autres enzymes
AAEL013603		short-chain dehydrogenase	1,37	0,047	Autres enzymes
AAEL014252		sulfite reductase	1,33	0,023	Autres enzymes
AAEL002194		uricase	1,29	0,021	Autres enzymes
AAEL005159		latent nuclear antigen, putative	1,28	0,008	Autres
AAEL007315		symbol, putative	1,36	0,032	Autres
AAEL009066		symbol, putative	1,20	0,045	Autres
AAEL018643	<i>Sphynx_2</i>	Sphinx conserved region 2	- infini	0,013	Autres
AAEL005266		40S ribosomal protein S14	1,20	0,048	Métabolisme des protéines
AAEL009196		calpain	1,30	0,044	Métabolisme des protéines
AAEL009637		cathepsin b	1,32	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL006383		chymotrypsin, putative	1,40	0,009	Métabolisme des protéines
AAEL010437		heparan n-sulfatase	1,21	0,049	Métabolisme des protéines
AAEL010930		l-asparaginase	1,33	0,042	Métabolisme des protéines
AAEL003834		metalloproteinase, putative	1,40	0,004	Métabolisme des protéines
AAEL009820		metalloproteinase, putative	1,95	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL011547		metalloproteinase, putative	1,30	0,012	Métabolisme des protéines
AAEL011550		metalloproteinase, putative	1,50	0,004	Métabolisme des protéines
AAEL014514		metalloproteinase, putative	1,48	0,006	Métabolisme des protéines
AAEL015412		metalloproteinase, putative	1,63	0,026	Métabolisme des protéines
AAEL010596		n-acetylgalactosaminyltransferase	1,38	0,008	Métabolisme des protéines
AAEL011095		n-acetylgalactosaminyltransferase	1,29	0,014	Métabolisme des protéines
AAEL006371		oviductin	1,33	0,010	Métabolisme des protéines
AAEL007514		oviductin	1,93	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL007519		oviductin	1,58	0,023	Métabolisme des protéines
AAEL013841		paraplegin	1,26	0,016	Métabolisme des protéines
AAEL011662		plasma glutamate carboxypeptidase	1,51	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL008699		prolylcarboxypeptidase, putative	1,24	0,010	Métabolisme des protéines
AAEL011291		protease m1 zinc metalloprotease	1,49	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL012217		protease m1 zinc metalloprotease	1,28	0,003	Métabolisme des protéines
AAEL012774		protease m1 zinc metalloprotease	1,28	0,007	Métabolisme des protéines
AAEL012776		protease m1 zinc metalloprotease	1,25	0,006	Métabolisme des protéines
AAEL015036		protease S51 alpha-aspartyl dipeptidase	1,50	0,005	Métabolisme des protéines
AAEL018208		putative Carboxypeptidase M	1,21	0,028	Métabolisme des protéines
AAEL017507		putative serine-type endopeptidase	1,62	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL018345	<i>thetaTry</i>	putative trypsin theta precursor	1,34	0,009	Métabolisme des protéines
AAEL011587		ribosomal protein L27, putative	1,26	0,017	Métabolisme des protéines
AAEL000068	<i>Rps25</i>	ribosomal protein S25, putative	1,22	0,028	Métabolisme des protéines
AAEL008199		serine collagenase 1 precursor, putative	1,32	0,028	Métabolisme des protéines
AAEL008201		serine collagenase 1 precursor, putative	1,24	0,050	Métabolisme des protéines
AAEL008203		serine collagenase 1 precursor, putative	1,27	0,019	Métabolisme des protéines
AAEL008212		serine collagenase 1 precursor, putative	1,46	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL012558		serine collagenase 1 precursor, putative	1,45	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL012559		serine collagenase 1 precursor, putative	1,38	0,013	Métabolisme des protéines
AAEL001178		serine protease	1,66	0,005	Métabolisme des protéines

ANNEXE 5 - L1F1 – Gènes sous-transcrits (5/10)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL002593		serine protease	1,23	0,026	Métabolisme des protéines
AAEL008207		serine protease	2,26	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL008208		serine protease	1,33	0,008	Métabolisme des protéines
AAEL008221		serine protease	1,23	0,025	Métabolisme des protéines
AAEL008364	<i>SRPN9</i>	Serine Protease Inhibitor (serpin) likely cleavage at S/S.	1,32	0,008	Métabolisme des protéines
AAEL006627		serine-type endopeptidase	1,50	0,014	Métabolisme des protéines
AAEL008218		serine-type endopeptidase	1,33	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL008567		serine-type endopeptidase	1,76	0,004	Métabolisme des protéines
AAEL011889		serine-type endopeptidase	1,39	0,044	Métabolisme des protéines
AAEL011913		serine-type endopeptidase	1,64	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL011916		serine-type endopeptidase	1,24	0,016	Métabolisme des protéines
AAEL011919		serine-type endopeptidase	1,47	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL011929		serine-type endopeptidase	1,30	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL013281		serine-type endopeptidase	1,47	0,013	Métabolisme des protéines
AAEL006376		trypsin, putative	1,56	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL006378		trypsin, putative	1,35	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL006384		trypsin, putative	1,43	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL008214		trypsin, putative	1,51	0,002	Métabolisme des protéines
AAEL009853		trypsin, putative	1,44	0,022	Métabolisme des protéines
AAEL015104		trypsin, putative	1,41	0,007	Métabolisme des protéines
AAEL015528		trypsin, putative	1,42	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL006365		trypsin-alpha, putative	1,54	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL015102		trypsin-alpha, putative	1,41	0,036	Métabolisme des protéines
AAEL006368		trypsin-beta, putative	1,33	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL009764		xaa-pro aminopeptidase	1,21	0,037	Métabolisme des protéines
AAEL008600		zinc carboxypeptidase	1,20	0,035	Métabolisme des protéines
AAEL011722		zinc carboxypeptidase	1,57	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL013269		zinc carboxypeptidase	1,31	0,007	Métabolisme des protéines
AAEL015559		zinc carboxypeptidase	1,26	0,014	Métabolisme des protéines
AAEL005049		heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	1,26	0,022	Métabolisme des ARN
AAEL015450		ribonuclease UK114, putative	1,40	0,026	Métabolisme des ARN
AAEL014169		small nuclear ribonucleoprotein, core, putative	1,53	0,004	Métabolisme des ARN
AAEL013978		step ii splicing factor slu7	1,35	0,023	Métabolisme des ARN
AAEL017800	<i>U12</i>	U12 spliceosomal RNA	- infini	0,013	Métabolisme des ARN
AAEL012513		calcium-binding protein E63-1	1,31	0,035	Transduction du signal
AAEL008108		guanine nucleotide-binding protein beta 2 (g protein beta2)	1,34	0,037	Transduction du signal
AAEL011522		MRAS2, putative	1,66	0,001	Transduction du signal
AAEL010171	<i>PGRPLB</i>	peptidoglycan recognition protein (Long)	1,62	0,004	Transduction du signal
AAEL017056	<i>PGRPS4</i>	Peptidoglycan Recognition Protein (Short)	1,28	0,001	Transduction du signal
AAEL007039		peptidoglycan recognition protein (short)	1,38	0,001	Transduction du signal
AAEL001969		protein serine/threonine kinase, putative	1,25	0,006	Transduction du signal
AAEL001981		protein serine/threonine kinase, putative	2,40	0,001	Transduction du signal
AAEL002040		protein serine/threonine kinase, putative	3,07	0,026	Transduction du signal
AAEL004616		actin	1,26	0,007	Structure
AAEL013656		bm-40 precursor	1,26	0,014	Structure
AAEL008303		calponin/transgelin	1,23	0,029	Structure
AAEL001745		candidate tumor suppressor protein	1,77	0,001	Structure
AAEL005097		cold induced protein (BnC24A), putative	1,21	0,033	Structure
AAEL011022		cysteine-rich protein, putative	1,33	0,014	Structure
AAEL010360		Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP1 homolog	1,45	0,006	Structure
AAEL014432		fibrinogen and fibronectin	2,50	0,001	Structure
AAEL014520		follistatin	1,31	0,001	Structure
AAEL001965		imaginal disc growth factor	1,29	0,014	Structure

ANNEXE 5 - L1F1 – Gènes sous-transcrits (6/10)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL002023		imaginal disc growth factor	1,33	0,001	Structure
AAEL008657		midline fasciclin	1,23	0,019	Structure
AAEL008921		myosin regulatory light chain 2 smooth muscle	1,20	0,049	Structure
AAEL012082		NF-180, putative	1,65	0,001	Structure
AAEL013698		restin (cytoplasmic linker protein-170) (clip-170)	1,47	0,006	Structure
AAEL002853		ccaat/enhancer binding protein	1,65	0,001	Régulation de la transcription
AAEL006597		nk homeobox protein	1,48	0,037	Régulation de la transcription
AAEL002154		transcription initiation factor IIA (TFIIA), gamma chain	1,40	0,045	Régulation de la transcription
AAEL005594		predicted protein	1,23	0,016	Indéterminée
AAEL011160		predicted protein	1,78	0,001	Indéterminée
AAEL012245		unknown putative protein	1,20	0,037	Indéterminée
AAEL013800		unknown putative protein	1,20	0,043	Indéterminée
AAEL004595		unknown putative protein	1,20	0,047	Indéterminée
AAEL003864		unknown putative protein	1,21	0,041	Indéterminée
AAEL013323		unknown putative protein	1,27	0,043	Indéterminée
AAEL005270		unknown putative protein	1,21	0,038	Indéterminée
AAEL005980		unknown putative protein	1,22	0,043	Indéterminée
AAEL001143		unknown putative protein	1,23	0,043	Indéterminée
AAEL011664		unknown putative protein	1,23	0,025	Indéterminée
AAEL012794		unknown putative protein	1,23	0,024	Indéterminée
AAEL009355		unknown putative protein	1,23	0,020	Indéterminée
AAEL013777		unknown putative protein	1,23	0,015	Indéterminée
AAEL005941		unknown putative protein	1,24	0,014	Indéterminée
AAEL003331		unknown putative protein	1,24	0,023	Indéterminée
AAEL006097		unknown putative protein	1,24	0,017	Indéterminée
AAEL001248		unknown putative protein	1,25	0,010	Indéterminée
AAEL014433		unknown putative protein	1,25	0,020	Indéterminée
AAEL007998		unknown putative protein	1,25	0,035	Indéterminée
AAEL000711		unknown putative protein	1,26	0,037	Indéterminée
AAEL001256		unknown putative protein	1,26	0,008	Indéterminée
AAEL000464		unknown putative protein	1,26	0,016	Indéterminée
AAEL010407		unknown putative protein	1,26	0,022	Indéterminée
AAEL010609		unknown putative protein	1,26	0,006	Indéterminée
AAEL000311		unknown putative protein	1,27	0,023	Indéterminée
AAEL014909		unknown putative protein	1,28	0,035	Indéterminée
AAEL014456		unknown putative protein	1,28	0,041	Indéterminée
AAEL003092		unknown putative protein	1,28	0,005	Indéterminée
AAEL014767		unknown putative protein	1,29	0,025	Indéterminée
AAEL017145		unknown putative protein	1,29	0,001	Indéterminée
AAEL006686		unknown putative protein	1,29	0,024	Indéterminée
AAEL002018		unknown putative protein	1,29	0,034	Indéterminée
AAEL008186		unknown putative protein	1,29	0,048	Indéterminée
AAEL007236		unknown putative protein	1,30	0,001	Indéterminée
AAEL005474		unknown putative protein	1,30	0,004	Indéterminée
AAEL006233		unknown putative protein	1,30	0,033	Indéterminée
AAEL005530		unknown putative protein	1,30	0,002	Indéterminée
AAEL002794		unknown putative protein	1,30	0,001	Indéterminée
AAEL005826		unknown putative protein	1,31	0,043	Indéterminée

ANNEXE 5 - L1F1 – Gènes sous-transcrits (7/10)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL006569		unknown putative protein	1,31	0,029	Indéterminée
AAEL000557		unknown putative protein	1,31	0,041	Indéterminée
AAEL011501		unknown putative protein	1,31	0,009	Indéterminée
AAEL010615		unknown putative protein	1,32	0,002	Indéterminée
AAEL017090		unknown putative protein	1,32	0,001	Indéterminée
AAEL009184		unknown putative protein	1,32	0,015	Indéterminée
AAEL000021		unknown putative protein	1,32	0,034	Indéterminée
AAEL008888		unknown putative protein	1,32	0,035	Indéterminée
AAEL002988		unknown putative protein	1,32	0,025	Indéterminée
AAEL015304		unknown putative protein	1,32	0,037	Indéterminée
AAEL012502		unknown putative protein	1,32	0,010	Indéterminée
AAEL013641		unknown putative protein	1,32	0,023	Indéterminée
AAEL012013		unknown putative protein	1,33	0,001	Indéterminée
AAEL010628		unknown putative protein	1,33	0,001	Indéterminée
AAEL014819		unknown putative protein	1,33	0,008	Indéterminée
AAEL007592		unknown putative protein	1,33	0,001	Indéterminée
AAEL002537		unknown putative protein	1,33	0,001	Indéterminée
AAEL001271		unknown putative protein	1,34	0,002	Indéterminée
AAEL010552		unknown putative protein	1,34	0,001	Indéterminée
AAEL002352		unknown putative protein	1,34	0,026	Indéterminée
AAEL013152		unknown putative protein	1,34	0,003	Indéterminée
AAEL000484		unknown putative protein	1,34	0,001	Indéterminée
AAEL012685		unknown putative protein	1,34	0,010	Indéterminée
AAEL013782		unknown putative protein	1,34	0,015	Indéterminée
AAEL005401		unknown putative protein	1,35	0,046	Indéterminée
AAEL014318		unknown putative protein	1,35	0,001	Indéterminée
AAEL008485		unknown putative protein	1,35	0,003	Indéterminée
AAEL016975		unknown putative protein	1,35	0,018	Indéterminée
AAEL013446		unknown putative protein	1,35	0,001	Indéterminée
AAEL000285		unknown putative protein	1,35	0,005	Indéterminée
AAEL014922		unknown putative protein	1,36	0,015	Indéterminée
AAEL007616		unknown putative protein	1,36	0,001	Indéterminée
AAEL002567		unknown putative protein	1,36	0,003	Indéterminée
AAEL003455		unknown putative protein	1,36	0,020	Indéterminée
AAEL002907		unknown putative protein	1,37	0,029	Indéterminée
AAEL003337		unknown putative protein	1,37	0,001	Indéterminée
AAEL008283		unknown putative protein	1,37	0,022	Indéterminée
AAEL010263		unknown putative protein	1,37	0,010	Indéterminée
AAEL014567		unknown putative protein	1,37	0,029	Indéterminée
AAEL017994		unknown putative protein	1,37	0,003	Indéterminée
AAEL000294		unknown putative protein	1,38	0,001	Indéterminée
AAEL012090		unknown putative protein	1,38	0,005	Indéterminée
AAEL014914		unknown putative protein	1,38	0,013	Indéterminée
AAEL012737		unknown putative protein	1,39	0,018	Indéterminée
AAEL013655		unknown putative protein	1,39	0,019	Indéterminée
AAEL003425		unknown putative protein	1,39	0,001	Indéterminée
AAEL001522		unknown putative protein	1,39	0,014	Indéterminée

ANNEXE 5 - L1F1 – Gènes sous-transcrits (8/10)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL011232		unknown putative protein	1,40	0,031	Indéterminée
AAEL004598		unknown putative protein	1,40	0,006	Indéterminée
AAEL012649		unknown putative protein	1,41	0,004	Indéterminée
AAEL013793		unknown putative protein	1,41	0,006	Indéterminée
AAEL012703		unknown putative protein	1,41	0,001	Indéterminée
AAEL004863		unknown putative protein	1,41	0,012	Indéterminée
AAEL015446		unknown putative protein	1,42	0,010	Indéterminée
AAEL017110		unknown putative protein	1,42	0,001	Indéterminée
AAEL005786		unknown putative protein	1,43	0,013	Indéterminée
AAEL009876		unknown putative protein	1,43	0,001	Indéterminée
AAEL009980		unknown putative protein	1,43	0,029	Indéterminée
AAEL006154		unknown putative protein	1,43	0,001	Indéterminée
AAEL005475		unknown putative protein	1,43	0,016	Indéterminée
AAEL009054		unknown putative protein	1,44	0,001	Indéterminée
AAEL006104		unknown putative protein	1,44	0,010	Indéterminée
AAEL002165		unknown putative protein	1,45	0,003	Indéterminée
AAEL001481		unknown putative protein	1,45	0,001	Indéterminée
AAEL006007		unknown putative protein	1,47	0,007	Indéterminée
AAEL012688		unknown putative protein	1,47	0,001	Indéterminée
AAEL007750		unknown putative protein	1,47	0,004	Indéterminée
AAEL015153		unknown putative protein	1,47	0,009	Indéterminée
AAEL001063		unknown putative protein	1,47	0,001	Indéterminée
AAEL011213		unknown putative protein	1,47	0,025	Indéterminée
AAEL011938		unknown putative protein	1,47	0,038	Indéterminée
AAEL004367		unknown putative protein	1,48	0,001	Indéterminée
AAEL001671		unknown putative protein	1,48	0,001	Indéterminée
AAEL012301		unknown putative protein	1,48	0,006	Indéterminée
AAEL003030		unknown putative protein	1,49	0,001	Indéterminée
AAEL007615		unknown putative protein	1,49	0,004	Indéterminée
AAEL001237		unknown putative protein	1,49	0,001	Indéterminée
AAEL003216		unknown putative protein	1,49	0,003	Indéterminée
AAEL009186		unknown putative protein	1,50	0,001	Indéterminée
AAEL002962		unknown putative protein	1,50	0,001	Indéterminée
AAEL012504		unknown putative protein	1,50	0,026	Indéterminée
AAEL017359		unknown putative protein	1,50	0,004	Indéterminée
AAEL001544		unknown putative protein	1,50	0,049	Indéterminée
AAEL000419		unknown putative protein	1,51	0,015	Indéterminée
AAEL013605		unknown putative protein	1,52	0,025	Indéterminée
AAEL011440		unknown putative protein	1,52	0,001	Indéterminée
AAEL008176		unknown putative protein	1,52	0,004	Indéterminée
AAEL017179		unknown putative protein	1,52	0,048	Indéterminée
AAEL012605		unknown putative protein	1,53	0,001	Indéterminée
AAEL009733		unknown putative protein	1,53	0,002	Indéterminée
AAEL007758		unknown putative protein	1,54	0,001	Indéterminée
AAEL001514		unknown putative protein	1,54	0,014	Indéterminée
AAEL017119		unknown putative protein	1,54	0,001	Indéterminée
AAEL015657		unknown putative protein	1,54	0,028	Indéterminée

ANNEXE 5 - L1F1 – Gènes sous-transcrits (9/10)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL010623		unknown putative protein	1,56	0,001	Indéterminée
AAEL004703		unknown putative protein	1,56	0,001	Indéterminée
AAEL007648		unknown putative protein	1,58	0,001	Indéterminée
AAEL017413		unknown putative protein	1,58	0,001	Indéterminée
AAEL009805		unknown putative protein	1,58	0,001	Indéterminée
AAEL011337		unknown putative protein	1,59	0,001	Indéterminée
AAEL014332		unknown putative protein	1,61	0,010	Indéterminée
AAEL010490		unknown putative protein	1,61	0,009	Indéterminée
AAEL015534		unknown putative protein	1,61	0,001	Indéterminée
AAEL002285		unknown putative protein	1,61	0,025	Indéterminée
AAEL015425		unknown putative protein	1,61	0,039	Indéterminée
AAEL017571		unknown putative protein	1,63	0,035	Indéterminée
AAEL012434		unknown putative protein	1,63	0,001	Indéterminée
AAEL012648		unknown putative protein	1,64	0,001	Indéterminée
AAEL009250		unknown putative protein	1,65	0,021	Indéterminée
AAEL014302		unknown putative protein	1,66	0,001	Indéterminée
AAEL010943		unknown putative protein	1,66	0,001	Indéterminée
AAEL003112		unknown putative protein	1,68	0,001	Indéterminée
AAEL011036		unknown putative protein	1,68	0,002	Indéterminée
AAEL010680		unknown putative protein	1,68	0,001	Indéterminée
AAEL001494		unknown putative protein	1,69	0,001	Indéterminée
AAEL002955		unknown putative protein	1,72	0,001	Indéterminée
AAEL010518		unknown putative protein	1,73	0,001	Indéterminée
AAEL008752		unknown putative protein	1,74	0,001	Indéterminée
AAEL000098		unknown putative protein	1,76	0,001	Indéterminée
AAEL017231		unknown putative protein	1,79	0,001	Indéterminée
AAEL014369		unknown putative protein	1,80	0,001	Indéterminée
AAEL013606		unknown putative protein	1,83	0,001	Indéterminée
AAEL015154		unknown putative protein	1,84	0,001	Indéterminée
AAEL009580		unknown putative protein	1,85	0,001	Indéterminée
AAEL001553		unknown putative protein	1,88	0,001	Indéterminée
AAEL013443		unknown putative protein	1,88	0,004	Indéterminée
AAEL008717		unknown putative protein	1,89	0,001	Indéterminée
AAEL014727		unknown putative protein	1,91	0,001	Indéterminée
AAEL017464		unknown putative protein	1,92	0,001	Indéterminée
AAEL009577		unknown putative protein	1,96	0,001	Indéterminée
AAEL010601		unknown putative protein	1,96	0,002	Indéterminée
AAEL006888		unknown putative protein	1,97	0,001	Indéterminée
AAEL007932		unknown putative protein	1,97	0,001	Indéterminée
AAEL017987		unknown putative protein	1,98	0,001	Indéterminée
AAEL005622		unknown putative protein	1,99	0,001	Indéterminée
AAEL014655		unknown putative protein	2,00	0,001	Indéterminée
AAEL003772		unknown putative protein	2,02	0,001	Indéterminée
AAEL005960		unknown putative protein	2,05	0,001	Indéterminée
AAEL009484		unknown putative protein	2,07	0,001	Indéterminée
AAEL009004		unknown putative protein	2,12	0,001	Indéterminée
AAEL000890		unknown putative protein	2,12	0,001	Indéterminée

ANNEXE 5 - L1F1 – Gènes sous-transcrits (10/10)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL005917		unknown putative protein	2,19	0,001	Indéterminée
AAEL014977		unknown putative protein	2,20	0,017	Indéterminée
AAEL004601		unknown putative protein	2,28	0,021	Indéterminée
AAEL004303		unknown putative protein	2,40	0,001	Indéterminée
AAEL009008		unknown putative protein	2,41	0,001	Indéterminée
AAEL002960		unknown putative protein	2,45	0,001	Indéterminée
AAEL007611		unknown putative protein	2,53	0,001	Indéterminée
AAEL001067		unknown putative protein	2,55	0,001	Indéterminée
AAEL013699		unknown putative protein	2,66	0,001	Indéterminée
AAEL017015		unknown putative protein	2,68	0,001	Indéterminée
AAEL002965		unknown putative protein	2,70	0,001	Indéterminée
AAEL014985		unknown putative protein	2,85	0,001	Indéterminée
AAEL013792		unknown putative protein	2,99	0,001	Indéterminée
AAEL013718		unknown putative protein	3,00	0,001	Indéterminée
AAEL000896		unknown putative protein	3,40	0,001	Indéterminée

ANNEXE 6

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (1/29)					
Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL014161		amino acids transporter	1,21	0,048	Métabolisme des acides aminés
AAEL009490		carbamoyl-phosphate synthase large chain	1,87	0,001	Métabolisme des acides aminés
AAEL003387		cationic amino acid transporter	1,33	0,002	Métabolisme des acides aminés
AAEL009362		cationic amino acid transporter	1,39	0,013	Métabolisme des acides aminés
AAEL007416		cysteine dioxygenase	1,29	0,015	Métabolisme des acides aminés
AAEL007878		ornithine decarboxylase	1,34	0,021	Métabolisme mitochondrial
AAEL007138		sugar transporter	1,35	0,019	Métabolisme des sucres
AAEL009794		Protéines cuticulaires protein, putative	2,20	0,018	Protéines cuticulaires
AAEL009801		Protéines cuticulaires protein, putative	2,14	0,002	Protéines cuticulaires
AAEL003049		pupal Protéines cuticulaires protein 78E, putative	1,36	0,006	Protéines cuticulaires
AAEL011444		pupal Protéines cuticulaires protein, putative	1,21	0,033	Protéines cuticulaires
AAEL012883		pupal Protéines cuticulaires protein, putative	1,27	0,002	Protéines cuticulaires
AAEL013512		pupal Protéines cuticulaires protein, putative	1,40	0,001	Protéines cuticulaires
AAEL008388		ATP-binding cassette sub-family A member 3, putative	1,29	0,025	Détoxication
AAEL011281		cytochrome B561	1,25	0,018	Détoxication
AAEL009123	<i>CYP6Z6</i>	cytochrome P450	1,24	0,026	Détoxication
AAEL001320	<i>CYP9M4</i>	cytochrome P450 (CYPM4)	1,47	0,049	Détoxication
AAEL018230		sulfotransferase	1,50	0,001	Détoxication
AAEL014900		ataxia telangiectasia mutated (atm)	1,33	0,004	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL001484		chromosome region maintenance protein 1/exportin	1,34	0,001	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL009392		chromosome region maintenance protein 5/exportin	1,33	0,001	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL004017		DNA polymerase v	1,24	0,015	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL009851		DNA polymerase zeta catalytic subunit	1,28	0,018	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL002551		DNA topoisomerase type I	1,22	0,023	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL010069		esr1 protein	1,48	0,001	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL009067		helicase	1,24	0,024	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL011380		high mobility group B1, putative	1,33	0,008	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL018244		putative DNA topoisomerase II (An.g 76%)	1,20	0,045	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL008881		RHC18, putative	1,34	0,028	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL010691		ribonucleoside-diphosphate reductase small chain	1,22	0,021	Structure et dynamique de l'ADN
AAEL017391			0	2,03	Régulations des marques épigénétiques
AAEL006655		chromatin regulatory protein sir2	1,43	0,001	Régulations des marques épigénétiques
AAEL001440		E1a binding protein P400	1,51	0,001	Régulations des marques épigénétiques
AAEL012057		enhancer of polycomb	1,88	0,001	Régulations des marques épigénétiques
AAEL002528		histone deacetylase	1,30	0,022	Régulations des marques épigénétiques
AAEL006783		histone H3 methyltransferase	2,26	0,001	Régulations des marques épigénétiques
AAEL000193		histone-lysine n-methyltransferase	1,95	0,001	Régulations des marques épigénétiques

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (2/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL008905		host cell factor C1	1,23	0,015	Régulations des marques épigénétiques
AAEL007360		lethal(3)malignant brain tumor	1,39	0,007	Régulations des marques épigénétiques
AAEL008662		mixed-lineage leukemia protein	1,40	0,001	Régulations des marques épigénétiques
AAEL000054	<i>Trx</i>	mixed-lineage leukemia protein, mll	2,08	0,001	Régulations des marques épigénétiques
AAEL005380	<i>Trr</i>	mixed-lineage leukemia protein, mll	1,22	0,022	Régulations des marques épigénétiques
AAEL010829		protein arginine n-methyltransferase	1,43	0,001	Régulations des marques épigénétiques
AAEL005378		set domain protein	4,28	0,001	Régulations des marques épigénétiques
AAEL007578		shk1 kinase-binding protein	1,27	0,038	Régulations des marques épigénétiques
AAEL012951		transformation/transcription domain-associated protein	1,47	0,001	Régulations des marques épigénétiques
AAEL013363	<i>Utx</i>	ubiquitously transcribed sex (x/y) chromosome tetratricopeptide repeat protein	1,53	0,001	Régulations des marques épigénétiques
AAEL013644	<i>Utx</i>	ubiquitously transcribed sex (x/y) chromosome tetratricopeptide repeat protein	1,65	0,001	Régulations des marques épigénétiques
AAEL012106		acetylcholine receptor protein alpha 1, 2, 3, 4 invertebrate	1,73	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL007397	<i>E75</i>	Ecdysone-induced protein 75B isoform A Nuclear receptor	1,26	0,012	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL013546	<i>ERR</i>	estrogen-related receptor (ERR)	2,55	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL009588	<i>HR3</i>	expressed protein (HR3)	1,47	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL008354		gaba receptor invertebrate	2,09	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL011981	<i>GAD</i>	glutamate decarboxylase	1,29	0,002	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL001887	<i>GS</i>	glutamine synthetase 1, 2 (glutamate-amonia ligase) (gs)	1,27	0,004	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL008287	<i>GPRDIH2</i>	GPCR Diuretic Insect Hormone/Kinin/CRF Family	1,87	0,012	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL000246	<i>GPRSTN</i>	GPCR Frizzled/Smoothed Family	2,55	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL006669	<i>GPRSMO</i>	GPCR Frizzled/Smoothed Family	1,29	0,038	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL006778	<i>GPRFZ2</i>	GPCR Frizzled/Smoothed Family	1,48	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL016997	<i>GPRGRP2_3</i>	GPCR Gastrin/Bombesin Family	#VALEUR!	0,014	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL009139	<i>GPRMGL3_1</i>	GPCR Metabotropic glutamate Family	3,19	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL006957	<i>GPRNNB4</i>	GPCR Orphan/Putative Class B Family	1,80	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL015043	<i>HR3</i>	hormone receptor hr3	1,38	0,015	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL005850	<i>HR4</i>	Hormone receptor-like in 4 (nuclear receptor)	1,86	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL014523		neuroendocrine convertase	1,33	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL002055	<i>SCG5</i>	neuroendocrine protein 7b2	1,31	0,005	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL008055		nicotinic acetylcholine receptor subunit	2,72	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL001304		nuclear hormone receptor ftz-f1 beta	1,37	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL018327	<i>GRIF-1</i>	putative GABA-A receptor interacting factor-1 (Cu.q 77%)	1,29	0,004	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL000818		putative G-protein coupled receptor (GPCR)	1,36	0,005	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL006472		rabconnectin	1,50	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL003860		sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter	1,41	0,002	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL008484		steroid receptor-interacting snf2 domain protein	1,76	0,001	Signalisation hormonale et neurotransmission
AAEL009167		bone morphogenetic protein 5/7, bmp5/7	1,44	0,001	Immunité
AAEL000086	<i>CLIPB32</i>	Clip-Domain Serine Protease family B.	1,56	0,021	Immunité
AAEL012911	<i>LRIM18</i>	leucine-rich immune protein (Coil-less)	1,58	0,018	Immunité

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (3/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe	
AAEL005351		leucine-rich transmembrane protein	2,00	0,001	Immunité	
AAEL005734		leucine-rich transmembrane protein	1,78	0,001	Immunité	
AAEL010286		leucine-rich transmembrane protein	4,06	0,001	Immunité	
AAEL012267		macroglobulin/complement	1,25	0,011	Immunité	
AAEL003990		myeloid leukemia factor	1,26	0,030	Immunité	
AAEL001567		myocyte-specific enhancer factor 2d	1,46	0,001	Immunité	
AAEL004142		Phagocyte signaling-impaired protein (N-terminal acetyltransferase B complex subunit NAA25 homolog)(N-terminal acetyltransferase B complex subunit MDM20 homolog)	1,23	0,026	Immunité	
AAEL012561		prominin (prom) protein	1,24	0,031	Immunité	
AAEL014931		sarm1	1,36	0,001	Immunité	
AAEL013534		tgf-beta resistance-associated protein trag	1,21	0,047	Immunité	
AAEL002583	<i>TOLL7</i>	Toll-like receptor	1,35	0,002	Immunité	
AAEL004000	<i>TOLL1</i>	Toll-like receptor	1,28	0,037	Immunité	
AAEL007619	<i>TOLL5A</i>	Toll-like receptor	1,24	0,033	Immunité	
AAEL000671	<i>TOLL6</i>	Toll-like receptor (TOLL6)	2,10	0,001	Immunité	
AAEL018324			0	3,61	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL017532			0	1,50	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL007377		ammonium transporter	1,34	0,002	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL007002		calsenilin	2,66	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL003106		clathrin coat associated protein ap-50	1,20	0,037	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL013614		clathrin heavy chain	1,26	0,006	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL010965		cubulin	1,53	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL011478		cytoplasmic dynein light chain	1,21	0,030	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL003588		DNA-J/hsp40	1,33	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL006687		exportin	1,30	0,009	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL008107		f14p3.9 protein (auxin transport protein)	1,41	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL011704		heat shock protein	1,36	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL004148		heat shock protein 70 (hsp70)-interacting protein	1,19	0,050	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL010948		heat shock protein 70 (hsp70)-interacting protein	1,30	0,008	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL017975	<i>HSP7Ba</i>	heat shock protein HSP70	2,72	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL017976	<i>HSP7Bb</i>	heat shock protein HSP70	2,37	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL017980	<i>HSP7Ab'</i>	heat shock protein HSP70	2,39	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL008432		high-affinity choline transporter	1,87	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL009080		importin 7,	1,23	0,018	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL012960		importin alpha	1,32	0,003	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL013275		importin beta-1	1,51	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL007521		importin beta-2	2,11	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL010159		importin beta-3	1,29	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL010698		importin beta-4	1,35	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL009886		kidney-specific Na-K-Cl cotransport protein splice isoform A, putative	1,42	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	
AAEL009212		lola	1,35	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes	

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (4/29)

Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL000417		monocarboxylate transporter	1,21	0,041	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL005915		monocarboxylate transporter	2,09	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL012062		Na+/K+ ATPase alpha subunit	1,21	0,029	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL010803		ncd	1,32	0,010	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL008647		no-mechanoreceptor potential a	1,26	0,007	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL001861		nuclear pore complex protein nup154	1,37	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL002455		nucleoporin, Nup153, putative	1,74	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL002617	<i>OBP12</i>	odorant binding protein OBP12	1,37	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL001808		organic anion transporter	1,33	0,004	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL013863		phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	1,23	0,015	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL006650		potassium channel beta	2,65	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL006055		potassium channel interacting protein	4,03	0,012	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL011792		potassium/chloride symporter, putative	1,32	0,018	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL014527		potassium-dependent sodium-calcium exchanger, putative	1,28	0,002	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL000794		Protein KIAA0664 homolog	1,22	0,026	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL018299		putative DENN domain-containing protein 1A	1,30	0,033	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL018306		putative calcium-activated potassium channel alpha chain (Cu.q 88%)	1,60	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL017462		putative Major Facilitator Superfamily protein	1,27	0,014	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL018234		putative potassium channel kcnq (Cu.q 79%)	1,81	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL018329		putative solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 2 (An.g 88%)	3,30	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL011870		rap55	1,38	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL003837		ryanodine receptor 3, brain	1,47	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL001914		scavenger receptor, putative	1,55	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL001273		Sec24B protein, putative	1,20	0,049	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL012480		sodium/calcium exchanger	1,55	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL013788		sodium/calcium exchanger	1,56	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL001503		sodium/hydrogen exchanger 3 (nhe3)	1,88	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL002051		sodium/hydrogen exchanger 7, 9 (nhe7, nhe9)	1,62	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL002735		sodium/hydrogen exchanger 7, 9 (nhe7, nhe9)	1,60	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL010783		sodium/potassium-dependent ATPase beta-2 subunit	1,33	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL007470		staufen	1,33	0,007	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL004559		synaptosomal associated protein	1,44	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL000704		synaptotagmin,	1,29	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL009169		synaptotagmin, putative	1,25	0,010	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL002756		synaptotagmin-4,	1,50	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL009304		syntaxin,	1,77	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL012657		syntaxin,	1,73	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL003391		tankyrase	1,76	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL000435		THO complex, putative	1,29	0,024	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL006948		tomosyn	1,31	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (5/29)

Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL000967	<i>tmc7</i>	Transmembran channel-like protein 7	1,50	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL003573		transportin	1,21	0,033	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL003858		UPF0466 protein AAEL003858, mitochondrial Precursor	1,31	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL009104		vacuolar protein sorting-associated protein (vps13)	1,30	0,050	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL010484		vacuolar protein sorting-associated protein (vps13)	1,49	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL010508		vacuolar protein sorting-associated protein (vps13)	1,37	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL005861		vacuolar sorting protein (vps)	1,34	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL002936		VAMP-associated protein, putative	1,26	0,012	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL012473		vav1	1,28	0,013	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL010462		vesamicol binding protein, putative	1,91	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL008816		vesicular monoamine transporter, putative	1,66	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL011280		voltage-dependent p/q type calcium channel	1,34	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL006809		voltage-gated ion channel	1,23	0,045	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL000242		voltage-gated potassium channel	4,36	0,001	Traffic intra et extracellulaire - Chaperonnes
AAEL018217			1,39	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL010470		calcineurin b subunit	1,22	0,026	Kinases et phosphatases
AAEL002277		cAMP-dependent protein kinase type i-beta regulatory subunit	1,59	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL009216		cAMP-dependent protein kinase type ii regulatory subunit	2,03	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL015314		cAMP-dependent protein kinase type ii regulatory subunit	2,43	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL008078		clk2	1,22	0,036	Kinases et phosphatases
AAEL004717		cyclin-dependent kinase 5 activator	1,82	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL010373		dullard protein	1,45	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL005238		mck1	1,30	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL014408		m-phase inducer phosphatase(cdc25)	1,34	0,016	Kinases et phosphatases
AAEL005319		myosin light chain kinase	1,22	0,024	Kinases et phosphatases
AAEL013729		myotonin-protein kinase	1,37	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL003412		nuclear lim interactor-interacting factor (nli-interacting factor) (nli-if)	1,64	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL009305		numb-associated kinase	1,57	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL002903		phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha, beta, delta	1,71	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL013596		phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit	2,76	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL008930		protein phosphatase-2b	1,29	0,006	Kinases et phosphatases
AAEL001467		sdk-P1	1,92	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL014055		thymidine kinase	1,21	0,032	Kinases et phosphatases
AAEL006730		traf2 and nck interacting kinase, tnik	1,21	0,033	Kinases et phosphatases
AAEL005839		uridine phosphorylase	1,35	0,001	Kinases et phosphatases
AAEL006307		acetyl-coa carboxylase	1,25	0,008	Métabolisme des lipides
AAEL013642		acyl-CoA dehydrogenase	1,23	0,025	Métabolisme des lipides
AAEL013260	<i>AMACR</i>	alpha methylacyl-coa racemase	1,26	0,042	Métabolisme des lipides
AAEL001478		bile acid beta-glucosidase, putative	1,37	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL010471		choline o-acyltransferase	4,20	0,001	Métabolisme des lipides

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (6/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL000256	<i>SCRB9</i>	Class B Scavenger Receptor (CD36 domain).	1,56	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL009486	<i>ENPP</i>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	1,40	0,004	Métabolisme des lipides
AAEL002673		elongase, putative	1,23	0,026	Métabolisme des lipides
AAEL009574		elongase, putative	1,56	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL013128		elongase, putative	1,40	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL008004		Elongation of very long chain fatty acids protein AAEL008004	1,34	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL014395		ethanolaminophosphotransferase	1,35	0,020	Métabolisme des lipides
AAEL005175		lipin	1,35	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL007041	<i>ldl</i>	low-density lipoprotein receptor (ldl)	1,35	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL009806	<i>ldl</i>	low-density lipoprotein receptor (ldl)	1,39	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL009869	<i>ldl</i>	low-density lipoprotein receptor (ldl)	1,41	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL010712	<i>ldl</i>	low-density lipoprotein receptor (ldl)	1,26	0,014	Métabolisme des lipides
AAEL003083	<i>mtm</i>	myotubularin	1,58	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL006022	<i>mtm</i>	myotubularin	1,44	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL003325	<i>NPC1</i>	niemann-pick C1	1,21	0,040	Métabolisme des lipides
AAEL012056	<i>ORP1</i>	oxysterol-binding protein related protein (ORP1)	1,57	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL010483	<i>ORP8</i>	oxysterol-binding protein related protein (ORP8)	1,37	0,004	Métabolisme des lipides
AAEL001940		phosphatidate cytidyltransferase	1,30	0,014	Métabolisme des lipides
AAEL009380		phospholipase c beta	1,36	0,003	Métabolisme des lipides
AAEL008246		phospholipase c epsilon	1,78	0,001	Métabolisme des lipides
AAEL007689		phospholipid-transporting ATPase 1 (aminophospholipid flippase 1)	1,23	0,036	Métabolisme des lipides
AAEL000770	<i>Lis-1</i>	platelet-activating factor acetylhydrolase isoform 1b alpha subunit	1,25	0,009	Métabolisme des lipides
AAEL001064		triacylglycerol lipase, putative	1,57	0,028	Métabolisme des lipides
AAEL005035		1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase	1,30	0,025	Autres enzymes
AAEL003983		adenylate cyclase	1,35	0,015	Autres enzymes
AAEL004236		arf6 guanine nucleotide exchange factor	1,25	0,023	Autres enzymes
AAEL013305		bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	1,21	0,049	Autres enzymes
AAEL001629		cAMP-specific 3,5-cyclic phosphodiesterase	2,44	0,001	Autres enzymes
AAEL001784		cytidine and deoxycytidylate deaminase zinc-binding region	1,38	0,022	Autres enzymes
AAEL001009		dab2-interacting protein	2,00	0,001	Autres enzymes
AAEL010665		developmentally regulated RNA-binding protein	1,28	0,011	Autres enzymes
AAEL013115		gpi inositol deacylase pgap1	1,26	0,047	Autres enzymes
AAEL009273		inosine-5-monophosphate dehydrogenase	1,28	0,003	Autres enzymes
AAEL005827		katanin P80 subunit	1,59	0,001	Autres enzymes
AAEL007915		Moesin/ezrin/radixin homolog 1	1,25	0,007	Autres enzymes
AAEL012397		ng,ng-dimethylarginine dimethylaminohydrolase	1,25	0,038	Autres enzymes
AAEL004922		nicotinate phosphoribosyltransferase	1,34	0,015	Autres enzymes
AAEL001461		oxidoreductase	1,69	0,038	Autres enzymes
AAEL001176		s-adenosylmethionine decarboxylase	1,44	0,001	Autres enzymes
AAEL008372		sulfatase-1, sulf-1	1,54	0,026	Autres enzymes

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (7/29)

Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL008607		tep3	1,23	0,034	Autres enzymes
AAEL011116		14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha	1,32	0,004	Autres
AAEL007574	<i>APG16L</i>	autophagy related gene	1,43	0,017	Autres
AAEL005463		calbindin-32	1,77	0,001	Autres
AAEL013726		epsin 4/enthoprotin	1,88	0,001	Autres
AAEL007289		NBP2b protein, putative	1,22	0,049	Autres
AAEL018172		putative Breast carcinoma amplified sequence 3	1,60	0,001	Autres
AAEL018294		putative carboxylesterase (An.g 80%)	1,32	0,034	Autres
AAEL018032		putative fragile site-associated protein	1,46	0,001	Autres
AAEL017560		putative patj-like family protein	1,37	0,003	Autres
AAEL000174		retinal protein	2,26	0,001	Autres
AAEL014355		symbol, putative	1,45	0,001	Autres
AAEL013559		uncoordinated protein	1,29	0,001	Autres
AAEL015049		60S ribosomal protein L35	1,28	0,007	Métabolisme des protéines
AAEL005076		alanyl aminopeptidase	1,35	0,013	Métabolisme des protéines
AAEL005949		beta-1,2-n-acetylglucosaminyltransferase ii	1,47	0,035	Métabolisme des protéines
AAEL006426		beta-1,4-galactosyltransferase	1,65	0,026	Métabolisme des protéines
AAEL001731		Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase	2,13	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL008434		ER lumen protein retaining receptor	1,22	0,046	Métabolisme des protéines
AAEL000884		eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 1 (heme-regulated eukaryotic initiation factor eif-2-alpha kinase)	1,27	0,017	Métabolisme des protéines
AAEL012410	<i>AGO1b</i>	eukaryotic translation initiation factor 2C	1,30	0,021	Métabolisme des protéines
AAEL015246	<i>AGO1a</i>	eukaryotic translation initiation factor 2C	1,43	0,002	Métabolisme des protéines
AAEL004875		F-box only protein	1,30	0,002	Métabolisme des protéines
AAEL007442		F-box/leucine rich repeat protein	1,38	0,039	Métabolisme des protéines
AAEL002306		hect E3 ubiquitin ligase	1,49	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL007705		hect E3 ubiquitin ligase	1,20	0,045	Métabolisme des protéines
AAEL000493		heparan sulphate 6-o-sulfotransferase	1,43	0,017	Métabolisme des protéines
AAEL010911		Kelch-like protein diablo	1,22	0,048	Métabolisme des protéines
AAEL002663		kuzbanian	1,43	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL004389		mannosidase alpha class 2a	1,53	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL004064		meiotic checkpoint regulator cut4	1,30	0,010	Métabolisme des protéines
AAEL007254		metalloprotease	1,41	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL000801		metalloproteinase, putative	1,21	0,041	Métabolisme des protéines
AAEL006558		n-acetylgalactosaminyltransferase	1,76	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL012823		n-acetylgalactosaminyltransferase	1,68	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL012972		n-acetylgalactosaminyltransferase	2,05	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL013274		n-acetylgalactosaminyltransferase	1,62	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL011900		N-acetylactosaminide acetylglucosaminyltransferase, putative	3,06	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL005207		nepriylsin	1,68	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL015673		nucleolar complex protein	1,30	0,040	Métabolisme des protéines

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (8/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL012365		o-linked n-acetylglucosamine transferase, ogt	1,50	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL018127		putative calpain-15	1,31	0,005	Métabolisme des protéines
AAEL018174		putative dual specificity protein phosphatase 7	1,44	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL018245	<i>UBR3</i>	putative E3 ubiquitin-protein ligase (Cu.q 76%)	1,46	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL018212		putative ubiquitinyl hydrolase	1,89	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL004047		regulator of presynaptic morphology protein	1,34	0,002	Métabolisme des protéines
AAEL001242		ribosomal pseudouridine synthase	1,86	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL000523		ring finger protein	1,47	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL012209		ring finger protein	1,43	0,006	Métabolisme des protéines
AAEL006187		translational activator gcn1	1,22	0,028	Métabolisme des protéines
AAEL007174		tripeptidyl peptidase ii	1,29	0,008	Métabolisme des protéines
AAEL001205		ubiquitin protein ligase	1,22	0,036	Métabolisme des protéines
AAEL011975		ubiquitin specific protease	1,53	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL009824		ubiquitin specific protease 9/faf	1,56	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL010798		ubiquitin-conjugating enzyme E2 g	1,24	0,014	Métabolisme des protéines
AAEL006073		ubiquitin-conjugating enzyme E2-230k	1,50	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL005930		ubiquitin-protein ligase	1,45	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL007245		WD40 protein	1,57	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL000300		WD-repeat protein	1,29	0,044	Métabolisme des protéines
AAEL001513		WD-repeat protein	1,36	0,033	Métabolisme des protéines
AAEL006038		WD-repeat protein	1,21	0,041	Métabolisme des protéines
AAEL011246		WD-repeat protein	1,44	0,018	Métabolisme des protéines
AAEL015054		WD-repeat protein 47	1,87	0,001	Métabolisme des protéines
AAEL008500		DEAD box ATP-dependent RNA helicase	1,37	0,001	Métabolisme des ARN
AAEL010317		DEAD box ATP-dependent RNA helicase	1,27	0,006	Métabolisme des ARN
AAEL001612		dicer-1	1,79	0,001	Métabolisme des ARN
AAEL006794		dicer-1	1,32	0,001	Métabolisme des ARN
AAEL009326		fragile X mental retardation syndrome-related protein 1, putative	1,30	0,002	Métabolisme des ARN
AAEL001245		heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	2,48	0,001	Métabolisme des ARN
AAEL005515		heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	1,22	0,039	Métabolisme des ARN
AAEL008257		heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27c	1,31	0,001	Métabolisme des ARN
AAEL009659		heterogeneous nuclear ribonucleoprotein l (hnrnp l)	1,37	0,014	Métabolisme des ARN
AAEL002879		heterogeneous nuclear ribonucleoprotein r	1,73	0,001	Métabolisme des ARN
AAEL006876		igf2 mRNA binding protein, putative	2,36	0,001	Métabolisme des ARN
AAEL008687	<i>loqs</i>	loquacious	1,30	0,002	Métabolisme des ARN
AAEL004134		lupus la ribonucleoprotein	1,26	0,013	Métabolisme des ARN
AAEL009073		lupus la ribonucleoprotein	1,24	0,012	Métabolisme des ARN
AAEL010841		lupus la ribonucleoprotein	2,11	0,001	Métabolisme des ARN
AAEL014965		nova	1,21	0,048	Métabolisme des ARN
AAEL004368		nucleolar RNA-associated protein	1,33	0,005	Métabolisme des ARN
AAEL006710		nucleolysin tia-1	2,48	0,001	Métabolisme des ARN

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (9/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe	
AAEL006249		poly(a) polymerase cid (pap) (cafein-induced death protein)	1,31	0,011	Métabolisme des ARN	
AAEL010318		polyadenylate-binding protein	1,30	0,004	Métabolisme des ARN	
AAEL013723		polypyrimidine tract binding protein	1,69	0,001	Métabolisme des ARN	
AAEL010827		programmed cell death protein 11 (pre-rRNA processing protein rrp5)	1,24	0,029	Métabolisme des ARN	
AAEL012420		pumilio	2,17	0,001	Métabolisme des ARN	
AAEL017421	<i>Nop56</i>	putative nucleolar protein Nop56	1,26	0,006	Métabolisme des ARN	
AAEL018206	<i>Smg1</i>	putative serine/threonine-protein kinase Smg1	1,60	0,001	Métabolisme des ARN	
AAEL000215		ribonuclease P, 29kD-subunit, putative	1,35	0,032	Métabolisme des ARN	
AAEL009072		ribonucleoprotein	2,16	0,001	Métabolisme des ARN	
AAEL005114		RNA and export factor binding protein	1,26	0,008	Métabolisme des ARN	
AAEL011150		RNA-binding protein precursor, putative	1,30	0,002	Métabolisme des ARN	
AAEL004263		small nuclear ribonucleoprotein sm d1	1,34	0,031	Métabolisme des ARN	
AAEL013510		smaug protein	1,31	0,017	Métabolisme des ARN	
AAEL004986		smg-7 (suppressor with morphological effect on genitalia protein 7)	1,30	0,001	Métabolisme des ARN	
AAEL002818		splicing factor u2af large subunit	1,32	0,002	Métabolisme des ARN	
AAEL004010		splicing factor, putative	1,24	0,014	Métabolisme des ARN	
AAEL015585		U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kd	1,30	0,043	Métabolisme des ARN	
AAEL000394		U2 small nuclear ribonucleoprotein, putative	1,31	0,006	Métabolisme des ARN	
AAEL005544		YTH domain protein	1,30	0,001	Métabolisme des ARN	
AAEL018348			0	1,30	0,004	Transduction du signal
AAEL018163			0	1,67	0,001	Transduction du signal
AAEL001277		arf GTPase-activating protein	1,32	0,013	Transduction du signal	
AAEL010289		beta nu integrin subunit	1,57	0,008	Transduction du signal	
AAEL007662		casein kinase	1,30	0,001	Transduction du signal	
AAEL004351		casein kinase	1,35	0,003	Transduction du signal	
AAEL009364		cdc2l5	1,28	0,006	Transduction du signal	
AAEL007240		cdc42 GTPase-activating protein	1,25	0,015	Transduction du signal	
AAEL002918		centaurin beta	1,80	0,001	Transduction du signal	
AAEL001492		cgmp-dependent 3,5-cyclic phosphodiesterase	1,43	0,013	Transduction du signal	
AAEL008634		c-Jun N-terminal kinase, jnk	1,28	0,016	Transduction du signal	
AAEL008234	<i>dsh</i>	dishevelled	1,80	0,001	Transduction du signal	
AAEL003359		dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase hemipterous MAPKK	1,30	0,003	Transduction du signal	
AAEL004319	<i>egfr</i>	epidermal growth factor receptor	1,28	0,011	Transduction du signal	
AAEL013939		erk1/2	2,04	0,001	Transduction du signal	
AAEL007958	<i>erk1/2</i>	erk1/2	2,48	0,001	Transduction du signal	
AAEL006110		g protein-coupled receptor kinase 6	1,61	0,001	Transduction du signal	
AAEL008688		G-protein signalling modulator	1,51	0,001	Transduction du signal	
AAEL004131	<i>GRTP1</i>	growth hormone regulated tbc protein-1	1,27	0,020	Transduction du signal	
AAEL008641	<i>gnao</i>	GTP-binding protein (o) alpha subunit, gnao	1,57	0,001	Transduction du signal	
AAEL003989		GTP-binding protein alpha subunit, gna	1,36	0,001	Transduction du signal	

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (10/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL010506		GTP-binding protein alpha subunit, gna	1,37	0,001	Transduction du signal
AAEL005643		guanine nucleotide exchange factor	2,11	0,001	Transduction du signal
AAEL013997		guanine nucleotide-binding protein beta 3 (g protein beta3)	1,26	0,029	Transduction du signal
AAEL013991	<i>Gnb3</i>	guanine nucleotide-binding protein beta 3 (g protein beta3)	2,06	0,001	Transduction du signal
AAEL012475		jnk/sapk-associated protein	1,36	0,001	Transduction du signal
AAEL008585	<i>Ksr</i>	kinase suppressor of ras (ksr)	1,26	0,048	Transduction du signal
AAEL009932		lethal giant larva homologue	1,24	0,014	Transduction du signal
AAEL008058		liprin alpha (lar-interacting protein alpha) (synapse defective protein 2)	1,26	0,017	Transduction du signal
AAEL009088	<i>lqf</i>	liquid facets	1,21	0,034	Transduction du signal
AAEL009402		map kinase-activated protein kinase (mapkapk)	1,36	0,001	Transduction du signal
AAEL004704		map kinase-interacting serine/threonine kinase	2,77	0,001	Transduction du signal
AAEL001442		map-kinase activating death domain protein (madd)/denn/aex-3(c.elegans)	1,47	0,001	Transduction du signal
AAEL006330		microtubule associated serine/threonine kinase	1,62	0,001	Transduction du signal
AAEL009391		misexpression suppressor of ras, putative	1,29	0,049	Transduction du signal
AAEL011596	<i>bub1</i>	mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase bub1 and bubr1	1,51	0,004	Transduction du signal
AAEL014329		mixed lineage protein kinase	1,58	0,001	Transduction du signal
AAEL008371		neurofibromin	1,92	0,001	Transduction du signal
AAEL010210		neurogenic locus notch (notch)	1,27	0,011	Transduction du signal
AAEL008069		notch	1,29	0,002	Transduction du signal
AAEL012149		npdc-1	1,57	0,002	Transduction du signal
AAEL003731		nuclear body associated kinase, putative	1,63	0,001	Transduction du signal
AAEL014307		oligophrenin	2,01	0,001	Transduction du signal
AAEL002594	<i>pak</i>	P21-activated kinase, pak	1,29	0,014	Transduction du signal
AAEL000489		P21-activated kinase, pak	1,40	0,038	Transduction du signal
AAEL002850	<i>ptc</i>	patched 1,	1,34	0,013	Transduction du signal
AAEL011432		plexin b	1,76	0,001	Transduction du signal
AAEL004412		polo kinase kinase	1,36	0,001	Transduction du signal
AAEL000810	<i>PKC</i>	protein kinase c	2,59	0,001	Transduction du signal
AAEL001108	<i>PKC</i>	protein kinase c	2,74	0,001	Transduction du signal
AAEL008194		protein phosphatase 2a, regulatory subunit	2,02	0,001	Transduction du signal
AAEL003015		protein phosphatase 2a, regulatory subunit	2,14	0,001	Transduction du signal
AAEL014042		protein phosphatase pp2a regulatory subunit b	1,30	0,001	Transduction du signal
AAEL004262		protein phosphatases pp1 regulatory subunit	1,58	0,007	Transduction du signal
AAEL002026		protein serine/threonine kinase, putative	1,64	0,014	Transduction du signal
AAEL002015		protein serine/threonine kinase, putative	4,40	0,038	Transduction du signal
AAEL006320	<i>Ptp69d</i>	protein tyrosine phosphatase 69d, drome	1,26	0,007	Transduction du signal
AAEL001798		protein tyrosine phosphatase prl	1,40	0,001	Transduction du signal
AAEL008777		proto-oncogene tyrosine-protein kinase abl1	1,35	0,003	Transduction du signal
AAEL018218		putative Ankyrin repeat protein	1,48	0,001	Transduction du signal
AAEL018350	<i>RhoGAP92B</i>	putative Rho GTPase-activating protein 92B	1,23	0,033	Transduction du signal

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (11/29)

Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL018059	<i>Rock1</i>	putative rho-associated protein kinase 1	2,59	0,001	Transduction du signal
AAEL018120	<i>S6k</i>	putative RPS6-p70-protein kinase	2,06	0,001	Transduction du signal
AAEL018211		putative serine/threonine phosphatase	1,28	0,003	Transduction du signal
AAEL018219		putative serrate protein	1,34	0,001	Transduction du signal
AAEL018205		putative tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	1,23	0,027	Transduction du signal
AAEL006308		px serine/threonine kinase (pxk)	1,32	0,002	Transduction du signal
AAEL001142		rab gdp/GTP exchange factor	1,34	0,009	Transduction du signal
AAEL009317		rab11	1,21	0,030	Transduction du signal
AAEL000737		rab6 GTPase activating protein, gapcena (rabgap1 protein)	1,40	0,001	Transduction du signal
AAEL008823		rac serine/threonine kinase	1,87	0,001	Transduction du signal
AAEL009884		ran-binding protein	1,51	0,001	Transduction du signal
AAEL014144		rapsynoid	1,36	0,007	Transduction du signal
AAEL012071		ras	1,48	0,001	Transduction du signal
AAEL001165	<i>sos</i>	ras GTP exchange factor, son of sevenless	2,05	0,001	Transduction du signal
AAEL008179	<i>rheb</i>	RAS homologue enriched in brain (RHEB)	1,28	0,045	Transduction du signal
AAEL004902		ras-related protein Rab-2A, putative	1,25	0,010	Transduction du signal
AAEL006267		ras-related protein Rab-3C, putative	1,28	0,026	Transduction du signal
AAEL008673	<i>Rab-9</i>	ras-related protein Rab-9, putative	1,83	0,001	Transduction du signal
AAEL013105		receptor protein tyrosine phosphatase	1,50	0,001	Transduction du signal
AAEL005284		receptor tyrosine phosphatase type r2a	1,85	0,001	Transduction du signal
AAEL003026		regulator of g protein signaling	1,70	0,001	Transduction du signal
AAEL009157		RHO GTPase activator, putative	1,49	0,001	Transduction du signal
AAEL012996		rho guanine dissociation factor	1,27	0,005	Transduction du signal
AAEL013487		RHO guanyl-nucleotide exchange factor, putative	2,44	0,001	Transduction du signal
AAEL008413		serine/threonine protein kinase	1,92	0,001	Transduction du signal
AAEL000217		serine/threonine protein kinase	3,05	0,001	Transduction du signal
AAEL014849	<i>STK38</i>	serine/threonine-protein kinase 38 (ndr2 protein kinase)	1,93	0,001	Transduction du signal
AAEL014741		serine/threonine-protein kinase ripk4	2,27	0,001	Transduction du signal
AAEL000343		serine/threonine-protein kinase vrk	1,27	0,008	Transduction du signal
AAEL013539		SH2/SH3 adaptor protein	1,80	0,001	Transduction du signal
AAEL008739		shc transforming protein	1,24	0,044	Transduction du signal
AAEL009175		slit protein	1,45	0,001	Transduction du signal
AAEL008021		specifically Rac-associated protein, putative	1,57	0,001	Transduction du signal
AAEL014510		sprouty	1,81	0,001	Transduction du signal
AAEL004246		still life, sif	1,38	0,001	Transduction du signal
AAEL001393		triple functional domain, trio	1,59	0,001	Transduction du signal
AAEL001384		triple functional domain, trio	2,39	0,001	Transduction du signal
AAEL007712	<i>TSC2</i>	tuberous sclerosis complex 2	1,26	0,007	Transduction du signal
AAEL001017		tyrosine-protein kinase	1,85	0,001	Transduction du signal
AAEL001952		28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein (PDGF-associated protein), putative	1,23	0,026	Structure

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (12/29)

Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL013661		actin binding protein, putative	1,20	0,041	Structure
AAEL006148		adamts-20	1,64	0,001	Structure
AAEL011105		adducin	1,20	0,037	Structure
AAEL004393		afadin (af-6 protein)	1,64	0,001	Structure
AAEL012136		allergen, putative	1,37	0,009	Structure
AAEL014668		ankyrin 2,3/unc44	1,73	0,001	Structure
AAEL014742		ankyrin 2,3/unc44	2,83	0,001	Structure
AAEL001238		bap28	1,41	0,001	Structure
AAEL005845		beta chain spectrin	1,34	0,001	Structure
AAEL001829		beta nu integrin subunit	1,52	0,018	Structure
AAEL013704	<i>Arrb1</i>	beta-arrestin 1,	1,47	0,004	Structure
AAEL000597		cadherin	1,31	0,001	Structure
AAEL000700		cadherin	1,29	0,005	Structure
AAEL011164		cadherin	1,44	0,001	Structure
AAEL012421		cadherin	1,91	0,001	Structure
AAEL007898		calmin	1,47	0,001	Structure
AAEL003499		calsyntenin-1 precursor	1,26	0,015	Structure
AAEL008340		cell adhesion molecule	1,25	0,012	Structure
AAEL005627		chordin	1,27	0,036	Structure
AAEL007518		complexin, putative	1,58	0,001	Structure
AAEL009102		crumbs	1,60	0,001	Structure
AAEL010094		cyclin b	1,25	0,018	Structure
AAEL009572		cyclin B3	1,47	0,001	Structure
AAEL004839		cyclin t	1,54	0,001	Structure
AAEL009718	<i>dock2</i>	Dedicator of cytokinesis protein 2	1,69	0,001	Structure
AAEL004720	<i>dock9</i>	dedicator of cytokinesis protein 9	1,71	0,001	Structure
AAEL000993	<i>dally</i>	Division abnormally delayed protein	1,48	0,001	Structure
AAEL007132		dynein heavy chain	2,31	0,001	Structure
AAEL006651		dystrophin	2,09	0,001	Structure
AAEL004133		echinoid	1,20	0,043	Structure
AAEL013460	<i>Evi5</i>	ecotropic viral integration site	1,43	0,001	Structure
AAEL002469		endophilin a,	1,29	0,009	Structure
AAEL001223	<i>ELMO</i>	engulfment and cell motility protein	1,75	0,001	Structure
AAEL007950	<i>eps-15</i>	Epidermal growth factor receptor substrate 15	1,43	0,001	Structure
AAEL009173		fasciclin ii (fas ii)	1,29	0,014	Structure
AAEL003044		fasciclin-1 precursor	1,67	0,001	Structure
AAEL003607		fibrinogen and fibronectin	1,31	0,016	Structure
AAEL015235		flotillin-1	1,28	0,017	Structure
AAEL004041		flotillin-2	1,43	0,005	Structure
AAEL004666		focal adhesion kinase	1,31	0,011	Structure
AAEL014858		ganglioside induced differentiation associated protein	1,57	0,031	Structure

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (13/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL009055		gliotactin	1,33	0,001	Structure
AAEL000433		glypican	1,58	0,001	Structure
AAEL009678		golgi-specific brefeldin a-resistance factor	1,27	0,004	Structure
AAEL012446	<i>IAP6</i>	Inhibitor of Apoptosis (IAP) containing Baculoviral IAP Repeat(s) (BIR domains).	1,62	0,001	Structure
AAEL014251	<i>IAP5</i>	Inhibitor of Apoptosis (IAP) containing Baculoviral IAP Repeat(s) (BIR domains).	1,40	0,048	Structure
AAEL014847	<i>inx2</i>	innexin	1,25	0,008	Structure
AAEL011505		integral membrane pore glycoprotein gp210, putative	1,38	0,001	Structure
AAEL001603		integrin alpha-ps	1,34	0,004	Structure
AAEL015560		integrin alpha-ps	1,43	0,005	Structure
AAEL008431		kinase anchor protein	1,73	0,001	Structure
AAEL003082		kinectin, putative	2,51	0,001	Structure
AAEL001582		kinesin	3,09	0,001	Structure
AAEL014084		kinesin eg-5	1,38	0,005	Structure
AAEL001648		kinesin family member 21	1,43	0,001	Structure
AAEL005497		kinesin heavy chain	1,60	0,031	Structure
AAEL005323		kinesin motor protein, putative	2,19	0,001	Structure
AAEL004812		Kinesin-like protein unc-104	2,66	0,001	Structure
AAEL008773		laminin A chain, putative	1,48	0,001	Structure
AAEL001477		laminin alpha-1, 2 chain	1,32	0,001	Structure
AAEL005187		laminin gamma 1 chain	1,28	0,001	Structure
AAEL002336		LAP4 protein (Scribble protein) (Smell-impaired protein)	1,75	0,001	Structure
AAEL012547		lkb1 interacting protein	1,30	0,019	Structure
AAEL014706		LL5 beta protein, putative	1,45	0,001	Structure
AAEL003953		map/microtubule affinity-regulating kinase 2,4	1,20	0,048	Structure
AAEL014907		merlin/moesin/ezrin/radixin	1,33	0,045	Structure
AAEL005712		microtubule associated protein xmap215	1,37	0,001	Structure
AAEL005211		microtubule associated-protein orbit	1,25	0,010	Structure
AAEL002771		microtubule binding protein, putative	1,24	0,024	Structure
AAEL013242		microtubule binding protein, putative	1,52	0,001	Structure
AAEL006911		microtubule-associated protein	2,45	0,001	Structure
AAEL009847		microtubule-associated protein	2,11	0,001	Structure
AAEL008316		mitotic spindle assembly checkpoint protein mad2	1,35	0,031	Structure
AAEL004651		multiple ankyrin repeats single kh domain protein	3,83	0,001	Structure
AAEL002558		myomesin	9,16	0,001	Structure
AAEL002868		myosin	2,65	0,001	Structure
AAEL011436		myosin xv	1,23	0,014	Structure
AAEL001220		Myosin-VIIa (Protein crinkled)	1,22	0,020	Structure
AAEL002754		nephrin	1,64	0,001	Structure
AAEL003047		netrin	1,34	0,024	Structure
AAEL008695		netrin receptor unc5	2,17	0,011	Structure
AAEL003592		neurobeachin	1,29	0,013	Structure

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (14/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL003609		neurobeachin	2,23	0,001	Structure
AAEL014730		neurobeachin	1,60	0,001	Structure
AAEL014303		neuroligin,	1,28	0,020	Structure
AAEL005338		novex-3 (titin isoform)	4,60	0,001	Structure
AAEL000405		odd Oz protein	1,63	0,001	Structure
AAEL013308		odd Oz protein	3,78	0,001	Structure
AAEL000569		omega-crystallin, putative	1,29	0,017	Structure
AAEL009795		papilin	1,22	0,019	Structure
AAEL013353		profilin	1,21	0,032	Structure
AAEL008863	<i>prc1</i>	protein regulator of cytokinesis 1	1,38	0,001	Structure
AAEL004544		proteophosphoglycan, putative	1,41	0,010	Structure
AAEL000717		protocadherin	2,64	0,001	Structure
AAEL006534		protocadherin	3,91	0,001	Structure
AAEL018215	<i>DOCK</i>	putative dedicator of cytokinesis	1,94	0,033	Structure
AAEL018288		putative kakapo (Cu.q 90%)	1,71	0,001	Structure
AAEL018321		putative myosin IIIB (Cu.q 94%)	1,33	0,001	Structure
AAEL018342	<i>PKP4</i>	putative plakophilin-4	2,33	0,001	Structure
AAEL001574		septin	1,30	0,003	Structure
AAEL005560		sidestep protein	1,58	0,001	Structure
AAEL012840		stathmin	2,24	0,001	Structure
AAEL004549		synapsin	1,79	0,001	Structure
AAEL012541		synapsin	1,90	0,001	Structure
AAEL013529		synapsin	1,86	0,001	Structure
AAEL006222		talin	1,31	0,003	Structure
AAEL006092		tartan	1,57	0,010	Structure
AAEL009271		testin	1,52	0,001	Structure
AAEL007670	<i>tio</i>	tiptop	1,34	0,002	Structure
AAEL005324		titin	1,36	0,001	Structure
AAEL005317		titin (connectin)	1,20	0,048	Structure
AAEL003208	<i>Tb</i>	Tubby, putative	1,43	0,003	Structure
AAEL006522		turtle protein, isoform	1,77	0,001	Structure
AAEL000334		villin	1,38	0,001	Structure
AAEL013892	<i>WAS</i>	wiskott-aldrich syndrome protein	1,80	0,001	Structure
AAEL014297	<i>xpr1</i>	xenotropic and polytropic murine leukemia virus receptor xpr1	1,46	0,006	Structure
AAEL003063		semaphorin	1,28	0,007	Structure
AAEL005993		semaphorin	1,35	0,002	Structure
AAEL018187		0	1,65	0,001	Régulation de la transcription
AAEL018134		0	1,36	0,001	Régulation de la transcription
AAEL010343	<i>arnt</i>	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (arnt protein) (hypoxia-inducible factor 1 beta)	1,22	0,049	Régulation de la transcription
AAEL004715		b-cell translocation protein	4,66	0,001	Régulation de la transcription
AAEL001361		brahma associated protein 170kD, putative	1,24	0,020	Régulation de la transcription

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (15/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL008426	<i>Br-c</i>	broad-complex core-protein	2,48	0,001	Régulation de la transcription
AAEL003097		calmodulin-binding transcription activator (camta), drome	1,48	0,001	Régulation de la transcription
AAEL004381	<i>Cic</i>	capicua protein	1,29	0,008	Régulation de la transcription
AAEL013767		ccr4-not transcription complex	1,31	0,001	Régulation de la transcription
AAEL011751	<i>ccar1</i>	Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1	1,30	0,016	Régulation de la transcription
AAEL002230	<i>Kis</i>	chromodomain helicase DNA binding protein	2,74	0,001	Régulation de la transcription
AAEL004716	<i>CHD1</i>	chromodomain helicase DNA binding protein	1,30	0,001	Régulation de la transcription
AAEL010226		daughterless	1,69	0,001	Régulation de la transcription
AAEL013374	<i>disco</i>	disconnected protein	1,33	0,031	Régulation de la transcription
AAEL001119		DNA-binding protein Ewg, putative	1,28	0,036	Régulation de la transcription
AAEL006012		factor for adipocyte differentiation	1,66	0,001	Régulation de la transcription
AAEL007042	<i>fubp</i>	far upstream (fuse) binding protein	1,28	0,003	Régulation de la transcription
AAEL012607		fetal alzheimer antigen, falz	1,46	0,001	Régulation de la transcription
AAEL015015		fetal alzheimer antigen, falz	1,66	0,001	Régulation de la transcription
AAEL013278		ga binding protein beta chain (transcription factor e4tf1-47)	1,38	0,007	Régulation de la transcription
AAEL006447	<i>GATAb</i>	GATA transcription factor (GATAb)	1,92	0,001	Régulation de la transcription
AAEL010319		heat shock transcription factor (hsf)	1,23	0,042	Régulation de la transcription
AAEL005195		homeobox protein	1,80	0,001	Régulation de la transcription
AAEL012877		homeobox protein extradenticle, putative	1,28	0,025	Régulation de la transcription
AAEL003794		homeobox protein nk-2	1,44	0,023	Régulation de la transcription
AAEL011643		homothorax homeobox protein	1,43	0,001	Régulation de la transcription
AAEL001097		hypoxia-inducible factor	1,47	0,006	Régulation de la transcription
AAEL015383		hypoxia-inducible factor	1,39	0,039	Régulation de la transcription
AAEL007505		iroquois-class homeodomain protein irx	1,46	0,014	Régulation de la transcription
AAEL006567		max binding protein, mnt	1,46	0,001	Régulation de la transcription
AAEL005513		mAutres against dpp protein	1,58	0,001	Régulation de la transcription
AAEL012145	<i>nfrkb</i>	nfrkb	1,50	0,001	Régulation de la transcription
AAEL014038		NIF3-like protein 1, putative	1,47	0,001	Régulation de la transcription
AAEL001344	<i>opa</i>	pair-rule protein odd-paired	1,66	0,008	Régulation de la transcription
AAEL003032		PHD finger protein	1,21	0,047	Régulation de la transcription
AAEL004834		PHD finger protein	3,70	0,001	Régulation de la transcription
AAEL000015		PHD finger transcription factor	1,26	0,014	Régulation de la transcription
AAEL000181		polybromo-1	1,30	0,017	Régulation de la transcription
AAEL005844		posF21, putative	1,51	0,001	Régulation de la transcription
AAEL011178	<i>Psc</i>	posterior sex combs protein	1,25	0,041	Régulation de la transcription
AAEL003560		pou domain/drifter/cf-1a	1,58	0,001	Régulation de la transcription
AAEL009607		Protein lingerer	1,22	0,018	Régulation de la transcription
AAEL012134	<i>PURA</i>	pur-alpha	2,27	0,001	Régulation de la transcription
AAEL006419	<i>RBPJ</i>	recombining binding protein suppressor of hairless	1,32	0,025	Régulation de la transcription
AAEL015467		segmentation protein cap'n'collar	1,27	0,019	Régulation de la transcription
AAEL014711		sin3b	1,33	0,002	Régulation de la transcription

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (16/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL006956		suppressor of ty	1,22	0,018	Régulation de la transcription
AAEL013653		tata-box binding protein	1,67	0,001	Régulation de la transcription
AAEL012817	<i>E2f1</i>	transcription factor E2f, putative (dE2F)	1,21	0,042	Régulation de la transcription
AAEL006082		transcription initiation factor TFIIID subunit 1	1,23	0,028	Régulation de la transcription
AAEL010502		transcriptional regulator ATRX (X-linked helicase II)	1,54	0,001	Régulation de la transcription
AAEL004320		Without children protein, putative	1,42	0,001	Régulation de la transcription
AAEL001518		zinc finger protein	1,30	0,015	Régulation de la transcription
AAEL001526		zinc finger protein	1,54	0,001	Régulation de la transcription
AAEL001893		zinc finger protein	1,33	0,006	Régulation de la transcription
AAEL002390		zinc finger protein	1,27	0,034	Régulation de la transcription
AAEL003529		zinc finger protein	1,31	0,029	Régulation de la transcription
AAEL005130		zinc finger protein	1,53	0,001	Régulation de la transcription
AAEL005369		zinc finger protein	2,90	0,001	Régulation de la transcription
AAEL007427		zinc finger protein	2,14	0,001	Régulation de la transcription
AAEL009508		zinc finger protein	2,17	0,001	Régulation de la transcription
AAEL011942		zinc finger protein	1,31	0,016	Régulation de la transcription
AAEL012168		zinc finger protein	2,79	0,001	Régulation de la transcription
AAEL013028		zinc finger protein	1,36	0,001	Régulation de la transcription
AAEL014034		zinc finger protein	1,29	0,003	Régulation de la transcription
AAEL008591		zinc finger protein, putative	1,37	0,003	Régulation de la transcription
AAEL000970		predicted protein	1,47	0,001	Indéterminée
AAEL007751		predicted protein	1,27	0,041	Indéterminée
AAEL009430		predicted protein	1,63	0,001	Indéterminée
AAEL003240		unknown putative protein	11,12	0,024	Indéterminée
AAEL004476		unknown putative protein	11,05	0,043	Indéterminée
AAEL007435		unknown putative protein	8,25	0,002	Indéterminée
AAEL012909		unknown putative protein	7,58	0,001	Indéterminée
AAEL001120		unknown putative protein	6,77	0,001	Indéterminée
AAEL009639		unknown putative protein	4,61	0,003	Indéterminée
AAEL007436		unknown putative protein	4,48	0,001	Indéterminée
AAEL012910		unknown putative protein	4,13	0,001	Indéterminée
AAEL004669		unknown putative protein	4,12	0,001	Indéterminée
AAEL005814		unknown putative protein	4,08	0,001	Indéterminée
AAEL001386		unknown putative protein	4,04	0,010	Indéterminée
AAEL011563		unknown putative protein	4,03	0,010	Indéterminée
AAEL005447		unknown putative protein	3,80	0,038	Indéterminée
AAEL017360		unknown putative protein	3,77	0,001	Indéterminée
AAEL007805		unknown putative protein	3,60	0,002	Indéterminée
AAEL011948		unknown putative protein	3,43	0,024	Indéterminée
AAEL012354		unknown putative protein	3,35	0,001	Indéterminée
AAEL004800		unknown putative protein	3,30	0,001	Indéterminée

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (18/29)

Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL010715		unknown putative protein	3,26	0,008	Indéterminée
AAEL013042		unknown putative protein	3,20	0,001	Indéterminée
AAEL004632		unknown putative protein	3,08	0,001	Indéterminée
AAEL001135		unknown putative protein	3,05	0,007	Indéterminée
AAEL005357		unknown putative protein	3,04	0,001	Indéterminée
AAEL004044		unknown putative protein	2,87	0,001	Indéterminée
AAEL001323		unknown putative protein	2,81	0,001	Indéterminée
AAEL017011		unknown putative protein	2,77	0,001	Indéterminée
AAEL012416		unknown putative protein	2,76	0,001	Indéterminée
AAEL001313		unknown putative protein	2,65	0,001	Indéterminée
AAEL018121		unknown putative protein	2,62	0,001	Indéterminée
AAEL006680		unknown putative protein	2,60	0,001	Indéterminée
AAEL014308		unknown putative protein	2,58	0,001	Indéterminée
AAEL012754, AAEL012756		unknown putative protein	2,58	0,034	Indéterminée
AAEL007447		unknown putative protein	2,57	0,001	Indéterminée
AAEL001868		unknown putative protein	2,54	0,001	Indéterminée
AAEL009687		unknown putative protein	2,51	0,001	Indéterminée
AAEL011955		unknown putative protein	2,51	0,001	Indéterminée
AAEL010933		unknown putative protein	2,50	0,001	Indéterminée
AAEL014964		unknown putative protein	2,46	0,001	Indéterminée
AAEL002327, AAEL002364		unknown putative protein	2,46	0,019	Indéterminée
AAEL017329		unknown putative protein	2,45	0,001	Indéterminée
AAEL011987		unknown putative protein	2,44	0,001	Indéterminée
AAEL017241		unknown putative protein	2,43	0,001	Indéterminée
AAEL001651		unknown putative protein	2,42	0,001	Indéterminée
AAEL009620		unknown putative protein	2,41	0,001	Indéterminée
AAEL012462		unknown putative protein	2,38	0,001	Indéterminée
AAEL017480		unknown putative protein	2,38	0,001	Indéterminée
AAEL000591		unknown putative protein	2,34	0,001	Indéterminée
AAEL007817		unknown putative protein	2,33	0,001	Indéterminée
AAEL004197		unknown putative protein	2,33	0,001	Indéterminée
AAEL011106		unknown putative protein	2,31	0,001	Indéterminée
AAEL000604		unknown putative protein	2,31	0,001	Indéterminée
AAEL009873		unknown putative protein	2,30	0,001	Indéterminée
AAEL009269		unknown putative protein	2,29	0,001	Indéterminée
AAEL011064		unknown putative protein	2,29	0,001	Indéterminée
AAEL014954		unknown putative protein	2,28	0,001	Indéterminée
AAEL007234		unknown putative protein	2,28	0,001	Indéterminée
AAEL003795		unknown putative protein	2,26	0,001	Indéterminée
AAEL003777		unknown putative protein	2,25	0,001	Indéterminée
AAEL005587		unknown putative protein	2,25	0,001	Indéterminée

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (19/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL000727		unknown putative protein	2,24	0,001	Indéterminée
AAEL002382		unknown putative protein	2,23	0,001	Indéterminée
AAEL000969		unknown putative protein	2,22	0,044	Indéterminée
AAEL009755		unknown putative protein	2,21	0,001	Indéterminée
AAEL004211		unknown putative protein	2,21	0,001	Indéterminée
AAEL001383		unknown putative protein	2,18	0,020	Indéterminée
AAEL004166		unknown putative protein	2,16	0,001	Indéterminée
AAEL017497		unknown putative protein	2,16	0,001	Indéterminée
AAEL014030		unknown putative protein	2,13	0,001	Indéterminée
AAEL005867		unknown putative protein	2,12	0,001	Indéterminée
AAEL005589		unknown putative protein	2,11	0,021	Indéterminée
AAEL008054		unknown putative protein	2,09	0,001	Indéterminée
AAEL010507		unknown putative protein	2,09	0,037	Indéterminée
AAEL013868		unknown putative protein	2,08	0,001	Indéterminée
AAEL013174		unknown putative protein	2,04	0,001	Indéterminée
AAEL000826		unknown putative protein	2,04	0,001	Indéterminée
AAEL004363		unknown putative protein	2,03	0,001	Indéterminée
AAEL010292		unknown putative protein	2,03	0,001	Indéterminée
AAEL011956		unknown putative protein	2,03	0,001	Indéterminée
AAEL009405		unknown putative protein	2,02	0,001	Indéterminée
AAEL012815		unknown putative protein	2,01	0,001	Indéterminée
AAEL017108		unknown putative protein	2,01	0,001	Indéterminée
AAEL002967		unknown putative protein	2,01	0,001	Indéterminée
AAEL006120		unknown putative protein	2,01	0,001	Indéterminée
AAEL010034		unknown putative protein	2,00	0,001	Indéterminée
AAEL005204		unknown putative protein	1,96	0,001	Indéterminée
AAEL009381		unknown putative protein	1,96	0,001	Indéterminée
AAEL003733		unknown putative protein	1,96	0,001	Indéterminée
AAEL004391		unknown putative protein	1,95	0,001	Indéterminée
AAEL002979		unknown putative protein	1,95	0,001	Indéterminée
AAEL005091		unknown putative protein	1,95	0,001	Indéterminée
AAEL017321		unknown putative protein	1,95	0,001	Indéterminée
AAEL017575		unknown putative protein	1,94	0,001	Indéterminée
AAEL005498		unknown putative protein	1,93	0,003	Indéterminée
AAEL015650		unknown putative protein	1,93	0,043	Indéterminée
AAEL004731		unknown putative protein	1,91	0,001	Indéterminée
AAEL018026		unknown putative protein	1,90	0,022	Indéterminée
AAEL002093		unknown putative protein	1,90	0,001	Indéterminée
AAEL011644		unknown putative protein	1,88	0,008	Indéterminée
AAEL011950		unknown putative protein	1,88	0,005	Indéterminée
AAEL011235		unknown putative protein	1,87	0,001	Indéterminée

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (20/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL000841		unknown putative protein	1,87	0,027	Indéterminée
AAEL006555		unknown putative protein	1,84	0,001	Indéterminée
AAEL009235		unknown putative protein	1,84	0,001	Indéterminée
AAEL005421		unknown putative protein	1,82	0,001	Indéterminée
AAEL011872		unknown putative protein	1,82	0,001	Indéterminée
AAEL006664		unknown putative protein	1,82	0,001	Indéterminée
AAEL017274		unknown putative protein	1,81	0,001	Indéterminée
AAEL013258		unknown putative protein	1,81	0,001	Indéterminée
AAEL005516		unknown putative protein	1,80	0,001	Indéterminée
AAEL017077		unknown putative protein	1,80	0,001	Indéterminée
AAEL012768		unknown putative protein	1,79	0,001	Indéterminée
AAEL006861		unknown putative protein	1,78	0,003	Indéterminée
AAEL002883		unknown putative protein	1,78	0,001	Indéterminée
AAEL004803		unknown putative protein	1,78	0,014	Indéterminée
AAEL011413		unknown putative protein	1,78	0,001	Indéterminée
AAEL018115		unknown putative protein	1,78	0,001	Indéterminée
AAEL011392		unknown putative protein	1,77	0,001	Indéterminée
AAEL017280		unknown putative protein	1,77	0,001	Indéterminée
AAEL006761, AAEL006766		unknown putative protein	1,76	0,042	Indéterminée
AAEL017240		unknown putative protein	1,76	0,001	Indéterminée
AAEL007744		unknown putative protein	1,74	0,020	Indéterminée
AAEL005529		unknown putative protein	1,74	0,001	Indéterminée
AAEL002865		unknown putative protein	1,74	0,001	Indéterminée
AAEL007376		unknown putative protein	1,74	0,001	Indéterminée
AAEL002408		unknown putative protein	1,74	0,001	Indéterminée
AAEL001295		unknown putative protein	1,73	0,001	Indéterminée
AAEL012850		unknown putative protein	1,72	0,001	Indéterminée
AAEL016963		unknown putative protein	1,71	0,001	Indéterminée
AAEL001116		unknown putative protein	1,71	0,001	Indéterminée
AAEL002122		unknown putative protein	1,71	0,001	Indéterminée
AAEL002169		unknown putative protein	1,71	0,001	Indéterminée
AAEL007379		unknown putative protein	1,70	0,017	Indéterminée
AAEL011569		unknown putative protein	1,70	0,001	Indéterminée
AAEL010064		unknown putative protein	1,70	0,001	Indéterminée
AAEL000416		unknown putative protein	1,69	0,001	Indéterminée
AAEL009684		unknown putative protein	1,68	0,019	Indéterminée
AAEL005055		unknown putative protein	1,68	0,001	Indéterminée
AAEL002090, AAEL002125		unknown putative protein	1,68	0,001	Indéterminée
AAEL000914		unknown putative protein	1,68	0,006	Indéterminée
AAEL007985		unknown putative protein	1,68	0,001	Indéterminée
AAEL017001		unknown putative protein	1,67	0,001	Indéterminée

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (21/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL009265		unknown putative protein	1,67	0,001	Indéterminée
AAEL003368		unknown putative protein	1,67	0,001	Indéterminée
AAEL011816		unknown putative protein	1,67	0,009	Indéterminée
AAEL012789		unknown putative protein	1,66	0,042	Indéterminée
AAEL014316		unknown putative protein	1,66	0,001	Indéterminée
AAEL004934		unknown putative protein	1,66	0,001	Indéterminée
AAEL007378		unknown putative protein	1,65	0,001	Indéterminée
AAEL010871		unknown putative protein	1,65	0,001	Indéterminée
AAEL006194		unknown putative protein	1,65	0,001	Indéterminée
AAEL008667		unknown putative protein	1,65	0,029	Indéterminée
AAEL013079		unknown putative protein	1,64	0,001	Indéterminée
AAEL017338		unknown putative protein	1,64	0,001	Indéterminée
AAEL002037		unknown putative protein	1,64	0,001	Indéterminée
AAEL006926		unknown putative protein	1,64	0,001	Indéterminée
AAEL010259		unknown putative protein	1,64	0,006	Indéterminée
AAEL006777		unknown putative protein	1,63	0,001	Indéterminée
AAEL014173		unknown putative protein	1,62	0,018	Indéterminée
AAEL005209		unknown putative protein	1,62	0,001	Indéterminée
AAEL001819		unknown putative protein	1,62	0,001	Indéterminée
AAEL010364		unknown putative protein	1,62	0,001	Indéterminée
AAEL011862		unknown putative protein	1,62	0,001	Indéterminée
AAEL017100		unknown putative protein	1,62	0,008	Indéterminée
AAEL007927		unknown putative protein	1,61	0,001	Indéterminée
AAEL008503		unknown putative protein	1,61	0,013	Indéterminée
AAEL011512		unknown putative protein	1,61	0,017	Indéterminée
AAEL008142		unknown putative protein	1,61	0,001	Indéterminée
AAEL002392		unknown putative protein	1,61	0,001	Indéterminée
AAEL013445		unknown putative protein	1,61	0,001	Indéterminée
AAEL013708		unknown putative protein	1,60	0,026	Indéterminée
AAEL007071		unknown putative protein	1,60	0,001	Indéterminée
AAEL005525		unknown putative protein	1,60	0,001	Indéterminée
AAEL015615		unknown putative protein	1,60	0,001	Indéterminée
AAEL016974		unknown putative protein	1,60	0,019	Indéterminée
AAEL001294		unknown putative protein	1,60	0,001	Indéterminée
AAEL015564		unknown putative protein	1,59	0,004	Indéterminée
AAEL017224		unknown putative protein	1,59	0,044	Indéterminée
AAEL014357		unknown putative protein	1,59	0,006	Indéterminée
AAEL003724		unknown putative protein	1,59	0,001	Indéterminée
AAEL009070		unknown putative protein	1,58	0,001	Indéterminée
AAEL000474		unknown putative protein	1,58	0,001	Indéterminée
AAEL001147		unknown putative protein	1,58	0,001	Indéterminée

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (22/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL017151		unknown putative protein	1,58	0,001	Indéterminée
AAEL009821		unknown putative protein	1,57	0,001	Indéterminée
AAEL008229		unknown putative protein	1,57	0,001	Indéterminée
AAEL008422		unknown putative protein	1,57	0,001	Indéterminée
AAEL001760		unknown putative protein	1,57	0,001	Indéterminée
AAEL010941		unknown putative protein	1,56	0,002	Indéterminée
AAEL002369		unknown putative protein	1,56	0,001	Indéterminée
AAEL012147		unknown putative protein	1,56	0,001	Indéterminée
AAEL008842		unknown putative protein	1,55	0,003	Indéterminée
AAEL000262		unknown putative protein	1,55	0,001	Indéterminée
AAEL007990		unknown putative protein	1,55	0,001	Indéterminée
AAEL004354		unknown putative protein	1,55	0,011	Indéterminée
AAEL002925		unknown putative protein	1,55	0,001	Indéterminée
AAEL011138		unknown putative protein	1,55	0,032	Indéterminée
AAEL017423		unknown putative protein	1,55	0,001	Indéterminée
AAEL002747, AAEL002751		unknown putative protein	1,55	0,001	Indéterminée
AAEL017141		unknown putative protein	1,54	0,001	Indéterminée
AAEL012880		unknown putative protein	1,54	0,001	Indéterminée
AAEL005948		unknown putative protein	1,54	0,020	Indéterminée
AAEL004849		unknown putative protein	1,54	0,001	Indéterminée
AAEL013847, AAEL013849		unknown putative protein	1,53	0,017	Indéterminée
AAEL010690		unknown putative protein	1,53	0,026	Indéterminée
AAEL001283		unknown putative protein	1,52	0,001	Indéterminée
AAEL003780		unknown putative protein	1,52	0,001	Indéterminée
AAEL003128		unknown putative protein	1,52	0,001	Indéterminée
AAEL002345		unknown putative protein	1,52	0,001	Indéterminée
AAEL005365		unknown putative protein	1,52	0,022	Indéterminée
AAEL005196		unknown putative protein	1,51	0,001	Indéterminée
AAEL002463		unknown putative protein	1,51	0,001	Indéterminée
AAEL001436		unknown putative protein	1,51	0,001	Indéterminée
AAEL006112		unknown putative protein	1,51	0,001	Indéterminée
AAEL000819		unknown putative protein	1,51	0,020	Indéterminée
AAEL013965		unknown putative protein	1,51	0,001	Indéterminée
AAEL013716		unknown putative protein	1,51	0,011	Indéterminée
AAEL007465		unknown putative protein	1,51	0,001	Indéterminée
AAEL005246		unknown putative protein	1,51	0,035	Indéterminée
AAEL017008		unknown putative protein	1,51	0,001	Indéterminée
AAEL006229		unknown putative protein	1,51	0,007	Indéterminée
AAEL005831		unknown putative protein	1,50	0,002	Indéterminée
AAEL017550		unknown putative protein	1,50	0,001	Indéterminée
AAEL011479		unknown putative protein	1,50	0,001	Indéterminée

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (23/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL004508		unknown putative protein	1,50	0,009	Indéterminée
AAEL007538		unknown putative protein	1,49	0,001	Indéterminée
AAEL017163		unknown putative protein	1,49	0,043	Indéterminée
AAEL002835		unknown putative protein	1,49	0,020	Indéterminée
AAEL011241		unknown putative protein	1,48	0,001	Indéterminée
AAEL017171		unknown putative protein	1,48	0,035	Indéterminée
AAEL000390		unknown putative protein	1,48	0,036	Indéterminée
AAEL000255		unknown putative protein	1,47	0,018	Indéterminée
AAEL008164		unknown putative protein	1,47	0,001	Indéterminée
AAEL011533		unknown putative protein	1,47	0,001	Indéterminée
AAEL009683		unknown putative protein	1,47	0,001	Indéterminée
AAEL013178		unknown putative protein	1,47	0,029	Indéterminée
AAEL013944		unknown putative protein	1,47	0,010	Indéterminée
AAEL015522		unknown putative protein	1,47	0,003	Indéterminée
AAEL011597		unknown putative protein	1,47	0,025	Indéterminée
AAEL016961		unknown putative protein	1,47	0,006	Indéterminée
AAEL015440		unknown putative protein	1,47	0,002	Indéterminée
AAEL010925		unknown putative protein	1,47	0,035	Indéterminée
AAEL007075		unknown putative protein	1,46	0,001	Indéterminée
AAEL010543		unknown putative protein	1,46	0,002	Indéterminée
AAEL015242		unknown putative protein	1,46	0,004	Indéterminée
AAEL002104		unknown putative protein	1,46	0,020	Indéterminée
AAEL012393		unknown putative protein	1,46	0,001	Indéterminée
AAEL017540		unknown putative protein	1,46	0,001	Indéterminée
AAEL000511		unknown putative protein	1,45	0,007	Indéterminée
AAEL000565		unknown putative protein	1,45	0,002	Indéterminée
AAEL011910		unknown putative protein	1,45	0,001	Indéterminée
AAEL012233		unknown putative protein	1,45	0,001	Indéterminée
AAEL013335		unknown putative protein	1,45	0,008	Indéterminée
AAEL017088		unknown putative protein	1,45	0,001	Indéterminée
AAEL009823		unknown putative protein	1,45	0,001	Indéterminée
AAEL011330		unknown putative protein	1,45	0,011	Indéterminée
AAEL004274		unknown putative protein	1,45	0,001	Indéterminée
AAEL005389		unknown putative protein	1,45	0,012	Indéterminée
AAEL018277		unknown putative protein	1,44	0,001	Indéterminée
AAEL010888		unknown putative protein	1,44	0,003	Indéterminée
AAEL009724		unknown putative protein	1,44	0,025	Indéterminée
AAEL009662		unknown putative protein	1,44	0,001	Indéterminée
AAEL003043		unknown putative protein	1,44	0,017	Indéterminée
AAEL000747		unknown putative protein	1,44	0,001	Indéterminée
AAEL012463		unknown putative protein	1,44	0,026	Indéterminée

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (24/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL004169		unknown putative protein	1,44	0,001	Indéterminée
AAEL006644		unknown putative protein	1,43	0,002	Indéterminée
AAEL002070		unknown putative protein	1,43	0,001	Indéterminée
AAEL012741		unknown putative protein	1,43	0,015	Indéterminée
AAEL013635		unknown putative protein	1,43	0,008	Indéterminée
AAEL003133		unknown putative protein	1,43	0,001	Indéterminée
AAEL010018		unknown putative protein	1,43	0,001	Indéterminée
AAEL003025		unknown putative protein	1,43	0,003	Indéterminée
AAEL011029		unknown putative protein	1,43	0,004	Indéterminée
AAEL005509		unknown putative protein	1,43	0,037	Indéterminée
AAEL018705		unknown putative protein	1,43	0,001	Indéterminée
AAEL006247		unknown putative protein	1,42	0,001	Indéterminée
AAEL015398		unknown putative protein	1,42	0,015	Indéterminée
AAEL014506		unknown putative protein	1,42	0,001	Indéterminée
AAEL007199		unknown putative protein	1,42	0,001	Indéterminée
AAEL017109		unknown putative protein	1,42	0,001	Indéterminée
AAEL003671		unknown putative protein	1,42	0,001	Indéterminée
AAEL017207		unknown putative protein	1,42	0,001	Indéterminée
AAEL006265		unknown putative protein	1,42	0,001	Indéterminée
AAEL002729		unknown putative protein	1,42	0,002	Indéterminée
AAEL003051		unknown putative protein	1,42	0,001	Indéterminée
AAEL004108		unknown putative protein	1,42	0,009	Indéterminée
AAEL003941		unknown putative protein	1,42	0,001	Indéterminée
AAEL010308		unknown putative protein	1,41	0,001	Indéterminée
AAEL006152		unknown putative protein	1,41	0,001	Indéterminée
AAEL007321		unknown putative protein	1,41	0,012	Indéterminée
AAEL003362		unknown putative protein	1,41	0,012	Indéterminée
AAEL003532		unknown putative protein	1,41	0,004	Indéterminée
AAEL012104		unknown putative protein	1,41	0,050	Indéterminée
AAEL013156		unknown putative protein	1,40	0,001	Indéterminée
AAEL015335		unknown putative protein	1,40	0,040	Indéterminée
AAEL003036		unknown putative protein	1,40	0,003	Indéterminée
AAEL004238		unknown putative protein	1,40	0,025	Indéterminée
AAEL005736		unknown putative protein	1,40	0,001	Indéterminée
AAEL011205		unknown putative protein	1,40	0,014	Indéterminée
AAEL011384		unknown putative protein	1,40	0,003	Indéterminée
AAEL003343		unknown putative protein	1,40	0,025	Indéterminée
AAEL011458		unknown putative protein	1,40	0,001	Indéterminée
AAEL003623		unknown putative protein	1,40	0,001	Indéterminée
AAEL005205		unknown putative protein	1,40	0,008	Indéterminée
AAEL013334		unknown putative protein	1,40	0,001	Indéterminée

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (25/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL015299		unknown putative protein	1,39	0,006	Indéterminée
AAEL011635		unknown putative protein	1,39	0,035	Indéterminée
AAEL008608		unknown putative protein	1,39	0,001	Indéterminée
AAEL000860		unknown putative protein	1,39	0,001	Indéterminée
AAEL016976		unknown putative protein	1,39	0,009	Indéterminée
AAEL007902		unknown putative protein	1,39	0,009	Indéterminée
AAEL013264		unknown putative protein	1,39	0,025	Indéterminée
AAEL004128		unknown putative protein	1,39	0,018	Indéterminée
AAEL007137		unknown putative protein	1,39	0,003	Indéterminée
AAEL008722		unknown putative protein	1,39	0,001	Indéterminée
AAEL004149		unknown putative protein	1,39	0,001	Indéterminée
AAEL017122		unknown putative protein	1,39	0,047	Indéterminée
AAEL017248		unknown putative protein	1,38	0,001	Indéterminée
AAEL002100		unknown putative protein	1,38	0,009	Indéterminée
AAEL009171		unknown putative protein	1,38	0,001	Indéterminée
AAEL004337		unknown putative protein	1,38	0,002	Indéterminée
AAEL011061		unknown putative protein	1,38	0,005	Indéterminée
AAEL002498		unknown putative protein	1,38	0,001	Indéterminée
AAEL000362		unknown putative protein	1,38	0,005	Indéterminée
AAEL010175		unknown putative protein	1,38	0,040	Indéterminée
AAEL002339		unknown putative protein	1,38	0,001	Indéterminée
AAEL001848		unknown putative protein	1,37	0,008	Indéterminée
AAEL010701		unknown putative protein	1,37	0,013	Indéterminée
AAEL017098		unknown putative protein	1,37	0,001	Indéterminée
AAEL004140		unknown putative protein	1,37	0,002	Indéterminée
AAEL013030		unknown putative protein	1,37	0,009	Indéterminée
AAEL013075		unknown putative protein	1,37	0,001	Indéterminée
AAEL006433		unknown putative protein	1,37	0,001	Indéterminée
AAEL017245		unknown putative protein	1,36	0,003	Indéterminée
AAEL003088		unknown putative protein	1,36	0,042	Indéterminée
AAEL014998		unknown putative protein	1,36	0,017	Indéterminée
AAEL007550		unknown putative protein	1,36	0,004	Indéterminée
AAEL014226		unknown putative protein	1,36	0,001	Indéterminée
AAEL009725		unknown putative protein	1,36	0,044	Indéterminée
AAEL009866		unknown putative protein	1,36	0,019	Indéterminée
AAEL009437		unknown putative protein	1,36	0,001	Indéterminée
AAEL015665		unknown putative protein	1,36	0,048	Indéterminée
AAEL012816		unknown putative protein	1,35	0,014	Indéterminée
AAEL007747		unknown putative protein	1,35	0,004	Indéterminée
AAEL008954		unknown putative protein	1,35	0,001	Indéterminée
AAEL007638		unknown putative protein	1,35	0,007	Indéterminée

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (26/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL007206		unknown putative protein	1,35	0,016	Indéterminée
AAEL013393		unknown putative protein	1,35	0,019	Indéterminée
AAEL010795		unknown putative protein	1,35	0,005	Indéterminée
AAEL008471		unknown putative protein	1,35	0,021	Indéterminée
AAEL007242		unknown putative protein	1,35	0,001	Indéterminée
AAEL007418		unknown putative protein	1,34	0,014	Indéterminée
AAEL008885		unknown putative protein	1,34	0,003	Indéterminée
AAEL012744		unknown putative protein	1,34	0,003	Indéterminée
AAEL011426		unknown putative protein	1,34	0,044	Indéterminée
AAEL017159		unknown putative protein	1,34	0,001	Indéterminée
AAEL014826		unknown putative protein	1,34	0,032	Indéterminée
AAEL014054		unknown putative protein	1,34	0,004	Indéterminée
AAEL007312		unknown putative protein	1,34	0,008	Indéterminée
AAEL007317		unknown putative protein	1,34	0,004	Indéterminée
AAEL001803		unknown putative protein	1,33	0,006	Indéterminée
AAEL001921		unknown putative protein	1,33	0,001	Indéterminée
AAEL012166		unknown putative protein	1,33	0,028	Indéterminée
AAEL008961		unknown putative protein	1,33	0,011	Indéterminée
AAEL006178		unknown putative protein	1,33	0,001	Indéterminée
AAEL010597		unknown putative protein	1,52	0,035	Indéterminée
AAEL000172		unknown putative protein	1,33	0,001	Indéterminée
AAEL014502		unknown putative protein	1,33	0,021	Indéterminée
AAEL014071		unknown putative protein	1,33	0,011	Indéterminée
AAEL009592		unknown putative protein	1,33	0,016	Indéterminée
AAEL017551		unknown putative protein	1,33	0,001	Indéterminée
AAEL002924		unknown putative protein	1,33	0,004	Indéterminée
AAEL017504		unknown putative protein	1,33	0,031	Indéterminée
AAEL000994		unknown putative protein	1,32	0,003	Indéterminée
AAEL008615		unknown putative protein	1,32	0,001	Indéterminée
AAEL018224		unknown putative protein	1,32	0,001	Indéterminée
AAEL001543		unknown putative protein	1,32	0,034	Indéterminée
AAEL010401		unknown putative protein	1,32	0,019	Indéterminée
AAEL012905		unknown putative protein	1,32	0,001	Indéterminée
AAEL010567		unknown putative protein	1,32	0,014	Indéterminée
AAEL017535		unknown putative protein	1,32	0,025	Indéterminée
AAEL002815		unknown putative protein	1,32	0,006	Indéterminée
AAEL010061		unknown putative protein	1,32	0,002	Indéterminée
AAEL003070		unknown putative protein	1,32	0,013	Indéterminée
AAEL008557		unknown putative protein	1,32	0,001	Indéterminée
AAEL018351		unknown putative protein	1,32	0,005	Indéterminée
AAEL010147		unknown putative protein	1,32	0,001	Indéterminée

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (27/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL005846		unknown putative protein	1,32	0,018	Indéterminée
AAEL017437		unknown putative protein	1,31	0,001	Indéterminée
AAEL008377		unknown putative protein	1,31	0,011	Indéterminée
AAEL005126		unknown putative protein	1,31	0,040	Indéterminée
AAEL013402		unknown putative protein	1,31	0,013	Indéterminée
AAEL002621		unknown putative protein	1,31	0,013	Indéterminée
AAEL015593		unknown putative protein	1,31	0,049	Indéterminée
AAEL006889		unknown putative protein	1,31	0,007	Indéterminée
AAEL007172		unknown putative protein	1,31	0,036	Indéterminée
AAEL006087		unknown putative protein	1,31	0,001	Indéterminée
AAEL004916		unknown putative protein	1,30	0,033	Indéterminée
AAEL011321		unknown putative protein	1,30	0,039	Indéterminée
AAEL005304		unknown putative protein	1,30	0,004	Indéterminée
AAEL011371		unknown putative protein	1,30	0,001	Indéterminée
AAEL017148		unknown putative protein	1,30	0,007	Indéterminée
AAEL018314		unknown putative protein	1,30	0,003	Indéterminée
AAEL013731		unknown putative protein	1,30	0,045	Indéterminée
AAEL018126		unknown putative protein	1,30	0,001	Indéterminée
AAEL011420		unknown putative protein	1,30	0,004	Indéterminée
AAEL010078		unknown putative protein	1,30	0,004	Indéterminée
AAEL003923		unknown putative protein	1,29	0,004	Indéterminée
AAEL013364		unknown putative protein	1,29	0,003	Indéterminée
AAEL013969		unknown putative protein	1,29	0,016	Indéterminée
AAEL003901		unknown putative protein	1,29	0,009	Indéterminée
AAEL017083		unknown putative protein	1,29	0,001	Indéterminée
AAEL017114		unknown putative protein	1,29	0,046	Indéterminée
AAEL017176		unknown putative protein	1,29	0,002	Indéterminée
AAEL014367		unknown putative protein	1,37	0,001	Indéterminée
AAEL008590		unknown putative protein	1,28	0,004	Indéterminée
AAEL010978		unknown putative protein	1,28	0,006	Indéterminée
AAEL008642		unknown putative protein	1,28	0,003	Indéterminée
AAEL002340		unknown putative protein	1,28	0,012	Indéterminée
AAEL001857		unknown putative protein	1,28	0,027	Indéterminée
AAEL018282		unknown putative protein	1,28	0,004	Indéterminée
AAEL017066		unknown putative protein	1,28	0,001	Indéterminée
AAEL005231		unknown putative protein	1,28	0,032	Indéterminée
AAEL017116		unknown putative protein	1,28	0,003	Indéterminée
AAEL002896		unknown putative protein	1,28	0,031	Indéterminée
AAEL006976		unknown putative protein	1,28	0,035	Indéterminée
AAEL001742		unknown putative protein	1,28	0,005	Indéterminée
AAEL003291		unknown putative protein	1,27	0,004	Indéterminée

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (28/29)

Numéro d'accion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL003252		unknown putative protein	1,27	0,008	Indéterminée
AAEL017121		unknown putative protein	1,27	0,010	Indéterminée
AAEL010510		unknown putative protein	1,27	0,031	Indéterminée
AAEL004332		unknown putative protein	1,27	0,043	Indéterminée
AAEL001379		unknown putative protein	1,27	0,017	Indéterminée
AAEL018133		unknown putative protein	1,27	0,037	Indéterminée
AAEL001692		unknown putative protein	1,26	0,018	Indéterminée
AAEL012169		unknown putative protein	1,26	0,015	Indéterminée
AAEL017212		unknown putative protein	1,26	0,006	Indéterminée
AAEL011240		unknown putative protein	1,26	0,011	Indéterminée
AAEL006395		unknown putative protein	1,26	0,010	Indéterminée
AAEL006211		unknown putative protein	1,26	0,039	Indéterminée
AAEL017010		unknown putative protein	1,26	0,022	Indéterminée
AAEL001583		unknown putative protein	1,26	0,010	Indéterminée
AAEL013147		unknown putative protein	1,26	0,012	Indéterminée
AAEL017049		unknown putative protein	1,26	0,015	Indéterminée
AAEL004818		unknown putative protein	1,26	0,019	Indéterminée
AAEL018323		unknown putative protein	1,26	0,006	Indéterminée
AAEL005305		unknown putative protein	1,25	0,033	Indéterminée
AAEL004838		unknown putative protein	1,25	0,010	Indéterminée
AAEL008063		unknown putative protein	1,25	0,017	Indéterminée
AAEL003373		unknown putative protein	1,24	0,016	Indéterminée
AAEL018320		unknown putative protein	1,24	0,017	Indéterminée
AAEL008495		unknown putative protein	1,24	0,032	Indéterminée
AAEL011827		unknown putative protein	1,24	0,033	Indéterminée
AAEL000276		unknown putative protein	1,24	0,014	Indéterminée
AAEL004969, AAEL018103		unknown putative protein	1,24	0,023	Indéterminée
AAEL014299		unknown putative protein	1,24	0,035	Indéterminée
AAEL007605		unknown putative protein	1,24	0,045	Indéterminée
AAEL018226		unknown putative protein	1,24	0,032	Indéterminée
AAEL003924		unknown putative protein	1,24	0,015	Indéterminée
AAEL001939		unknown putative protein	1,23	0,022	Indéterminée
AAEL006589		unknown putative protein	1,23	0,015	Indéterminée
AAEL005024		unknown putative protein	1,23	0,041	Indéterminée
AAEL009422		unknown putative protein	1,23	0,033	Indéterminée
AAEL009893		unknown putative protein	1,23	0,027	Indéterminée
AAEL006071		unknown putative protein	1,23	0,048	Indéterminée
AAEL005224		unknown putative protein	1,33	0,003	Indéterminée
AAEL008073		unknown putative protein	1,23	0,020	Indéterminée
AAEL007258		unknown putative protein	1,23	0,028	Indéterminée
AAEL004417		unknown putative protein	1,23	0,023	Indéterminée

ANNEXE 6 - L1F1 – Gènes sur-transcrits (29/29)

Numéro d'accèsion Vectorbase	Nom du gène	Description du gène	Fold change	q-valeur	Classe
AAEL017054		unknown putative protein	1,23	0,025	Indéterminée
AAEL018274		unknown putative protein	1,23	0,046	Indéterminée
AAEL017276		unknown putative protein	1,23	0,033	Indéterminée
AAEL003768		unknown putative protein	1,23	0,032	Indéterminée
AAEL017357		unknown putative protein	1,23	0,022	Indéterminée
AAEL009386		unknown putative protein	1,23	0,017	Indéterminée
AAEL005970		unknown putative protein	1,22	0,029	Indéterminée
AAEL003955		unknown putative protein	1,22	0,024	Indéterminée
AAEL002788		unknown putative protein	1,22	0,040	Indéterminée
AAEL012243		unknown putative protein	1,22	0,021	Indéterminée
AAEL014559		unknown putative protein	1,22	0,031	Indéterminée
AAEL008645		unknown putative protein	1,22	0,025	Indéterminée
AAEL018128		unknown putative protein	1,22	0,042	Indéterminée
AAEL001322		unknown putative protein	1,22	0,048	Indéterminée
AAEL004506		unknown putative protein	1,21	0,034	Indéterminée
AAEL011476		unknown putative protein	1,21	0,046	Indéterminée
AAEL000883		unknown putative protein	1,21	0,038	Indéterminée
AAEL010574		unknown putative protein	1,21	0,037	Indéterminée
AAEL007082		unknown putative protein	1,21	0,047	Indéterminée
AAEL018235		unknown putative protein	1,28	0,003	Indéterminée
AAEL017315		unknown putative protein	1,23	0,015	Indéterminée
AAEL010971		unknown putative protein	1,35	0,001	Indéterminée
AAEL005425		unknown putative protein	1,45	0,001	Indéterminée