

# Capacités d'adaptation des populations naturelles à la contamination des milieux aquatiques : cas d'étude du cadmium chez le crustacé *Gammarus fossarum*

Amandine Vigneron

## ► To cite this version:

Amandine Vigneron. Capacités d'adaptation des populations naturelles à la contamination des milieux aquatiques : cas d'étude du cadmium chez le crustacé *Gammarus fossarum*. Ecosystèmes. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10100 . tel-01256734

**HAL Id: tel-01256734**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01256734>**

Submitted on 15 Jan 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.



## THESE DE DOCTORAT

N° Ordre 100-2015

Présentée et soutenue publiquement le 10 juillet 2015 par

**Amandine VIGNERON**

En vue de l'obtention du grade de

**Docteur**

de l'Université de Lyon

**Spécialité: Ecotoxicologie Evolutive**

**Capacités d'adaptation des populations naturelles à la contamination des milieux  
aquatiques: cas d'étude du cadmium chez le crustacé *Gammarus fossarum*.**

Délivré par l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

ECOLE DOCTORALE : Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

### JURY

|                           |                                                |                       |
|---------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|
| Mme Marie-Agnes COUTELLEC | Chargée de Recherche, Inra de Rennes           | Rapporteur            |
| M Jean LAROCHE            | Professeur, Université de Bretagne Occidentale | Rapporteur            |
| M Guy CHARMANTIER         | Professeur, Université de Montpellier          | Examineur             |
| M Simon DEVIN             | Maître de Conférences, Université de Lorraine  | Examineur             |
| Mme Dominique PONTIER     | Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1   | Examineur             |
| M Wilfried SANCHEZ        | Directeur général de la Fondation Rovaltain    | Examineur             |
| M Olivier GEFFARD         | Chargé de Recherche, Irstea Lyon-Villeurbanne  | Directeur de thèse    |
| M Arnaud CHAUMOT          | Chargé de Recherche, Irstea Lyon-Villeurbanne  | Co-directeur de thèse |









# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

**M. François-Noël GILLY**

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

## *COMPOSANTES SANTE*

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

## *COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE*

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE



## REMERCIEMENTS

*Voilà sans doute la partie de ce manuscrit à laquelle j'attache le plus d'importance. J'ai souvent pensé à ce jour où j'écrirai ces remerciements. Et voilà que ce jour est déjà là, et que c'est aussi compliqué que bouleversant à écrire que je l'avais imaginé. Aller, je me lance...*

*Je commencerai par remercier mes deux encadrants, Arnaud Chaumot et Olivier Geffard qui un beau jour de printemps en 2011 ont fait le pari de miser sur moi pour mener à bien ces travaux. J'aimerais leur dire que je ne leur serai jamais assez reconnaissante de m'avoir accordé ce privilège de faire une thèse et leur dire merci pour la richesse de leur enseignement, pour leur disponibilité, pour avoir su me guider tout au long de ces travaux et pour m'avoir laissé le temps d'écrire ce manuscrit à mon rythme. Merci pour votre patience et votre générosité. Olivier, merci pour ta capacité à me montrer ma thèse et mes résultats sous un angle différent et ta façon habile et constructive de bousculer tes étudiants. Arnaud, merci pour ton soutien quotidien infailible, 15 minutes avant ma première conf' dans le hall de la SETAC à Glasgow, pour les tris de bouchons le soir avant de partir, pour m'avoir laissé symboliquement cliquer sur le bouton pour soumettre mon premier papier etc.*

*Je remercie Marie-Agnès Coutellec et Jean Laroche d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et ce malgré le délai un peu court ; ainsi que Guy Charmantier, Simon Devin, Dominique Pointer et Wilfried Sanchez d'avoir accepté d'examiner cette thèse.*

*J'ai une pensée particulière pour toi Simon, car tu n'y es pas pour rien si j'en suis là. C'est quand même un de tes cours qui m'a décidé à voir ce que ça donnait du côté de la recherche, et c'est toi qui m'as mis le pied à l'étrier en me permettant d'y réaliser mon premier stage. J'adresse par la même occasion toute ma sympathie aux chercheurs que j'ai croisés à Metz, ainsi qu'à Fanny et Emilie que j'apprécie beaucoup.*

*Je souhaiterais également remercier les personnes qui ont participé aux comités de pilotage de cette thèse : Jean-Marc Bonzom, Stéphane Reynaud, Thierry Rigaud, Jeanne Garric, mais aussi Federica Calevro en sa qualité de tutrice de l'école doctorale E2M2. Ces comités de pilotage ont toujours été très constructifs et m'ont beaucoup apporté dans le cheminement de ces travaux.*

*Je remercie par ailleurs chaleureusement Thierry Rigaud ainsi que Rémi Wattier pour mon accueil au sein de l'équipe Ecologie Evolutive du laboratoire Biogéosciences de l'Université de Bourgogne qui aura permis de génotyper les organismes étudiés et ainsi de donner à ces travaux une dimension différente.*

*Ces remerciements ne seraient pas complets si je n'en adressais pas à l'ensemble des membres du laboratoire d'écotoxicologie d'Irstea de Lyon-Villeurbanne. J'ai une pensée toute particulière pour Adeline François et Hervé*

Quéau. Radélin, le terrain toutes les deux ça a toujours été un peu la loose mais peu importe. On a souvent fermé le labo ensemble et tu as souvent été là pour me filer un coup de main en cas de besoin. Hervé, je ne peux pas ne pas faire allusion à ton humour tant décalé que maladroit (alors ? est-ce que tu mérites ton week-end ?!) ni à tes anecdotes (c'est vrai quoi, t'as toujours une petite histoire sous la main !). Je ne peux pas non plus ne pas mentionner la contribution significative que tu as apportée à ces travaux notamment avec toutes ces journées passées derrière la bino et un pot de juv, sans parler des clics ! Merci aussi pour votre oreille attentive, ce n'est pas rien. Une pensée pour toi aussi Rémi, binôme de kayak, plus à Irstea mais toujours dans les parages. Merci pour les cours de badminton !

Une pensée également pour Romain et Guillaume, qui en bon vieux ex-thésards du labo, ont toujours su distiller encouragements et bons conseils. Mais surtout un grand merci pour avoir instauré cette tradition de la bière du vendredi !

Spéciale dédicace à Delphine et Judith, mes deux collègues thésardes depuis le premier jour. J'ai l'impression que c'était hier qu'on a commencé notre thèse. Je me rappelle très bien de ce jour-là au quai Chauveau. Halala, on se sera bien marrées quand même. Judith pour le post-doc faut voir... Delphine, mais pourquoi tu prends pas un CDI ? J'ai été touchée par l'attention que vous m'avez témoignée ces dernières semaines qui n'ont pas été faciles. Paul, garde le moral, surtout ne te décourage pas, toi aussi un jour tu écriras tes remerciements de thèse. Duarte, vas-y tu es sur la bonne lancée ! J'ai été ravie de partager mon bureau avec toi et de t'apprendre le français...

Mes dernières pensées vont vers ma famille, je serai brève par pudeur mais je voudrai dire à mes grands-parents, mes parents et beaux-parents, ma sœur (triste ou comique ?), mon frère (un jour tu seras grand et peut-être liras-tu ces quelques lignes), et à toi aussi Paul, que tout ça est aussi grâce à vous. Que cette thèse m'a demandé des sacrifices mais que je suis bien décidée à rattraper le temps perdu.

Merci à tous d'y avoir cru pour moi parfois...

Isa !





## TABLE DES MATIERES

|                                                                                                                           |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>TABLE DES MATIERES .....</b>                                                                                           | <b>XII</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....</b>                                                                                | <b>XVI</b>  |
| <b>LISTE DES ARTICLES ET DES COMMUNICATIONS.....</b>                                                                      | <b>XXVI</b> |
| <b>INTRODUCTION.....</b>                                                                                                  | <b>1</b>    |
| <b>CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>                                                                        | <b>7</b>    |
| <b>1. ETAT DES LIEUX DES PHÉNOMÈNES DE TOLÉRANCE AUX CONTAMINANTS AU SEIN DES POPULATIONS NATURELLES ANIMALES : .....</b> | <b>9</b>    |
| 1.1. <i>Mise en évidence des phénomènes de tolérance aux contaminants :.....</i>                                          | <i>9</i>    |
| 1.1.1. Définition : .....                                                                                                 | 9           |
| 1.1.2. Un phénomène ubiquiste : .....                                                                                     | 10          |
| 1.1.3. Co-tolérance : .....                                                                                               | 12          |
| 1.2. <i>Les facteurs de sécurité appliqués en évaluation du risque couvrent-ils les phénomènes de tolérance ? .....</i>   | <i>13</i>   |
| 1.3. <i>La tolérance au contaminant : un phénomène qui peut être trans-générationnel et/ou réversible : .....</i>         | <i>16</i>   |
| 1.4. <i>Fréquence du phénomène dans les milieux : .....</i>                                                               | <i>17</i>   |
| <b>2. DIFFÉRENTS PROCESSUS POPULATIONNELS POSSIBLES DE MISE EN PLACE DE LA TOLÉRANCE : .....</b>                          | <b>19</b>   |
| 2.1. <i>L'adaptation génétique : .....</i>                                                                                | <i>19</i>   |
| 2.1.1. Description du processus : .....                                                                                   | 19          |
| 2.1.2. Cas du tri de lignées pour les espèces à reproduction clonale : .....                                              | 20          |
| 2.1.3. Mise en place : .....                                                                                              | 21          |
| 2.1.4. Persistance de la tolérance acquise en milieu non contaminé : .....                                                | 24          |
| 2.2. <i>Acclimatation physiologique : .....</i>                                                                           | <i>25</i>   |
| 2.2.1. Description du processus : .....                                                                                   | 25          |
| 2.2.2. Mise en place : .....                                                                                              | 25          |
| 2.2.3. Persistance de la tolérance acquise en milieu non contaminé : .....                                                | 26          |
| 2.3. <i>Les mécanismes non génétiques d'hérédité : les effets parentaux : .....</i>                                       | <i>27</i>   |
| 2.3.1. Description du processus : .....                                                                                   | 27          |
| 2.3.2. Effets paternels et effets maternels : .....                                                                       | 29          |
| 2.3.3. Persistance de la tolérance acquise en milieu non contaminé : .....                                                | 30          |
| 2.4. <i>Quel(s) mécanisme(s) populationnel(s) d'acquisition de la tolérance dans les milieux : .....</i>                  | <i>35</i>   |
| <b>3. COÛTS DE LA TOLÉRANCE ET MODIFICATIONS DE TRAITS D'HISTOIRE DE VIE : .....</b>                                      | <b>37</b>   |
| 3.1. <i>Coûts de la tolérance : .....</i>                                                                                 | <i>37</i>   |
| 3.1.1. Définition : .....                                                                                                 | 37          |
| 3.1.2. Les coûts énergétiques et génétiques comme mécanismes possibles à l'origine des coûts de la tolérance : .....      | 39          |
| 3.1.3. Conséquences populationnelles et écosystémiques possibles des coûts de la tolérance : coûts écologiques : .....    | 41          |
| 3.2. <i>Modification des traits d'histoire de vie : coûts de la tolérance ou adaptation des histoires de vie ? .....</i>  | <i>43</i>   |
| <b>4. MÉTHODES D'ÉTUDE DES RÉPONSES POPULATIONNELLES ADAPTATIVES DANS LES MILIEUX CONTAMINÉS : .....</b>                  | <b>48</b>   |
| 4.1. <i>Designs expérimentaux et prise en compte des facteurs de confusion dans les approches comparatives : .....</i>    | <i>49</i>   |
| 4.2. <i>Importance de la caractérisation de l'exposition à la contamination des populations naturelles : .....</i>        | <i>50</i>   |
| 4.2.1. Rôle de la contamination dans la mise en place d'une tolérance : .....                                             | 50          |
| 4.2.2. Caractérisation de la contamination des sites d'étude : .....                                                      | 55          |

|                                                                                                                                                            |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3. Identifier la nature de la tolérance des populations naturelles :                                                                                     | 56         |
| 4.3.1. Les « breeding experiments » :                                                                                                                      | 56         |
| 4.3.2. Les approches de génétique quantitative :                                                                                                           | 59         |
| <b>5. GAMMARUS FOSSARUM : UNE ESPECE MODELE EN ECOTOXICOLOGIE ET D'INTERET POUR L'ETUDE DES REPONSES ADAPTATIVES A LA CONTAMINATION DANS LES MILIEUX :</b> | <b>61</b>  |
| 5.1. Description de l'espèce :                                                                                                                             | 61         |
| 5.1.1. Taxonomie et classification :                                                                                                                       | 61         |
| 5.1.2. Répartition géographique :                                                                                                                          | 62         |
| 5.1.3. Habitat et rôle fonctionnel dans les écosystèmes :                                                                                                  | 63         |
| 5.1.4. Morphologie générale :                                                                                                                              | 64         |
| 5.1.5. Identification de l'espèce :                                                                                                                        | 67         |
| 5.1.6. Caractéristiques principales de la reproduction :                                                                                                   | 71         |
| 5.2. Utilisation des gammares en écotoxicologie :                                                                                                          | 76         |
| 5.2.1. De bons modèles biologiques pour l'écotoxicologie :                                                                                                 | 76         |
| 5.2.2. De nombreux outils disponibles pour l'évaluation de la toxicité :                                                                                   | 76         |
| 5.2.3. Des espèces sentinelles pour la biosurveillance des milieux :                                                                                       | 77         |
| 5.3. Gammares et écotoxicologie évolutive :                                                                                                                | 78         |
| <b>6. OBJECTIFS ET STRATEGIE EXPERIMENTALE DES TRAVAUX :</b>                                                                                               | <b>81</b>  |
| <b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES</b>                                                                                                                 | <b>85</b>  |
| <b>1. SELECTION ET CARACTERISATION DES POPULATIONS D'ETUDE :</b>                                                                                           | <b>87</b>  |
| 1.1. Sélection des populations :                                                                                                                           | 87         |
| 1.2. Caractérisation de la contamination métallique biodisponible des sites d'étude (monitoring actif) :                                                   | 90         |
| 1.3. Caractérisation moléculaire de la diversité phylogénétique des populations (barcoding) :                                                              | 92         |
| <b>2. ORGANISMES UTILISES AU COURS DES TESTS :</b>                                                                                                         | <b>93</b>  |
| 2.1. Prélèvement et maintien des organismes au laboratoire :                                                                                               | 93         |
| 2.1.1. Prélèvement :                                                                                                                                       | 93         |
| 2.1.2. Conditions générales de stabulation au laboratoire :                                                                                                | 94         |
| 2.2. Production d'organismes tests issus des populations naturelles :                                                                                      | 95         |
| 2.3. Contrôle de la production d'organismes pour l'obtention de frères et demi-frères :                                                                    | 98         |
| 2.3.1. Schéma de croisement :                                                                                                                              | 98         |
| 2.3.2. Fratries, demi-fratries :                                                                                                                           | 100        |
| <b>3. MESURE DE LA SENSIBILITE AU CADMIUM :</b>                                                                                                            | <b>101</b> |
| 3.1. Mesure de la sensibilité : temps-réponse, dose-réponse :                                                                                              | 102        |
| 3.2. Concentrations d'exposition :                                                                                                                         | 102        |
| 3.3. Conditions d'exposition :                                                                                                                             | 103        |
| 3.4. Organismes exposés :                                                                                                                                  | 105        |
| <b>4. MESURE DES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE :</b>                                                                                                            | <b>106</b> |
| 4.1. Taux d'alimentation :                                                                                                                                 | 106        |
| 4.2. Taux de croissance :                                                                                                                                  | 108        |
| 4.3. Mesures démographiques in situ des populations :                                                                                                      | 109        |
| 4.3.1. Distribution en taille :                                                                                                                            | 110        |
| 4.3.2. Fécondité des femelles in situ :                                                                                                                    | 111        |

**CHAPITRE III : ETUDE DES EFFETS D'UNE EXPOSITION A LONG TERME AU CD SUR UNE POPULATION DE *GAMMARUS FOSSARUM* : TOLERANCE AU CD ET MODIFICATIONS DE TRAITS D'HISTOIRE DE VIE ..... 115**

1. PUBLICATION N°1 : EVOLUTION DE LA SENSIBILITE AU CADMIUM ET COUTS ASSOCIES AU SEIN D'UNE POPULATION DE *GAMMARUS FOSSARUM* HABITANT UNE RIVIERE FAIBLEMENT CONTAMINEE : ..... 117

2. NOTE N°1 : MISE EN EVIDENCE DE MODIFICATIONS DE TRAITS D'HISTOIRE DE VIE AU SEIN DE LA POPULATION ARDI : ..... 145

**CHAPITRE IV : ETUDE DES MECANISMES POPULATIONNELS D'ACQUISITION DE LA TOLERANCE AU CADMIUM CHEZ *GAMMARUS FOSSARUM* : ..... 155**

1. ETUDE A *PRIORI* A PARTIR DE POPULATIONS NATURELLES DE REFERENCE : ..... 157

PUBLICATION N°2 : DIFFERENCES DE SENSIBILITE AU CADMIUM LIEES A UN DETERMINISME MATERNEL ET NON HERITEES GENETIQUEMENT AU SEIN DE POPULATIONS NATURELLES DE REFERENCE DU CRUSTACE DULÇAQUICOLE *G. FOSSARUM*. ..... 157

NOTE N°2 : COMPLEMENTS A LA PUBLICATION N°2 POUR LA PARTIE « GENETIQUE QUANTITATIVE » : ..... 181

NOTE N°3 : ETUDE DE L'EFFET D'UNE SELECTION MATERNELLE AU CADMIUM SUR LA SENSIBILITE DES JUVENILES : ..... 185

2. ETUDE A *POSTERIORI* AVEC LE CAS D'ETUDE DE LA POPULATION ARDI : ..... 189

PUBLICATION N°3 : HEREDITE NON GENETIQUE DE LA TOLERANCE AU CADMIUM D'UNE POPULATION NATURELLE DE *G. FOSSARUM* : DES EFFETS PARENTAUX ORIENTENT LA SENSIBILITE AU CADMIUM DES JUVENILES. .... 189

NOTE N°4 : COMPLEMENTS A LA PUBLICATION N°3 : ..... 209

**CHAPITRE V : CARACTERISATION DE LA VARIABILITE DE LA SENSIBILITE AU CADMIUM AU SEIN DU COMPLEXE D'ESPECES *GAMMARUS FOSSARUM* (NOTE N°5) ..... 213**

1. PRESENTATION DES POPULATIONS D'ETUDES : ..... 215

2. VARIABILITE DE LA SENSIBILITE AU CADMIUM ENTRE POPULATIONS D'ETUDE : ..... 217

3. DIVERSITE PHYLOGENETIQUE DES POPULATIONS ETUDIEES : ..... 220

**CHAPITRE VI : SYNTHÈSE ET DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS ..... 227**

**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ..... 249**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 259**

**ANNEXES ..... 279**



## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

### LISTE DES FIGURES

#### Chapitre I : Synthèse bibliographique

- Figure I-1 :** Figure illustrant différentes voies par lesquelles une exposition parentale aux contaminants peut influencer la sensibilité de générations suivantes non exposées. Une exposition parentale à des toxiques peut : A) induire une tolérance (représentée par les nageoires noires) dans la première génération de descendants du fait d'un transfert soma-à-soma lié à l'exposition directe des parents. Il peut s'agir de transferts d'éléments maternels via les oocytes, par exemple un transfert de protéines de détoxification (schématisés par les pois rouge). Ce mécanisme n'est pas transmissible à la deuxième génération de descendants non-exposés (hors cadre ombragé). Elle peut aussi B) provoquer des modifications de la chromatine, par exemple une modification des méthylations de l'ADN (représentées par les pois noirs sur le brin d'ADN), et des effets phénotypiques (représentés par les nageoires noires). Ces changements épigénétiques et/ou les effets phénotypiques peuvent ou non être transmis à la génération suivante, qui n'est pas exposée à la substance chimique. Si ces changements persistent pendant plusieurs générations (cadre ombragé), les organismes non exposés subissent les effets de l'exposition des générations antérieures. (Inspirée de Vandegehuchte et Janssen 2011) .....32
- Figure I-2 :** Illustration schématique de différents scénarios possibles de manifestation de coûts de la tolérance. ....39
- Figure I-3 :** Illustration théorique de la concentration-dépendance de l'acclimatation aux métaux : effet de différentes concentrations de préexposition sur la tolérance au cours d'une exposition ultérieure plus aiguë et sur la mortalité pendant la préexposition. (Inspirée de Chapman (1985), Roesijadi et Fellingham (1987), et des résultats expérimentaux de Roesijadi et Fellingham (1987), Stuhlbacher et Maltby (1992) et de Klerks (1999).).....52
- Figure I-4 :** Processus d'évaluation de la tolérance à la contamination de populations naturelles chroniquement exposées dans le milieu. (Adaptée de Johnston 2011) .....58
- Figure I-5 :** Aire de distribution de *Gammarus fossarum* en France en 2011. (Piscart et Bollache 2012) .....62
- Figure I-6 :** Morphologie générale externe d'un amphipode et détails de certaines pièces morphologiques. (Extraits de Piscart et Bollache 2012) .....66
- Figure I-7 :** Extraits d'une clé de détermination permettant l'identification morphologique de l'espèce *G. fossarum*. (Piscart et Bollache 2012) .....69
- Figure I-8 :** *Gammarus fossarum* mâle et femelle en précopulat. (Xuereb 2009 ; photo Laboratoire d'Ecotoxicologie Irstea Lyon-Villeurbanne) .....72
- Figure I-9 :** Représentation du cycle de reproduction de *G. fossarum* et du synchronisme entre les cycles de mue, ovocytaire et embryonnaire. Les nombres indiqués pour le cycle n correspondent aux durées moyennes cumulées en jours de chaque stade de mue à 12°C décrites par Coulaud (2012). .....74

|                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure I-10 :</b> Durée (jours) des différents stades du cycle de mue de <i>G. fossarum</i> pour les trois températures : 7,0 (±0,05) °C ; 12,1 (±0,01) °C et 16,4 (±0,3) °C du début du cycle jusqu'à la mue estimées avec un modèle par stade et par température. (Coulaud 2012) ..... | 75 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## Chapitre II : Matériels et méthodes

|                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure II-1 :</b> Localisation de la population Ardi et des 17 populations de référence étudiées. Les points gris foncés représentent les 5 populations de référence du premier lot, et les points gris clairs les 12 populations de référence du deuxième lot. .... | 89 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure II-2 :</b> Illustration de la méthodologie d'encagement. (A) Systèmes d'encagement des gammarès. (B) Fixation des systèmes d'exposition dans les caisses. (C) Caisse disposée dans la rivière, lestée et camouflée. (D'après Besse et al. 2012 a) ..... | 91 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure II-3 :</b> Prélèvement des gammarès et séparation des classes de taille sur colonne de tamis. (Photos Laboratoire d'Ecotoxicologie Irstea Lyon-Villeurbanne)..... | 93 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure II-4 :</b> Stabulation des gammarès au laboratoire (dispositif avec aquarium). (D'après Lacaze 2011)..... | 94 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure II-5 :</b> Illustration de la corrélation entre le degré de naïveté vis-à-vis du milieu des F1 produits au laboratoire, la cohorte, et l'environnement où ont eu lieu l'ovogénèse et l'embryogénèse. Le nombre de jours entre deux mues est donné pour une température de 12°C. .... | 97 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure II-6 :</b> Schéma général du design de croisement mis en place. Illustration avec trois femelles. Les mâles identifiés par une lettre correspondent aux mâles inconnus ayant fécondé les femelles dans le milieu. Ces mâles sont les pères des juvéniles des fratries de la cohorte 1. Les mâles identifiés par un nombre sont les mâles connus. Les couples représentés au cycle 2 (ceux où le mâle et la femelle portent le même numéro) sont les couples qui ont été triés et isolés au début du protocole (cycle1). Ces couples sont les parents des juvéniles des fratries de la cohorte 2. Les couples représentés au cycle 2 (ceux où le mâle et la femelle portent un numéro différent) sont les parents des juvéniles des fratries de la cohorte 3. Ces couples ont été formés par redistribution aléatoire des mâles au milieu du cycle 2 (après la fécondation de la femelle du même numéro au début du cycle 2). Les femelles des trois cycles sont connues..... | 99 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure II-7 :</b> Chronologie des étapes clés du design de croisements au cours des trois cycles de reproduction connues. .... | 100 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure II-8 :</b> Représentation des trois types de liens de parentés obtenus à partir du schéma général de croisement. | 101 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <b>Figure II-9 :</b> Illustration des dispositifs expérimentaux d'exposition au cadmium, exemples d'un test d'exposition de gammarès adultes en semi-statique (A) et en continue (B), et exemple d'un test d'exposition de juvéniles en semi-statique (C). a.m.e. arrivée du milieu d'exposition dans le bécher ; b. becher d'exposition ; b.m. bain-marie thermorégulé ; f. falcon d'exposition ; f.a. feuille d'aulnes (morceaux grossiers) ; g.f. groupe froid ; m.e. milieu d'exposition ; p. portoir à falcons ; p.p. pompes péristaltiques pompant le milieu d'exposition et |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

le distribuant dans les béciers équipés d'une arrivée ; s. surverse des béciers renouvelés en continue ; t.b. toile à bluter. (Photos Laboratoire d'Ecotoxicologie Irstea Lyon-Villeurbanne) .....104

**Figure II-10 :** Stades embryonnaires de *G. fossarum*. Stade 1 : Embryon nouvellement fertilisé, ovale et indifférencié ; Stade 2 : Apparition de la ventroflexion ; Stade 3 : Apparition du céphalothorax et segmentation des appendices ; Stade 4 : Les yeux sont clairement visibles, et les appendices sont complètement développés ; Stade 5 : Juvénile nouvellement éclos. (D'après Xuereb 2009, Geffard et al. 2010) .....113

### Chapitre III : Etude des effets d'une exposition à long terme au Cd sur une population de *Gammarus fossarum* : tolérance au Cd et modifications de traits d'histoire de vie

**Fig.1** Bioavailable Cd contamination in the sites inhabited by the six study populations (Ardi, Bacu, Bois, Gala, Mand, and Tour). Accumulated Cd concentrations in  $\mu\text{g g}^{-1}$  dw (dry weight) in caged gammarids for 7 days (one source population) are presented for campaigns on different dates (three replicates). Dashed lines link mean values between campaigns for each study site.....127

**Fig.2** Cd sensitivity of the *G. fossarum* populations. Survival during Cd exposure is presented for (a) not-acclimatized males exposed to  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , (b) three-weeks acclimatized males exposed to  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , and (c) F1 juveniles exposed to  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ . (a) and (b) : Small dots represent replicates (survival rate of 20 organisms), large dots represent mean values, vertical segments link minimum and maximum values. (c) : Dots represent mean survival rate of 60 juveniles exposed individually, lines represent binomial 95% confidence intervals.....129

**Fig.3** Feeding assays. Feeding rate (FR) was assessed (a) (b) for four populations on 2 dates in the laboratory and (c) *in situ* for Ardi and Tour populations during campaigns at different temperatures. Dots represent replicates, vertical segments link minimum and maximum values. (c) The straight line corresponds to the FR of organisms from the Tour population predicted for different temperatures by the model developed by Coulaud et al. (2011). .....131

**Supplementary Figure 1.** Complementary Cd toxicity test with the *G. fossarum* populations (July 2013). One week acclimatized males were exposed to  $160 \mu\text{g Cd L}^{-1}$  (nominal concentration). Small dots represent replicates ; large dots represent the mean survival rate ; vertical segments link minimum and maximum survival rates. ....143

**Figure III-1 :** Taux de croissance au laboratoire. Pour chaque population, le premier point représente la taille moyenne  $\pm$  l'écart-type (mm) des individus à t0 mesurée sur un sous échantillon d'individus, et le deuxième point la taille moyenne  $\pm$  l'écart-type (mm) des individus à la fin du test soit après 24 jours pour la classe de taille 1 et après 19 jours pour la classe de taille 2. Les valeurs en italique correspondent à la moyenne (mm) des croissances individuelles mesurées au cours du test calculées en soustrayant la taille moyenne à t0 de la population et de la classe de taille appropriée, à la taille finale de chaque individu. ....147

**Figure III-2 :** Distribution de taille des femelles en reproduction prélevées *in situ* et mesurées au cours des 7 relevés démographiques en classe de taille de 0,5 mm. ....149

**Figure III-3 :** Fécondité de femelles prélevées *in situ* des cinq populations de référence étudiées. ....151

**Figure III-4 :** Fécondité de femelles prélevées *in situ* pour la population Ardi par rapport aux mesures réalisées pour les cinq populations de référence. ....151

**Figure III-5 :** Fécondité de femelles prélevées *in situ* d'une taille inférieure à 7,5 mm pour la population Ardi et les cinq populations de référence. Pour la population Gala, aucune femelle dont la fécondité a été étudiée n'a une taille inférieure à 7,5 mm. ....152

## **Chapitre IV : Etude des mécanismes populationnels d'acquisition de la tolérance au cadmium chez *Gammarus fossarum* :**

**Figure 1.** Artificial selection experiment. Dots represent the mean survival rates recorded for offspring from the selected and the two control conditions (S-20%, C-I, C-II) exposed to  $20 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ . Binomial 95% confidence intervals are pictured by vertical lines. Asterisk indicate time for which significant difference have been detected between the three conditions. ....167

**Figure 2.** Estimation of brood component and optimization of the experimental design. 95% confidence intervals of the estimate of the brood component ( $\sigma_B - FS$ ), were simulated for different number of broods (10, 20, 50, 100), and for different number of neonates tested per brood (3, 4, 5, 7, 10), based on brood and total variances estimated by Chaumot et al. (2009). Dots represent average  $\sigma_B - FS$  calculated from 100 simulations. Solid lines represent expected value. ....168

**Figure 3.** Estimation of the sire component and optimization of the paternal design. 95% confidence intervals of the estimate of the sire component ( $\sigma_S - PHS$ ) were simulated for different values of  $h^2$  (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8) and for different number of sires tested (10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 400), based on brood and total variances estimated by Chaumot et al. (2009). Dots represent average  $\sigma_S - PHS$  calculated from 100 simulations. Solid lines represent expected values. ....169

**Figure S1.** Schematic overview of the experimental design of the artificial selection experiment. ....179

**Figure IV-1 :** Temps de survie des demi-fratries paternelles (A) et maternelles (B) de la population Tour exposées à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd. Les boîtes représentent les temps de survie en jours enregistrés transformés en log pour l'ensemble des juvéniles d'une même fratrie et s'étendent du premier au troisième quartile de la distribution des mesures. Le trait horizontal noir correspond à la médiane. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes des mesures ne dépassant pas 1,5 fois l'écart interquartile. Les points marginaux sortant de cette gamme sont représentés par des points noirs. Pour le paternal design (A), deux boîtes successives du même niveau de gris représentent les deux fratries d'un même père accouplé à deux mères différentes (*i.e.* deux demi-fratries paternelles). Pour le maternal design (B), trois boîtes successives du même niveau de gris représentent les trois fratries d'une même mère accouplée à trois pères différents (*i.e.* trois demi-fratries maternelles). ....182

**Figure IV-2 :** Taux de survie des juvéniles produits par les quatre conditions parentales C-I, C-II, S-20% P et S-20% P&M à une exposition à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd. Test des juvéniles de la deuxième (A) et de la troisième (B) cohorte produites après l'exposition des parents au cadmium. Le graphique B correspond à la Figure 1 présentée dans la Publication n°2 à laquelle a été ajoutée la survie des juvéniles de la condition S-20% P&M. ....187

**Figure 1 :** Between-brood heterogeneity in Cd tolerance. Box-and-whisker plots of log transformed lethal times of neonates exposed to  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  of Cd. Panels correspond to the records of the three batches of broods (C1, C2 and C3) for the population Ardi on the left (A–C), and for the population Tour on the right (A'–C'). Boxes extend from the first to the third quartile of lethal times within each brood with a bold segment for the median lethal time ; the whiskers extend to the most extreme data points which are no more than 1.5 times the interquartile range, and dots represent outliers. ....198

**Figure IV-3 :** Temps de survie de la première cohorte de fratries (full-sibs) produite au laboratoire pour les trois populations Ardi (A), Bois (B) et Tour (C) à une exposition à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd. Les boîtes représentent les temps de survie en jours enregistrés transformés en log pour l'ensemble des juvéniles d'une même fratrie et s'étendent du premier au troisième quartile de la distribution des mesures. Le trait horizontal noir correspond à la médiane. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes des mesures ne dépassant pas 1,5 fois l'écart interquartile. Les points marginaux sortant de cette gamme sont représentés par des points noirs. Les graphiques (A) et (C) présentés pour la population Ardi et Tour sont les mêmes que ceux de la Publication n°3. ....211

## Chapitre V : Caractérisation de la variabilité de la sensibilité au cadmium au sein du complexe d'espèces *Gammarus fossarum* (Note n°5)

**Figure V-1 :** Courbe dose-réponse des 17 populations de référence et de la population Ardi à quatre jours d'exposition au cadmium. Courbes générées avec le package drc du logiciel R. ....219

**Figure V-2 :** Positionnement phylogénétique (séquence du COI) des 209 individus issus des 17 populations de référence (les individus présentant le même haplotype sont regroupés sur la même branche terminale). Des séquences de la littérature pour *G. roeseli* (outgroup) ; *G. pulex* ; chacune des 3 sous-lignées cryptiques de *G. fossarum* (A, B, C), ainsi que des séquences d'individus de deux autres populations étudiées au laboratoire d'Ecotoxicologie de Lyon-Villeurbanne (Bast située dans les Cévennes et Tanc située dans le Jura) ont également été incluses. Les valeurs de bootstrap sont figurées sur les branches. ....222

**Figure V-4 :** Comparaison des  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  des 17 populations de référence et de la population Ardi en fonction de leur composition phylogénétique (définies en Figure V-2). Des  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  à une exposition au cadmium menée à une dureté d'eau équivalente à celle de nos tests issues de la littérature (<sup>1</sup>étude de Boets et al. 2012) sont également placés sur la partie supérieur de l'axe.....224

**Figure V-5 :** Positionnement des individus génotypés de la population Ardi dans l'arbre phylogénétique (séquence du COI) d'un sous-échantillon de 6 des 17 populations de référence du groupe *G. fossarum*. Des séquences de la littérature pour *G. pulex* (outgroup) ; chacune des 3 sous-lignées cryptiques de *G. fossarum* (A B et C), ainsi que des séquences d'individus de la population des Cévennes Bast présentée en Figure V-2. ....225

## Chapitre VI : Synthèse et discussion générale des résultats

**Figure VI-1 :** Proposition d'amélioration du processus d'évaluation de la tolérance à la contamination de populations naturelles chroniquement exposées dans le milieu.....235

**Figure VI-2 :** Illustration schématique du type de coût (A) que constitue la modification du taux d'alimentation, et (B) que peut constituer la modification du taux de croissance de la population Ardi par rapport aux différents scénarios possibles de manifestation de coûts de la tolérance présentés en synthèse bibliographique.....237

**Figure VI-3 :** Mesure du taux de croissance individuel *in situ* de juvéniles de *G. fossarum* des populations Ardi et Tour encagés dans leurs propres sites à deux saisons. La croissance a été mesurée après 30 jours pour le test réalisé en novembre 2008 et après 28 jours pour celui réalisé en avril 2009. Pour chacun des tests, les mesures ont été effectuées sur des classes de tailles et des températures similaires. Les valeurs au-dessus des boîtes indiquent la taille initiale en mm des organismes mesurés sur un sous-échantillon d'individus à t0 pour celles en italique, et la température en °C pour les autres. (Données issues de Coulaud 2012) .....238

**Figure VI-4 :** Taille à la maturité sexuelle des femelles au sein de la population Ardi et de différentes populations de référence au laboratoire évaluée en mesurant la taille à la 1<sup>ère</sup> reproduction de femelles F1 nées élevées au laboratoire en conditions non contaminées. ....240

## Annexes

**Figure A-1 :** Fécondité de femelles prélevées *in situ* pour la population Ardi et cinq populations de référence présentées individuellement.....283

## LISTE DES TABLEAUX

### Chapitre I : Synthèse bibliographique

**Tableau I-1 :** Synthèse des différents processus pouvant être à l'origine d'une tolérance à la contamination à l'échelle populationnelle présentés dans cette synthèse bibliographique, et caractéristiques principales. ....34

**Tableau I-2 :** Exemples de modifications de traits d'histoire de vie autres que la sensibilité toxicologique en lien avec une exposition à une contamination métallique chez des espèces animales.....46

### Chapitre II : Matériels et méthodes

**Tableau II-1 :** Présentation de la population Ardi et des 17 populations de référence étudiées. ....90

**Tableau II-2 :** Caractéristiques du suivi démographique réalisé pour les cinq populations. ....113

**Tableau II-3 :** Caractéristiques des prélèvements réalisés pour la détermination de la fécondité des populations.....113

### Chapitre III : Etude des effets d'une exposition à long terme au Cd sur une population de *Gammarus fossarum* : tolérance au Cd et modifications de traits d'histoire de vie

**Table 1 :** Location and general physicochemical characterization of the six study sites. Mean water temperatures for each season were calculated from one-year continuous records of temperature. Physicochemical parameters were assessed from a punctual sampling on April 2012. ....122

**Table 2 :** LT50 values and 95% confidence intervals of adults and juveniles from the different *G. fossarum* populations exposed to Cd. Survival curves are presented in Figure 2.....128

**Supplementary Table 1.** Characterization of the bioavailable metallic contamination in the six study sites. Mean accumulated concentrations of caged gammarids (transplanted for 7 days from one source population) are presented. Concentrations of metals, limits of quantifications (LQ) and threshold values (TV) of contamination are expressed in  $\mu\text{g g}^{-1}$  dw (dry weight). Detailed protocol and determination of TV are reported by Besse et al. (2013). ....141

**Supplementary Table 2.** Size of gammarid males used for each experiment. ....142

**Supplementary Table 3.** Dissolved Cd concentration in water of the site inhabited by the Ardi population on different dates.....143

**Tableau III-1 :** Tableau descriptif des mesures de taille de femelles en reproduction obtenues. ....150

## Chapitre IV : Etude des mécanismes populationnels d'acquisition de la tolérance au cadmium chez *Gammarus fossarum* :

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Table 1.</b> Full sib analysis of the Cd sensitivity of neonates from the two populations. Here are provided REML estimators (and 95% confidence intervals) of the variance components from a linear mixed-effect model considering log-transformed lethal time of neonates as a response explained by a brood effect ( $\sigma_B - FS$ ) and a residual environmental variance ( $\sigma_R - FS$ ). The significance of the brood effect was tested by LRT (NS not significant, * for $p < 0.05$ and ** for $p < 0.01$ ).....                                                                            | 170 |
| <b>Table 2.</b> Half sib analysis of the Cd sensitivity of neonates from the Tour population, considering paternal and maternal designs. Here are provided REML estimators (and 95% confidence intervals) of the observational components of variance with significance tested by LRT (* for $p < 0.05$ and ** for $p < 0.01$ ), along with estimated genetic parameters (SD : Standard Deviation).....                                                                                                                                                                                                      | 172 |
| <b>Table S1.</b> Relationships between observational and causal components of variance for each kind of relatives. $VA$ = additive genetic variance, $VD$ = dominance genetic variance, $VEm$ = maternal effects, $VEsm$ = brood-specific maternal effect, $VEw$ = residual environmental variance. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 178 |
| <b>Table S2.</b> Results for the half-sib analysis for the population Bois, REML estimators (NS : not significant LRT).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 178 |
| <b>Tableau IV-1 :</b> $LT_{50}$ en heures de juvéniles de la deuxième et de la troisième cohorte produites par les quatre conditions parentales C-I, C-II, S-20% P et S-20% P&M exposés à $20 \mu g.L^{-1}$ de Cd. $LT_{50}$ calculées par interpolation. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 188 |
| <b>Table 1 :</b> Quantitative description of survival recorded for neonates exposed to $20 \mu g.L^{-1}$ of Cd for the three batches of broods (C1, C2 and C3) and for the two populations Ardi and Tour. Values for the third and the fourth column have been calculated regardless of broods. Values for column 5 to 7 have been calculated taking into account broods. All values have been calculated from log transformed survival time except that the column 7 (maximum brood's mean survival time). ....                                                                                             | 195 |
| <b>Table 2 :</b> Results of analyses performed to test difference in mean level of Cd-sensitivity (fixed effect) and between and difference in between-brood variability (interaction with random brood effect) between batches of broods and between populations (anova and likelihood ratio test : * = $P < 0.05$ ). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 197 |
| <b>Tableau IV-2 :</b> Statistiques descriptives des survies enregistrées à une exposition à $20 \mu g.L^{-1}$ de Cd pour la première cohorte de juvéniles produite au laboratoire à partir de couples prélevés <i>in situ</i> pour les trois populations étudiées Ardi, Bois et Tour. Les valeurs des colonnes 3 et 4 ont été calculées sans tenir compte de la structure en fratrie des données. Les colonnes 5 et 6 ont été calculées en tenant compte de la structure en fratrie des données. Les résultats présentés pour la population Ardi et Tour sont les mêmes que ceux de la Publication n°3. .... | 210 |

## Chapitre V : Caractérisation de la variabilité de la sensibilité au cadmium au sein du complexe d'espèces *Gammarus fossarum* (Note n°5)

|                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tableau V-1 :</b> Caractéristiques des 17 populations de référence étudiées et de la population Ardi. Les concentrations en métaux correspondent à la moyenne calculée sur 3 réplicats de 5 gammarus encagés pendant 7 jours |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

dans les sites. Les concentrations en métaux ainsi que les valeurs seuils (VS) sont exprimées en  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de poids sec de gammares. Les LQ (limites de quantification) correspondantes à chaque série d'encagement sont présentées en annexe (Tableau A-5). Le rang de Strahler est un « indicateur simple de classification de l'importance d'un cours d'eau : il démarre à la valeur 1 à la source de tout ruisseau. Les rangs de 1 à 3 caractérisent les petits cours d'eau ou têtes de bassin. Les rangs de 4 à 8 caractérisent les cours d'eau les plus larges et les fleuves. » (Besse et al. 2012a). .....216

**Tableau V-2 :**  $CL_{50-96h}$  et intervalle de confiance à 95% exprimés en  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd estimés avec le package drc du logiciel R. Notons que l'intervalle de confiance de l'estimation de la  $CL_{50-96h}$  de la population Ardi est relativement grand du fait qu'après quatre jours d'exposition, 50% de mortalité n'avait été atteint dans aucune des concentrations d'exposition du fait de la tolérance au cadmium importante de cette population. ....219

**Tableau V-3 :** Résultat du génotypage des 19 populations d'études (Ardi et 17 populations de référence). La composition phylogénétique exacte des populations est donnée en colonne 4 et 5. Les diagrammes circulaires résument la composition de lignées (définie en Figure V-2) de chacune des populations. Les parts sont proportionnelles au % d'individus de chaque lignée. Les lignées dont le pourcentage d'individus est inférieur à 15% ne sont pas représentées dans les diagrammes. ....221

## Chapitre VI : Synthèse et discussion générale des résultats

**Tableau VI-1 :** Facteurs de tolérance au cadmium de la population Ardi par rapport aux populations de référence calculés à partir des  $LT_{50}$  à  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd (heures) mesurées dans la publication n°2, et des  $LC_{50-96h}$  ( $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd) mesurées dans le Chapitre V. ....244

## Annexes

**Tableau A-1 :** Présentation des différentes expérimentations de mesure de la sensibilité au cadmium réalisées et des conditions expérimentales. ....280

**Tableau A-2 :** Caractéristiques de l'expérimentation mise en place pour la mesure de la croissance au laboratoire et résultats obtenus. ....282

**Tableau A-3 :** Correspondance entre les quatre conditions parentales et les modalités d'exposition au cadmium des mâles et des femelles de l'expérience de sélection parentale présentée dans la Publication n°2 et la Note n°3. ....284

**Tableau A-4 :** Nombre (n) et survie en pourcentage des juvéniles témoins produits par les quatre conditions parentales C-I, C-II, S-20% P et S-20% P&M. Ceux-ci ont subi le même traitement que les juvéniles exposés à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd dont la survie est présentée en Note n°3 à la différence qu'ils n'ont pas été exposés au cadmium. ....284

**Tableau A-5 :** Limites de quantification correspondantes à chaque série d'encagement présentées dans le Tableau V-1. ....285



## LISTE DES ARTICLES ET DES COMMUNICATIONS

### Articles

#### *Publiés*

Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a *Gammarus fossarum* population inhabiting a low-level contaminated stream. Ecotoxicology. In Press. Doi: 10.1007/s10646-015-1491-z. Vigneron A., Geffard O., Coquery M., François A., Quéau H., Chaumot A., 2015.

Linking feeding inhibition with reproductive impairment in *Gammarus* confirms the ecological relevance of feeding assays in environmental monitoring. Environmental Toxicology and Chemistry 34:1031–1038. Doi: 10.1002/etc.2886. Coulaud R., Geffard O., Vigneron A., Quéau H., François A. and Chaumot A., 2015.

The contribution of a niche-based approach to ecological risk assessment: Using macroinvertebrate species under multiple stressors. Environmental Pollution 185:24-34. doi: 10.1016/j.envpol.2013.09.033. Colas F., Vigneron A., Felten V., Devin S., 2014.

#### *Soumis*

Mothers and not genes determine inherited differences in cadmium sensitivities within naïve populations of the freshwater crustacean *Gammarus fossarum*. Vigneron A., Geffard O., Quéau H., Chaumot A. Soumis à Evolutionary Applications.

#### *En préparation*

Non-genetic inheritance of increased Cd-tolerance in a natural *Gammarus fossarum* population: Parental effects steer offspring sensitivity. Vigneron A., Geffard O., Chaumot A. Rédaction en cours.

### Communications orales

#### *Colloques nationaux*

Réponses populationnelles à la contamination chez *Gammarus fossarum* (Crustacea): modifications des sensibilités toxicologiques et des traits d'histoire de vie. Vigneron A., Geffard O., Quéau H., Chaumot A., Petit Pois Dérivé (PPD), 36<sup>ème</sup> réunion du Groupe d'Etude de Biologie et Génétique des Populations, Orsay-France, 25-28 Août 2014.

Tolérance au cadmium d'une population naturelle de *Gammarus*: adaptation génétique, acclimatation ou sélection d'une lignée cryptique? Vigneron A., Wattier R., Quéau H., Rigaud T., Geffard O., Chaumot A., *Colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), Besançon-France, 1-2 Juillet 2014.*

Variability of life history and sensitivity to toxicants in field *Gammarus* populations. Vigneron A., Geffard O., Chaumot A., *Colloque national d'Ecophysiologie Animale (CEPA), Lyon-France, 7-9 Novembre 2013.*

#### *Colloques internationaux*

Cd-resistance in field *Gammarus* populations: genetic adaptation, transgenerational effect, or selection of phylogenetic cryptic lineages? Vigneron A., Wattier R., Quéau H., Rigaud T., Geffard O., Chaumot A., *24<sup>th</sup> Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe Annual meeting, Basel-Switzerland, 11-15 May 2014.*

The GAMMA project: Variability – diversity and Ecotoxicology in *Gammarids*. Geffard O., Assoumani A., Charmantier G., Charron L., Coquery M., Dabrin A., Dedourge O., Geffard A., Issartel J., Jaffal A., Larrose A., Lignot J., Margoum C., Miegé C., Recoura-Massaquant R., Vigneron A., Chaumot A., *8<sup>th</sup> International Crustacean Congress (ICC), Frankfurt-Germany, 18-23 Août 2014.*

Adaptation to pollutants through modifications of sensitivities and life-history traits: a case study based on 9 field *Gammarus* populations. Vigneron A., Geffard O., Chaumot A., *23<sup>th</sup> Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe Annual meeting, Glasgow-Scotland, 12-16 May 2013.*

#### **Posters**

#### *Colloques internationaux*

Variability of Cd-sensitivity and phylogenetic diversity of field populations throughout the *Gammarus fossarum/pulex* species complex. Vigneron A., Geffard O., Pellerin H., Recoura-Massaquant R., François A., Quéau H., Rigaud T., Wattier R., Chaumot A., *24<sup>th</sup> Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe Annual meeting, Basel-Switzerland, 11-15 May 2014.*







## INTRODUCTION

Pour répondre aux questionnements croissants quant aux effets des polluants dans le milieu aquatique, l'écotoxicologie s'est munie de différents outils. Les bioessais et la mesure de marqueurs biologiques permettent d'évaluer les effets d'une exposition à la contamination aux niveaux sub-individuel et individuel. L'évaluation des effets à des niveaux d'organisation biologiques plus intégrés est quant à elle possible via la modélisation (extrapolation des effets au niveau individuel et sub-individuel au niveau de la population et de la communauté), ou par mesure directe via l'étude des populations et de la composition des communautés. Ils peuvent être utilisés au laboratoire dans une démarche d'écotoxicologie prédictive visant à évaluer *a priori* l'effet écotoxicologique de substances, et/ou *in situ* dans une démarche d'écotoxicologie rétrospective afin d'évaluer les niveaux de contamination et l'impact réel de ces substances dans les écosystèmes, mais aussi de diagnostiquer la contamination d'un milieu donné et ses effets dans une approche de biomonitoring.

*La variabilité inter-populations, une source d'incertitude pour l'évaluation des risques liés aux contaminations environnementales et pour les approches de biomonitoring*

Les bioessais classiquement utilisés en écotoxicologie prédictive (dans le cadre du programme d'enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques (REACH) par exemple) sont réalisés au laboratoire dans des conditions standardisées et faisant intervenir des organismes élevés en laboratoire appartenant à des espèces modèles (clones de daphnies (*Daphnia magna*), chironomes (*Chironomus riparius*), poisson medaka japonais (*Oryzias latipes*), poisson-zèbre (*Danio rerio*) etc.), et pour des durées d'exposition généralement relativement courtes (jusqu'à 21 jours avec *D. magna* pour un test d'inhibition de la reproduction (essais OCDE n°211), jusqu'à 60 jours chez le poisson pour un test de toxicité sur le développement sexuel (essais OCDE n°234)). Ces tests ont été développés dans un souci nécessaire de reproductibilité mais au détriment de leur représentativité pour les espèces rencontrées *in situ* et pour l'ensemble des populations de ces espèces (Breitholtz et al.

2006, Berthet et al. 2011), qui constituent pourtant les niveaux cibles de protection dans l'évaluation du risque (Forbes et Calow 2002a, Ramade 2007, Forbes et al. 2010, Hommen et al. 2010). C'est pourquoi des facteurs de sécurité (aussi appelés facteurs d'extrapolation ou d'incertitude) sont appliqués, notamment pour tenir compte de la variabilité potentielle de la sensibilité écotoxicologique entre populations et entre espèces, pour prédire les effets des stress chimiques sur les populations naturelles à partir des résultats de ces tests standardisés et pour déterminer les concentrations considérées comme protectrices pour l'environnement (Chapman et al. 1998, Forbes et Calow 2002b, TGD 2003 partie 2, Berthet et al. 2011). Développer des recherches sur la variabilité de la sensibilité des marqueurs biologiques utilisés pour évaluer les effets écotoxicologiques des substances chimiques *(i)* entre populations naturelles et populations d'expérimentation, *(ii)* entre populations naturelles entre elles, *(iii)* ainsi qu'entre espèces du milieu et espèces de laboratoire s'avère donc nécessaire dans ce contexte d'évaluation du risque afin d'évaluer et d'améliorer la pertinence des facteurs de sécurité appliqués. Il est en effet essentiel que ces derniers, puisqu'ils jouent un rôle crucial dans les extrapolations et donc dans le processus d'évaluation des risques, ne conduisent ni à sous-estimer ni à surestimer les risques liés aux produits chimiques potentiellement dangereux afin de protéger l'environnement de façon appropriée (Forbes et Calow 2002b). En outre, si l'établissement de ces derniers relève du domaine réglementaire, les gestionnaires et décisionnaires se basent sur des résultats relevant de la recherche scientifique comme source d'indications sur l'ampleur de l'incertitude (Chapman et al. 1998).

Les approches de biomonitoring passif et actif, mises en place dans les démarches d'écotoxicologie rétrospective, se confrontent également à cette question de la variabilité des marqueurs biologiques suivis pour l'évaluation écotoxicologique d'un milieu. En effet, dans le cas du biomonitoring passif, la mesure des marqueurs est réalisée sur des organismes autochtones. L'interprétation des mesures faites sur ces organismes ne peut s'affranchir de la caractérisation de la variabilité des niveaux de base et de la sensibilité aux contaminants de ces marqueurs entre populations et entre espèces. De même, les approches de biomonitoring actif et les bioessais réalisés *in situ* (encagement d'individus transplantés), ne s'affranchissent pas de la question de la variabilité des marqueurs, la représentativité de la population et de

l'espèce choisie comme source d'organismes vis-à-vis des populations et des espèces des milieux à diagnostiquer pouvant être questionnée.

La caractérisation et la prise en compte de la variabilité inter-populations, apparaît donc indispensable, pour améliorer la pertinence de l'évaluation des risques liés aux contaminations environnementales (ERE).

*L'exposition à la contamination : une source de variabilité inter-populations à étudier pour améliorer l'évaluation des risques écologiques*

La variabilité entre populations peut être le fruit de processus neutres de dérive ou de processus déterministes d'adaptation aux conditions locales d'habitat liés au fait que chaque population d'une espèce est soumise à des conditions écologiques biotiques (parasitisme, compétition interspécifique) et abiotiques (conditions physico-chimique) particulières. Parmi les conditions particulières d'habitat que rencontre une population dans le milieu naturel, la présence d'une contamination est un cas particulier pouvant être à l'origine d'une divergence entre populations présentes dans des sites dits de référence, c'est-à-dire non-impactés par une contamination, et populations présentes dans des sites impactés, présentant une contamination chimique, notamment du fait de phénomènes dits « d'adaptation à la contamination ». Cette variabilité induite par la présence des contaminants eux-mêmes questionne d'autant plus la représentativité et la pertinence de l'ERE dont l'objectif est justement d'évaluer leurs effets.

Des changements de sensibilité toxicologique (développement d'une tolérance à la contamination) (Klerks et Weis 1987, Posthuma et van Straalen 1993, Johnston 2011, Amiard-Triquet et Rainbow 2011), et/ou des changements de traits d'histoire de vie (Maltby 1991, Donker et al. 1993a, Postma et al. 1995a, Fisker et al. 2011) ont été rapportés au sein de populations naturelles exposées historiquement à la contamination. Ces modifications en réponse à une exposition questionnent la pertinence de l'ERE à plusieurs points de vue. En effet, si ces modifications sont fréquentes alors les résultats obtenus au cours d'études écotoxicologiques sur des populations naïves ne seront pas représentatifs de l'ensemble des populations naturelles et des effets des stress chimiques dans le milieu. Les conséquences possibles sont alors de sous-estimer ou sur-estimer un effet, une toxicité, ou d'aboutir à de faux positifs ou faux négatifs (Millward et Klerks 2002, Coutellec et Barata 2011, Weis 2002,

Berthet et al. 2011, Amiard-Triquet et Roméo 2011). La tolérance peut donc avoir des implications si elle touche des espèces utilisées (1) pour l'évaluation du risque basée sur des bioessais, (2) dans les démarches de biomonitoring avec la mesure de biomarqueurs et/ou des dosages chimiques, et (3) dans le suivi de la biodiversité (Amiard-Triquet 2011, Berthet et al. 2011). D'autre part, ces modifications de sensibilité ou de traits d'histoire de vies, peuvent se maintenir plus ou moins longtemps dans la population, et être transmissibles ou non entre générations, en fonction des processus populationnels à l'origine de ces modifications (plasticité, adaptation). La variabilité entre populations induite par la contamination peut donc varier dans le temps. Ces changements en lien avec une exposition à long terme peuvent également avoir des effets négatifs indirects (notion de coûts (Posthuma et van Straalen 1993, van Straalen et Hoffman 2000, Xie et Klerks 2003, 2004, Morgan et al. 2007, Mouneyrac et al. 2011)) pour les populations exposées elles-mêmes (augmentation de la vulnérabilité), et pour des niveaux d'organisation biologiques supérieurs (Weis 2002, Medina et al. 2007, revu dans Mouneyrac et al. 2011).

Les phénomènes d'adaptation à la contamination ont des implications directes pour l'ERE, en affectant l'issue des évaluations écotoxicologiques, ainsi que des implications indirectes par l'intermédiaire des coûts associés. Il est donc essentiel de prendre en compte ces processus évolutifs dans les réponses populationnelles à la pollution, ainsi que les conséquences évolutives de l'exposition des populations à ces substances (Coutellec et Barata 2011). De plus en plus d'arguments s'accumulent montrant la nécessité d'intégrer les impacts évolutifs dans l'évaluation du risque (Coutellec et Barata 2011). Il apparaît cependant que les effets d'une exposition à long terme à la contamination à l'échelle populationnelle sur la sensibilité aux contaminants et les traits d'histoire de vies, et les conséquences sur la vulnérabilité des populations, ne sont pas évalués au cours des tests écotoxicologiques classiques. De plus, l'attention des organismes de réglementation pour tenir compte des effets de ces réponses évolutives dans l'évaluation et la gestion des risques écologiques, ainsi que dans l'établissement des normes de qualité environnementale reste limitée (De Coninck et al. 2014).

Evaluer l'effet d'une exposition à long terme à la contamination à l'échelle populationnelle, et identifier les mécanismes sous-jacents, constituent donc un champ de recherche majeur à développer pour améliorer la pertinence de l'ERE.

### *Problématique et objectifs de ces travaux de thèse*

Dans ce contexte, ces travaux de thèse ont eu pour objectif d'avancer dans la compréhension des effets des expositions à long terme à la contamination à l'échelle populationnelle dans le milieu. Ils ont visé plus particulièrement à avancer dans la compréhension de l'évolution des sensibilités toxicologiques populationnelles, des processus soutenant ces modifications, et de leurs implications directes et indirectes pour l'évaluation du risque écologique. Ils s'intègrent ainsi dans le projet intitulé « Variabilité-adaptation-diversité et Ecotoxicologie des Gammaridés » (projet GAMMA) financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Ce projet vise à réduire l'incertitude liée à l'utilisation de *G. fossarum* comme espèce modèle dans l'évaluation des risques de la contamination environnementale à large échelle, et ainsi à améliorer la pertinence écologique des méthodes de monitoring actif dans l'évaluation de la qualité des milieux.

Ces travaux ont été rendus possibles au sein du laboratoire d'Ecotoxicologie d'Irstea de Lyon-Villeurbanne notamment grâce à l'identification d'un cas d'étude : une population du crustacé amphipode dulçaquicole *Gammarus fossarum* établie dans un site contaminé par du cadmium (Cd). Ainsi, ces travaux de thèse se sont centrés sur *G. fossarum* et sur le Cd comme contaminant modèle et ont plus particulièrement visé à :

- 1) déterminer si une exposition historique au Cd peut induire une augmentation de la tolérance à ce métal et/ou une modification de traits d'histoire de vie autres que la sensibilité chez *G. fossarum*,
- 2) identifier les mécanismes populationnels soutenant, ou pouvant soutenir, l'évolution d'une tolérance chez *G. fossarum*,
- 3) évaluer la divergence populationnelle (sensibilité au cadmium) induite par une exposition à long terme dans le cas d'étude par rapport à la variabilité observable entre populations de gammares.

L'étude approfondie de la population « cas d'étude » (approche dite rétrospective ou *a posteriori*), en complémentarité de l'analyse des réponses de populations de référence (approche dite prédictive ou *a priori*), ainsi qu'un couplage laboratoire /terrain ont été mis en place afin de répondre à ces questions.

Ce manuscrit se structure en six chapitres. Le **Chapitre 1** est une synthèse bibliographique centrée sur les réponses populationnelles à l'exposition à long terme à la contamination avec une réflexion sur les méthodes d'études de ces réponses dans le milieu. Ce chapitre se poursuit par une présentation de *Gammarus fossarum*, espèce modèle sur laquelle ont porté ces travaux. Il se conclut par une présentation de la stratégie d'étude mise en place pour répondre aux objectifs de la thèse. Le **Chapitre 2** présente les choix expérimentaux qui ont été réalisés et les méthodologies mises en place. Les chapitres 3, 4 et 5, présentent l'ensemble des résultats obtenus sous forme de publications et de notes. Le **Chapitre 3** présente la confirmation d'une population « cas d'étude » de *G. fossarum* exposée à long terme au Cd ; ainsi que les effets de cette exposition sur la sensibilité au Cd et les traits d'histoire de vie de cette population. Le **Chapitre 4** est consacré à l'étude de l'acquisition de la tolérance au Cd chez *G. fossarum*. Il se découpe en deux grandes sous-parties : une première centrée sur l'étude *a priori* de ces mécanismes à partir de populations de référence ; et une deuxième centrée sur leur étude *a posteriori* avec la population tolérante « cas d'étude ». Le **Chapitre 5** est quant à lui centré sur l'analyse de la variabilité de la sensibilité au Cd entre populations de référence du groupe *Gammarus* et sur le positionnement de la population « cas d'étude » dans cette variabilité en lien avec la diversité phylogénétique, afin d'évaluer la divergence de cette population par rapport à l'ensemble des populations de gammarus. Enfin, le **Chapitre 6** correspond à une discussion générale des principaux résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse, à la suite duquel une conclusion générale et des propositions de perspectives pour poursuivre ces travaux clôtureront ce manuscrit.

## **CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **Etude des réponses adaptatives des populations à la contamination des milieux**



## **1. Etat des lieux des phénomènes de tolérance aux contaminants au sein des populations naturelles animales :**

### **1.1. Mise en évidence des phénomènes de tolérance aux contaminants :**

#### **1.1.1. Définition :**

Une population tolérante peut être définie comme une population qui, du fait d'une exposition à plus ou moins long terme à un contaminant, présente une baisse de sensibilité toxicologique vis-à-vis de celui-ci par rapport à des populations naïves de la même espèce n'ayant pas été exposées. Au niveau populationnel cette tolérance se traduit par un décalage du niveau moyen de sensibilité, c'est-à-dire qu'un niveau de stress plus élevé (dose ou durée d'exposition) est nécessaire pour induire une altération équivalente des réponses biologiques chez les organismes tolérants (Amiard-Triquet 2011).

La tolérance à un contaminant peut être mise en évidence au cours de tests de toxicité par une comparaison des réponses létales et/ou sub-létales (comportement, croissance, reproduction, alimentation etc.) entre populations naïves et exposées (Amiard-Triquet 2011, Johnston 2011). La tolérance au cuivre (Cu) d'un clone de *Daphnia longispina* provenant d'un site impacté aux métaux (drainage minier acide) a ainsi pu être mise en évidence car il présentait une  $CL_{50}$  (concentration létale pour 50% des individus testés) ainsi que des  $CE_{50}$  (concentration ayant un effet pour 50% des individus testés) du taux de reproduction et du taux de croissance au cuivre plus élevées (*i.e.* en moyenne 11,8 fois pour la  $CL_{50}$  et 3,7 fois pour la  $CE_{50}$  du taux de croissance) que celles de deux autres clones naïfs provenant de sites non impactés aux métaux (Agra et al. 2011).

Dans ce manuscrit la notion de tolérance est abordée du point de vue d'une diminution de la sensibilité toxicologique comme définie dans cette première partie. Cependant, une population peut être tolérante à la contamination par le biais d'autres mécanismes, notamment

au travers de changements comportementaux (évitement des zones et de la nourriture contaminées), et des changements de patron d'histoire de vie (Rözen 2000).

### *1.1.2. Un phénomène ubiquiste :*

Des cas de tolérance aux contaminants ont été observés à de nombreuses reprises pour des populations naturelles exposées dans le milieu via une contamination de leur habitat, et ce pour la plupart des groupes taxonomiques eucaryotes : plantes (McNeilly et Bradshaw 1968, Gregory et Bradshaw 1965), algues (Pawlik-Skowrońska 2003), annélides (Klerks et Levinton 1989a), bivalves (Luoma et al. 1983), crustacés terrestres (Donker et Bogert 1991) ou aquatiques (Bodar et al. 1990, Lopes et al. 2005, Luoma et al. 1983), insectes (Postma et al. 1995a, 1995b; Groenendijk et al. 2002), poissons (Burnett et al. 2007), concernant ainsi l'ensemble des organismes vivants animaux ou végétaux, terrestres ou aquatiques.

Des observations d'acquisition de la tolérance ont été rapportées chez des espèces cibles exposées de manière intentionnelle à des substances chimiques dans une démarche de lutte contre les nuisibles. Parmi les exemples les plus connus (revue dans Ramade 2007), on peut citer le cas de la résistance des insectes aux insecticides (exemples de la résistance des diptères du genre *Aedes*, *Anopheles* et *Culex* (moustiques) à des insecticides de différentes familles chimique comme le DDT, la dieldrine, le malathion ; de l'espèce de pou *Pediculus capitis* au DDT, au lindane et à la perméthrine (Hemingway et Ranson 2000)); ou encore le cas de la résistance des plantes adventices aux herbicides (*Lolium rigidum*, graminée résistante au glyphosate, *Papaver rhoeas* papavéracée résistante au iodosulfuron-méthyl-sodium, mesosulfuron-méthyl, et au metsulfuron-méthyl (Heap 2015)). Ces phénomènes de tolérance aux pesticides s'observent également pour des espèces non-cibles (Jansen et al. 2011, Ramade 2007), et sont encore mal connus pour ces dernières (Weston et al. 2013). Des cas de résistance aux insecticides ont par exemple été rapportés chez le crustacé branchiopode *Daphnia magna* pour un insecticide de la famille des carbamates (Jansen et al. 2011), chez le crustacé amphipode *Hyalella azteca* pour des pyréthroïdes (Weston et al. 2013), ou encore

chez le poisson *Gambusia affinis* tolérant à différents pesticides (toxaphène) (revue dans Andreassen 1985).

Des phénomènes de tolérance ont également été rapportés pour des substances diffusées dans l'environnement de manière passive, contrairement aux cas des pesticides, et provenant par exemple de la production d'énergie ou des industries chimiques et métallurgiques. Des cas de tolérance aux métaux comme le cuivre (Gall et al. 2013, Brown 1976, Khan et al. 2011), le cadmium (Khan et al. 1988, Klerks et Levinton 1989a, Chiodi Boudet et al. 2013, Xie et Klerks 2004), le plomb (Pb) (Brown 1976, Fraser et al. 1978, Klerks et Lentz 1998), ou encore le zinc (Zn) (Spicer et al. 1998, Khan et al. 2011) ont ainsi été rapportés pour des populations naturelles exposées à ces contaminants dans le milieu. De la même manière, des cas de tolérance à des composés organiques autres que les pesticides comme les PCB, les HAP ou les dioxines (revue dans Burnett et al. 2007 chez *Fundulus heteroclitus*) ont aussi été rapportés pour des populations naturelles.

Ces phénomènes de tolérance ainsi bien documentés pour les populations naturelles, peuvent également être induits expérimentalement au laboratoire. Dans ce cas la tolérance peut être induite individuellement chez des organismes ayant eux-mêmes été exposés antérieurement (phénomène de plasticité phénotypique individuelle). Cela a par exemple été montré par Klerks (1999) chez le crustacé *Palaemonetes pugio*. Ce dernier a montré qu'une préexposition au zinc à  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  pendant 14 jours induisait une augmentation significative de la tolérance à une exposition ultérieure à  $35 \text{ mg.L}^{-1}$  par rapport aux individus témoins non pré-exposés. De même, cet auteur a montré qu'une préexposition à  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de naphthalène (famille des HAP) augmentait la tolérance au cours d'une exposition ultérieure à  $4 \text{ mg.L}^{-1}$ . Une augmentation de la tolérance peut également être induite par expositions successives de plusieurs générations comme mis en évidence avec le cadmium par Postma et Davids (1995) pour l'insecte *Chironomus riparius* et par Shirley et Sibly (1999) chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*). Dans ce cas la tolérance d'un individu résulte d'une exposition à des doses létales ou sub-létales de son ascendance (phénomène d'adaptation génétique ou de plasticité phénotypique trans-générationnelle).

En résumé, l'existence de ces phénomènes de tolérance à un contaminant du fait d'une exposition antérieure des individus ou des générations précédentes, est aujourd'hui largement

reconnue et ces processus ont fait l'objet de plusieurs documents de synthèse, à savoir review (Klerks et Weis 1987, Posthuma et van Straalen 1993, Medina et al. 2007, Morgan et al. 2007), special issue dans la revue *Ecotoxicology* (2011 : volume 20 (3) voir Coutellec et Barata 2011, et 2013 : volume 22 (5) voir Coutellec et Barata 2013), chapitres d'ouvrages (Ramade 2006, Amiard-Triquet et al. 2012, Kamenga et Laskowski 2000), et récemment d'un ouvrage entier intitulé « Tolerance to environmental contaminants » (2011, édité par Amiard-Triquet, Rainbow et Roméo). Ils apparaissent comme étant des phénomènes ubiquistes et assez répandus puisqu'ils peuvent se retrouver pour l'ensemble des contaminants, métalliques ou organiques, l'ensemble des organismes vivants, et aussi bien pour des populations naturelles exposées à long terme *in situ* qu'être induits au laboratoire.

### 1.1.3. Co-tolérance :

Dans certains cas, des organismes présentant une tolérance vis-à-vis d'un contaminant auquel ils ont été exposés, sont également plus tolérants à un autre contaminant auquel ils n'auront cependant pas été exposés. On parle alors de co-tolérance (Millward et Klerks 2002, Amiard-Triquet et al. 2012). L'existence de la co-tolérance a été montrée dans de nombreux cas, et est particulièrement bien documentée pour les microorganismes (Amiard-triquet et Roméo 2011). Les études s'intéressant à la co-tolérance pour les espèces animales sont plus rares (Amiard-Triquet 2011). Toutefois, dans le cas de la tolérance aux métaux, il a par exemple été démontré au laboratoire qu'une exposition au cadmium peut induire, en plus d'une tolérance à celui-ci, une tolérance au cuivre chez le poisson *Heterandria Ferosa* (Xie et Klerks 2003) ou au plomb chez *Daphnia magna* (Ward et Robinson 2005). Une exposition au zinc peut quant à elle induire également une tolérance au cuivre comme cela a été rapporté par Spurgeon et Hopkin (2000) pour l'annélide *Eisenia fetida*. Néanmoins, une autre étude conduite chez la daphnie (*Daphnia magna*) n'a pas mis en évidence ce phénomène. Des daphnies pré-exposées et résistantes au cuivre ne l'étaient pas pour le zinc et le plomb (Leblanc 1982).

Ainsi les phénomènes de co-tolérance semblent se mettre en place pour certains couples particuliers de toxiques, et dépendre de l'espèce et de la population exposée. La co-tolérance se produit le plus probablement pour des composés ayant des structures chimiques et des activités similaires partageant des mécanismes physiologiques et/ou biochimiques individuels et sub-individuels de tolérance communs. La co-tolérance à deux substances ne partageant pas de similitudes de structure et d'activité peut également se produire car les gènes responsables de la tolérance des différents contaminants peuvent être portés par les mêmes éléments génétiques mobiles comme un plasmide ou un transposon (Amiard-Triquet et al. 2012, Amiard-triquet et Roméo 2011, Millward et Klerks 2002), ou du fait d'effets pléiotropiques ou de liaisons génétiques (Xie et Klerks 2003, Millward et Klerks 2002).

### 1.2. Les facteurs de sécurité appliqués en évaluation du risque couvrent-ils les phénomènes de tolérance ?

Une des conséquences directes de l'augmentation de la tolérance à un contaminant porte sur la définition des normes environnementales, telles que les NQE (Normes de Qualité Environnementale), qui pourraient ne pas constituer une protection adéquate si elles sont basées sur des données de sensibilité obtenues à partir de populations naïves et si elles ne tiennent pas compte de ces phénomènes de tolérance. Il est donc nécessaire de quantifier le niveau de décalage de la sensibilité aux contaminants de ces populations tolérantes par rapport aux populations n'ayant pas développé de tolérance particulière du fait d'une exposition à la contamination (populations dites « sensibles » ou « naïves »). Le niveau d'augmentation de la tolérance des populations tolérantes peut être exprimé sous la forme d'un facteur de tolérance. Il correspond au ratio entre la sensibilité des populations tolérantes et des populations naïves (rapport de  $CL_{50}$  ou de  $CE_{50}$  par exemple).

Des facteurs de tolérance de différents ordres de grandeurs ont été rapportés dans la littérature pour les populations naturelles animales. Plusieurs études rapportent des niveaux de décalage de tolérance relativement faible, d'un ordre de grandeur inférieur à 10. Dans une revue portant sur l'augmentation de la tolérance aux contaminants de populations naturelles d'invertébrés aquatiques et de poissons (publications entre 1999 et 2009), Johnston (2011) a

pu calculer un facteur de tolérance pour 11 études parmi les 34 sélectionnées répondant aux critères de la revue. Il en ressort que 10 des 11 facteurs de tolérance calculés sont compris entre 1,4 et 8. D'autres études rapportent également des facteurs de tolérance de cet ordre de grandeur. Par exemple, dans une publication d'Andreasen (1985) s'intéressant à la tolérance au toxaphène (pesticide) de populations du poisson *Gambusia affinis* exposées dans le milieu aux pesticides et synthétisant les résultats de quatre autres études, sept facteurs de tolérance, parmi les 11 calculés sont compris entre 1,5 et 9,7. Un autre exemple est celui de la tolérance de populations naturelles de crustacés aux métaux. Pour *Gammarus pulex*, un facteur de tolérance de 1,5 au cours d'une exposition *in situ* au cuivre et au zinc par encagement dans des sites contaminés a été rapporté par Khan et al. (2011). Un facteur de tolérance au zinc de 5 (Roberts 1996 dans Maltby 1999), et un autre de 2,5 (Spicer et al. 1998 d'après L. Maltby, observations non publiées) ont également été rapportés. Toujours chez *Gammarus pulex*, on trouve dans la littérature une augmentation de la tolérance au cadmium d'un facteur 7 (Roberts 1996 dans Maltby 1999). Enfin, un facteur de tolérance de 2 au cadmium a été rapporté pour le décapode marin *Palaemonetes pugio* (Khan et al. 1988). Lopes et al. (2004) ont également rapporté un facteur de tolérance de 2 pour une population de *Daphnia longispina* tolérante au cuivre. Notons que les facteurs de sécurité classiquement appliqués dans l'évaluation du risque pour tenir compte (i) d'une différence de sensibilité entre l'espèce la plus sensible dans le milieu et l'espèce la plus sensible testée au laboratoire, (ii) d'une différence entre des concentrations à effets aiguës et chroniques, et (iii) d'une différence entre des effets chroniques mesurés sur une seule espèce au laboratoire et ceux dans le milieu sont de 10 pour chacun de ces trois niveaux (Chapman et al. 1998, Forbes et Calow 2002b). Ainsi, certains auteurs suggèrent que quand les niveaux de décalage de tolérance sont relativement faibles, comme ces facteurs de tolérance inférieurs à 10, ils semblent être couverts par les facteurs de sécurité classiques appliqués pour calculer les normes environnementales (Medina et al. 2007, Berthet et al. 2011, Johnston 2011).

Cependant, dans certains cas, l'augmentation de la tolérance est bien supérieure. Dans l'étude d'Andreasen (1985) sur la tolérance au toxaphène de populations de *Gambusia affinis*, un facteur de tolérance de 16, deux de 48, et un de 377 ont été rapportés. Un facteur de tolérance de 370 au cyfluthrin, un insecticide de la famille des pyréthroïdes, a également été

calculé à partir d'une étude menée par Weston et al. (2013) chez la hyallèle (*Hyallela azteca* Crustacea amphipoda). Ce facteur de résistance a été calculé à partir des CL<sub>50</sub>-96h entre la population naturelle considérée comme naïve la plus sensible et la population exposée dans le milieu la plus résistante pour lesquelles une CL<sub>50</sub> a pu être calculée. Dans sa revue, Johnston (2011) rapporte également un cas de tolérance à un PCB chez un poisson (*Fundulus heteroclitus*) 347 000 fois plus tolérant que la population contrôle. De ces derniers exemples il apparaît donc que les facteurs de sécurité classiques ne sont pas adéquats pour prendre en compte la variabilité potentielle induite par l'ensemble des cas de tolérance à un contaminant.

En outre, si à la vue des exemples cités précédemment, il semble que dans un grand nombre de cas les facteurs de tolérance soient inférieurs à 10 ou de l'ordre de grandeur de la dizaine, aucun consensus n'apparaît clairement dans la littérature ni quant à l'ordre de grandeur des décalages de sensibilité des populations tolérantes, ni pour expliquer ces variations de facteurs de tolérance et les mécanismes moléculaires, physiologiques ou démographiques responsables de cette acquisition de tolérance plus ou moins marquée. Cette difficulté tient probablement en partie du fait que pour la majorité des études rapportant un décalage de tolérance, la nature de cette dernière (c'est-à-dire adaptation ou plasticité) n'est pas identifiée, mais aussi probablement d'un manque de données pour couvrir de manière satisfaisante la diversité des contaminants et taxons. En effet, il semble que le niveau de décalage de sensibilité de populations, et d'organismes, tolérants dépende du type de contaminant ainsi que du mécanisme par lequel la tolérance est acquise. Par exemple, pour les pesticides dont le mode d'action est spécifique d'une cible biologique, une simple mutation ponctuelle modifiant le site cible du toxique confère aux arthropodes un haut degré de tolérance à ces composés (Taylor et Feyereisen 1996 dans van Straalen et Hoffman 2000). En revanche, pour des composés comme les métaux, ayant de nombreuses cibles biologiques comme mode d'action (Posthuma et van Straalen 1993), les acquisitions de tolérance observées peuvent être différentes et notamment être plus faibles. Ainsi, et comme le souligne Johnston (2011), il est donc nécessaire d'étudier la mesure dans laquelle la sensibilité populationnelle au contaminant peut être modifiée par une exposition afin d'évaluer si les facteurs de sécurité classique couvrent de manière satisfaisante ces phénomènes de tolérance ou non.

### 1.3. La tolérance au contaminant : un phénomène qui peut être trans-générationnel et/ou réversible :

La tolérance à un contaminant, observée chez des organismes et des populations ayant été exposés à la contamination, peut être trans-générationnelle, c'est-à-dire être transmise à la génération suivante, et ce même en l'absence d'une exposition à la contamination de ces nouvelles générations. Cela a par exemple été rapporté pour la tolérance au cadmium d'une population de l'isopode *Porcellio scaber* transmissible à la première génération de juvéniles produite au laboratoire en conditions non contaminées (F1) (Donker et Bogert 1991). Le maintien d'une tolérance au sein d'une deuxième génération de juvéniles produite au laboratoire en conditions non contaminées (F2) a par ailleurs été observé pour une tolérance au plomb acquise dans le milieu chez le crustacé *Asellus meridianus* (Brown 1976), ainsi que pour une population de *Limnodrilus hoffmeisteri* (oligochète) tolérante à du sédiment naturel contaminé aux métaux (Klerks et Levinton 1989a). Miliou et al. (2000) ont même montré avec une population naturelle de *Tisbe holothuriae* (copépode) tolérante au Co et Cr que la tolérance peut se maintenir jusqu'à 40 générations au laboratoire.

Cependant, la transmission de la tolérance n'est pas systématique. Elle peut disparaître dès la F1, comme l'ont montré Kwok et al. (2009) pour le copépode marin *Tigriopus japonicus* tolérant au cuivre à la suite d'une induction de la tolérance au laboratoire. Par ailleurs, d'autres études ont montré qu'en l'absence d'une exposition à la contamination la tolérance pouvait être perdue au sein de la même cohorte, et le niveau de tolérance des organismes initialement tolérants revenir à un niveau équivalent à celui des témoins. Par exemple Klerks et Lentz (1998) ont montré qu'une population de *Gambusia affinis* (poisson) habitant un site contaminé par du plomb et du zinc, présentant une tolérance au plomb par rapport à une population contrôle lors d'un test de toxicité aiguë réalisé après trois jours de stabulation au laboratoire, perd cette tolérance après 34 jours de stabulation. Muyssen et al. (2002) ont observé le même phénomène avec des clones de *Daphnia magna* collectés dans un site impacté au zinc perdant graduellement leur tolérance à ce métal au cours de leur culture dans un milieu non contaminé.

Le caractère trans-générationnel et la durée de persistance de la tolérance en l'absence d'une exposition dépendent du processus par lequel elle a été acquise (adaptation génétique, plasticité phénotypique etc.). Ces processus, seront décrits dans un deuxième temps au cours de cette synthèse bibliographique, en *section I.2.*

#### 1.4. Fréquence du phénomène dans les milieux :

Il existe plusieurs études rapportant une absence d'augmentation de la tolérance (Klerks et al. 1997, Klerks et Lentz 1998, Spurgeon et Hopkin 1999a, Klerks 1999, Costa et al. 2013) pour des populations habitants des sites impactés, voire même une augmentation de la sensibilité (revue d'exemples dans Klerks et Weis 1987) vis-à-vis du ou des contaminants auxquels elles sont exposées *in situ*. Une telle augmentation de la sensibilité a d'ailleurs également été rapportée au laboratoire par Leblanc (1982). Cet auteur a observé que l'exposition de plusieurs générations successives de daphnies (*Daphnia magna*) à du sodium lauryl sulphate peut se traduire par une augmentation croissante de la sensibilité à la toxicité de ce détergent à chaque génération. Ainsi, la tolérance aux contaminants n'est pas une réponse à la contamination se mettant systématiquement en place au sein des populations exposées.

Certains auteurs soulignent par ailleurs que l'occurrence des cas de tolérance pourrait être surestimée du fait de la difficulté à publier des résultats négatifs (Klerks et Weis 1987, Grant 2002, Amiard-Triquet et Rainbow 2011). De plus, les études sur la tolérance comparent souvent les sensibilités toxicologiques de populations présentes dans des sites impactés à celles de populations habitant des sites contrôles. Cette méthode constitue un biais à l'encontre des espèces qui n'ont pas développé de tolérance et qui sont par conséquent absentes des sites impactés (Klerks et Weis 1987, Klerks 2002, Klerks et al. 2011). En outre, les sites contaminés sont souvent caractérisés par une diversité spécifique inférieure aux sites contrôles (Klerks et Weis 1987, Klerks et Levinton 1989b, Klerks et al. 1997, Klerks 2002). Une telle réduction du nombre d'espèces constitue une preuve que la tolérance n'est pas une réponse systématique, et que de nombreuses espèces et/ou populations ne se maintiennent pas de façon durable dans des sites contaminés (Klerks et Weis 1987, Woods et Hoffman 2000).

Elle illustre également les autres effets possibles d'une exposition à la contamination, à savoir la disparition de populations au sein de sites impactés par migration (évitement de la contamination) ou par extinction (Lopes et al. 2004).

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine d'une absence de tolérance, avec d'une part des facteurs liés aux caractéristiques de la contamination des sites (développé *section I.4.2.1*), et d'autre part des facteurs biologiques liés aux espèces et aux populations les peuplant. La mise en place d'une tolérance n'est en effet pas universelle et est conditionnée par l'existence des mécanismes physiologiques biochimiques individuels et sub-individuels de tolérance au sein des populations exposées qui sont toxique, espèce et population-dépendants. Toutes les espèces n'ont, en effet, pas le même potentiel à devenir tolérantes. Différentes espèces exposées à la même substance chimique peuvent présenter de nombreux degrés d'acclimatation ou d'adaptation différents. De même, les mêmes espèces exposées à différents toxiques peuvent présenter des réponses différentes (Ward et Robinson 2005). Cela peut notamment dépendre du groupe phylogénétique auquel elles appartiennent, ou de la taille de leur génome, comme le suggère Dallinger et Höckner (2013) dans une revue sur l'évolution de la tolérance au cadmium chez les invertébrés. D'après Grant (2002), la plupart des espèces n'ont pas le potentiel de développer une tolérance à la pollution. Il rapporte ainsi, d'après l'analyse de trois autres études, que 10% des plantes habitant un site non contaminé adjacent à un site impacté aux métaux auraient la capacité de développer une forme tolérante aux métaux et donc de coloniser des sites sévèrement impactés. La mise en place d'une tolérance dépend également des caractéristiques propres à chaque population, notamment de l'existence d'une variabilité phénotypique de la tolérance et d'individus tolérants dans la population, de sa variabilité génétique (en lien avec sa taille et son histoire évolutive), de son taux de mutation mais aussi de la condition physiologique des individus (Rözen 2000, Grant 2002, Salice et al. 2010, Dallinger et Höckner 2013).

## 2. Différents processus populationnels possibles de mise en place de la tolérance :

Une baisse de sensibilité toxicologique au contaminant peut résulter, à l'échelle populationnelle de différents processus. Elle peut soit être acquise par adaptation génétique (*section I.2.1*), soit relever de processus plastiques, en opposition à l'adaptation génétique, pouvant être ou non trans-générationnels avec d'une part l'acclimatation physiologique individuelle (*section I.2.2*) et d'autre part les effets parentaux (*section I.2.3*). Nous allons ici décrire brièvement ces processus par lesquels une population peut acquérir une tolérance au contaminant. Ils seront décrits séparément bien qu'ils ne s'excluent pas mutuellement, étant donné que les processus physiologiques ont une base génétique (Johnston 2011), et peuvent ainsi avoir été sélectionnés.

A noter que dans ce manuscrit l'expression « mécanismes de tolérance », est utilisée pour désigner ces processus d'acquisition de la tolérance à l'échelle populationnelle, et non pas les mécanismes physiologiques et biochimiques individuels et sub-individuels de tolérance permettant à un individu d'être tolérant comme le sont par exemple des modifications de l'accumulation, de la séquestration ou de l'excrétion des contaminants, qui peuvent résulter de l'un ou l'autre des mécanismes populationnels.

### 2.1. L'adaptation génétique :

#### 2.1.1. Description du processus :

La tolérance à un contaminant peut être acquise par adaptation génétique des populations exposées sur plusieurs générations par l'action de la sélection naturelle, le contaminant agissant comme un agent de sélection sur la variation individuelle de la résistance d'origine génétique (Klerks et Weis 1987, Posthuma et van Straalen 1993, Rainbow et Luoma 2011). Le contaminant agit comme une force sélective sur la population en réduisant la contribution des génotypes sensibles à la génération suivante par réduction de la survie ou de la reproduction des individus portant ces génotypes (Klerks 2002, Millward et

Klerks 2002), c'est-à-dire par élimination des individus ayant une mauvaise fitness en conditions contaminées. Tandis que les individus tolérants, portant des génotypes leur conférant une tolérance aux effets toxiques des contaminants, survivent et se reproduisent mieux, et sont ainsi favorisés (Dallinger et Höckner 2013). L'adaptation génétique à la contamination se traduit par un changement des fréquences alléliques au sein de la population adaptée (Klerks 2002, Lopes et al. 2006). Il s'agit d'un processus microévolutif (Lopes et al. 2006, Ribeiro et Lopes 2013), la microévolution ayant été définie par Hendry et Kinnison (2001) comme l'évolution à l'intérieur et entre populations.

Par ailleurs, deux types d'individus tolérants peuvent être sélectionnés. En effet, l'adaptation génétique d'une population à la contamination peut se mettre en place par la sélection d'individus étant constitutivement tolérants au toxique, et/ou par la sélection, d'individus pouvant mettre en place des systèmes de défenses contre le toxique de manière efficace. Il s'agit des mêmes réponses que celles décrites dans le cas d'une acclimatation physiologique (*section I.2.2*), à la différence que les individus présentant ces aptitudes seront présents en plus grande fréquence dans la population adaptée du fait du phénomène de sélection (Johnston 2011, Posthuma et van Straalen 1993).

### 2.1.2. Cas du tri de lignées pour les espèces à reproduction clonale :

Des études portant sur des clones de *Daphnia longispina* (Lopes et al. 2004) et de *Ceriodaphnia pulchella* (Lopes et al. 2005) ont mis en évidence des populations naturelles présentant une tolérance aux métaux en lien avec une exposition dans le milieu. Dans ces deux études, les auteurs attestent que cette augmentation de la tolérance est génétiquement déterminée, et qu'elle résulte de l'érosion génétique d'une population fondatrice d'origine avec la disparition des individus, et donc des génotypes sensibles. Le même constat d'une tolérance d'origine génétique en parallèle d'une baisse de la diversité génétique a été observée au laboratoire, par exposition de plusieurs générations successives de clones de *Daphnia magna* au cadmium (Ward et Robinson 2005).

Certains auteurs suggèrent que cet état apparent d'adaptation, est un état transitoire atteint avec la perte des lignées sensibles en présence de contaminant, et qui pourrait disparaître à chaque reproduction sexuée du fait d'une faible héritabilité de la tolérance (Chaumot et al. 2009) (la notion d'héritabilité est développée dans la section suivante). Selon cette hypothèse la tolérance se maintient dans le temps entre générations « clonales » issues d'une reproduction asexuée par parthénogénèse de cohortes « triées », mais à chaque génération issue d'une reproduction sexuée, tous les types d'individus (sensibles et tolérants) sont produits dans la population. Dans un contexte de contamination, « un tri de lignées » s'opère alors : les individus sensibles ne survivant pas en conditions contaminées disparaissent de la population, tandis que les individus tolérants se maintiennent et se reproduisent soutenant ainsi l'existence de la population. Ainsi, bien que dans ce cas on observe un décalage du niveau moyen de tolérance ainsi qu'un changement des fréquences alléliques dans la population du fait d'une érosion génétique (perte des génotypes sensibles), il semble discutable qu'il s'agisse d'une adaptation génétique à la contamination dans le sens où des individus tolérants ne sont pas sélectionnés au fil des générations, et où les fréquences alléliques n'évoluent pas entre chaque génération (reproduction sexuée), mais évoluent dans le temps au sein d'une même cohorte.

### 2.1.3. Mise en place :

L'adaptation génétique est un processus qui requiert une exposition prolongée et répétée au(x) contaminant(s) sur plusieurs générations (revue dans Mouneyrac et al. 2011). Elle peut néanmoins se mettre en place rapidement, en quelques années et en quelques générations, comme l'ont observé Klerks et Levinton (1989) pour une population naturelle de *Limnodrilus hoffmeisteri* (oligochète) ayant développé une adaptation génétique à une contamination métallique 30 ans après l'établissement de la pollution. La mise en place d'une adaptation génétique à la contamination d'une population est conditionnée par plusieurs facteurs, notamment :

- La variabilité de la sensibilité :

La variabilité de la tolérance au sein de la population doit être suffisante pour permettre une sélection d'individus tolérants (Klerks 2002). Ce premier point est l'une des conditions nécessaires pour qu'une sélection puisse se mettre en place, et correspond au principe de variation énoncé par Darwin (1872).

- Le caractère héréditaire de la tolérance :

Pour être sélectionnée la tolérance doit pouvoir être génétiquement transmise des parents aux juvéniles. Si elle ne l'est pas celle-ci ne peut en effet pas évoluer entre générations puisque des individus tolérants donnent à la fois naissance à des juvéniles sensibles et tolérants. La tolérance peut avoir une base génétique sans être héritable, et donc sans pouvoir être sélectionnée, si elle résulte de relations de dominance entre gènes, celles-ci n'étant pas transmissibles entre générations dans le cas d'une reproduction sexuée (Falconer et Mackay 1996). En génétique quantitative, la variabilité et le caractère héritable d'un trait sont mesurés par son héritabilité au sens strict ( $h^2$ ). Cette valeur renseigne sur le potentiel de réponse à la sélection et donc sur le potentiel d'adaptation génétique d'une population pour le trait en question. Si l'héritabilité de la tolérance est faible, alors la population a un faible potentiel d'adaptation génétique. Cela a été observé par Chaumot et al. (2009) pour la tolérance au cadmium chez *Gammarus fossarum*, et par Klerks et Moreau (2001) pour la tolérance au zinc et au phénanthrène (famille des HAP) du poisson *Cyprinodon variegatus*. A l'inverse si l'héritabilité de la tolérance est élevée, comme cela a été observé par Klerks et Levinton (1989) pour la résistance aux métaux de l'oligochète *Limnodrilus hoffmeisteri*, alors la population est susceptible de s'adapter rapidement au contaminant.

- Les flux de gènes :

Les flux de gènes peuvent représenter un obstacle à la mise en place d'une adaptation locale, l'empêcher ou la ralentir, en empêchant une différenciation génétique entre les populations exposées et non exposées à la contamination par l'apport régulier de génotypes sensibles qui empêche la fixation des génotypes résistants dans la population exposée. Cet effet est en particulier admis dans les cas où les flux de gènes sont importants (revue dans

Gall et al. 2013, revue dans Groenendijk et al. 2002, Klerks et al. 1997, Klerks 2002). A l'inverse certains auteurs ont rapportés que les flux de gènes pourraient avoir un effet potentiateur dans l'adaptation locale des populations, en représentant une source de nouveaux gènes ou combinaisons de gènes nécessaires à l'augmentation de la tolérance (Slatkin 1987, Caprio et Tabashnik 1992). Il est généralement admis que l'adaptation génétique à la contamination d'une population est un équilibre entre la force de la sélection exercée par le contaminant, et l'intensité des flux de gènes en lien avec le taux d'immigration d'individus à partir de populations non exposées (Brandon 1990 dans Groenendijk et al. 2002, revue dans Gall et al. 2013). Néanmoins, l'effet des flux de gènes sur la mise en place d'une adaptation locale dépend également d'autres facteurs comme la structure de la population (par exemple la densité) dans l'environnement contaminé, ou encore de la fréquence des allèles de résistance (Caprio et Tabashnik 1992, Woods et Hoffman 2000).

- Les coûts de fitness et trade-offs :

Pour constituer une adaptation, la tolérance doit par définition procurer à la population adaptée une meilleur fitness que la population non-adaptée en conditions contaminées (Klerks 2002). Ainsi, si la tolérance est associée à des coûts de fitness et trade-offs trop importants, par exemple si les individus tolérants ont une fertilité réduite, alors celle-ci n'est pas sélectionnée. Cette notion de coûts est développée un peu plus tard (*section I.3*).

- Les contraintes de sélection :

La mise en place ou non d'une adaptation peut aussi être liée à des contraintes de sélection, c'est-à-dire que l'évolution d'un trait donné, ici la tolérance, est limitée par les conséquences de la sélection de celle-ci sur des traits autres du fait de contraintes génétiques, physiologiques, développementales ou phylogénétiques (Wagner 1988, Arnold 1992, Brakefield 2006, Coutellec et Barata 2013).

#### 2.1.4. Persistance de la tolérance acquise en milieu non contaminé :

La tolérance acquise par adaptation génétique est héréditaire, et est donc transmise génétiquement aux générations suivantes (Posthuma et van Straalen 1993, Rainbow et Luoma 2011). De ce fait, pour les populations naturelles, l'adaptation génétique à la contamination protège à la fois les individus vivants directement dans un site impacté et leurs descendants, assurant ainsi la durabilité de populations locales habitant un environnement contaminé (Amiard-Triquet 2011).

Néanmoins, l'adaptation génétique à la contamination peut être perdue en l'absence d'une exposition continue au contaminant. Levinton et al. (2003) dans une étude portant sur une population naturelle de l'oligochète *Limnodrilus hoffmeisteri* adaptée au cadmium, ont dans ce sens observé un retour de la sensibilité de cette population à un niveau équivalent à celui d'une population de référence 8 ans après la restauration du site impacté où vit cette population, c'est-à-dire entre 9 et 18 générations. Cela peut se produire par sélection naturelle si l'augmentation de la tolérance est associée à des coûts (par exemple une baisse de la reproduction), car en conditions non contaminées elle représente alors un désavantage sélectif pour les individus tolérants par rapport aux individus non tolérants. Ainsi selon Klerks (2002) le degré de permanence d'une adaptation dépend en grande partie de la présence et de l'ampleur des coûts de fitness associés. Elle peut également être perdue du fait de flux de gènes provenant de populations non adaptées, selon les mêmes mécanismes décrits précédemment. Groenendijk et al. (2002), ont d'ailleurs expérimentalement démontré que l'adaptation génétique aux métaux d'une population de chironomes *Chironomus riparius* pouvait être perdue rapidement par ce biais, et ceci dès la première génération d'hybrides produits à partir d'un croisement entre des individus provenant d'une population adaptée et non adaptée. Cette hypothèse de l'immigration de génotypes sensibles a d'ailleurs également été suggérée pour expliquer la perte de tolérance de la population naturelle de l'oligochète *Limnodrilus hoffmeisteri* adaptée au cadmium de l'étude de Levinton et al. (2003) par Mackie et al. (2010).

## 2.2. Acclimatation physiologique :

### 2.2.1. Description du processus :

L'augmentation de la tolérance à un contaminant d'une population peut résulter de l'acclimatation physiologique des individus composant la population (Klerks et Weis 1987, Posthuma et van Straalen 1993). Elle est acquise individuellement au cours d'une exposition au contaminant à des concentrations sub-létales des organismes pendant une période de leur vie (Klerks et Weis 1987, Posthuma et van Straalen 1993, Amiard-Triquet et al. 2011). Ainsi, l'acclimatation physiologique à la contamination est un type de plasticité phénotypique, qui résulte uniquement de l'effet de l'environnement, c'est à dire de la présence du contaminant dans le milieu, sur l'expression phénotypique des génotypes présents dans la population, et qui de ce fait, n'affecte pas la structure génétique des populations (Posthuma et van Straalen 1993, Lopes et al. 2004, 2006).

### 2.2.2. Mise en place :

L'acclimatation physiologique d'un individu peut résulter d'ajustements physiologiques de traits aux conditions environnementales ambiantes (flexibilité phénotypique) (Piersma et Drent 2003), notamment par l'activation des mécanismes physiologiques et biochimiques de tolérance (par exemple, l'augmentation d'activités enzymatiques, la production de protéines de séquestration des métaux) (Lopes et al. 2004, Woods et Hoffman 2000). Elle peut également résulter de processus mis en place au cours du développement en réponse à des conditions environnementales particulières (plasticité développementale) (Piersma et Drent 2003, Uller 2008). Flexibilité phénotypique et plasticité développementale sont considérées ici comme deux types particuliers de plasticité phénotypique (Piersma et Drent 2003) mais la distinction entre ces deux mécanismes n'est pas communément faite en écotoxicologie. Généralement l'ensemble des cas d'augmentation de la tolérance à la suite d'une exposition d'un individu à un moment de sa vie sont interprétés

comme étant le résultat d'une acclimatation physiologique (en accord avec la définition donnée ci-dessus). Néanmoins, il apparaît que le terme « acclimatation » désigne, dans d'autres disciplines, exclusivement les ajustements physiologiques de traits aux conditions environnementales ambiantes, c'est-à-dire la flexibilité phénotypique (Piersma et Drent 2003).

L'acclimatation physiologique est un mécanisme de tolérance ayant été rapporté pour des populations naturelles comme par exemple dans les études de Klerks et Lentz (1998) sur le poisson *Gambusia affinis* ou de Maltby et Crane (1994) sur l'amphipode *Gammarus pulex*. Elle a également été vérifiée expérimentalement au laboratoire au travers de nombreuses études mettant en évidence qu'une préexposition à un contaminant à des doses sub-létales, peut conférer aux organismes pré-exposés, une tolérance plus importante au cours d'une exposition ultérieure plus aigüe. Cela a par exemple été observé pour la tolérance aux métaux de poissons et de différents invertébrés aquatiques (Leblanc 1982, Khan et al. 1988, Stuhlbacher et Maltby 1992, Klerks 1999). De même, la tolérance acquise par plasticité développementale a également déjà été induite au laboratoire dans une étude de Plautz et Salice (2013) chez *Physa pomilia* à la suite d'une exposition de masses d'œufs au cadmium. Par ailleurs, il apparaît des études conduites au laboratoire, que l'acclimatation peut se mettre en place rapidement. Une tolérance à la contamination a notamment pu être constatée après une courte préexposition de 20h pour *Daphnia magna* (Leblanc 1982), et une semaine pour le crustacé marin *Palaemonetes pugio* (Khan et al. 1988).

### 2.2.3. Persistance de la tolérance acquise en milieu non contaminé :

A l'échelle de l'individu la tolérance au contaminant est irréversible dans le cas d'une tolérance acquise par plasticité développementale, et réversible dans le cas d'une tolérance acquise par flexibilité phénotypique (Piersma et Drent 2003). Si la réversibilité de la tolérance est reconnue, peu d'études s'intéressent au temps nécessaire pour le retour à un niveau de sensibilité équivalent à celui d'une population contrôle. Klerks et Lentz (1998) ont néanmoins

rapportés que la tolérance au plomb pouvait être perdue après 34 jours de maintien des organismes en conditions contrôles au laboratoire.

La tolérance acquise par acclimatation physiologique n'est pas transmise à la descendance, qui doit elle-même avoir été exposée pour l'acquérir (Klerks et Weis 1987, Amiard-Triquet et al. 2011). A l'échelle populationnelle, elle peut donc être acquise ou perdue en une seule génération si l'exposition n'est pas maintenue (Posthuma et van Straalen 1993), comme observé par Kwok et al. (2009) pour le copépode marin *Tigriopus japonicus* et le cuivre.

### 2.3. Les mécanismes non génétiques d'hérédité : les effets parentaux :

#### 2.3.1. Description du processus :

Il est possible que la tolérance à un contaminant soit héritable sans être liée à une adaptation génétique de la population. Dans ce cas la tolérance est transmise à la descendance par des moyens non génétiques d'hérédité. La tolérance au contaminant peut en effet être le résultat d'effets parentaux; c'est-à-dire liée à un effet de l'environnement ou du phénotype des parents sur le phénotype de leur juvéniles (Badyaev et Uller 2009). Les effets parentaux constituent une forme de plasticité traversant les générations (Uller 2008). La sensibilité aux contaminants des descendants est alors influencée par des mécanismes non-génétiques ou épigénétiques d'hérédité (épigénétique au sens large), c'est-à-dire des moyens autres que la transmission d'une séquence particulière d'ADN (Jablonka et Raz 2009, Ho et Burggren 2010, Pfennig et Servedio 2013). On parle alors d'effets épigénétiques trans-générationnels (Ho et Burggren 2010). Dans ces cas la transmission peut se faire au travers de modifications de la chromatine (ex : (dé)méthylation de l'ADN, modification des histones), de transferts d'ARN non codants, ou encore de transferts de différents éléments via les œufs (vitellus, organelles, ARN codants, facteurs d'immunité etc). Ces mécanismes ont par ailleurs été détaillés dans des revues relativement récentes (Badyaev et Uller 2009, Jablonka et Raz 2009, Ho et Burggren 2010, Vandegehuchte et Janssen 2001, Pfennig et Servedio 2013). Dans le cas

d'une acquisition de la tolérance via des effets parentaux il n'y a donc pas de changement des fréquences alléliques dans la population au cours des générations.

Par ces mécanismes, des individus n'ayant pas été eux même exposés à la contamination peuvent être tolérants à un contaminant. Cela a notamment été mis en évidence au laboratoire par Plautz et Salice (2013), qui ont montré que des juvéniles de *Physa pomilia* (gastéropode d'eau douce) issus de parents exposés 7 jours à 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cadmium étaient plus tolérants au cadmium que des juvéniles issus de parents non exposés. Ces phénomènes ne sont pas systématiques puisqu'à l'inverse Kwok et al. (2009) n'ont pas observé d'augmentation de la tolérance de juvéniles issus de parents exposés à 10 ou 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cuivre chez le copépode marin *Tigriopus japonicus*.

Bien que les effets parentaux et le rôle de l'épigénétique dans la détermination du phénotype d'un individu soient connus, il s'agit de concepts nouveaux en écotoxicologie. Les conséquences d'une exposition parentale à des contaminants sur la sensibilité de la génération suivante sont en effet assez peu étudiées. De plus, lorsque les effets parentaux sont abordés, ils le sont le plus souvent sous l'angle des effets maternels, mais sans que ceux-ci ne soient clairement définis, ce qui de surcroît ne tient pas compte de possibles effets paternels. Il est par ailleurs avéré qu'une exposition à des substances chimiques peut induire des changements épigénétiques chez les individus exposés, comme le montre une récente revue sur l'implication de l'épigénétique en écotoxicologie de Vandeghechuchte et Janssen (2011) ainsi que Legler (2010). Néanmoins, ces auteurs soulignent que les recherches sur les phénomènes épigénétiques en écotoxicologie sont très limitées. Ils insistent par ailleurs sur le manque de connaissances sur le potentiel des modifications épigénétiques induites par des produits chimiques à être transmises de manière stable sur plusieurs générations, et la nécessité d'études dédiées à ces questions pouvant avoir des implications profondes pour l'évaluation des risques des produits chimiques.

### 2.3.2. Effets paternels et effets maternels :

Les effets paternels ne sont, en général, pas considérés comme des forces majeures dans les phénomènes d'hérédité épigénétique. Néanmoins certains auteurs soulignent que cela tiendrait du fait qu'ils ont été beaucoup moins étudiés que les effets maternels, et ajoutent, exemples à l'appui, qu'ils peuvent bel et bien affecter le phénotype de leurs descendants (revue de Ho et Burggren 2010).

Les effets maternels peuvent moduler de manière significative le phénotype des juvéniles notamment au travers des œufs (taille, transfert d'éléments maternels). Ils sont parfois considérés comme un mécanisme important permettant une réponse phénotypique chez les descendants à un signal environnemental perçu par les parents. En d'autres termes, les phénotypes des descendants sont ajustés en réponse à des signaux environnementaux perçus à la génération précédente et aboutissant à un gain de fitness (Bernardo 1996, Mousseau et Fox 1998). Dans ce manuscrit nous distinguerons deux types d'effets maternels. Avec d'une part les effets maternels « neutres », propres aux caractéristiques génétiques et phénotypiques de la mère, qui s'expriment dans des conditions environnementales stables et non stressantes. Ces effets maternels sont reproductibles entre portées. Dans ce cas la mère est considérée comme un environnement que partage l'ensemble de ces descendants. Et d'autre part, les effets maternels liés à l'environnement de la mère. Ces effets incluent les effets de la mère en tant qu'environnement (i.e. ceux énoncés ci-dessus) qui peuvent être modulés par l'environnement (Mousseau et Fox 1998), ainsi que des effets maternels autres, se mettant en place dans des conditions particulières d'environnement. Ces effets sont spécifiques à une portée du fait qu'elle est produite dans un environnement particulier subi par la mère. Par souci de clarté, dans la suite de ce manuscrit, ces deux types d'effets maternels seront désignés sous le terme « effets de la mère en tant qu'environnement » pour les premiers, et « effets de l'environnement de la mère » pour les seconds.

Dans le cas de la tolérance aux contaminants, plusieurs études ont ainsi mis en évidence qu'une exposition à la contamination de femelles pouvait induire une augmentation de la tolérance de leurs juvéniles. Cela a notamment été montré expérimentalement chez la

daphnie (*Daphnia magna*, Tsui et Wang 2005), ou encore chez différents poissons (*Pimephales promelas* avec le cuivre (Peake et al. 2004, Sellin et Kolok 2006) ; *Oreochromis mossambicus* avec le cadmium (Lin et al. 2000)), mais a également été observé pour une population naturelle de *Catostomus commersoni* (poisson) exposée au cuivre et zinc (Munkittrick et Dixon 1988). Dans ces cas de tolérance, les auteurs suggèrent que la tolérance pourrait être liée à des transferts maternels dans les oocytes : du contaminant lui-même, d'ARN messagers pour des protéines d'acclimatation (par exemples des protéines de séquestration des métaux comme les métallothionéines), et/ou les protéines elles-mêmes. Peake et al. (2004), ajoutent également qu'un des mécanismes possibles serait une mortalité des oocytes ou des œufs conduisant uniquement à la naissance des juvéniles les plus tolérants.

### 2.3.3. Persistance de la tolérance acquise en milieu non contaminé :

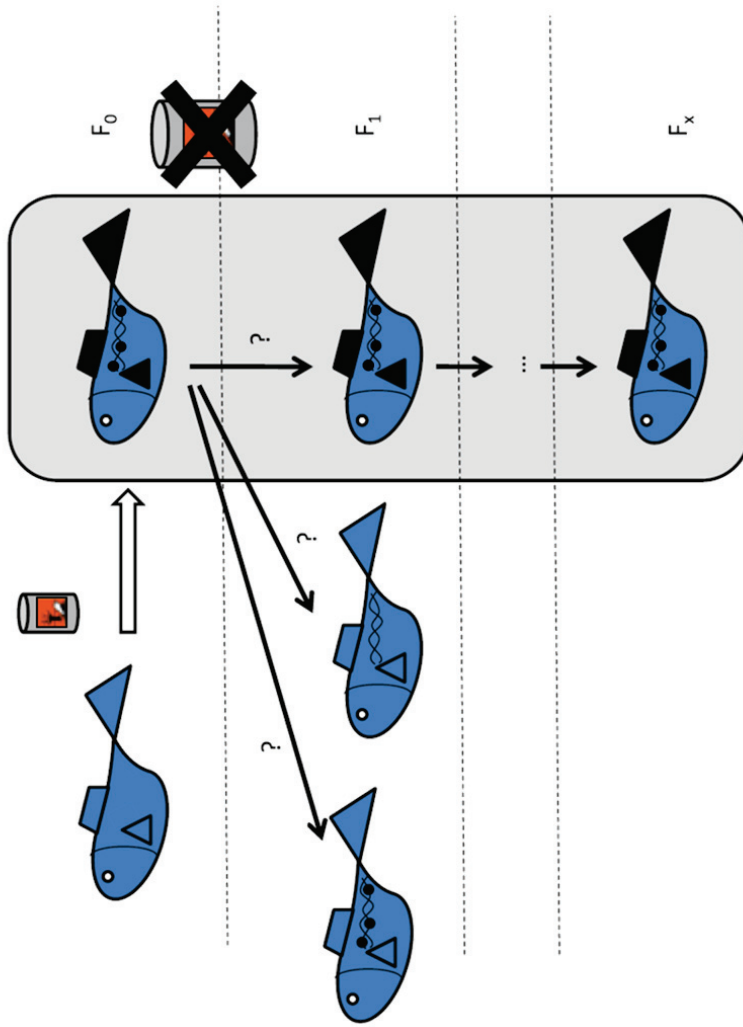
A l'échelle de l'individu, la durée de persistance d'une augmentation de la tolérance via des effets maternels n'est pas bien connue (Sellin et Kolok, 2006). Néanmoins, des études rapportent qu'elle pourrait s'estomper rapidement : en 12 jours pour des juvéniles de *Pimephales promelas* (Sellin et Kolok, 2006), et en 25 jours pour des juvéniles de *Catostomus commersoni* (Munkittrick et Dixon 1988) dans le cas de tolérance au cuivre des deux espèces de poisson. Une autre étude, portant sur le gastéropode *Brotia hainanensis*, a également mis en évidence que la tolérance au cadmium de F1 était observable pour des juvéniles de moins de 2 jours mais plus pour des juvéniles de 7 jours (Lam 1996).

A l'échelle de la population, la tolérance à un contaminant acquise au travers d'effets parentaux est réversible, mais elle perdurera sur un plus ou moins grand nombre de générations après arrêt de l'exposition, en fonction du mécanisme non génétique d'hérédité sous-jacent. Certains effets parentaux peuvent en effet n'affecter la tolérance que de la première génération de juvéniles (F1) issus de parents exposés, et ne plus exister dès la F2. Ces effets parentaux qui sont perdus très rapidement dès lors que l'exposition est suspendue, correspondent notamment à un type particulier d'effets maternels : les transferts spécifiques

soma-à-soma liés à l'exposition directe des mères au contaminant (par exemple un transfert de protéines de détoxification, ou d'ARNm dans les oocytes) (Figure I-1 A)). Ces transferts constituent une réponse physiologique de la mère à la présence de contaminant dans son habitat. Ainsi, selon le même principe que l'acclimatation physiologique, ces transferts peuvent s'estomper rapidement dès lors que la mère n'est plus exposée. Ces effets maternels correspondent à une partie des « effets de l'environnement de la mère » définie un peu plus haut. Par exemple, Tsui et Wang (2004) ont observé chez *Daphnia magna* que la tolérance au mercure (Hg) en lien avec une exposition maternelle ne s'exprimait que chez les juvéniles directement produits par les mères exposées, et qu'elle était perdue à la génération suivante, c'est à dire dès la deuxième génération (F2). Ces effets peuvent également avoir une origine paternelle (revue de Bonduriansky et Day 2009).

Les effets parentaux peuvent cependant également se maintenir au-delà de la 1<sup>ère</sup> génération de juvéniles produits au laboratoire. Ils peuvent même être très stables et perdurer pendant plusieurs dizaines de générations. Cela peut être le cas s'ils sont transmis entre générations via des modifications de la chromatine (exemple : méthylation de l'ADN), comme le montre une revue de Jablonka et Raz (2009). Ces modifications de la chromatine peuvent en effet persister même en l'absence du stimulus environnemental ayant induit ces modifications (Jablonka 2013). La durée de persistance d'effets parentaux supportés par ce type de mécanisme est néanmoins très variable, et s'ils peuvent perdurer très longtemps, ils peuvent également être rapidement perdus (exemples dans la revue de Jablonka et Raz 2009 et de Vandegehuchte et Janssen 2011) (Figure I-1 B)). Ils peuvent également être d'origine paternelle et/ou maternelle (Bonduriansky et Day 2009, et exemple d'origine paternelle dans la revue de Jablonka et Raz 2009). Une tolérance acquise via des effets parentaux peut donc avoir des implications profondes pour l'évaluation des risques écologiques des produits chimiques puisqu'elle peut se maintenir dans la population et ce même si l'exposition a cessé depuis plusieurs générations.

B)



A)

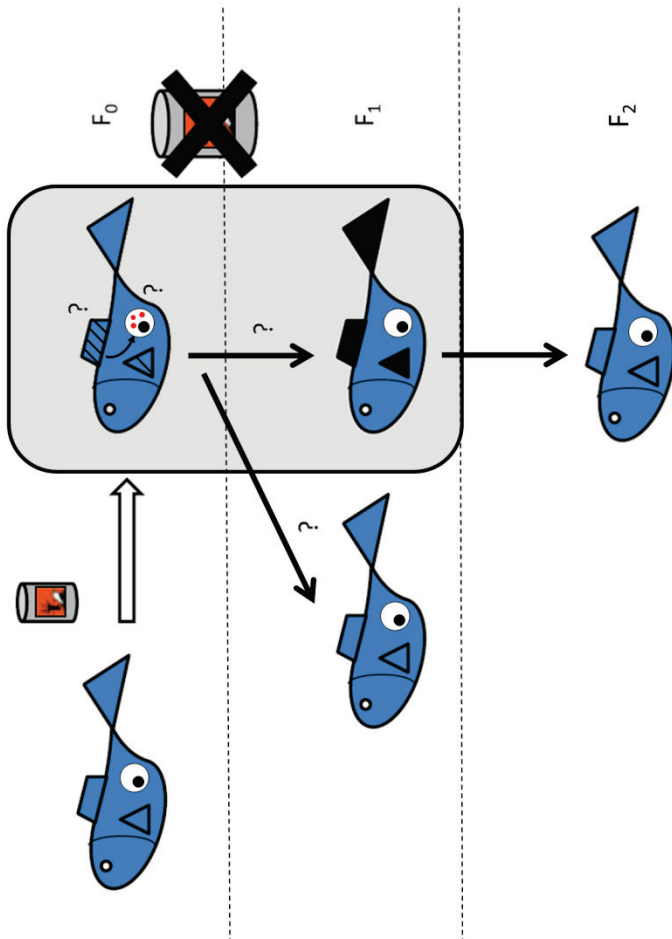


Figure I-1 : Figure illustrant différentes voies par lesquelles une exposition parentale aux contaminants peut influencer la sensibilité de générations suivantes non exposées. Une exposition parentale à des toxiques peut : A) induire une tolérance (représentée par les nageoires noires) dans la première génération de descendants du fait d'un transfert soma-à-soma lié à l'exposition directe des parents. Il peut s'agir de transferts d'éléments maternels via les oocytes, par exemple un transfert de protéines de détoxification (schématisés par les pois noirs). Ce mécanisme n'est pas transmissible à la deuxième génération de descendants non-exposés (hors cadre ombragé). Elle peut aussi B) provoquer des modifications de la chromatine, par exemple une modification des méthylation de l'ADN (représentées par les pois noirs sur le brin d'ADN), et des effets phénotypiques (représentés par les nageoires noires). Ces changements épigénétiques et/ou les effets phénotypiques peuvent ou non être transmis à la génération suivante, qui n'est pas exposée à la substance chimique. Si ces changements persistent pendant plusieurs générations (cadre ombragé), les organismes non exposés subissent les effets de l'exposition des générations antérieures. (Inspirée de Vandeghechuchte et Janssen 2011)

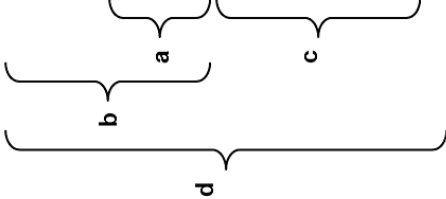
### Synthèse :

Traditionnellement en écotoxicologie la tolérance est perçue comme pouvant être liée soit à une adaptation génétique, soit à une acclimatation physiologique. La tolérance étant transmissible à la descendance dans le premier cas, et non dans le second. Les effets parentaux sont quant à eux peu étudiés en tant que tels. Ils sont généralement traités de manière « anecdotique », et quasiment exclusivement sous le terme « effets maternels ».

Il ressort de la synthèse de la littérature proposée ici, que cette vision dichotomique de l'origine de la tolérance n'est plus suffisante. Les mécanismes possibles à l'origine d'une tolérance peuvent en effet être détaillés de manière plus fine (Tableau I-1). Cette analyse plus fine apparaît nécessaire pour améliorer la connaissance de l'incertitude que représentent les phénomènes de tolérance pour l'évaluation des risques liés aux substances chimiques toxiques. En fonction du mécanisme de tolérance les implications pour l'évaluation des risques ne sont pas les mêmes, car la tolérance ne se met pas en place et ne persiste pas sur les mêmes échelles temporelles et biologiques, mais aussi car les coûts potentiellement associés à la tolérance peuvent être différents (*section I.3*). Il est donc important de distinguer ces différentes possibilités (Amiard-Triquet et Roméo 2011).

Tableau I-1 : Synthèse des différents processus pouvant être à l'origine d'une tolérance à la contamination à l'échelle populationnelle présentés dans cette synthèse bibliographique, et caractéristiques principales.

| Mécanisme populationnel     | Réversible en condition non contaminée |                                 | Héritable     | Mise en place                                                        | Modification des fréquences alléliques dans la population | Manifestation de la tolérance                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------|----------------------------------------|---------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                             | Individus                              | Générations                     |               |                                                                      |                                                           |                                                                                                                                                                                                                                   |
| Adaptation génétique        | Non                                    | Oui à long terme                | Oui           | Sur plusieurs générations d'exposition                               | Oui                                                       | F0, F1, F2 à Fn avec n inconnu                                                                                                                                                                                                    |
| Plasticité développementale | Non                                    | Oui                             | Non           | Pendant le développement d'un individu si exposé                     | Non                                                       | F0                                                                                                                                                                                                                                |
| Flexibilité phénotypique    | Oui                                    | Oui                             | Non           | Du fait d'une exposition pendant une période de la vie d'un individu | Non                                                       | F0                                                                                                                                                                                                                                |
| Effets parentaux            | Possible*                              | Oui, avec une durée variable ** | Oui et Non ** | Résulte de l'exposition des parents des individus testés             | Non                                                       | F0 (possible) à Fn avec $1 < n < x$ et x inconnu mais pouvant aller jusqu'à plusieurs dizaines **<br><br>F0 (possible), F1 pour les effets liés aux transferts spécifiques soma-à-soma liés à l'exposition directe au contaminant |



**a** Acclimatation physiologique      **b** Plasticité phénotypique individuelle      **c** Plasticité phénotypique trans-générationnelle      **d** Réponses plastiques

\* Cas rapportés où les effets parentaux disparaissent après un ceratin temps mais possible qu'ils soient irréversibles selon le(s) mécanisme(s) biochimique(s) et moléculaire(s) sous-jacent(s).

\*\* Selon le(s) mécanisme(s) biochimique(s) et moléculaire(s) sous-jacent(s).

#### 2.4. Quel(s) mécanisme(s) populationnel(s) d'acquisition de la tolérance dans les milieux :

Il est difficile de savoir si certains des processus par lesquels une population peut être tolérante sont plus ou moins fréquents que d'autres dans le milieu. Cela tient du fait que parmi les nombreuses études rapportant une augmentation de la tolérance aux contaminants au sein de populations naturelles, seulement une faible proportion s'intéresse à la nature de celle-ci, et que la plupart des études ne permettent pas de faire la différence entre adaptation génétique et acclimatation physiologique (Klerks et Weis 1987, Posthuma et van Straalen 1993, Belfiore et Anderson 2001). Les effets parentaux sont quant à eux encore moins étudiés et ne peuvent souvent pas être distingués de l'adaptation génétique non plus. Cela est par exemple illustré dans la revue de Johnston 2011 : sur 29 études mettant en évidence une différence de tolérance entre populations naturelles, seules 14 sont allées jusqu'à évaluer si la différence de tolérance était maintenue dans les générations suivantes produites en conditions non contaminées. Par ailleurs, parmi ces 14 études 11 observent un maintien de la tolérance mais la plupart ne permettent pas de déterminer s'il s'agit d'une adaptation génétique ou d'effets maternels car elles ne testent pas si la tolérance est maintenue au-delà de la F1. La fréquence de la tolérance qui se retrouve pour les générations suivantes rapportée dans cette revue (11/14) est relativement importante, mais Johnston souligne que cela ne signifie pas forcément que la tolérance est transmissible dans la plupart des cas, mais il est probable que cela reflète, ici encore, plutôt la plus grande facilité de publier des résultats significatifs.

Néanmoins, plusieurs auteurs suggèrent que l'adaptation génétique à la contamination serait relativement rare dans le milieu (Klerks 2002, Millward et Klerks 2002 et Woods et Hoffmann 2000). Comme le soulignent Belfiore et Anderson (2001), il y a un manque de données validant l'hypothèse de la base génétique de la tolérance, et plus de tests sur le terrain de l'adaptation génétique aux contaminants aideraient à déterminer si ce phénomène est commun ou non. Par ailleurs le mécanisme populationnel de tolérance mis en place pourrait dépendre du niveau de contamination auquel est soumise la population. Dutilleul et al. (2013) avancent par exemple, en se basant sur des résultats expérimentaux obtenus au laboratoire via l'exposition du nématode *Caenorhabditis elegans* à de l'uranium, qu'à faible concentration

l'acclimatation se mettrait en place, tandis que pour des concentrations plus élevées l'acclimatation ne serait plus suffisante et une adaptation serait nécessaire pour permettre à la population exposée d'éviter l'extinction. Cette hypothèse selon laquelle l'adaptation génétique ne se mettrait en place qu'à partir d'une certaine dose semble assez intuitive. En effet, pour que la sélection d'individus résistants s'opère, le niveau d'exposition doit être suffisamment élevé pour altérer la contribution d'une partie de la population à la génération suivante (*e.g.* mortalité ou reproduction).

### 3. Coûts de la tolérance et modifications de traits d'histoire de vie :

#### 3.1. Coûts de la tolérance :

##### 3.1.1. Définition :

L'augmentation de la tolérance peut être associée à des coûts de fitness, c'est-à-dire à des modifications négatives de traits d'histoire de vie autres que la sensibilité aux contaminants, comme une baisse de la croissance ou de la fécondité pouvant affecter négativement la fitness des individus et le potentiel démographique des populations. Ainsi, certaines populations sont tolérantes au prix d'une baisse de la fitness des individus qui les composent par rapport à des individus provenant de populations non tolérantes. En conditions contaminées la tolérance constitue néanmoins un avantage pour les populations tolérantes par rapport aux populations non tolérantes (malgré ces coûts), puisqu'elle leur permet de se maintenir dans des milieux desquels elles auraient disparues si la tolérance ne s'était pas mise en place (Posthuma et van Straalen 1993, van Straalen et Hoffmann 2000, van Straalen et Timmermans 2002, Klerks 2002, Xie et Klerks 2003, Klerks et al. 2011).

Des coûts de fitness ont été rapportés pour des populations naturelles, comme illustré dans le Tableau I-2 (p. 46-47), mais ne se produisent pas de façon systématique (van Straalen et Timmermans 2002, Klerks 2002, Jansen et al. 2011, Klerks et al. 2011, Ribeiro et Lopes 2013). Une étude sur *Daphnia longispina* n'a par exemple permis de mettre en évidence de coûts associés à une tolérance au cuivre en conditions non contaminées (Lopes et al. 2004). L'existence de coûts de fitness et trade-offs semble dépendre du mode d'action du polluant et du type de mécanismes mis en place par les organismes pour faire face à ces effets toxiques (van Straalen et Hoffmann 2000, Jansen et al. 2011). Par ailleurs, certains auteurs soulignent la difficulté de faire la part entre des modifications de traits liées à des coûts de fitness et des modifications liées à un effet direct du contaminant (Xie et Klerks 2004), voire d'une adaptation à d'autres facteurs environnementaux corrélés à la contamination (par exemple une faible disponibilité des nutriments pour les sols pollués aux métaux) (van Straalen et

Hoffmann 2000), ou à une adaptation à la contamination elle-même (*i.e.* adaptation de l'histoire de vie (*section I.3.2*)).

Certains coûts associés à la tolérance aux contaminants se manifestent lorsque la population tolérante est placée en conditions non contaminées. Ils peuvent se traduire, par exemple, par une augmentation de la mortalité, une baisse de la reproduction, et/ou une baisse de la croissance (Postma et al. 1995a, Postma et al. 1995b, Shirley et Sibly 1999, Agra et al. 2001). Ces phénomènes peuvent par exemple être liés dans le cas de la tolérance aux métaux, à une modification du métabolisme des minéraux se traduisant par une dépendance des organismes tolérants à des concentrations élevées (Posthuma et van Straalen 1993, revue dans van Straalen et Hoffmann 2000). Ainsi, cela peut se traduire dans des milieux non contaminés par une carence en métaux essentiels si en vertu de leur mécanisme de tolérance les individus sont moins efficaces à leur absorption, leur distribution ou leur utilisation (Harper et al. 1997). Cette « hypothèse de dépendance aux métaux » (« metal requirement hypothesis » (Harper et al. 1997) ou « metal deficiency hypothesis » (Agra et al. 2011)) a été proposée pour les plantes (Harper et al. 1997) mais a également été proposées pour l'isopode *Porcellio scaber* (Van Capelleveen 1985 dans Posthuma et van Straalen 1993), le diptère *Drosophila melanogaster* (Shirley et Sibly 1999, *Daphnia longispina* (Agra et al. 2011), mais aussi pour une population de *Chironomus riparius* tolérante au cadmium (Postma et al. 1995b). Concernant ce dernier exemple, les auteurs ont dans un deuxième temps corroboré cette hypothèse en mettant en évidence un déficit en zinc en absence de cadmium chez cette population (Postma et al. 1995a).

Ainsi, les coûts associés à la tolérance à un contaminant peuvent se manifester de différentes manières, schématisées en Figure I-2.

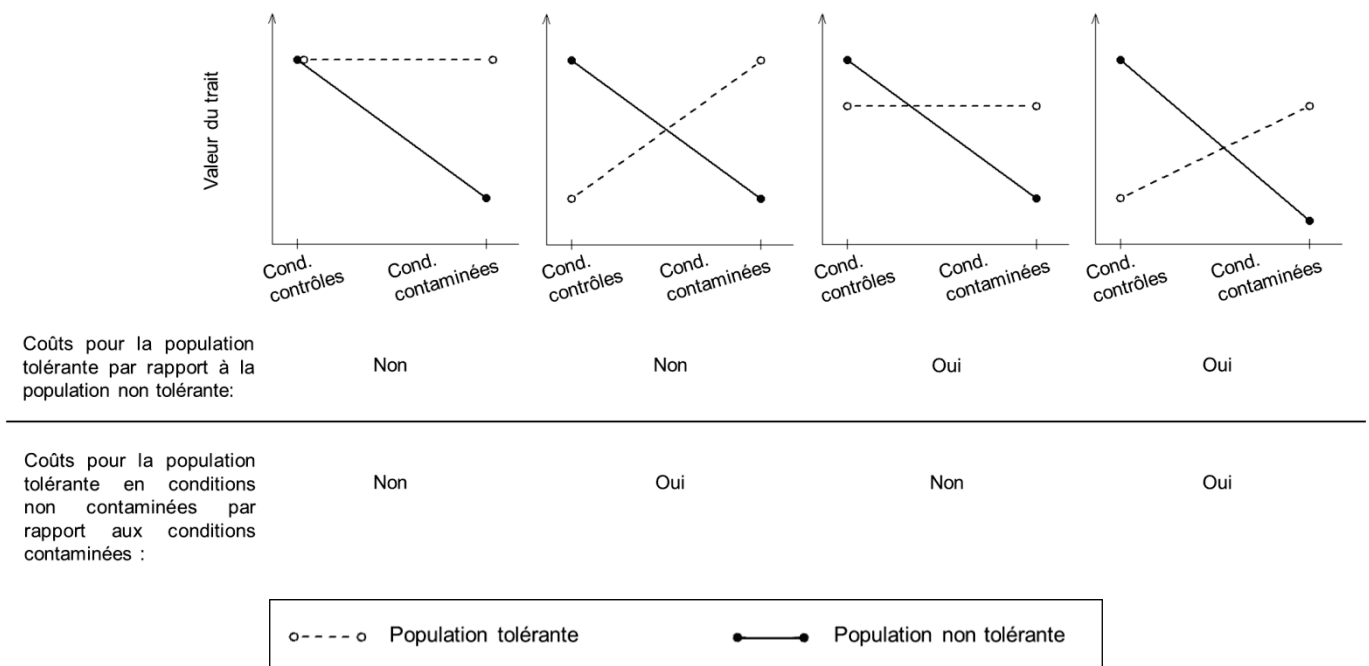


Figure I-2 : Illustration schématique de différents scénarios possibles de manifestation de coûts de la tolérance.

### 3.1.2. Les coûts énergétiques et génétiques comme mécanismes possibles à l'origine des coûts de la tolérance :

Théoriquement les modifications de traits associées à l'acquisition d'une tolérance peuvent résulter de différents processus, incluant des mécanismes physiologiques et génétiques, dont l'existence dépend du mécanisme populationnel d'acquisition de la tolérance toxicologique. Ils sont également qualifiés de coûts.

#### Les coûts énergétiques :

Les modifications de traits d'histoire de vie associées à l'acquisition d'une tolérance peuvent résulter de trade-off énergétique c'est-à-dire d'un compromis dans l'allocation de l'énergie (théorie de l'allocation de l'énergie et de la ressource). Selon cette théorie, l'énergie que requièrent les mécanismes physiologiques et biochimiques individuels de tolérance, (e.g. la production de métallothionéines) ne sera pas allouée à d'autres fonctions comme la croissance ou la reproduction qui peuvent alors être affectées négativement (Posthuma et van Straalen 1993, van Straalen et Hoffmann 2000, van Straalen et Timmermans 2002, Klerks

2002, Xie et Klerks 2004, Lopes et al. 2004). Ces coûts peuvent se produire quel que soit le mécanisme populationnel d'acquisition de la tolérance (adaptation génétique ou réponses plastiques).

D'un point de vue théorique les coûts de fitness associés à la demande énergétique des processus de tolérance sont admis. Néanmoins, les études empiriques tendent à montrer que lorsque des coûts de fitness se produisent, ils sont dans la plupart des cas liés à une pléiotropie (*i.e.* gène déterminant plusieurs traits phénotypiques) négative ou des liens génétiques et non pas à la demande énergétique des mécanismes de détoxication (van Straalen et Hoffmann 2000, Medina et al. 2007).

#### Les coûts génétiques :

Les coûts génétiques se manifestent quant à eux, exclusivement dans le cas d'une tolérance acquise par adaptation génétique et peuvent résulter de deux processus.

Les coûts de fitness peuvent résulter de corrélations génétiques négatives entre la tolérance et d'autres traits (Posthuma et van Straalen 1993). Ainsi, la sélection de la tolérance au sein d'une population peut être corrélée à des changements d'autres traits du fait de la pléiotropie et de liens génétiques (déséquilibre de liaison, épistasie) (van Straalen et Hoffmann 2000, van Straalen et Timmermans 2002, Klerks 2002, Xie et Klerks 2004). La sélection d'un trait peut en effet affecter d'autres traits, par exemple si le taux de recombinaison entre les loci gouvernant ces traits est faible notamment s'ils se trouvent proches l'un de l'autre sur le même chromosome (van Straalen et Timmermans 2002).

Par ailleurs, la sélection d'individus tolérants peut se traduire par une perte de diversité génétique dans les populations exposées (Posthuma et van Straalen 1993, van Straalen et Timmermans 2002, Athrey et al. 2007). Cette érosion génétique des populations tolérantes peut également être considérée comme un coût lié à l'acquisition de la tolérance, car bien qu'elle n'induisse pas directement de modifications de traits (si ce n'est via les processus décrits dans le paragraphe précédent inhérents à la sélection de certains génotypes), et ne constitue pas *stricto sensu* un trade-off ou un coût de fitness, elle peut se traduire par des coûts écologiques comme cela est développé dans la section suivante (van Straalen et Hoffmann 2000).

### 3.1.3. Conséquences populationnelles et écosystémiques possibles des coûts de la tolérance : les coûts écologiques :

La tolérance à un contaminant peut avoir des conséquences indirectes sur la vulnérabilité des populations tolérantes, mais aussi à des niveaux biologiques supérieurs à la population en affectant les relations écologiques entre espèces et le fonctionnement des écosystèmes. Ces conséquences écologiques négatives de la tolérance, développées dans cette partie, peuvent être qualifiées de coûts écologiques.

#### Conséquences populationnelles :

Si la mise en place d'une tolérance au contaminant représente un avantage pour les populations exposées, elle peut néanmoins dans certains cas augmenter la vulnérabilité des populations tolérantes et menacer leur maintien à long terme.

D'une part, une baisse de la variabilité génétique peut rendre les populations moins viables, et plus susceptibles aux effets négatifs d'autres facteurs environnementaux (Dallinger et Höckner 2013), et peut conduire à une diminution du potentiel adaptatif de la population face à des stress futurs (Ribeiro et Lopes 2013, van Straalen et Timmermans 2002, Athrey et al. 2007) du fait d'une perte d'allèles (revu dans Meyer et Di Giulio 2003). Des études, bien qu'elles ne fassent pas le lien avec la diversité génétique, ont montré que des populations tolérantes à un contaminant peuvent avoir une sensibilité accrue à d'autres stress chimiques et environnementaux. Par exemple, pour l'augmentation de la vulnérabilité aux stress chimiques, une population de daphnies (*Daphnia magna*) dont la tolérance au cadmium a été induite au laboratoire, s'est avérée plus sensible au phénol que le groupe contrôle non tolérants au cadmium (Ward et Robinson 2005). D'autres exemples ont été revus par Weis (2002). Pour l'augmentation de la vulnérabilité aux stress environnementaux, Xie et Klerks (2003) ont montré que des poissons (*Heterandria formosa*) tolérants au cadmium à la suite d'une exposition multigénérationnelle au laboratoire, étaient plus sensibles à un stress thermique. De même, la tolérance aux insecticides peut induire une augmentation de la susceptibilité aux parasites (Salice et al. 2010, Jansen et al. 2011), et la tolérance à des sédiments contaminés à une sensibilité accrue à l'hypoxie chez le poisson *Fundulus heteroclitus* (Meyer et Di Giulio

2003). Ces types de trade-offs se manifestant lorsqu'un nouveau stress est introduit peuvent être désignés sous le terme de « coûts latents » comme proposé par Salice et al. (2010).

D'autre part, le maintien à long terme des populations tolérantes peut être remis en cause par les changements de traits de vies associés dans certains cas à la tolérance, puisqu'ils peuvent en affectant la dynamique de populations, affecter le taux d'accroissement de la population, et augmenter leur vulnérabilité (Tanaka et Tatsuta 2013).

Enfin, la modification de certains traits peut modifier les interactions de ces populations avec les autres espèces de la communauté (notion d'effets écologiques indirects (Fleeger et al. 2003, Chapman 2004)) et augmenter leur risque d'extinction. Par exemple, chez *Daphnia magna*, Ward et Robinson (2005) ont observé une diminution de la taille moyenne dans une population tolérante au cadmium. Ils ont suggéré qu'elle pourrait se traduire par une baisse de la vitesse de nage, et donc une baisse de la capacité à échapper aux prédateurs.

#### Conséquences écosystémiques :

En plus des effets négatifs directs sur la fitness et la vulnérabilité des populations tolérantes, des impacts écosystémiques indirects peuvent également se produire en lien avec la tolérance acquise par une population présente (Fleeger et al. 2003, Chapman 2004).

Les modifications de traits potentiellement associées à la tolérance à la contamination peuvent d'une part avoir des effets à l'échelle de la communauté. Elles peuvent avoir des conséquences pour la population tolérante elle-même, comme expliqué dans le paragraphe précédent, mais également pour les autres espèces avec lesquels ces populations interagissent (Jørgensen et al. 2011). En effet, les traits d'histoire de vie déterminent la dynamique de population, et leurs modifications peuvent avoir des répercussions sur la biomasse et la démographie des populations tolérantes ayant pour conséquence de modifier les relations prédateurs-proies, les relations de compétition ou encore l'abondance relative des espèces (Jørgensen et al. 2007). Par exemple, une baisse de la taille des individus d'une population peut représenter une baisse significative de la ressource alimentaire pour ces prédateurs.

D'autre part la tolérance peut également aller jusqu'à affecter des processus fonctionnels au sein des écosystèmes. De tels effets sont possibles si les modifications de

traits associées à la tolérance touchent des traits fonctionnels effets de la population modifiant ainsi la façon dont elle exploite sa niche écologique et participe au fonctionnement globale de l'écosystème (Medina et al. 2007). Un trait fonctionnel effet pouvant être défini comme un trait ayant un effet sur le fonctionnement de l'écosystème (revu dans Violle et al. 2007).

Ainsi, la tolérance peut avoir des conséquences écologiques à long terme susceptibles de toucher des niveaux d'organisation biologiques élevés. Néanmoins, comme le soulignent Medina et al. (2007), celles-ci ne sont pas explicitement prises en compte dans les procédures d'évaluation du risque écologique.

### 3.2. Modification des traits d'histoire de vie : coûts de la tolérance ou adaptation des histoires de vie ?

Des modifications de traits d'histoire de vie, autre que la sensibilité toxicologique et non liées aux effets toxiques directes des contaminants, peuvent se produire au sein de populations exposées à la contamination. Ces changements peuvent concerner des traits d'histoires de vie comme l'âge ou la taille à la première reproduction, la fertilité, la croissance, la taille des juvéniles ou encore la taille maximum atteintes par les individus. Ces modifications peuvent aller dans le sens d'une augmentation ou d'une précocité tout comme d'une diminution ou d'un retard en fonction des études et ce pour les même traits, comme le montre le Tableau I-2 qui présente des exemples de modifications de traits pour des populations naturelles ou des populations expérimentales exposées pendant plusieurs générations au laboratoire à une contamination métallique.

Ces modifications de traits d'histoires de vie en réponse à une exposition à la contamination ont jusqu'à présent été beaucoup moins étudiées que les modifications de sensibilités toxicologiques et sont couramment interprétées comme étant des coûts associés à l'acquisition d'une tolérance toxicologique au contaminant.

A l'inverse, des auteurs ont suggéré que ces modifications de traits de vies peuvent ne pas être un simple effet collatéral, mais constituer en soi un mécanisme de tolérance contrebalançant les effets négatifs d'une exposition à la contamination sur la démographie des

populations. Ainsi, ces modifications de traits d'histoire de vies peuvent être directement sélectionnées, et constituer une adaptation de l'histoire de vie des populations concernées (life-history adaptation), en accord avec la théorie des histoires de vie (life-history theory) (Stearns 1992, Posthuma et van Straalen 1993, Belfiore et Anderson 2001, Roff 2002). L'adaptation des histoires de vies des populations est bien connue en écologie, et a déjà été vérifiée expérimentalement chez *Daphnia magna* (Edley et Law 1988) ainsi que pour des populations naturelles de guppy (*Poecilia latipinna*) en lien avec la prédation (Reznick et al. 1990), et *in natura* pour diverses espèces de poissons en lien avec la pêche (Jørgensen et al. 2007). La théorie des histoires de vie prédit, entre autre, qu'une baisse de la survie adulte peut sélectionner une maturité plus précoce et une augmentation de l'investissement dans la reproduction (Reznick et al. 1990, Posthuma et van Straalen 1993, Jørgensen et al. 2007). La mise en place de ces modifications de traits prédite par cette théorie est néanmoins conditionnée par la capacité des populations à réaliser ces modifications, en terme de ressource énergétique par exemple, et/ou par la présence nécessaire d'une variabilité génétique ou d'une plasticité des traits impliqués, et d'autant plus dans un environnement pollué, susceptible d'affecter négativement ces deux points (allocation de l'énergie et variabilité génétique). Des exemples d'adaptation de l'histoire de vie de populations ont été rapportés dans des cas de pollutions métalliques pour des populations naturelles de l'isopode terrestre *Porcellio scaber* (Donker et al. 1993a), mais également chez l'isopode d'eau douce *Asellus aquaticus* (Maltby 1991) (Tableau I-2). Maltby distingue alors deux types de réponses populationnelles à la contamination : les réponses « directes » (augmentation de la tolérance au sens baisse de la sensibilité toxicologique) et les réponses indirectes (adaptation de l'histoire de vie), et montre au travers de ces travaux sur *Asellus aquaticus*, que ces deux types de réponses sont possibles au sein de la même espèce. Ces deux réponses à une exposition aux métaux ont aussi été suggérées avec le collembole (*Orchesella cincta*), par la mise en évidence de changement de caractéristiques en lien avec la tolérance et de modification de traits de d'histoire de vie en accord avec les prédictions de la théorie des histoires de vie (Posthuma et al. 1993) (Tableau I-2). Cependant, l'adaptation de l'histoire de vie des populations en réponse à la contamination est relativement peu étudiée. Il est possible

que ce phénomène soit probablement plus répandu que ce qu'il est actuellement connu, comme le soulignait déjà Posthuma et van Straalen en 1993.

Par ailleurs, des changements d'histoires de vie peuvent également conférer une tolérance au contaminant aux populations exposées en minimisant le temps d'exposition au polluant des organismes ou en augmentant les ressources disponibles pour lutter contre les effets toxiques (Woods et Hoffman 2000).

Tableau I-2 : Exemples de modifications de traits d'histoire de vie autres que la sensibilité toxicologique en lien avec une exposition à une contamination métallique chez des espèces animales.

| + (augmentation/retard) -<br>(diminution/avancée) | Espèce                                           | Interprétation                      | Conditions des mesures de traits<br>présence/absence de contaminant | Origine des organismes | Référence                  |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Age / taille /ère reproduction                    |                                                  |                                     |                                                                     |                        |                            |
| -                                                 | <i>Porcellio scaber</i> (isopode terrestre)      | Adaptation histoire de vie          | Laboratoire - absence                                               | Population naturelle   | Donker et al. 1993a        |
| -                                                 | <i>Lumbricus rubellus</i> (oligochète terrestre) | Adaptation histoire de vie possible | Laboratoire - absence                                               | Population naturelle   | Spurgeon et Hopkin 1999    |
| -                                                 | <i>Daphnia magna</i> (crustacé aquatique)        | Coût de fitness                     | Laboratoire - présence                                              | Population naturelle   | Agra et al. 2011           |
| -                                                 | <i>Dendrobaena octaedra</i> (annélide terrestre) | Non précisé                         | Laboratoire - présence et absence                                   | Population naturelle   | Fisker et al. 2011         |
| +                                                 | <i>Heterandria formosa</i> (Poisson)             | Coût de fitness                     | Laboratoire - absence                                               | Laboratoire            | Xie et Klerks 2004         |
| -                                                 | <i>Orchesella cincta</i> (collembole terrestre)  | Adaptation histoire de vie          | Non précisé                                                         | Population naturelle   | Posthuma et al. 1993       |
| Fertilité / fécondité                             |                                                  |                                     |                                                                     |                        |                            |
| -                                                 | <i>Porcellio scaber</i> (isopode terrestre)      | Adaptation histoire de vie          | Laboratoire - absence                                               | Population naturelle   | Donker et al. 1993a        |
| -                                                 | <i>Daphnia magna</i> (crustacé aquatique)        | Coût de fitness                     | Laboratoire - absence                                               | Population naturelle   | Agra et al. 2011           |
| +                                                 | <i>Daphnia magna</i> (crustacé aquatique)        | Coût de fitness                     | Laboratoire - présence                                              | Population naturelle   | Agra et al. 2011           |
| -                                                 | <i>Asellus aquaticus</i> (isopode aquatique)     | Adaptation histoire de vie          | Laboratoire - absence                                               | Population naturelle   | Matby 1991                 |
| +                                                 | <i>Daphnia longispina</i> (crustacé aquatique)   | Coût de fitness                     | Laboratoire - absence                                               | Population naturelle   | Lopes et al. 2004          |
| -                                                 | <i>Heterandria formosa</i> (Poisson)             | Coût de fitness                     | Laboratoire - absence                                               | Laboratoire            | Xie et Klerks 2004         |
| -                                                 | <i>Drosophila melanogaster</i> (diptère)         | Coût de fitness                     | Laboratoire - absence                                               | Laboratoire            | Shriley et Sibly 1999      |
| +                                                 | <i>Drosophila melanogaster</i> (diptère)         | Coût de fitness                     | Laboratoire - présence                                              | Laboratoire            | Shriley et Sibly 1999      |
| -                                                 | <i>Tigriopus japonicus</i> (copépode marin)      | Coût de fitness                     | Non précisé                                                         | Laboratoire            | Kwok et al. 2008           |
| -                                                 | <i>Chironomus riparius</i> (diptère)             | Coût de fitness                     | Laboratoire - absence                                               | Population naturelle   | Postma et al. 1995a; 1995b |
| +                                                 | <i>Dendrobaena octaedra</i> (annélide terrestre) | Non précisé                         | Laboratoire - présence et absence                                   | Population naturelle   | Fisker et al. 2011         |
| +                                                 | <i>Orchesella cincta</i> (collembole terrestre)  | Adaptation histoire de vie          | Non précisé                                                         | Population naturelle   | Posthuma et al. 1993       |
| Taux de croissance/ temps développement           |                                                  |                                     |                                                                     |                        |                            |
| +                                                 | <i>Lumbricus rubellus</i> (oligochète terrestre) | Adaptation histoire de vie possible | Laboratoire - absence                                               | Population naturelle   | Spurgeon et Hopkin 1999    |
| -                                                 | <i>Daphnia magna</i> (crustacé aquatique)        | Coût de fitness                     | Laboratoire - absence                                               | Population naturelle   | Agra et al. 2011           |
| +                                                 | <i>Daphnia magna</i> (crustacé aquatique)        | Coût de fitness                     | Laboratoire - présence                                              | Population naturelle   | Agra et al. 2011           |
| -                                                 | <i>Chironomus riparius</i> (diptère)             | Coût de fitness                     | Laboratoire - absence                                               | Population naturelle   | Postma et al. 1995a; 1995b |
| +                                                 | <i>Dendrobaena octaedra</i> (annélide terrestre) | Non précisé                         | Laboratoire - présence et absence                                   | Population naturelle   | Fisker et al. 2011         |
| -                                                 | <i>Drosophila melanogaster</i> (diptère)         | Coût de fitness                     | Laboratoire - présence                                              | Laboratoire            | Shriley et Sibly 1999      |
| +                                                 | <i>Tigriopus japonicus</i> (copépode marin)      | Coût de fitness                     | Laboratoire - présence                                              | Laboratoire            | Kwok et al. 2008           |

Tableau I-2 (suite)

| Taille/poids à la naissance ou des juvéniles |   |                                                 |                            |                                   |                      |
|----------------------------------------------|---|-------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|----------------------|
|                                              | + | <i>Asellus aquaticus</i> (Isopode aquatique)    | Adaptation histoire de vie | Laboratoire - absence             | Population naturelle |
|                                              | - | <i>Heterandria formosa</i> (Poisson)            | Coût de fitness            | Laboratoire - absence             | Laboratoire          |
|                                              | - | <i>Drosophila melanogaster</i> (diptère)        | Coût de fitness            | Laboratoire - absence             | Laboratoire          |
|                                              | + | <i>Orchesella cincta</i> (collembole terrestre) | Adaptation histoire de vie | Laboratoire - présence et absence | Population naturelle |
| Taille                                       |   |                                                 |                            |                                   |                      |
|                                              | - | <i>Porcellio scaber</i> (isopode terrestre)     | Coût de fitness            | In situ - présence                | Population naturelle |
|                                              | - | <i>Daphnia magna</i> (crustacé aquatique)       | Coût de fitness            | Laboratoire - absence             | Laboratoire          |
|                                              | + | <i>Daphnia longispina</i> (crustacé aquatique)  | Coût de fitness            | Laboratoire - absence             | Population naturelle |
| Espérance de vie                             |   |                                                 |                            |                                   |                      |
|                                              | - | <i>Heterandria formosa</i> (Poisson)            | Coût de fitness            | Laboratoire - absence             | Laboratoire          |
| Taux d'alimentation                          |   |                                                 |                            |                                   |                      |
|                                              | - | <i>Daphnia magna</i> (crustacé aquatique)       | Coût de fitness            | Laboratoire - absence             | Population naturelle |
|                                              | + | <i>Daphnia magna</i> (crustacé aquatique)       | Coût de fitness            | Laboratoire - présence            | Population naturelle |
| Taux de respiration                          |   |                                                 |                            |                                   |                      |
|                                              | + | <i>Daphnia magna</i> (crustacé aquatique)       | Coût de fitness            | Laboratoire - présence            | Population naturelle |

Laboratoire: expérience de sélection multigénération

#### **4. Méthodes d'étude des réponses populationnelles adaptatives dans les milieux contaminés :**

Comme souligné par Coutellec et Barata (2013), l'étude des réponses évolutives et trans-générationnelles à long terme à la pollution a le plus souvent été limitée à des études expérimentales basées sur les espèces modèles appropriées à l'exposition multi-génération au laboratoire. Il apparaît cependant, que l'un des enjeux actuels de l'étude de ces phénomènes réside dans leur compréhension dans le milieu, dans une démarche d'étude dans des conditions environnementales réalistes plutôt que dans des conditions spécifiques de laboratoire et impliquant des espèces présentant un intérêt écologique (Klerks et al. 2011, Coutellec et Barata 2013).

Alors que la littérature rapporte régulièrement des cas de tolérance aux contaminants dans les populations naturelles, il n'y a actuellement que peu de conclusions sur des patrons généraux de réponse qui peuvent être proposés pour les organismes aquatiques (Johnston 2011). Cette difficulté à mettre en évidence des tendances nettes résulte probablement essentiellement (i) d'un nombre encore insuffisant d'études approfondies allant au-delà du simple constat de l'augmentation de la tolérance et identifiant la nature de celle-ci, et (ii) du fait que la plupart des études, ne permettent pas de conclure, de par leur design expérimental avec en cause un nombre de populations étudiées trop faible et une caractérisation de la contamination insuffisante, mais aussi de par la difficulté méthodologique de distinguer certains mécanismes populationnels d'acquisition de la tolérance. Ces points sont explicités, dans les sections suivantes au cours desquelles nous revenons plus spécifiquement sur l'importance de la prise en compte des facteurs de confusion dans les design expérimentaux visant à étudier la tolérance au contaminant dans le milieu, sur la nécessité d'une caractérisation de l'exposition à la contamination des populations naturelles, et sur deux types de méthodologies permettant d'étudier les processus populationnels d'acquisition d'une tolérance au sein des populations naturelles : les « breeding experiments » et la génétique quantitative.

#### 4.1. Designs expérimentaux et prise en compte des facteurs de confusion dans les approches comparatives :

La sensibilité aux contaminants peut être différente entre populations d'une même espèce du fait d'une acclimatation ou d'une adaptation aux conditions locales, et particulièrement pour des espèces pouvant occuper une large gamme d'habitats (Rözen 2000). Ces différences peuvent notamment être dues à des différences phénotypiques ou d'histoires phylogéographiques, à des facteurs environnementaux comme les caractéristiques biotiques et abiotiques des sites de chaque population, ou encore à la condition physiologique des organismes (Crane 1995, Rözen 2000, Johnston 2011, Berthet et al. 2011, Feckler et al. 2012). Des différences inter-populationnelles de réponses à un stress toxique peuvent donc ne pas uniquement résulter d'une exposition antérieure à un contaminant, mais également d'autres facteurs qui doivent être pris en compte dans les études *in situ* (Belfiore et Anderson 2001). Hors, lorsque peu de populations sont étudiées ces facteurs ne peuvent pas être exclus en tant que facteurs explicatifs des différences de sensibilité observées entre populations (Johnston 2011, Feckler et al. 2012). Il semble que cela soit le cas pour un nombre relativement important d'études rapportant une augmentation de la tolérance pour des populations naturelles exposées à la contamination où généralement une seule population exposée est comparée à une seule population de référence (revue dans Grant 2002, Gall et al. 2013). Dans la revue de Johnston 2011 (présentée en *section I.1.2*), 8 études sur 34 ne testent ainsi des populations que de deux sites. Ainsi, Johnston (2011) suggère que l'étude de la tolérance devrait être basée sur la comparaison de populations chroniquement exposées avec plusieurs populations provenant de sites de référence.

#### 4.2. Importance de la caractérisation de l'exposition à la contamination des populations naturelles :

##### 4.2.1. Rôle de la contamination dans la mise en place d'une tolérance :

L'apparition d'une tolérance à la contamination au sein de populations naturelles dépend fortement des caractéristiques de la contamination et notamment :

##### De la concentration et de la biodisponibilité du contaminant :

L'absence de tolérance peut résulter du fait que la contamination n'est pas ou peu biodisponible, ou la concentration être trop faible pour avoir un effet toxique et induire une réponse biologique au sein des populations exposées (Klerks et Weis 1987, Roesijadi et Fellingham 1987, Klerks et al. 1997). Ce phénomène peut notamment être observé à partir d'expérience de préexposition au laboratoire visant à tester les processus d'acclimatation. Au cours de ces expériences des organismes sont exposés à plusieurs concentrations sub-létales de toxique dans l'objectif de mettre en évidence le potentiel d'acclimatation des organismes testés, mais il est également possible de montrer à partir de ces études que l'augmentation de la tolérance ne se met en place qu'à partir d'une certaine dose. Ainsi, dans une étude de Kwok et al. (2009), il a été montré qu'une préexposition à  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cuivre se traduisait par une augmentation de la tolérance du copépode marin *Tigriopus japonicus* alors qu'une préexposition à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  non. Roesijadi et Fellingham (1987) ont trouvé des résultats similaires chez une moule marine (*Mytilus edulis*) : augmentation de la tolérance au mercure après une préexposition à 10 et  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cadmium et à  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  de zinc, mais pas après une préexposition à  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cadmium et à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  de zinc.

Par ailleurs, la concentration ne doit pas non plus être trop élevée, car elle peut alors excéder le seuil des capacités de tolérance des organismes exposés, et dans ce cas induire des effets toxiques « classiques » connus liés aux contaminations aiguës, avec des conséquences pouvant être létales au cours de la phase de préexposition (Roesijadi et Fellingham 1987, Dallinger et Höckner 2013). Par exemple dans une étude de Klerks (1999) sur l'acclimatation du crustacé *Palaemonetes pugio*, il est apparu qu'une préexposition au zinc et au naphthalène

(HAP) au-delà d'une certaine concentration induit une augmentation de la sensibilité au cours d'une exposition ultérieure plus aigüe avec une mortalité importante pendant la phase de préexposition, alors que dans la même étude une préexposition à des doses plus faibles induit une augmentation de la tolérance. Les résultats de l'étude de Roesijadi et Fellingham (1987) vont eux aussi dans ce sens, avec une augmentation de la sensibilité au mercure de moules pré-exposées à  $250 \mu\text{g.L}^{-1}$  de zinc avec des effets toxiques pendant la phase de préexposition. Cette dépendance de l'acclimatation à la concentration de préexposition a aussi été observée au cours d'une étude de Stuhlbacher et Maltby (1992) sur la capacité d'acclimatation de *G. pulex*. Une préexposition au zinc et au cadmium se traduit par une augmentation de la tolérance au cadmium jusqu'à une certaine concentration au-delà de laquelle la préexposition se traduit alors par une augmentation de la sensibilité.

En résumé, la mise en place d'une tolérance, acquise par acclimatation physiologique, dépend de la concentration (et donc de la biodisponibilité) du contaminant (Roesijadi et Fellingham 1987, et revue dans Klerks 1999 et Klerks et al. 1997) comme illustré dans la Figure I-3. La tolérance croît avec l'augmentation du niveau de préexposition (induction des mécanismes biochimiques et moléculaires de tolérance), puis diminue à partir d'une certaine dose (capacité de tolérance maximale atteinte) (Klerks et al. 1997). Il n'y a pas de consensus quant aux effets d'une préexposition à des doses inférieures à celles induisant une augmentation de la tolérance sur la sensibilité au toxique (zone du graphique en pointillés). Il semble qu'une préexposition à des doses inférieures puisse avoir pour effet une augmentation de la sensibilité, se traduisant graphiquement par une légère inflexion de la courbe comme cela a été schématisé par Chapman (1985) (revue) à partir de l'étude de Dixon et Sprague (1981) sur l'acclimatation de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) aux métaux. Néanmoins, cette réponse n'a pas été couramment rapportée, et pour certains auteurs (Roesijadi et Fellingham (1987) dans un schéma), une préexposition à des doses inférieures à celles induisant une augmentation de la tolérance ne se traduit par aucun effet.

Par ailleurs, s'il est connu que l'acclimatation dépend de la concentration de préexposition, le fait ou non que tous les contaminants ont au moins une gamme de concentrations de préexposition pour laquelle l'acclimatation se produit n'est pas clair (Klerks 1999). Cette concentration-dépendance a essentiellement été montrée pour les métaux,

comme l'illustre les exemples cités ici, à l'exception de l'exemple du naphthalène, un HAP, de l'étude de Klerks (1999). Par ailleurs, dans la même étude, aucun phénomène d'acclimation au phénanthrène (HAP) n'a par exemple pu être mis en évidence chez *Palaemonetes pugio* pour quatre concentrations testées.

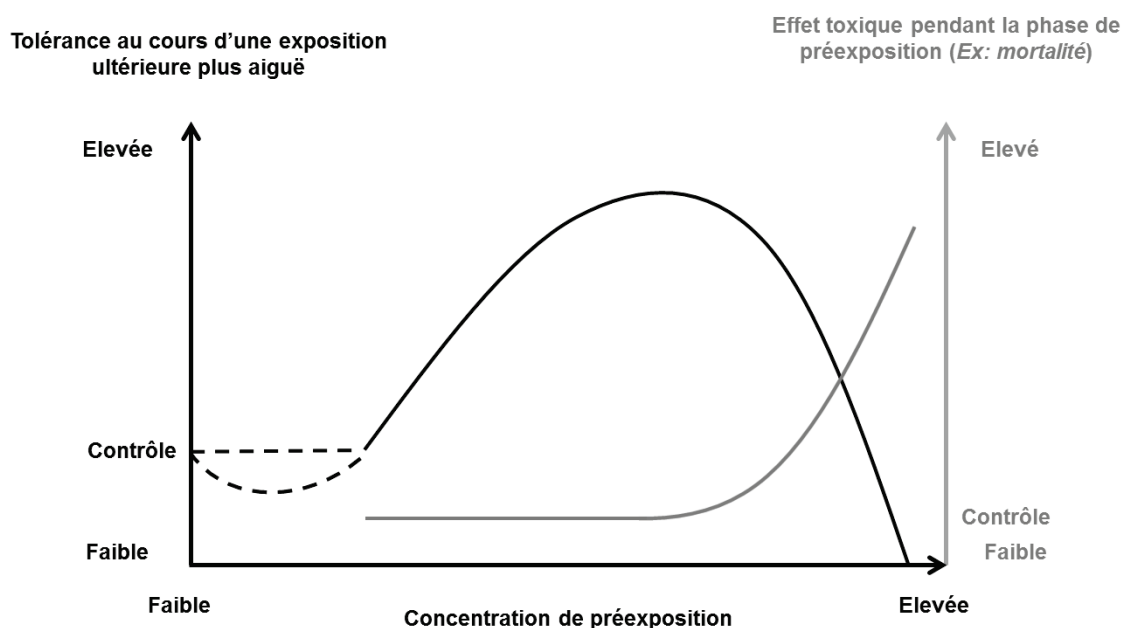


Figure I-3 : Illustration théorique de la concentration-dépendance de l'acclimation aux métaux : effet de différentes concentrations de préexposition sur la tolérance au cours d'une exposition ultérieure plus aiguë et sur la mortalité pendant la préexposition. (Inspirée de Chapman (1985), Roesijadi et Fellingham (1987), et des résultats expérimentaux de Roesijadi et Fellingham (1987), Stuhlbacher et Maltby (1992) et de Klerks (1999).)

Les exemples cités ici et la Figure I-3 concernent des cas où l'augmentation de la tolérance est acquise par acclimation physiologique, mais les autres mécanismes de tolérance (adaptation génétique et effets parentaux) sont également dépendants de la concentration du contaminant, et ceci probablement selon le même schéma, même si les gammes de concentrations concernées peuvent ne pas être les mêmes. En effet, dans le cas des effets parentaux, Plautz et Salice (2013) ont par exemple observé chez *Physa pomilia* qu'une exposition parentale à  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cadmium n'avait pas d'effets sur la sensibilité au cadmium des juvéniles (F1), alors qu'une exposition parentale à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  induisait une augmentation de la tolérance. De la même manière Tsui et Wang (2005) ont observé une augmentation de la

tolérance au mercure de juvéniles de *Daphnia magna* issus de mères exposées à 25 nM mais pas à 2,5 nM. Concernant la mise en place d'une adaptation génétique, celle-ci est aussi conditionnée par le niveau d'exposition au toxique du fait de la dépendance à la concentration de l'expression de la variabilité des sensibilités individuelles (*i.e.* hypothèse de la convergence (Barata et al. 2000)). L'exposition doit ainsi être suffisamment aiguë pour révéler des différences génotypiques de sensibilité et pour que la sélection se mette en place.

#### De la présence de contaminants en mélange :

L'apparition d'une tolérance dépend également de la « complexité » de la contamination (Klerks et al. 1997, Grant 2002). L'acclimatation et la différenciation génétique sont moins probables lorsque plusieurs contaminants sont impliqués (Klerks et al. 1997). Tout d'abord, car dans les deux cas cela implique la présence simultanée d'une tolérance à plusieurs contaminants et à leurs possibles interactions dans la population, voire au sein des mêmes individus, ce qui est peu probable sur la seule base du hasard (Klerks et al. 1997, Klerks 1999). Dans le cas particulier de l'adaptation, l'héritabilité de la tolérance diminue à mesure que le nombre de contaminants augmente (Klerks et Moreau 2001). Cela indique que la sélection naturelle est peu probable pour les populations touchées par un grand nombre de contaminants différents (Klerks et Moreau 2001). De plus, la sélection d'un allèle spécifique pour la tolérance à un contaminant peut être contrebalancée par une sélection à l'encontre de cet allèle par un autre contaminant (Klerks et al. 1997). Par ailleurs, l'absence d'augmentation de tolérance peut résulter du fait qu'un mécanisme de tolérance affecte négativement l'autre, d'une compétition énergétique entre les différents mécanismes de tolérance, ou encore du fait que la tolérance à l'un des contaminants du mélange puisse être éclipsée par les effets négatifs d'un autre toxique du mélange auquel les organismes ne seraient pas tolérants. Ces dernières causes potentielles ont été proposées par Klerks (1999) pour expliquer l'absence d'acclimatation à un mélange de zinc et de naphthalène du crustacé *Palaemonetes pugio* au laboratoire alors que l'acclimatation individuelle à chacun de ces composants était observée. Dans cette étude Klerks conclut notamment que la fréquence de l'acclimatation diminue à mesure que le nombre de contaminants augmente et que l'acclimatation est peu probable dans les environnements multi-contaminés, cas généralement rencontré dans les milieux.

Il est probable que la mise en place d'une tolérance dans le cas de contaminations en mélange dépend également du type de contaminants et notamment de leur mode d'action. Soit les contaminants ont des modes d'action très différents et dans ce cas il est peu probable que la tolérance se mette en place pour les raisons citées au-dessus. Soit les contaminants ont des modes d'action similaires et dans ce cas il est possible qu'un même individu soit tolérant à plusieurs toxiques à la fois (Cf. *section 1.1.1.3* sur la co-tolérance). Cependant, dans ce dernier scénario, se pose la question de la concentration de chacun des composants du mélange notamment du fait de possibles phénomènes d'additivité et de synergie.

Un cas d'augmentation de la tolérance au mercure à la suite d'une exposition à un mélange de trois métaux (Cu, Cd, Zn) a ainsi déjà été constaté (Roesijadi et Fellingham 1987, chez *Mytilus edulis*). Au regard d'un test parallèle de préexposition à ces métaux aux mêmes concentrations mais testés individuellement, les auteurs expliquent que cette réponse d'acclimatation est uniquement liée au cuivre, le cadmium et le zinc étant présents à une concentration trop faible.

#### De l'hétérogénéité de la contamination :

Dans le milieu, la mise en place de la tolérance dépend également de l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la contamination. Si elle est spatialement hétérogène alors il est possible que les organismes évitent les zones les plus contaminées, et de ce fait ne soient pas exposés aux doses induisant des phénomènes de tolérance (Klerks et al. 1997). Par ailleurs l'exposition à la contamination doit être suffisamment prolongée ou répétée pour que les organismes soient exposés et développent une tolérance. Ainsi, si la contamination n'est pas stable dans le temps alors, l'exposition peut-être trop courte pour que la tolérance se mette en place (Klerks 1999). Dans le cas de l'acclimatation, la tolérance peut se mettre en place rapidement : 20h pour *Daphnia magna* (Leblanc 1982), 24h pour *Gammarus pulex* (Stuhlbacher et Maltby 1992), une semaine (Khan et al. 1988) et 14 jours (Klerks 1999) pour le crustacé marin *Palaemonetes pugio*. Il s'agit d'exemples d'acclimatation aux métaux sauf pour l'étude de Klerks (1999) impliquant également le naphthalène. Il semble qu'une exposition courte puisse également induire des effets parentaux puisque dans une étude de Plautz et Salice (2013), de tels effets se manifestent à la suite d'une exposition parentale de 7

jours chez la physa (*Physa pomilia*), ou encore après 4 jours dans une étude de Tsui et Wang (2005) conduite avec *Daphnia magna*. Au contraire, une adaptation génétique peut se mettre en place si la contamination persiste sur des échelles de temps supérieures, dépendant de la durée du cycle de vie des organismes, car elle implique une exposition sur plusieurs générations.

#### 4.2.2. Caractérisation de la contamination des sites d'étude :

Une caractérisation rigoureuse de la contamination et de l'exposition est essentielle pour l'étude de la tolérance de populations naturelles dans le milieu. Il s'agit en effet d'une étape importante car les caractéristiques de la contamination sont susceptibles d'influencer la possibilité même de mise en place d'une tolérance au sein des populations exposées (Cf. section précédente), ainsi que les mécanismes populationnels sous-jacents. Il est notamment important d'évaluer : (i) la nature de la contamination (métallique/organique, mono/multi contaminant(s)), (ii) l'intensité de la contamination en termes de niveau d'exposition, c'est-à-dire la concentration biodisponible, (iii) la dynamique temporelle de la contamination, c'est-à-dire s'il s'agit d'une contamination stable ou par pulses, ainsi que son caractère « historique » ou « récent », et enfin, (iv) la répartition spatiale de la contamination (en particulier dans les sols et sédiments).

Pour un certain nombre d'études cette caractérisation de la contamination repose sur une analyse paysagère (« land use »), ou sur des analyses antérieures réalisées hors des études (rapport gouvernementaux (Boets et al. 2012), publications (Lopes et al. 2004, 2005, 2006 : renvoient à une caractérisation de la contamination métallique dans des publications de 1999 et 2000, Chiodi Boudet et al. 2013 : caractérisation des sites à des dates différentes, en 2008 pour le site impacté et 2010 pour le site de référence, organismes prélevés en 2010 pour l'expérimentation), et ne prennent pas en compte la biodisponibilité des contaminants (mesure de la contamination dans des échantillons d'eau (Munkittrik et Dixon 1988, Lopes et al. 2004, 2005, 2006, Khan et al. 2011, Boets et al. 2012), de sédiment (Klerks et al. 1997, Khan et al.

2011, Chiodi Boudet et al. 2013), ou de sol (Spurgeon et Hopkin 1999a)), ni la dynamique temporelle et spatiale de la contamination.

Ces méthodes qui ne permettent pas de caractériser rigoureusement la contamination et les niveaux d'exposition aboutissent à des résultats souvent discutables. Par exemple Klerks et al. 1997 et Spurgeon et Hopkin 1999a, n'ont pas observé de différences de sensibilité entre populations dites « exposées » à la contamination et populations de référence (respectivement pour la tolérance aux HAP chez le poisson *Gobionellus boleosoma* aux HAP, et au zinc chez l'annélide *Lumbricus rubellus*). Dans ces deux études les auteurs suggèrent que l'absence d'augmentation de la tolérance pourrait être due à une faible biodisponibilité ou à une hétérogénéité spatiale de la contamination étant donné que celle-ci avait été mesurée dans le sédiment pour la première et dans le sol pour la seconde. Par ailleurs, Boets et al. (2012) n'ont pas non plus mis en évidence d'augmentation de la tolérance au cadmium chez des gammaridés provenant de sites *a priori* impactés aux métaux. Cependant, au cours de cette étude, les sites impactés avaient été sélectionnés sur la base de rapports gouvernementaux, mais l'analyse d'échantillons d'eau prélevés au même moment que les organismes utilisés pour les tests, présentaient des niveaux de cadmium inférieurs à la limite de détection. Une variation de la sensibilité au fer, corrélée à une variation du niveau de contamination du site impacté a par ailleurs été observée par Maltby et Crane (1994) pour le crustacé *Gammarus pulex*. Ces exemples illustrent ainsi l'importance de caractériser qualitativement et quantitativement la contamination et les limites d'une caractérisation *a priori* des sites d'intérêts pour l'étude des phénomènes de tolérance dans le milieu.

#### 4.3. Identifier la nature de la tolérance des populations naturelles :

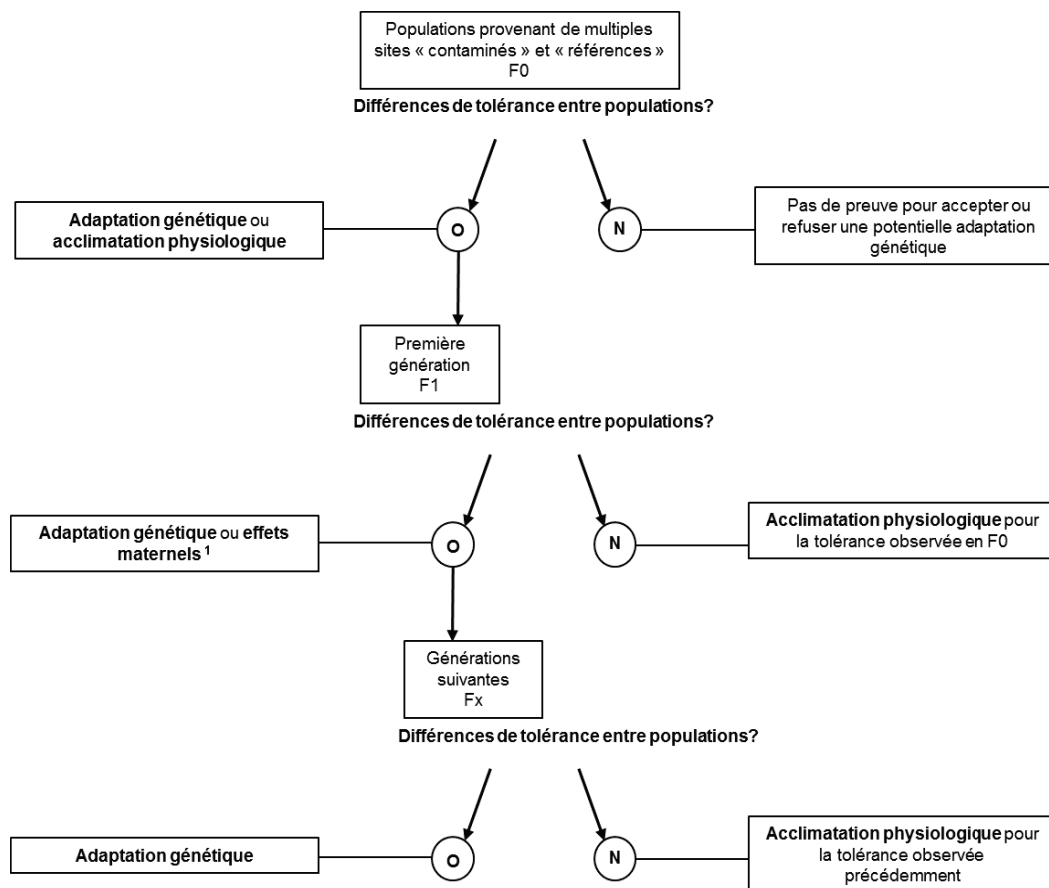
##### 4.3.1. Les « breeding experiments » :

Lorsqu'une population habitant un site contaminé présente une tolérance accrue par rapport à une population témoin, des tests supplémentaires sont nécessaires pour identifier la nature de cette tolérance (Klerks et al. 2011). L'identification de la nature d'une tolérance

observée dans une population naturelle est souvent abordée avec un type d'expérimentation désigné dans la littérature sous le terme « breeding experiments ». Cela consiste à étudier l'évolution de la sensibilité au contaminant chez des descendants de ces populations produits et élevés au laboratoire en conditions non contaminées (Klerks et al. 2011, Klerks et Weis 1987, et revus par Belfiore et Anderson 2001). En fonction du maintien ou non de la tolérance il est alors possible de déterminer la nature de celle-ci comme l'illustre le schéma de Johnston (2011) présenté en Figure I-4. Il s'articule autour de deux grands principes :

(1) Si la tolérance est perdue en F1, alors la tolérance observée précédemment résulte d'une acclimatation physiologique. Ceci est en accord avec l'idée générale qui fait consensus dans la littérature qui veut que, si la tolérance n'est pas basée génétiquement, alors celle-ci peut disparaître rapidement lorsque les organismes sont maintenus dans des conditions non-contaminées (revu dans Meyer et Di Giulio 2003, Lopes 2004 et dans Klerks et al. 2011).

(2) La discussion entre adaptation génétique et effets maternels (*i.e.* effets dû à l'exposition des mères au contaminant) est réalisée en comparant la sensibilité de F2, avec l'hypothèse que des effets maternels peuvent être à l'origine d'une tolérance en F1 mais plus en F2. Cette idée est tacite dans d'autres articles qui préconisent d'étudier la tolérance en F2, ou dans les générations suivantes pour s'affranchir des effets maternels ou pour pouvoir qualifier la tolérance de génétique (Levinton 1980 dans Klerks et Weis 1987, Klerks et Levinton 1989b dans Posthuma et van Straalen 1993, Lam 1999, Belfiore et Anderson 2001, Lopes et al. 2005, Klerks et al. 2011, revu dans Rainbow et Luoma 2011). Ainsi, une tolérance maintenue en F2 et au-delà est donc considérée comme étant génétiquement déterminée. Cela a notamment été appliqué par Brown (1976), Andreasen (1985), Klerks et Levinton (1989), Meyer et Di Giulio (2003), bien que parmi ceux-ci certains relativisent cette conclusion et mentionnent une rémanence possible des effets maternels. D'une manière générale, il est admis que la meilleure preuve que la tolérance à une base génétique est la persistance de celle-ci dans de nombreuses générations suivantes aux générations exposées (Belfiore et Anderson 2001).



<sup>1</sup> Effets maternels définis comme étant des effets dérivés de la réponse de la mère au contaminant (essentiellement une forme d'acclimation physiologique transféré à la première génération). Ils correspondent aux « effets de l'environnement de la mère » définis en partie 3.3.2 de cette synthèse bibliographique.

**Figure I-4 : Processus d'évaluation de la tolérance à la contamination de populations naturelles chroniquement exposées dans le milieu. (Adaptée de Johnston 2011)**

Ces critères de décision peuvent cependant être remis en question, au regard de la connaissance actuelle plus exhaustive des processus populationnels pouvant être à l'origine d'une tolérance au contaminant que celle traditionnellement adoptée en écotoxicologie (synthèse *section I.2* p.50).

(1) Tout d'abord, s'il est vrai qu'une tolérance ne se maintenant pas en F1 résulte d'une acclimation physiologique, cette interprétation peut être précisée. Une tolérance observée en F0 puis perdue en F1 peut en effet résulter de deux mécanismes : flexibilité phénotypique et plasticité développementale.

(2) Par ailleurs, l'idée que des effets maternels (*i.e.* effets dû à l'exposition des mères au contaminant) peuvent être à l'origine d'une tolérance en F1 mais plus en F2 est vrai pour une partie seulement des effets maternels, comme les transferts spécifiques soma-à-soma liés à l'exposition directe des mères au contaminant. D'autres types d'effets maternels peuvent, en

fonction des mécanismes moléculaires impliqués, perdurer sur plusieurs générations au-delà de la F1 (revues de Bonduriansky et Day 2009, de Jablonka et Raz 2009, et de Vandegehuchte et Janssen 2011). Ainsi, une tolérance se maintenant en F2 ne permet pas d'affirmer que celle-ci est d'origine génétique (*i.e.* liée à un allèle ou à un groupe de gènes particulier, à une séquence particulière d'ADN). Enfin, à partir des résultats obtenus avec les simples « breeding experiments » exposés ici il n'est pas possible de conclure spécifiquement quant à l'origine maternelle d'une tolérance. Une tolérance au contaminant transmissible en F1 et pas en F2 peut en effet tout aussi bien être liée à un effet paternel (revue de Ho et Burggren 2010). Il est donc approprié de ne parler que « d'effets parentaux ».

D'autre part si les « breeding experiments » sont des approches très performantes, et constituent des outils robustes pour mettre en évidence la tolérance à un contaminant d'une population naturelle, et identifier la nature de celle-ci, elles s'avèrent toutefois inefficaces pour déterminer la nature d'une tolérance se maintenant au-delà de la F2. Il n'est en effet pas possible de trancher entre les deux mécanismes que sont l'adaptation génétique et les effets parentaux. Cela tient du fait que si la tolérance résulte par exemple de marquages épigénétiques très stables de certains gènes particuliers, alors les effets parentaux peuvent se maintenir sur plusieurs générations et jusqu'à même une durée équivalente à une adaptation génétique, et l'effet de ceux-ci peut être indiscernable de l'effet des allèles d'une séquence d'ADN au niveau de la population comme cela peut être le cas avec les épiallèles (variants méthylés d'ADN) (Johannes et al. 2008).

#### 4.3.2. Les approches de génétique quantitative :

Les approches de génétique quantitative peuvent être utilisées en compléments des « breeding experiments ». Ces approches font intervenir des protocoles de croisements d'individus similaires aux « breeding experiments », mais avec un design et une analyse plus poussés. En étudiant la variabilité d'un trait d'intérêt entre individus avec des relations de parentés et des pedigrees connus (*i.e.* entre parents et enfants (« parent-offspring »), entre frères (« full-sibs »), entre demi-frères (« half-sibs ») etc.), la génétique quantitative permet

notamment de décomposer la variabilité phénotypique de celui-ci et de déterminer les contributions relatives des différentes composantes génétiques et environnementales agissant sur sa variabilité ainsi que de calculer son héritabilité ( $h^2$ ). Elles permettent ainsi de révéler une éventuelle sélection passée et d'étudier le potentiel d'adaptation génétique d'une population pour ce trait (Falconer et Mackay 1996, Lynch et Walsh 1998).

La génétique quantitative constitue un outil pertinent et puissant pour l'étude des processus évolutifs en écotoxicologie et notamment pour l'étude de l'évolution de la tolérance au contaminant (revue de Klerks et al. 2011, Coutellec et Barata 2011). Elle a déjà été appliquée à plusieurs reprises dans ce contexte et sur différentes espèces animales en lien avec une contamination métallique comme par exemple l'oligochète *Limnodrilus hoffmeisteri* (Klerks et Levinton 1993), le crustacé amphipode *G. fossarum* (Chaumot et al. 2009), le crustacé branchiopode *Daphnia magna* (Messiaen et al. 2010, 2012), le collembole *Orchesella cincta* (Posthuma et al. 1993, Roelofs et al. 2006), ou encore les poissons *Cyprinodon variegatus* (Klerks et Moreau 2001) et *Heterandria formosa* (Xie et Klerks 2003), et dans le cas d'une contamination à l'uranium chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Dutilleul et al. 2014, 2015). Plusieurs traits en lien avec la mise en place d'une tolérance au contaminant peuvent être étudiés comme la survie à une exposition (Chaumot et al. 2009, Klerks et Moreau 2001, Klerks et Levinton 1993), mais aussi des caractéristiques physiologiques comme des paramètres liés à la reproduction (Messiaen et al. 2010, 2012), et l'expression des gènes liés à la tolérance (Posthuma et al. 1993, Roelofs et al. 2006). Les approches de génétique quantitative ont ainsi permis de conclure quant à un fort (Klerks et Levinton 1993, Klerks et Moreau 2001) ou un faible potentiel (Chaumot et al. 2009) d'adaptation génétique à une contamination métallique, et d'avancer la compréhension des mécanismes populationnels de tolérance au contaminant.

Toutefois, les approches de génétique quantitative présentent la limite de nécessiter la mise en place de protocoles lourds d'un point de vue expérimental notamment pour obtenir des estimations d'héritabilité précises comme le détaillent Klerks et al. (2011) dans leur revue. Par ailleurs, les résultats obtenus sont spécifiques d'un trait, d'une population et d'un environnement donné ce qui limite la possibilité de généraliser les résultats obtenus à partir d'une seule expérimentation.

## 5. ***Gammarus fossarum* : une espèce modèle en écotoxicologie et d'intérêt pour l'étude des réponses adaptatives à la contamination dans les milieux :**

### 5.1. Description de l'espèce :

#### 5.1.1. Taxonomie et classification :

Le groupe taxonomique des amphipodes regroupe un grand nombre d'espèces. 20% de la diversité totale des amphipodes connue, soit quelques 1870 espèces en 2005, serait représentée par des espèces ou sous espèces dulçaquicoles. La diversité réelle pourrait être encore plus importante (Väinölä et al. 2008). Parmi les amphipodes, les Gammaridea, plus de 4500 espèces, constituent le groupe le plus répandu, ils sont présents au travers d'un éventail d'habitats marins, d'eaux douces et terrestres (revu dans Kunz et al. 2010). Le genre *Gammarus* compte quant à lui plus de 200 espèces (Väinölä et al. 2008) et est probablement le genre d'amphipode avec le plus grand nombre de taxons épigés d'eau douce (Kartamen et Pinkster 1977), dont *Gammarus fossarum*, espèce sur laquelle ont porté l'essentiel de ces travaux de thèse. Sa systématique est la suivante (Martin et Davis 2001, Piscart et Bollache 2012) :

|                 |                                     |
|-----------------|-------------------------------------|
| Embranchement : | Arthropoda                          |
| Super-classe :  | Crustacea                           |
| Classe :        | Malacostraca                        |
| Sous-classe :   | Eumalacostraca                      |
| Super-ordre :   | Peracarida                          |
| Ordre :         | Amphipoda                           |
| Sous-ordre :    | Gammaridea                          |
| Famille :       | Gammaridae                          |
| Gernre :        | <i>Gammarus</i>                     |
| Espèce :        | <i>Gammarus fossarum</i> Koch, 1835 |

Cette espèce peut également être rencontrée sous d'autres noms tels que *Rivulogammarus fossarum*, *Gammarus pulex fossarum*, *Gammarus delebecquei*, *Gammarus pulex danubialis*, *Gammarus cantor*, *Gammarus subterranea*, *Gammarus subterraneus*, ou encore *Gammarus pulex rambouseki* (Goedmakers 1972, Piscart et Bollache 2012, MNHN).

### 5.1.2. Répartition géographique :

*Gammarus fossarum* est une espèce très répandue en Europe. Elle a été retrouvée en France, en Belgique, au Luxembourg, aux Pays-Bas, en Allemagne, en Pologne, en Tchécoslovaquie, en Autriche, en Suisse, en Italie, en Slovénie, en Croatie, en Bosnie, en Serbie, en Hongrie, en Roumanie, en Bulgarie, en Grèce et a déjà aussi été mentionnée sur la péninsule ibérique (Goedmakers 1972, Živić et Marković 2007). Elle serait également présente dans certaines zones en Asie mineure (Karaman et Pinkster 1977).

En France, *G. fossarum* est considérée comme native. La distribution géographique actualisée de l'espèce indique qu'elle est présente sur tout le territoire à l'exception de la Corse, de la Bretagne et d'une partie de la Normandie (Figure I-5 ) (Piscart et Bollache 2012). Il s'agit de l'espèce de gammare la plus répandue en France après *G. pulex* (Piscart et Bollache 2012).

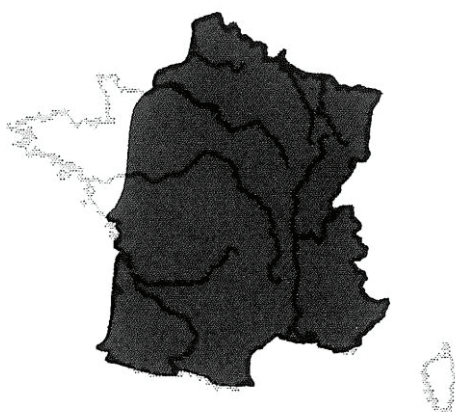


Figure I-5 : Aire de distribution de *Gammarus fossarum* en France en 2011. (Piscart et Bollache 2012)

### 5.1.3. Habitat et rôle fonctionnel dans les écosystèmes :

*G. fossarum* est un amphipode d'eau douce principalement présent dans les parties amont des cours d'eau, dans les petites rivières, ruisseaux de tête de bassin et sources, mais l'espèce peut également être trouvée dans les grands cours d'eau comme le Rhône (Piscart et Bollache 2012, Weiss et al. 2014). *G. fossarum* est décrite comme une espèce rhéophile (Roux et Roux 1967, Pinkster 1978 dans Goedmakers 1981) et sténotherme froide, la température létale ayant été établie à 25,8°C pour une population par Roux et Roux (1967). Les Gammaridae sont néanmoins ubiquistes et peuvent occuper une gamme variée d'habitats (MacNeil et al. 1997, Tachet et al. 2000). Il est possible de les trouver sur la plupart des substrats mais ils sont plus abondants dans les racines, la litière et les galets, et sont rarement retrouvés sur du sable ou de la vase (Piscart et Bollache 2012 à propos des amphipodes mais applicable à *G. fossarum*). La distribution des espèces de gammares est influencée par des facteurs abiotiques tels que la température, la salinité, l'oxygène, l'acidité et la pollution (MacNeil et al. 1997).

Les gammares représentent des espèces clés importantes dans les écosystèmes aquatiques. Leur importance écologique est triple. *Gammarus spp.* sont en effet des espèces localement abondantes pouvant représenter une partie dominante de nombreux assemblages de macroinvertébrés benthiques en termes de biomasse (MacNeil et al. 1997). *Gammarus pulex* peut par exemple représenter plus de 38% de la biomasse totale de macroinvertébrés (MacNeil et al. 1997). Ils jouent un rôle central dans le cycle du matériel détritique en participant au processus de décomposition de la litière. En effet, bien qu'il soit aujourd'hui reconnu que les gammares sont omnivores, ils se nourrissent, au moins en partie, de matériel détritique tel que les feuilles (MacNeil et al. 1997, Tachet et al. 2000, Kelly et al. 2002, Felten et al. 2008). Ils sont d'ailleurs traditionnellement classés au sein du groupe fonctionnel trophique (FFG) des décheteteurs (revue Kelly et al. 2002 et Graça 2001). Ils jouent donc un rôle clef dans l'incorporation du matériel organique terrestre dans les réseaux trophiques d'eau douce et donc dans la redistribution de la matière et de l'énergie dans ces écosystèmes (Maltby et Crane 1994, revu dans Graça et al. 2001). Une relation entre le taux de décomposition des feuilles et la présence de gammares, et plus généralement la présence de

décomposeurs, a d'ailleurs également été rapportée par différents auteurs (Hieber et Gessner 2002, Dangles et al. 2004). Une corrélation entre le taux d'alimentation de *Gammarus pulex* et la décomposition des feuilles a également été montrée (Maltby et al. 2002). Ils constituent également un élément important dans les réseaux trophiques en constituant des proies pour les consommateurs secondaires. Les espèces du genre *Gammarus* sont notamment largement reconnues comme un élément important du régime alimentaire de certains poissons (revu dans MacNeil et al. 1997).

#### 5.1.4. Morphologie générale :

La taille des crustacés amphipodes rencontrés en France (marins et dulçaquicoles) peut être très variable entre espèces et entre populations d'une même espèce. Elle varie généralement entre 6 et 25 mm pour les adultes, mais peut dans certains cas dépasser les 30 mm comme pour le genre *Dikerogammarus* (genre dulçaquicole exotique en France) ou pour l'espèce *Phronima sedentaria* (espèce marine retrouvée sur les côtes françaises) (Piscart et Bollache 2012, Chevreux et Fage 1925). Ces tailles étant mesurées entre la partie antérieure de la tête et l'extrémité du telson.

Le corps des amphipodes est caractérisé par un aplatissement latéral (excepté pour la famille des Corophiidae) (Tachet et al. 2000). Il est divisé en quatre parties (Piscart et Bollache 2012, Chevreux et Fage 1925) :

##### - La tête :

Elle est constituée d'une capsule céphalique (ou céphalon) portant une paire d'yeux (ocelles), deux paires d'antennes (antennes 1 et 2), et les pièces buccales. L'antenne 1 (antenne supérieure ou antennule) et l'antenne 2 (antenne inférieure ou antenne) sont composées de plusieurs éléments présentés de manière détaillée en Figure I-6. Les pièces buccales sont fixées sur la partie inférieure de la capsule céphalique. Elles sont plus ou moins cachées par la première paire de plaques coxales.

- Le mésosome :

Cette partie du corps comprend sept segments, à chacun desquels est soudée une paire de plaques coxales. Chacun des segments porte une paire de pattes, les plaques coxales étant considérées comme en étant le premier article. Les lobes branchiaux et les oostégites (lamelles incubatrices) des femelles sont fixés aux plaques coxales. Les oostégites constituent les contours de la chambre incubatrice, le marsupium (ou poche marsupiale), dans laquelle les œufs fécondés se développent et éclosent. Les pattes des deux premiers segments, les gnathopodes, sont des pattes modifiées pour la nutrition et la reproduction. Les autres segments portent quant à eux des pattes servant à la locomotion, les péréiopodes. Toutes les pattes se composent de sept articles (Figure I-6).

- Le métasome :

Il est composé de trois segments dont les faces latérales sont appelées plaque épimérales. Ces segments portent chacun une paire d'appendices souples biramés, les pléopodes. Leur battement, en créant un courant d'eau, joue un rôle dans la ventilation de la cavité branchiale et du marsupium chez les femelles.

- L'urosome :

Cette division la plus postérieure du corps des amphipodes est composée de 3 segments portants chacun une paire d'uropodes. Un uropode est composé d'un pédoncule et de deux branches : une branche interne (l'endopodite) et une branche externe (l'exopodite). L'urosome des amphipodes se termine par un petit appendice appelé telson. Il est formé de 2 lobes.

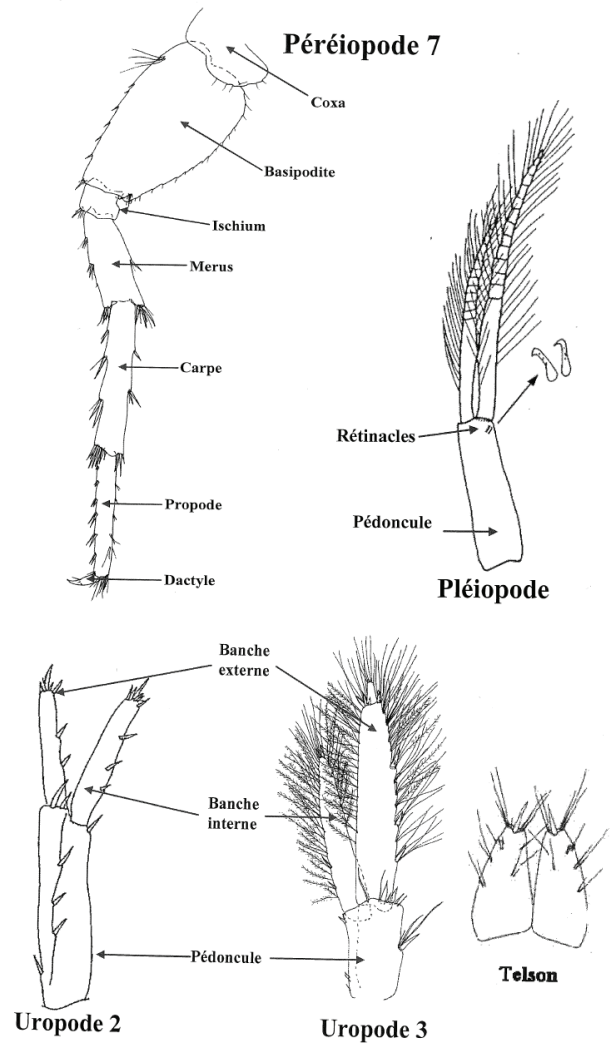
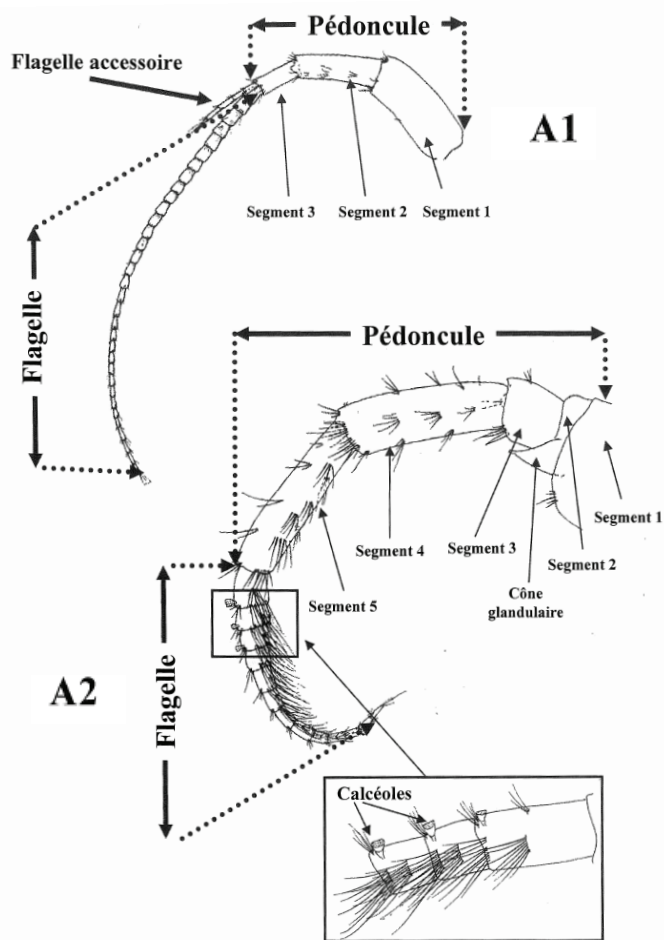
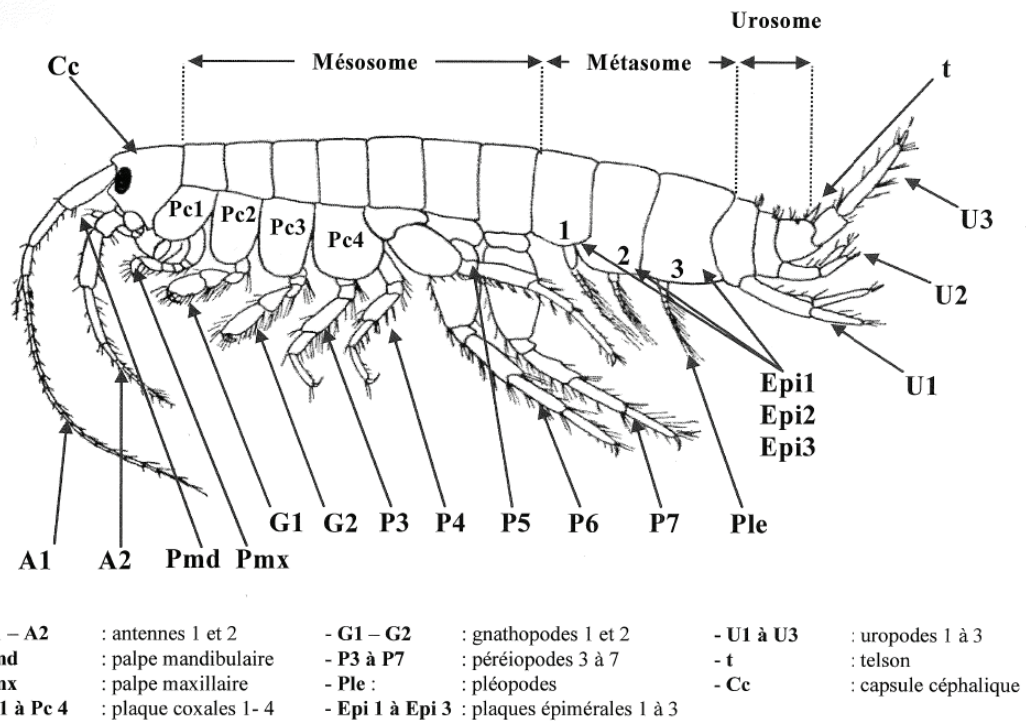


Figure I-6 : Morphologie générale externe d'un amphipode et détails de certaines pièces morphologiques. (Extraits de Piscart et Bollache 2012)

#### 5.1.5. Identification de l'espèce :

*Gammarus fossarum* est une espèce de taille relativement petite dont la longueur maximale observée est de 14 mm (Pinkster 1972). Une clé récente permettant de distinguer les différentes espèces d'amphipodes épigés d'eau douce présentes en France, et celles susceptibles d'arriver dans un futur proche, a été proposée par Piscart et Bollache (2012) à partir d'une revue de la littérature et d'une synthèse d'un ensemble de clés déjà existantes. La clé du genre *Gammarus*, permettant d'identifier l'espèce *Gammarus fossarum* est présentée en Figure I-7. Elle permet également d'identifier *G. wautieri* et *G. orinos*, deux espèces sœurs de *G. fossarum*. Il est recommandé de procéder à l'identification sur des individus mâles matures (Tacher et al. 2000, Piscart et Bollache 2012). Bien qu'il soit possible d'utiliser des individus femelles, les caractères distinctifs sont moins nombreux chez ces dernières, et lorsqu'ils sont présents, ceux-ci sont moins discriminants. D'après cette clé, les espèces du genre *Gammarus* se distinguent des autres genres de la famille :

- par la longueur du propode du gnathopode 2 qui est supérieure ou égale au propode du gnathopode 1,
- par les extrémités des basidopodites des P5 à P7 formant un angle aigu ou droit et les soies U3 ne formant pas de peigne,
- et par la longueur de la branche interne de l'uropode 3 qui dépasse 25% de la branche externe.

Du fait de la grande diversité des espèces au sein du genre *Gammarus*, celles-ci ont été regroupées en groupes d'espèces relativement proches morphologiquement. Ces groupes n'ont aucune validité systématique et écologique. En Europe, on compte trois groupes dans le genre *Gammarus* : le groupe *Gammarus pulex* qui comprend 12 des 13 espèces présentes en France, dont *Gammarus fossarum* ; le groupe *Gammarus roeselii* qui ne comprend qu'une seule espèce en France ; et le groupe *Gammarus balcanicus* dont il n'y a pas, à l'heure actuelle, de représentants connus sur le territoire (Karaman et Pinkster 1977, Piscart et Bollache 2012). Les espèces du groupe *Gammarus pulex* sont entre autres caractérisées par

l'absence de carène dorsale (présente chez le groupe *Gammarus Roeselii*), des péréiopodes 3 et 4 et des urpodes 3 avec de nombreuses soies plus ou moins longues (courtes, peu nombreuses ou absentes chez le groupe *Gammarus balcanicus*) (Pinkster 1972, Karaman et Pinkster 1977, Piscart et Bollache 2012).

L'identification des espèces du groupe *Gammarus pulex*, sur la seule base de critères morphologiques, n'est pas tout à fait robuste. Certains caractères taxonomiques peuvent en effet être très variables dans une population, ainsi qu'entre populations (Karaman et Pinkster 1977) rendant parfois l'identification difficile. Ceci est particulièrement le cas pour *G. fossarum* pour qui il existe une forte variabilité géographique (Goedmakers 1972, revu dans Meyran et al. 1997, Piscart et Bollache 2012). Les caractéristiques morphologiques classiquement utilisés pour distinguer *G. fossarum* de *G. pulex* n'ont par exemple pas permis à Lagrue et al. (2014) une discrimination fiable entre espèces. Il est également difficile de distinguer *G. fossarum* et *G. wautieri* (Karaman et Pinkster 1977).

Par ailleurs, des analyses moléculaires montrent que *G. fossarum* et *G. pulex* constitueraient deux morpho-espèces composées de plusieurs lignées génétiquement très différentes, avec des divergences pouvant être de l'ordre de grandeur de celles observées entre espèces. Ces lignées génétiquement divergentes ne peuvent pas être identifiées par le biais de critères morphologiques, et sont donc qualifiées de lignées cryptiques.

L'existence de lignées génétiquement très divergentes au sein de *G. fossarum* est connue, notamment depuis les travaux de Scheepmaker et al. à la fin des années 80 (revu dans Müller 1998, 2000b et Westram et al. 2011).

## Clé du genre *Gammarus* Fabricius, 1775

1. - Segments du métasome avec des extensions en pointe (Fig. C12) ..... *G. roeselii*  
 - Segments du métasome sans extension (Fig. C20) ..... 2
2. - Branche interne de U3 ≤ ½ L branche externe (Fig. C13a) ..... 3  
 - Branche interne de U3 > ½ L branche externe (Fig. C13b) ..... 7
3. - Présence de soies sur la face antérieure des P5 à P7 plus longues que les épines (Fig. C14a) ..... 4  
 - Soies absentes ou rares et courtes (Fig. C14b) ..... 5
4. - 4 à 6 groupes de soies sur le segment 4 de A2 (Fig. C15a), caléoïles sur le flagelle de A2 ..... *G. orinos*  
 - 3 à 5 groupes de soies sur le segment 4 de A2 (Fig. C15b), pas de caléoïles sur le flagelle de A2, (espèce présente uniquement dans le Var et à l'est du département des bouches du Rhône) ..... *G. stupendus*
5. - Une soie sur le segment 1 du Pmd et les soies-D à l'extrémité distale du segment 3 du Pmd sont plus courtes que les soies proximales (Fig. C16a), présence d'une diagonale sur Epi3 (Fig. C16b) et pas plus d'une soie sur le bord ventral de la plaque Epi2 (espèce connue uniquement dans le bassin de la Meuse et dans les Ardennes belges) ..... *G. caparti*  
 - Au moins deux soies sur le bord ventral de la plaque Epi2 dont une qui est 2x plus longue que l'épine qui la suit ..... 6
6. - Les soies sur les segments 4 et 5 du pédoncule de A2 sont plus longues que la largeur des segments qui les portent et sont régulièrement distribuées avec 4 à 5 groupes de soies sur le segment 4, et 5 à 7 groupes sur le segment 5 (Fig. C17a) ..... *G. fossarum*  
 - La longueur des soies ne dépasse pas ou peu la largeur des segments qui les portent. 4 groupes de soie au maximum sur le segment 4 et 5 sur le segment 5 (Fig. C17b), la longueur des soies sur le flagelle diminue progressivement ..... *G. wautieri*
7. - Yeux réniformes très allongés, 2,5 à 3x plus hauts que larges (Fig. C18a), (espèce uniquement présente à l'extrémité ouest de la Bretagne) ..... *G. duebeni celticus*  
 - Yeux arrondis ou moyennement allongés (1 à 2x plus hauts que larges) (Fig. C18b) ..... 8
8. - A2 et les P5 à P7 avec de longues soies souvent bouclées (Fig. C19a,c) ..... *G. tigrinus*  
 - A2 partiellement poilues et quelques rares soies courtes sur les P5 à P7 (Fig. C19b, d) ..... 9
9. - Epi3 pointues avec un angle postéro-ventral très aigu (Fig. C20a) ..... 10  
 - Angle postéro-ventral des Epi3 plus rectangulaire (Fig. C20b) ..... 11
10. - A1 très longues, 45 à 50 segments sur le flagelle. Nombreuses et longues soies sur le flagelle de A2 formant une brosse chez les mâles (Fig. C21), petites protubérances sur les segments 2 et 3 de l'urosome (Fig. C20a) (espèce uniquement présente dans le Lez à Montpellier) ..... *G. monspeliensis*  
 - A1 nettement plus courtes avec moins de 30 segments sur le flagelle, les soies de A2 sont courtes et ne forment jamais de brosse (Fig. C17b), urosome lisse (Fig. C20b) ..... *G. lacustris*
11. - A2 avec des petites soies sur le pédoncule (longueur soies < largeur du segment), les soies sont réparties en 3 ou 4 groupes pour le segment 4 et en 4-5 groupes sur le segment 5, longues soies sur les segments du flagelle formant une brosse chez les mâles (Fig. C21a) ..... *G. pulex pulex*  
 - A2 avec des soies plus longues sur le pédoncule où les groupes de soies sont également plus nombreux (5 à 7 sur le segment 5), les soies du flagelle forment une brosse moins marquée (Fig. C21b), le flagelle de A2 ne présente pas d'aplatissement dorso-ventral ..... *G. pulex arauensis*  
 - A2 avec des soies courtes (longueur soies < largeur du segment) sur le pédoncule et sur le flagelle, pas de brosse sur le flagelle de A2 (Fig. C21c), mêmes groupes de soies sur le pédoncule de A2 que *G. pulex pulex* (Fig. C17b), présence de très légères élévations sur l'urosome (Fig. C22), individus plus petits que chez les autres sous-espèces de *G. pulex* ..... *G. pulex gallicus*

Figure I-7 : Extraits d'une clé de détermination permettant l'identification morphologique de l'espèce *G. fossarum*. (Piscart et Bollache 2012)

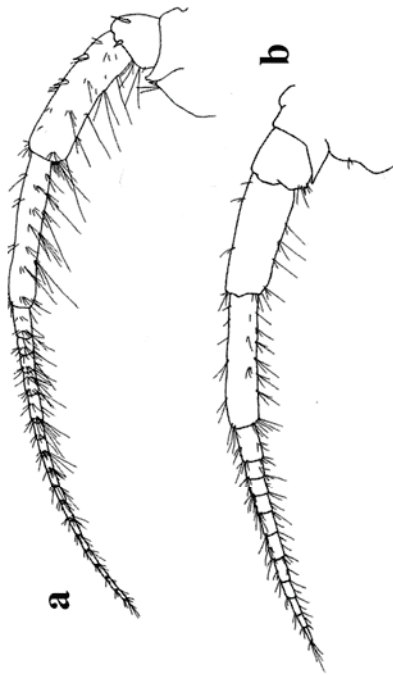


Fig. C12 – Métasome et urosome de *G. roeselii*

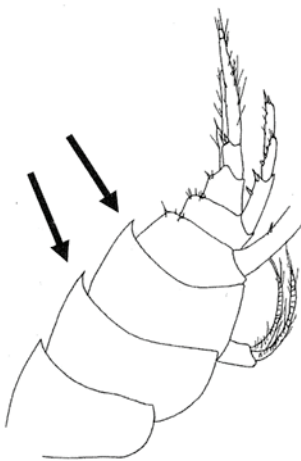


Fig. C13 – U3 de *G. fossarum* (a) et de *G. pulex* (b)

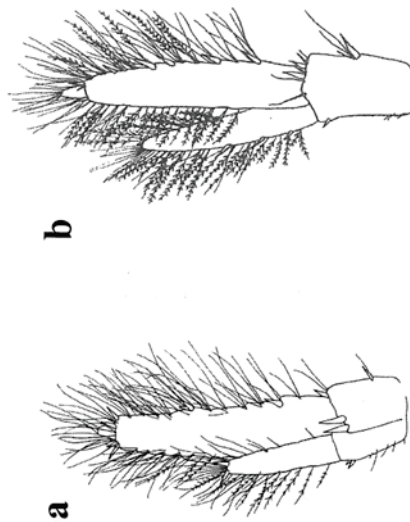


Fig. C14 – P7 de *G. orinos* (a) et de *G. fossarum* (b)

Fig. C17 – A2 de *G. fossarum* (a) et de *G. wautieri* (b)

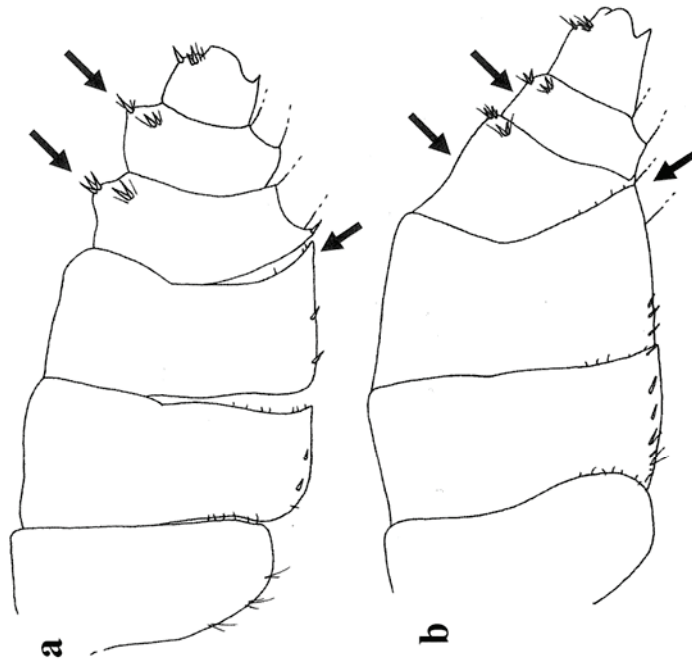


Fig. C20 – Métasomes et urosomes de *G. monspeliensis* (a) et de *G. pulex* (b)

Des études plus récentes ont confirmé l'existence de deux (Müller 1998) puis trois lignées (A, B et C) (Müller 2000, Westram et al. 2011). La diversité au sein de *G. fossarum* pourrait néanmoins être bien plus grande, car des lignées supplémentaires ont été mises en évidence par Weiss et al. (2014). Le grand nombre de lignées mises en évidence dans cette étude dépend certainement de la zone géographique échantillonnée. Dans cette étude la zone échantillonnée est vaste et s'étend de l'Est de la France à l'Est de la Serbie alors que les études de Müller (2000b) et Westram et al. (2011) ont eu lieu dans des zones géographiques beaucoup plus restreintes à l'ouest de l'Europe et plutôt centrées sur la Suisse. Huit lignées (MOTUs : unités taxonomiques moléculaires opérationnelles) différentes au sein de *G. fossarum*, avec une divergence génétique entre lignées pouvant aller jusqu'à 18% (séquence du cytochrome c oxydase sous-unité I (COI)), ont par ailleurs été mises en évidence par Lagrue et al. (2014). Cette étude a pourtant eu lieu dans une zone géographique proche de Müller (2000b) et Westram et al. (2011) mais plus centrée sur la France. Néanmoins, elle ne fait pas de lien avec les lignées A-B-C et ne permet donc pas de savoir si des nouvelles lignées ont été identifiées dans cette étude en Europe de l'Ouest. Cette dernière étude a montré l'existence d'un isolement reproducteur pré-zygotique entre certaines lignées de *G. fossarum* indiquant que certaines peuvent être considérées comme des espèces. *G. fossarum* est ainsi considérée comme un complexe d'espèces cryptiques. Plusieurs lignées cryptiques pouvant être sympatriques (Müller 2000, Westram et al. 2011, Lagrue et al. 2014).

#### 5.1.6. Caractéristiques principales de la reproduction :

*Gammarus fossarum*, est une espèce gonochorique itéropare. Elle peut se reproduire toute l'année. Néanmoins, l'activité de reproduction est plus élevée pendant les saisons chaudes et peut être ralentie voir même dans certains cas stoppée pendant la période automnale (Roux 1970, Pöckl et al. 2003, Coulaud et al. 2014).

La reproduction des gammarus est caractérisée par la formation d'un amplexus précopulatoire (ou précopulat) (Figure I-8). Lorsque la femelle approche de la mue, le mâle se cramponne à elle au moyen du dactyle de ces gnathopodes antérieurs accroché au bord des plaques coxales I de la femelle. Pour l'accouplement, le mâle retourne la femelle sans la

lâcher, et se place en travers de façon à pouvoir féconder les ovocytes dès leur sortie des ovaires (Chevreux et Fage 1925). La fécondation est donc externe et se produit dans la poche marsupiale des femelles. Elle n'est possible que pendant une courte période de 2 à 3 heures après l'ovulation (Sutcliffe 2010).

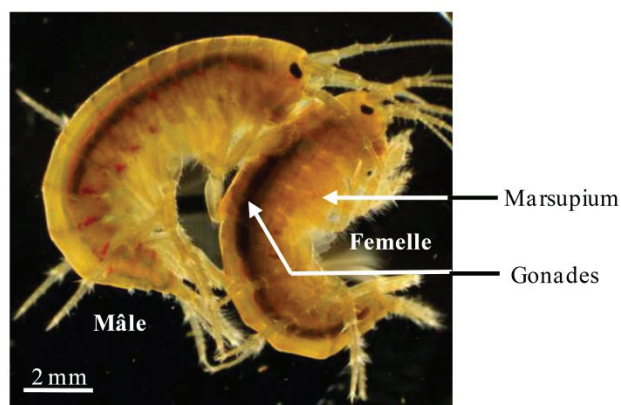


Figure I-8 : *Gammarus fossarum* mâle et femelle en précopulat. (Xuereb 2009 ; photo Laboratoire d'Ecotoxicologie Irstea Lyon-Villeurbanne)

Le cycle de reproduction des femelles (développement des oocytes dans les ovaires et des embryons dans le marsupium) est parfaitement synchronisé avec le cycle de mue. Les cycles de mue et de reproduction de *G. fossarum* ont été précisément caractérisés par Geffard et al. (2010). Le cycle de mue se décompose en 6 stades (A, B, C1, C2, D1, D2) identifiables au microscope en fonction du degré de décollement de la matrice de l'ongle par rapport à la cuticule, ainsi qu'en fonction du degré de formation d'une nouvelle cuticule au niveau du dactyle et du propode des péréiopodes 3 et 4. Le développement des embryons peut quant à lui être décomposé en 5 stades (stades 1 à 5), identifiables à la loupe binoculaire.

Le cycle de reproduction des gammares se déroule de la façon suivante (Figure I-9). La mue (ou exuviation) de la femelle correspond à la transition entre deux cycles de mue et donc de reproduction. Juste après la mue les femelles, en stade A, pondent des ovocytes matures, développés au cours du cycle précédent, dans leur marsupium où ils seront immédiatement fécondés par un mâle. Les embryons alors nouvellement formés y poursuivront l'ensemble de leur développement. Parallèlement un nouveau lot d'ovocytes

entre en développement (vitellogénèse). Peu de temps avant la mue suivante, les juvéniles quittent le marsupium. La femelle alors à la fin d'un cycle, mue, entraînant la ponte des nouveaux ovocytes matures etc., et entre dans un nouveau cycle. Les ovocytes développés au cours d'un cycle  $n$ , correspondent donc aux juvéniles qui se développeront au cycle suivant (juvéniles produits au cours du cycle  $n+1$ ), et des juvéniles se développant au cycle  $n$  résultent de la fécondation d'ovocytes développés au cycle  $n-1$ . La mue est le seul moment du cycle où les mâles peuvent féconder les ovocytes des femelles.

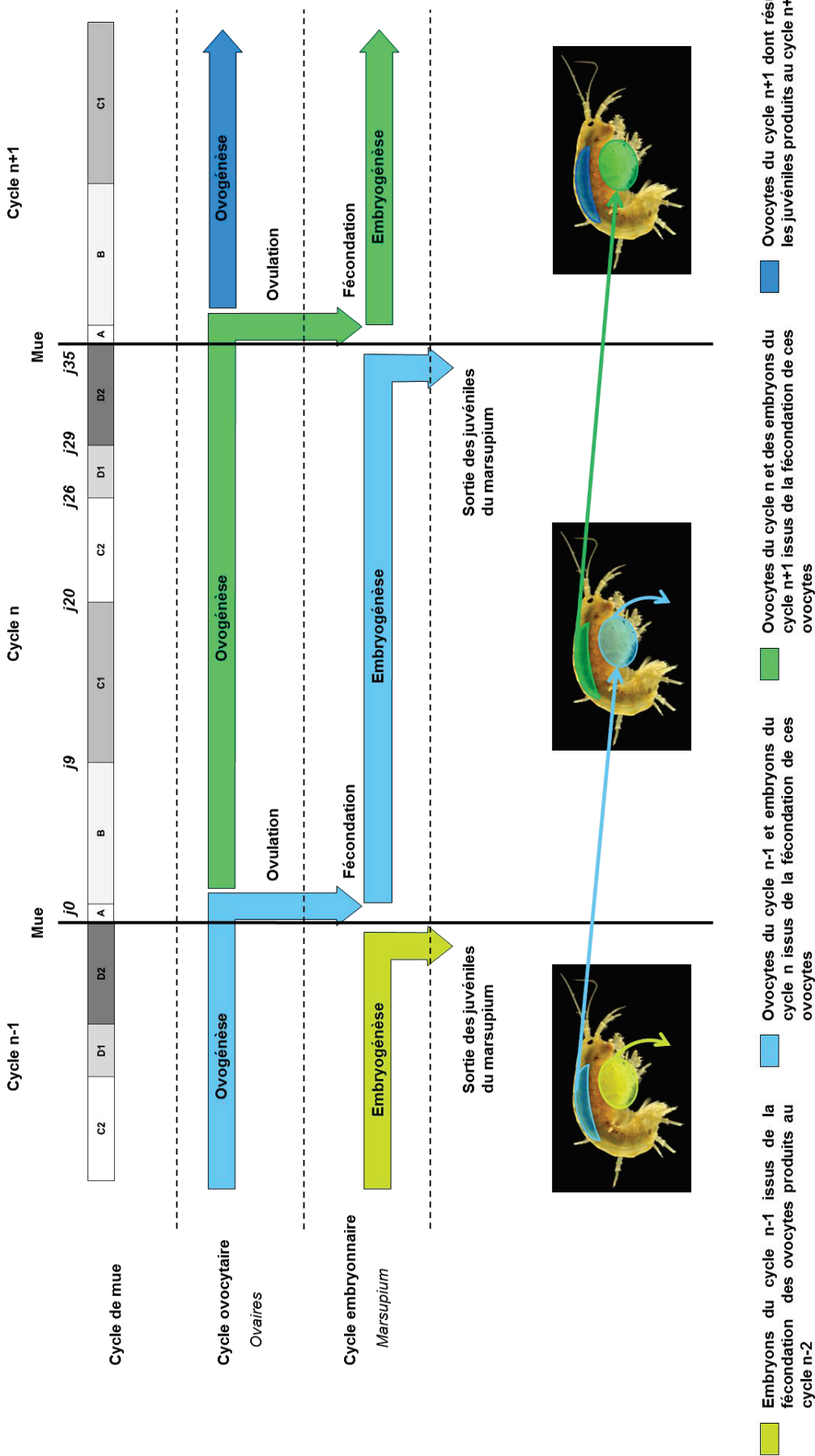
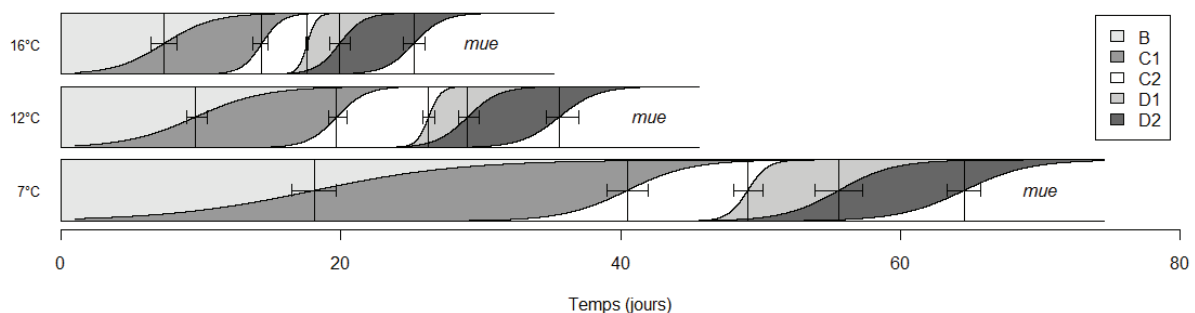


Figure I-9 : Représentation du cycle de reproduction de *G. fossarum* et du synchronisme entre les cycles de mue, ovocytaire et embryonnaire. Les nombres indiqués pour le cycle n correspondent aux durées moyennes cumulées en jours de chaque stade de mue à 12°C décrites par Coulaud (2012).

La fréquence entre deux pontes d'une femelle est contrainte par la fréquence des mues. La durée du cycle de mue, et donc du cycle de reproduction, dépend de la température. Elle diminue quand la température augmente (Figure I-10). A 12°C la durée de cycle de mue est d'environ 35 jours pour *G. fossarum* (Geffard et al. 2010). La fertilité (nombre d'ovocytes) et la fécondité (nombre d'embryons) de *G. fossarum* dépendent de la taille de la femelle mais ne dépendent pas de facteurs environnementaux comme la température et la conductivité (Pöckl 1993, Coulaud 2012). Pour un échantillon de 15 femelles de *G. fossarum* d'une taille médiane de 8.3 mm, le nombre d'embryons à la fin du cycle de reproduction (D1), est en moyenne de  $11,5 (\pm 3,2)$  embryons (Geffard et al. 2010).

Le cycle de reproduction des mâles, où spermatogenèse, n'est pas connecté directement au cycle de mue et est beaucoup plus court que celui de la femelle. Sept jours après l'accouplement sont suffisants pour que le stock de spermatozoïdes maximal soit restauré (Lacaze 2011).



**Figure I-10 :** Durée (jours) des différents stades du cycle de mue de *G. fossarum* pour les trois températures : 7,0 (±0,05) °C ; 12,1 (±0,01) °C et 16,4 (±0,3) °C du début du cycle jusqu'à la mue estimées avec un modèle par stade et par température. (Coulaud 2012)

## 5.2. Utilisation des gammares en écotoxicologie :

### 5.2.1. De bons modèles biologiques pour l'écotoxicologie :

Les gammares sont largement utilisés comme espèces modèles en écotoxicologie, en particulier des espèces comme *G. pulex* et *G. fossarum*, comme le montre la revue de Kunz et al. (2010) résumant le grand nombre d'études menées avec *Gammarus spp.* Ces espèces sont en effet pertinentes d'un point de vue écologique (Cf. section I.5.1.3) et présentent de surcroît de nombreux avantages d'ordres techniques ainsi que des caractéristiques biologiques intéressantes. Elles présentent en effet les avantages : (i) d'être largement distribuées, d'être généralement présentes toute l'année, et de pouvoir l'être en forte densité (800 individus par m<sup>2</sup> rapporté dans une population naturelle de *G. fossarum* (Coulaud et al. 2014)) ; (ii) de pouvoir être prélevées (Goedmakers 1981), maintenues au laboratoire, manipulées et même transplantées relativement facilement ; (iii) de présenter un dimorphisme sexuel permettant l'identification sexuel des individus ; (iv) d'avoir un cycle de reproduction relativement court ; (v) de passer l'ensemble de leur vie dans l'eau (Goedmakers 1981) ; (vi) d'avoir un cycle de vie relativement long (1 à 2 ans) (Tachet et al. 2000, Gerhardt 2011) conférant la particularité aux individus autochtones d'être intégratifs des flux de contaminants (Charron 2014) ; et enfin (vii) d'être sensibles à une large gamme de contaminants.

Ainsi, ces espèces sont utilisées dans les études écotoxicologiques tant au laboratoire que sur le terrain, et dans de multiples scénarios d'exposition différents, pour évaluer la toxicité de sédiments, d'eau, d'effluents etc. (revue de Kunz et al. 2010).

### 5.2.2. De nombreux outils disponibles pour l'évaluation de la toxicité :

De nombreux biomarqueurs et bioessais utilisant des gammares sont disponibles pour évaluer la présence de contaminants dans les milieux aquatiques et tester leur impact notamment chez *G. fossarum* et *G. pulex*.

(1) Au niveau subindividuel avec par exemple la mesure de l'osmolarité de l'hémolymphe et de l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) (enzyme impliquée dans l'osmorégulation) (Felten et al. 2008, Issartel et al. 2010), la mesure de protéines de stress de la famille des « heat shock protein » (Schill et al. 2003, Schirling et al. 2006), ou des analyses histologiques (*e.g.* histologie des oocytes (Schirling et al. 2006)),

(2) au niveau individuel avec la mesure du taux d'alimentation (Maltby et al. 2002, Coulaud et al. 2011), la locomotion et la ventilation (Felten et al. 2008), mais aussi de certains traits d'histoire de vie liés à la dynamique de population bien caractérisés comme la reproduction (Geffard et al. 2010),

(3) et jusqu'au niveau populationnel via la modélisation (Baird et al. 2007, Coulaud et al. 2014, 2015).

Par ailleurs certains biomarqueurs sont spécifiques d'un mode d'action particulier comme la neurotoxicité (Xuereb et al. 2009), la génotoxicité (Lacaze et al. 2011a), ou une perturbation endocrinienne (Simon et al. 2010), tandis que d'autres sont utilisés pour évaluer l'état physiologique global des organismes comme le sont les mesures de l'activité des enzymes digestives et des réserves énergétiques (Dedourge-Geffard et al. 2009, 2013, Charron et al. 2013).

### 5.2.3. Des espèces sentinelles pour la biosurveillance des milieux :

Les gammarès, et en particulier *G. fossarum*, sont employés pour diagnostiquer la contamination des milieux. Leur utilisation en tant qu'espèce sentinelle est déjà réalisée dans certaines études et est fortement recommandée (Fialkowski et al. 2003, Kunz et al. 2010, Gerhardt 2011, Besse et al. 2013, Coulaud et al. 2014, Geffard 2014). Ils constituent notamment de bons candidats pour mettre en place des systèmes de bio-surveillance active de la qualité des milieux (Coulaud et al. 2014). Des liens entre les réponses biologiques entre différents niveaux ont déjà été faits, notamment entre inhibition du taux d'alimentation et effets sur la reproduction et la dynamique de population (Coulaud et al. 2015), inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme impliquée dans la neurotransmission, et

changements comportementaux (taux d'alimentation et locomotion) (Xuereb et al. 2009), ou encore entre dommages à l'ADN et fécondité (Lacaze et al. 2011b). De plus, des modèles de dynamique de populations ont déjà été développés (Coulaud et al. 2014). Ces liens ainsi que les modèles de dynamique de population permettent notamment de pouvoir prédire des éventuels impacts populationnel d'effet mesurés au niveau sub-individuel et individuel. Enfin, l'encagement de *G. fossarum* constitue un outil robuste pour mesurer la contamination biodisponible (métaux et substances organiques hydrophobes) dans les eaux continentales et peut également être utilisé dans l'application d'une stratégie de biomonitoring actif (Besse et al. 2013).

### 5.3. Gammarus et écotoxicologie évolutive :

*Gammarus fossarum*, et espèces proches comme *Gammarus pulex*, sont des espèces permettant d'étudier les processus évolutifs en réponse à la contamination à l'échelle populationnelle dans le milieu.

(1) Tout d'abord pour les raisons évoquées précédemment et qui font qu'elles sont déjà utilisées en écotoxicologie (avantages pratiques, nombreux marqueurs biologiques et bioessais disponibles applicables au laboratoire et *in situ* etc. Cf. *section I.5.2.1.*), mais surtout car ces espèces étant autochtones, il est possible d'étudier ces phénomènes évolutifs en réponse à la contamination directement dans le milieu, sur des populations naturelles chroniquement exposées. Les réponses ainsi obtenues sont donc représentatives du milieu, contrairement aux études multi-générationnelles au laboratoire par exemple, répondant ainsi à la nécessité d'intégrer plus d'« éco » dans l'écotoxicologie (Chapman 2002, Breitholtz et al. 2006).

(2) De plus, *G. fossarum* est une espèce avec laquelle il est possible de mettre en œuvre des protocoles de génétique quantitative (Chaumot et al. 2009), approches souvent utilisées pour étudier les processus évolutifs en écotoxicologie (Klerks et al. 2011). Cela tient

(i) aux caractéristiques biologiques de cet organisme (gonochorisme, itéroparité, absence de spermathèque chez les femelles, comportement précopulatoire), et (ii) à une maîtrise de la reproduction de cet organisme au laboratoire du fait de la connaissance du cycle de reproduction de l'espèce permettant d'étudier des individus avec un pedigree connu et une histoire individuelle d'exposition contrôlée. Néanmoins, ces espèces ne sont pas appropriées pour certaines approches couramment utilisées en écotoxicologie évolutive, comme par exemple les expériences de sélection multi-génération au laboratoire, car leur cycle de vie est relativement long (maturité sexuelle atteinte après plusieurs mois).

(3) Enfin car la sensibilité aux métaux est un trait variable chez *Gammarus pulex/fossarum* pouvant être modulé par une exposition. Des différences de sensibilité au zinc entre quatre populations de *G. pulex* habitant des sites de référence ont été observées (Crane 1995). Une variabilité inter-populations de la sensibilité au cadmium (LT<sub>50</sub>, *i.e.* temps létal pour 50% pour des individus testés) chez *G. pulex* a également été observée (Howell 1985). Concernant l'effet d'une exposition aux métaux dans le milieu de populations de *Gammarus pulex/fossarum* sur leur réponse ultérieure à un stress toxique, les résultats diffèrent entre études. Il a en effet été observé que des populations de *Gammarus* (*pulex* et *fossarum*) historiquement exposées aux métaux pouvaient, par rapport à une population contrôle, (i) montrer une tolérance plus importante (Naylor et al. 1990, Roberts 1996 dans Maltby 1999, Khan et al. 2011), (ii) ne pas montrer de différence de sensibilité (Boets et al. 2012), ou encore (iii) montrer une tolérance momentanée (Maltby et Crane 1994).

En parallèle, une base génétique de la sensibilité au cadmium, avec une variabilité intra-population de la sensibilité structurée en famille au sein d'une population de référence de *G. fossarum* a été mise en évidence par Chaumot et al. (2009). Cette étude n'a cependant pas permis de mettre en évidence un fort potentiel d'adaptation génétique de cette population (faible héritabilité). Toutefois ces résultats sont à prendre avec précaution. Premièrement, car comme précisé par l'auteur il est probable qu'ils résultent d'un manque de puissance statistique. Deuxièmement, car ces résultats devraient être généralisés à d'autres populations, une mesure d'héritabilité étant propre à une population.

Par ailleurs une augmentation de la tolérance aux métaux chez les gammarès peut résulter de réponses phénotypiques plastiques (*i.e.* « d'acclimatation ») comme l'indique la tolérance momentanée mise en évidence par Maltby et Crane (1994). La capacité d'acclimatation des gammarès aux métaux a également été expérimentalement démontrée chez *G. pulex* par Stuhlbacher et Maltby (1992) avec le cadmium. Une baisse de la sensibilité à ce métal à la suite d'une préexposition au zinc a aussi été mise en évidence par Howell (1985). De même, une exposition préalable à une dose faible d'aluminium ( $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ ) confère une meilleure survie à *G. pulex* dans un milieu acide contenant de l'aluminium (Ormerod et al. 1987). Cette réponse n'est cependant pas systématique, car à l'inverse, aucun effet protecteur d'une préexposition au zinc ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et à l'aluminium ( $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$  *i.e.* même concentration) sur la toxicité du même milieu acide contenant de l'aluminium n'a été observé dans une étude ultérieure de McCahon et Pascoe (1989).

Ainsi, bien que ces études aient mis en évidence que la sensibilité aux métaux chez *Gammarus pulex/fossarum* peut être variable entre populations, et qu'une exposition peut être à l'origine d'une augmentation de la tolérance, elles ne permettent pas de distinguer une tendance claire ni quant aux effets d'une exposition à long terme à une contamination métallique sur les sensibilités toxicologiques des populations exposées, ni quant à la nature des réponses populationnelles associées (*i.e.* plasticité ou adaptation). Cela tient en partie d'un nombre d'études très restreint, et aux designs ne permettant pas systématiquement de conclure. En effet, dans ces études portant sur des populations naturelles (Naylor et al. 1990, Maltby et Crane 1994, Kahn et al. 2011, et Boets et al. 2012), seulement deux populations sont comparées (une population exposée contre une population témoin), la caractérisation de la contamination est insuffisante (*e.g.* faite dans l'eau et/ou le sédiment), et pour certaines la sensibilité est testée chez des organismes avec un temps de stabulation relativement court, en général stabulés une semaine ou « au moins » une semaine en conditions contrôles après avoir été prélevés *in situ*.

## 6. Objectifs et stratégie expérimentale des travaux :

Les travaux de cette thèse ont eu pour but d'étudier dans le milieu les effets d'une exposition historique à la contamination à l'échelle populationnelle, en particulier l'évolution des sensibilités toxicologiques, les processus populationnels soutenant ces modifications, et leurs implications directes et indirectes pour l'évaluation du risque environnemental afin d'en améliorer la pertinence.

Pour répondre à ces objectifs généraux, il a été choisi d'orienter ces travaux sur une contamination métallique, le cadmium, et sur *G. fossarum*. Ces choix ont été guidés par l'identification fortuite par le laboratoire d'Ecotoxicologie d'Irstea de Lyon-Villeurbanne, d'un cas d'étude potentiel. Il s'agit d'une population naturelle de *G. fossarum* ayant été identifiée comme habitant un site de tête de bassin qui bien que dépourvu de pression anthropique présente un haut niveau de cadmium biodisponible, probablement d'origine géochimique (Besse et al. 2013). A partir de ces observations, il était possible de penser que cette population, qui sera dénommée « Ardi » tout au long de ce manuscrit, est probablement exposée de façon historique au cadmium. Elle est par conséquent apparue comme étant un cas d'étude idéal permettant d'étudier les réponses évolutives liées à une exposition à long terme à la contamination dans le milieu, au sein d'une population naturelle.

Deux types d'approches ont été mises en place au cours de ces travaux, couplant expérimentations au laboratoire et études *in situ* : des approches prédictives (ou *a priori*), consistant à étudier au laboratoire le potentiel d'évolution de la tolérance au cadmium de populations naturelles de référence de *G. fossarum* et les mécanismes populationnels de réponses possibles ; et des approches rétrospectives (ou *a posteriori*), basées sur la comparaison de la population Ardi avec un panel de populations de référence. La volonté de comparer la population Ardi à plusieurs populations de référence répond à la nécessité d'intégrer la variabilité naturelle existant entre populations de gammares, et ainsi prendre en compte l'influence des facteurs autres qu'une exposition à long terme à la contamination pouvant être à l'origine de cette variabilité entre populations (facteurs de confusion). Ainsi, la première étape des travaux a été de sélectionner des populations de référence. La méthodologie mise en place est explicitée au cours du matériel et méthode (chapitre 2).

Les travaux se sont ensuite déroulés en trois étapes :

- 1) L'objectif de la première étape était double : (1) confirmer et caractériser le cas d'étude Ardi, notamment en terme d'exposition des organismes de cette population, et (2) déterminer si cette population exposée à long terme au cadmium présente une augmentation de la tolérance à ce métal, et/ou une modification d'autres traits que la sensibilité toxicologique (taux d'alimentation, traits d'histoire de vie). La persistance et le caractère héritable d'une éventuelle tolérance ont également été testés ici par retour au laboratoire en conditions non contaminées. Cette première phase des travaux est présentée dans le chapitre 3.
- 2) La deuxième étape (*Chapitre IV*) a consisté à étudier les mécanismes populationnels d'acquisition de la tolérance au cadmium chez *G. fossarum*. Cette question a été abordée sous deux angles. Tout d'abord avec l'approche *a priori*, en évaluant les voies possibles d'une augmentation de la tolérance chez des populations de référence avec des protocoles de génétique quantitative et l'estimation de l'héritabilité de la sensibilité au cadmium, ainsi que des expériences de sélection au laboratoire. Et ensuite avec l'approche rétrospective, en identifiant la nature de la tolérance de la population Ardi.
- 3) Afin d'évaluer la divergence de la sensibilité au cadmium de la population Ardi induite par une exposition dans le milieu, la troisième étape de ces travaux (*Chapitre V*) a eu pour but de caractériser et quantifier la variabilité de la sensibilité au cadmium de populations de gammares vivant dans des conditions contrastées d'environnement. L'objectif était d'étendre la gamme de variabilité inter-populationnelle naturelle de la sensibilité au cadmium mise en évidence au cours de l'étape 1, en intégrant des populations habitant des sites avec des conditions environnementales plus contrastées, et en intégrant une autre source de variabilité, la diversité phylogénétique, en élargissant à des populations d'espèces sœurs de *G. fossarum*, et appartenant à différentes lignées cryptiques.

La question des conséquences de ces phénomènes évolutifs pour l'évaluation du risque a été abordée en discussion à partir de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux. Les conséquences directes pour l'ERE ont pu être évaluées à partir de l'analyse de la

divergence de la sensibilité au cadmium de la population Ardi au regard de la variabilité de la sensibilité au cadmium des populations de gammares du complexe *G. fossarum* (*Chapitre III* et *Chapitre V*) avec le calcul de facteurs de tolérance. Les conséquences indirectes pour l'ERE ont quant à elles été abordées avec l'étude de la modification de traits, autres que la sensibilité au cadmium, au sein de la population Ardi. Pour cela il a été choisi d'étudier des traits étant directement reliés à la fitness des individus et pouvant se traduire par des impacts démographiques (traits d'histoire de vie impliqués dans la dynamique de population : croissance etc.), ou pouvant l'influencer indirectement et pouvant se traduire par des conséquences écologiques (taux d'alimentation) (*Chapitre III*).



## CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

L'objectif est ici de présenter les méthodes mises en place lors de ce travail de thèse. Pour répondre aux objectifs de celui-ci, il a notamment fallu sélectionner et caractériser des populations naturelles, prélever, maintenir et produire des organismes avec un historique d'exposition et un pedigree connus, et enfin mesurer la sensibilité et les traits d'histoire de vie (*i.e.* autres que la sensibilité au cadmium) des différentes populations. Ainsi, à l'exception des protocoles de mesure des traits d'histoire de vie, ce chapitre ne détaille pas les protocoles précis de chacune des expérimentations. Ces dernières sont en effet présentées dans les Chapitres III, IV et V, au travers des articles et des notes reprenant les principaux résultats.



## **1. Sélection et caractérisation des populations d'étude :**

### **1.1. Sélection des populations :**

Ce travail de thèse a eu pour point de départ la population Ardi, population exposée au Cd située dans le Beaujolais. L'identification de ce cas d'étude a ainsi structuré ces travaux de thèse et notamment l'approche rétrospective consistant à comparer la sensibilité au cadmium et les traits d'histoire de vie de cette population à la gamme de variabilité naturelle au sein des populations de gammares.

Au total 17 populations du complexe *Gammarus fossarum* ont été sélectionnées pour constituer le panel de populations de référence représentant cette gamme de variabilité à laquelle comparer la population Ardi (Tableau II-1, Figure II-1). La sélection de ces populations s'est basée sur une prospection d'une soixantaine de stations réparties dans le quart sud-est de la France (Bourgogne, Beaujolais, Bresse, Vallée du Rhône, Chartreuse, Bugey, Vercors, Pilat, Cévennes). Les stations prospectées étaient *a priori* non exposées au cadmium (informations issues d'études précédentes, ou *a priori* liés à l'occupation des sols (*i.e.* sites éloignés des villes et des industries)). Cette étape de sélection des sites et des populations s'est ainsi tout d'abord appuyée sur des études de caractérisation de la contamination chimique antérieures et en cours au Laboratoire d'Ecotoxicologie d'Irstea de Lyon-Villeurbanne au moment de ces travaux de thèse (Besse et al. 2012a, Besse et al. 2013, Geffard et al. 2014).

Afin de sélectionner un panel de populations représentatif de l'ensemble des populations de gammares, c'est-à-dire intégrant la variabilité naturelle de populations non liée à l'influence des sources de variabilité autre que la contamination au cadmium (*i.e.* facteurs environnementaux comme la dureté de l'eau, facteurs d'habitat comme la trophie des cours d'eau, facteurs biotiques comme la diversité phylogéographique des peuplements de gammares etc.), nous avons sélectionné des populations habitant des sites couvrant une

grande diversité de rivières. Pour cela nous avons choisi des populations dispersées à une large échelle géographique, dans une grande diversité de systèmes hydrologiques (*i.e.* torrent, ruisseau, grands cours d'eau, rivière de plaine) et une large gamme de conditions physico-chimiques. En outre, les populations choisies présentent une forte densité de gammares indiquant la présence d'une population pérenne. L'identification de l'espèce *Gammarus fossarum* ou *orinos*, pour cette étape de sélection des populations a été réalisée à partir des critères morphologiques à partir de la clé présentée au Chapitre I.

Parmi ces 17 populations on peut distinguer deux lots de populations. Le premier lot est constitué de 5 populations de *G. fossarum* habitant des sites situés en amont des rivières, proches des sources, présentant des habitats préférentiels de *G. fossarum* avec une hauteur d'eau relativement faible, un courant assez fort, et une oxygénation élevée. Ces caractéristiques sont également similaires à celles du site de la population Ardi. Ces 5 sites Rhône-alpins ont été choisis dans des zones sous faible pression anthropique. Le deuxième lot de populations, constitué des 12 autres populations, est volontairement plus diversifié en termes de gamme de variabilité des facteurs environnementaux. Ainsi, à la différence des populations précédentes, celles-ci habitent des sites n'étant pas exclusivement des amonts de petites rivières situés en tête de bassin versant mais également des sites situés plus en aval, et enfin, il ne s'agit pas exclusivement de populations de *G. fossarum* mais aussi d'espèces proches, appartenant aux complexes *G. fossarum*. Les sites de ces populations sont également dispersés à une plus large échelle géographique (de la Bourgogne au sud de Dijon (Côte-d'Or), et jusque dans les Cévennes à l'Est d'Alès (Gard)) (Figure II-1).

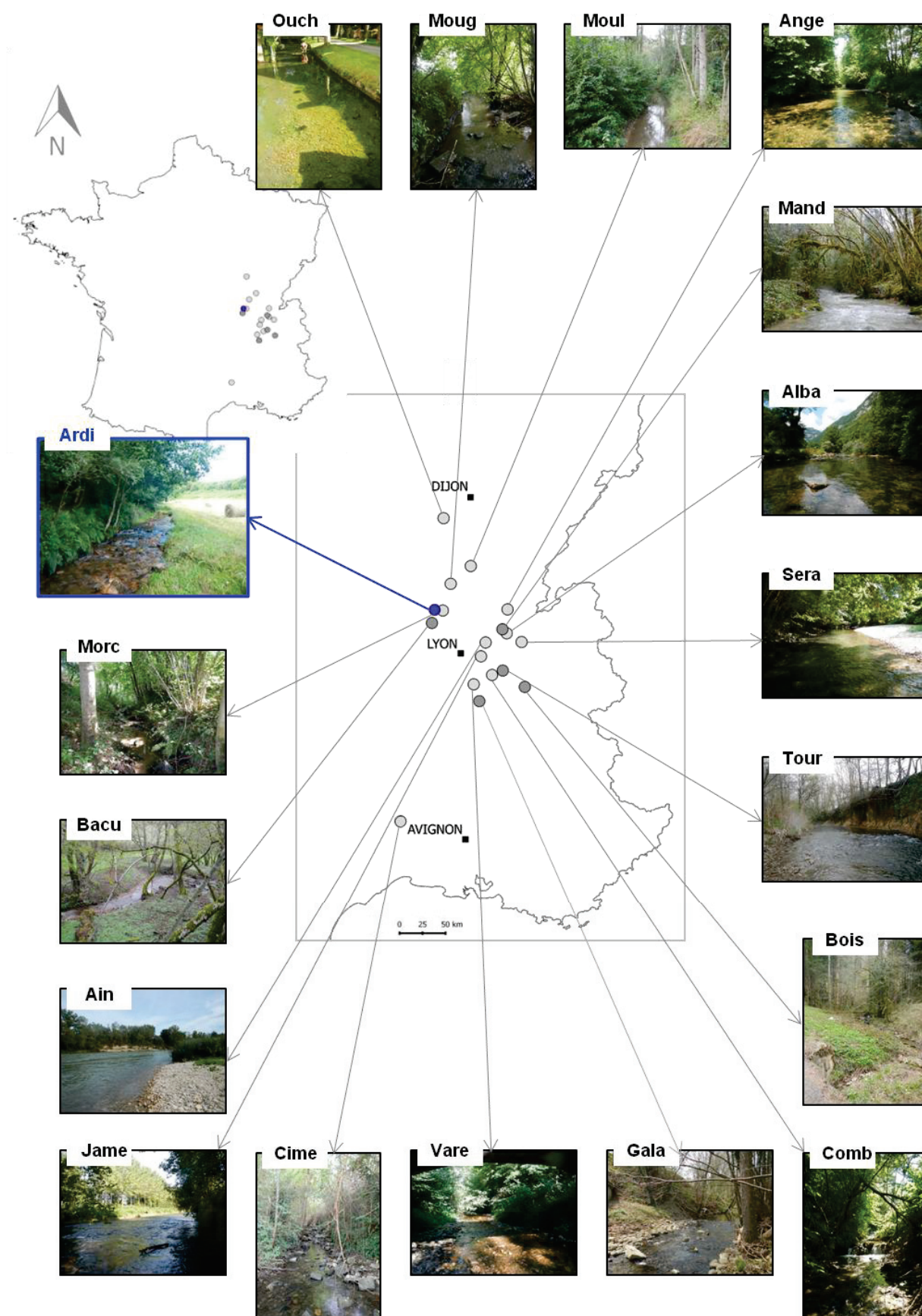


Figure II-1 : Localisation de la population Ardi et des 17 populations de référence étudiées. Les points gris foncés représentent les 5 populations de référence du premier lot, et les points gris clairs les 12 populations de référence du deuxième lot.

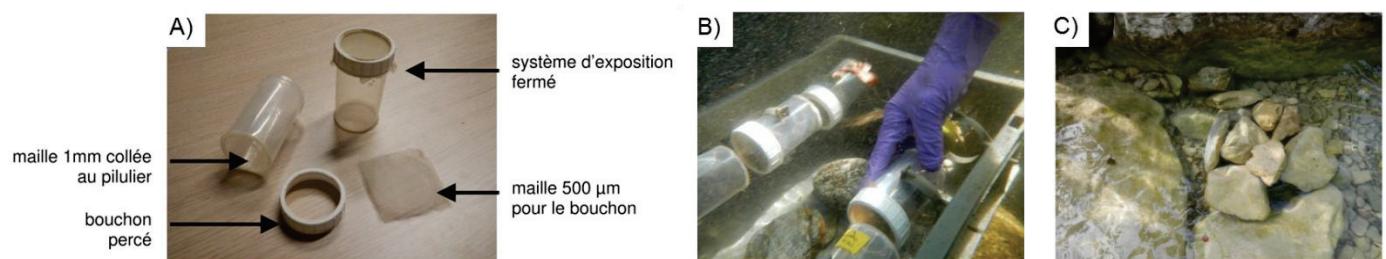
**Tableau II-1 : Présentation de la population Ardi et des 17 populations de référence étudiées.**

| Population                                            | Coordonnées GPS     | Nom du cours d'eau        |
|-------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------|
| Ardi                                                  | 46.186456, 4.520702 | L'Ardière                 |
| <i>1<sup>er</sup> lot de populations de référence</i> |                     |                           |
| Bacu                                                  | 46.057211, 4.479995 | Ruisseau de Pramenoux     |
| Bois                                                  | 45.401026, 5.76014  | Ruisseau de Courbière     |
| Gala                                                  | 45.274071, 5.118899 | Galaveyzon                |
| Mand                                                  | 45.977117, 5.473423 | Mandorne                  |
| Tour                                                  | 45.569442, 5.459425 | Bourbre                   |
| <i>1<sup>er</sup> lot de populations de référence</i> |                     |                           |
| Ain                                                   | 45.85197, 5.230114  | Ain                       |
| Alba                                                  | 45.936617, 5.53196  | Albarine                  |
| Ange                                                  | 46.171941, 5.554318 | Ange                      |
| Cime                                                  | 44.103084, 3.997259 | Amous                     |
| Comb                                                  | 45.529576, 5.307981 | Ruisseau de Tonnebas      |
| Jame                                                  | 45.716128, 5.159268 | Bourbre                   |
| Morc                                                  | 46.177992, 4.635758 | Morcille                  |
| Moug                                                  | 46.440193, 4.756265 | Mouge                     |
| Moul                                                  | 46.611184, 5.048819 | Ruisseau du Moulin du Roi |
| Ouch                                                  | 47.089797, 4.674801 | Ouche                     |
| Sera                                                  | 45.845468, 5.737588 | Séran                     |
| Vare                                                  | 45.442022, 5.047038 | Varèze                    |

### 1.2. Caractérisation de la contamination métallique biodisponible des sites d'étude (monitoring actif) :

Afin d'avoir une évaluation de l'exposition aux contaminants métalliques des organismes au sein des 17 populations d'étude, une caractérisation de la contamination métallique biodisponible des stations a été réalisée selon un protocole de biomonitoring actif développé au laboratoire d'Ecotoxicologie en collaboration avec le laboratoire de chimie des milieux aquatiques (laboratoire d'Irstea de Lyon-Villeurbanne) (Besse et al. 2012a, 2012b ; Besse et al. 2013 ; Geffard et al. 2014). Ce protocole consiste à transplanter pendant une période contrôlée (méthode d'encagement) dans les sites d'intérêt, des gammares provenant d'une population source et de référence provenant d'un site situé à l'amont de la rivière Bourbe, un affluent du Rhône à la Tour-du-Pin en Isère (38).

Après une période de stabulation au laboratoire, des mâles de *G. fossarum*, de tailles égales sont répartis dans des dispositifs d'encagement cylindrique de 180 mL en polypropylène (5,5 cm de diamètre, 10 cm de hauteur). Ces systèmes sont fermés aux deux extrémités par de la toile à Bluter en nylon (Figure II-2) permettant à l'eau de circuler et une bonne oxygénation de chaque système. Ces systèmes sont ensuite placés dans des caisses en PVC (60 cm de longueur x 40 cm de largeur x 20 cm de hauteur) disposées dans les rivières. Les gammarres encagés sont ainsi exposés dans les sites d'études pendant 7 jours. Les concentrations de contaminants bioaccumulés sont ensuite mesurées dans ces gammarres encagés. Les protocoles de dosages des métaux et l'interprétation des concentrations obtenues sont détaillés dans la publication du Chapitre III. Tout au long du test, les gammarres sont nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulnes (*Alnus glutinosa*).



**Figure II-2 : Illustration de la méthodologie d'encagement. (A) Systèmes d'encagement des gammarres. (B) Fixation des systèmes d'exposition dans les caisses. (C) Caisse disposée dans la rivière, lestée et camouflée. (D'après Besse et al. 2012 a)**

La calibration des organismes encagés pour cette mesure (sexe, taille, alimentation) permet de contrôler l'effet des facteurs biotiques pouvant agir sur les concentrations de contaminants accumulés (taille, masse, croissance, sexe, cycle de reproduction, carence alimentaire), et ainsi de s'affranchir de leur influence dans l'interprétation des résultats. Cette méthode de mesure de la contamination permet ainsi une caractérisation fiable et robuste de la contamination des sites nécessaire à ces travaux en s'appuyant sur une comparaison à des niveaux de concentrations moyens nationaux et à des seuils de contamination établis sur 120 sites distribués au niveau national (Besse et al. 2013). Ainsi elle permet (1) d'obtenir une mesure indicatrice de la contamination biodisponible présente sur un site, cette mesure est d'ailleurs d'autant plus pertinente pour la caractérisation de l'exposition des organismes dans

nos travaux qu'elle est réalisée à partir de *G. fossarum* ; et (2) de comparer de façon fiable les niveaux de contamination entre les différents sites et à différentes dates (avantage lié au biomonitoring actif, et au contrôle des facteurs biotiques).

### 1.3. Caractérisation moléculaire de la diversité phylogénétique des populations (barcoding) :

Etant donné que *G. fossarum* est connue pour être une morpho-espèce composée de plusieurs lignées cryptiques, la diversité phylogénétique des 17 populations étudiées a été analysée et replacée au sein de la diversité phylogénétique connue au sein du genre *Gammarus*. Cette caractérisation génétique des populations a été réalisée en collaboration avec l'équipe Ecologie Evolutive du laboratoire Biogéosciences de l'université de Bourgogne (Dijon). Pour cela, l'ADN de mâles calibrés en taille de chaque population a été extrait (méthode phénol-chloroforme modifiée). Un fragment de 710 paires de bases du gène mitochondrial cytochrome c oxydase sous-unité I (COI) a ensuite été amplifié par PCR avec les amorces définies par Folmer et al. (1994) : LCO11490 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' (forward), et HCO2198 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' (reverse) puis séquencé. Les protocoles détaillés de ces différentes étapes du génotypage (eg le protocole de PCR, de purification de l'ADN etc.) sont disponible dans la publication de Lagrue et al. (2014). Un minimum de 10 individus par population, et jusqu'à 24 individus pour certaines, ont été génotypés, ce qui représente un total de 238 individus.

Il a été choisi, pour chaque population, de ne génotyper que des mâles de taille homogène, correspondant aux organismes utilisés lors des tests d'exposition mis en œuvre pour caractériser la sensibilité au cadmium des différentes populations. L'objectif ici n'était pas de caractériser génétiquement les populations peuplant réellement chaque site. Le protocole du prélèvement des organismes est présenté dans le Chapitre V.

## 2. Organismes utilisés au cours des tests :

### 2.1. Prélèvement et maintien des organismes au laboratoire :

#### 2.1.1. Prélèvement :

Les gammares sont prélevés selon la méthode dite du « kick sampling » (Figure II-3). Cette méthode est classiquement utilisée pour prélever des invertébrés aquatiques dans les rivières. Elle consiste à remuer énergiquement le substrat et à capturer avec un troubleau (maille du filet : 500  $\mu$ m, base rectangulaire : 20 x 25 cm) placé légèrement en aval, la matière et les organismes remis en suspension et emportés par le courant. Dans certains cas, notamment lorsque la lame d'eau et le courant étaient trop faibles, les gammares ont été prélevés selon la même méthode mais en remuant le substrat manuellement et en récupérant les organismes à l'aide d'un surber (maille du filet : 250  $\mu$ m, base rectangulaire : 20 x 25 cm). Le prélèvement est ensuite passé sur une colonne de tamis (Figure II-3) permettant d'enlever les débris grossiers et éventuellement les organismes des espèces non ciblées, ainsi que de séparer les gammares prélevés en classes de tailles homogènes en fonction des mailles de tamis utilisées correspondant aux besoins des expérimentations. Les gammares de classe(s) de taille voulue(s) sont placés dans des seaux en polypropylène (10,7 L) avec de l'eau du site de prélèvement et en densité contrôlée de manière à prévenir des phénomènes d'anoxie. Les seaux, sont ensuite placés dans une glacière contenant des plaques eutectiques pour limiter les variations de température en attendant d'être ramenés au laboratoire.

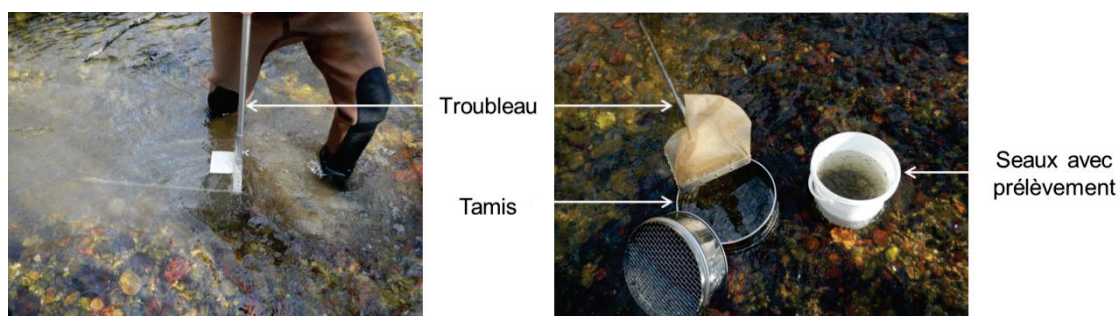


Figure II-3 : Prélèvement des gammares et séparation des classes de taille sur colonne de tamis. (Photos Laboratoire d'Ecotoxicologie Irstea Lyon-Villeurbanne)

### 2.1.2. Conditions générales de stabulation au laboratoire :

De retour au laboratoire, les prélèvements sont triés sur une table lumineuse, pour enlever les débris organiques, le gravier et ne conserver que les gammares. Ils sont ensuite répartis dans des aquariums en polystyrène (20 L) (Figure II-4) ou des seaux en polypropylène (10L) contenant l'eau du site, placés dans un bain-marie thermorégulé. Ces aquariums sont reliés à un système d'alimentation continue en eau (goutte à goutte) et d'une surverse permettant l'évacuation du trop-plein d'eau. L'eau du site est alors progressivement remplacée par cette eau permettant aux gammares de s'acclimater progressivement, et de leur éviter un choc osmotique. L'eau alimentant les aquariums est constituée soit d'un mélange d'eau de forage et d'eau osmosée (conductivité de l'ordre de  $300 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), soit d'eau de forage brute (conductivité de l'ordre de  $500 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Les aquariums sont équipés d'un bullage permettant de maintenir une saturation en oxygène dissous. La photopériode est réglée à 16 heures de jour / 8 heures de nuit. Au laboratoire, les gammares sont nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulnes. En complément, des vers (*Tubifex sp.*) lyophilisés sont distribués ponctuellement. Les conditions de stabulation décrites ici correspondent aux conditions de stabulation standards. En fonction des besoins des expérimentations, la durée et la température de stabulation ont été ajustées.

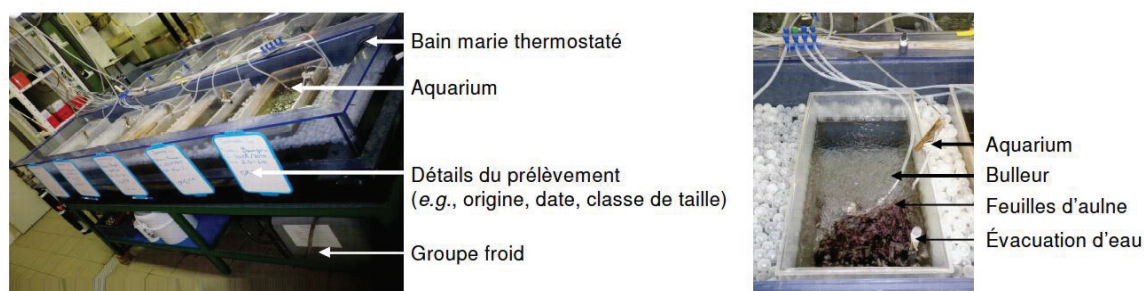


Figure II-4 : Stabulation des gammares au laboratoire (dispositif avec aquarium). (D'après Lacaze 2011)

## 2.2. Production d'organismes tests issus des populations naturelles :

Ces travaux de thèse ont nécessité de pouvoir mesurer la sensibilité au cadmium, et les traits d'histoire de vie d'individus au laboratoire en conditions contrôlées à partir des organismes prélevés dans les populations naturelles. Cela a impliqué de travailler sur des individus ou sur leur descendance après différents temps de stabulation, notamment afin de contrôler l'historique d'exposition au cadmium des organismes testés dans le cas de la population Ardi qui ont pu être exposés ou dont les parents ont pu être exposés au cadmium dans leur milieu d'origine.

Pour les individus récoltés *in situ*, nous avons observé différents temps de stabulation (de quelques jours à plusieurs semaines), dans les conditions standards décrites dans la partie précédente, généralement à une température programmée de 12°C. Les conditions spécifiques de stabulation de chaque lot d'organismes sont renseignées dans le Tableau A-1 en annexe ainsi que dans les publications et notes correspondantes. Il s'agit essentiellement d'individus adultes (excepté pour la mesure du taux de croissance Cf. *section II.4.2*).

Nous avons également travaillé sur des individus produits au laboratoire. Les gammares sont des organismes avec un cycle de vie relativement long, atteignant une maturité sexuelle après plusieurs mois (environ quatre mois pour une température de 12°C). C'est pourquoi, le choix a été fait de ne travailler que sur la première génération d'individus produits au laboratoire (F1), afin d'éviter un biais lié à une sélection des individus tolérants aux conditions de laboratoire. Si l'élevage des gammares n'est pas encore contrôlé, leur stabulation et leur reproduction au laboratoire sont en revanche bien maîtrisées. Ainsi, il a été possible de produire plusieurs cohortes de F1 à partir de mêmes couples reproducteurs. Le cycle de reproduction des gammares étant bien connu, la fréquence de production des différentes cohortes et la durée depuis le prélèvement ont été contrôlées en ajustant la température de stabulation en fonction du stade de reproduction des femelles au moment de leur arrivée au laboratoire (*i.e.* du début de la stabulation). La durée moyenne du cycle de reproduction des femelles est par exemple de 25 jours à 16°C, de 35 jours à 12°C et de 64 jours à 7°C (Coulaud 2012). La durée de la spermatogénèse est quant à elle de 7 jours à 12°C (Lacaze 2011). En outre, la possibilité d'isoler de façon très précise des femelles en fin de

cycle de reproduction (*i.e.* au stade D2) permet de synchroniser le cycle de reproduction des femelles et d'obtenir des lots de femelles muant toutes dans les 48h suivant le tri. L'éloignement vis-à-vis des conditions du milieu d'origine a ainsi pu être contrôlé en termes de nombre de jour de stabulations des parents, ainsi qu'en nombre de cycles de reproduction effectués par les femelles en conditions contrôlées au laboratoire.

L'éloignement vis-à-vis des conditions du milieu d'origine est croissant, à mesure que le nombre de cycles de reproduction réalisés au laboratoire augmente. On peut distinguer trois niveaux pour les individus produits au laboratoire, en fonction du numéro cohorte, et donc du nombre de cycles de reproduction réalisé par les femelles en stabulation, dont ils proviennent (Figure II-5) :

- Gammares issus de la première cohorte née au laboratoire :

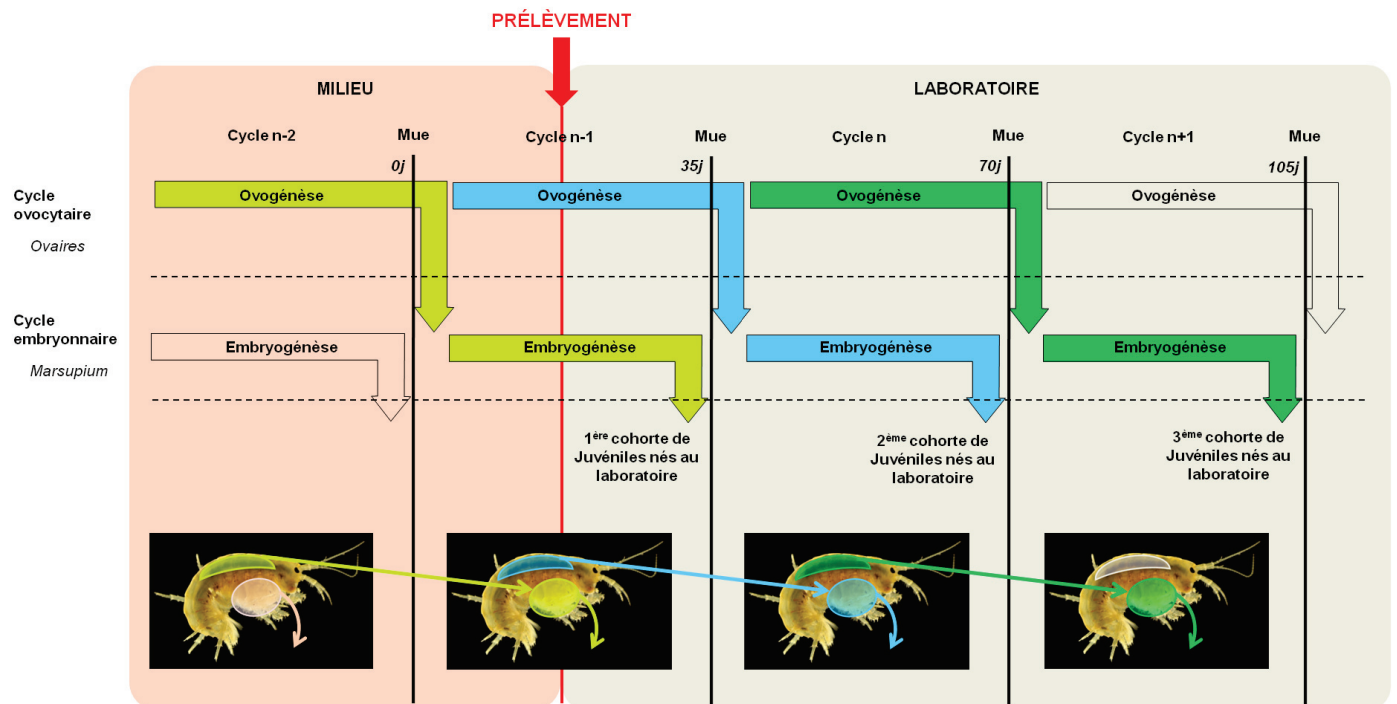
Ces individus, sont présents au stade embryonnaire dans le marsupium des femelles au moment du prélèvement. Ils sont le fruit d'ovocytes dont l'ovogénèse complète s'est déroulée *in situ*, et ont eux-mêmes été soumis aux conditions environnementales de leurs sites d'origine puisqu'ils y ont réalisé une partie de leur développement embryonnaire.

- Gammares issus de la deuxième cohorte née au laboratoire :

Ces individus sont moins influencés par les conditions du site d'origine que ceux de la première cohorte. Ils ont en effet réalisé la totalité de leur développement embryonnaire au laboratoire, et n'ont donc jamais directement expérimenté le milieu en tant qu'individu. En revanche, ils sont issus d'ovocytes dont une partie de l'ovogénèse s'est déroulée *in situ*.

- Gammares issus de la troisième cohorte née au laboratoire :

Les gammares issus de cette troisième cohorte, c'est-à-dire du deuxième cycle de reproduction complet réalisé au laboratoire, ont à la fois réalisé l'ensemble de leur développement embryonnaire au laboratoire, et résultent de la fécondation d'ovocytes (et de spermatozoïdes) dont l'ovogénèse (et la spermatogénèse) complète s'est également déroulée au laboratoire. Ces individus sont donc complètement naïfs vis-à-vis des conditions du milieu d'origine.



#### Juvéniles nés au Laboratoire:

|                                | Cycle | Environnement |
|--------------------------------|-------|---------------|
| <b>1<sup>ère</sup> cohorte</b> |       |               |
| → Ovogenèse :                  | n-2   | Milieu        |
| → Embryogenèse :               | n-1   | Mixte         |
| <b>2<sup>ème</sup> cohorte</b> |       |               |
| → Ovogenèse :                  | n-1   | Mixte         |
| → Embryogenèse :               | n     | Laboratoire   |
| <b>3<sup>ème</sup> cohorte</b> |       |               |
| → Ovogenèse :                  | n     | Laboratoire   |
| → Embryogenèse :               | n+1   | Laboratoire   |

Cohortes non utilisées au cours de ces travaux

Figure II-5 : Illustration de la corrélation entre le degré de naïveté vis-à-vis du milieu des F1 produits au laboratoire, la cohorte, et l'environnement où ont eu lieu l'ovogénèse et l'embryogénèse. Le nombre de jours entre deux mues est donné pour une température de 12°C.

### 2.3. Contrôle de la production d'organismes pour l'obtention de frères et demi-frères :

La bonne maîtrise de la production de juvéniles, et de plusieurs cohortes à partir d'un même lot d'adultes au laboratoire, ainsi que la bonne connaissance du cycle de reproduction de *G. fossarum*, ont par ailleurs permis de produire au laboratoire des individus avec un pedigree connu, ainsi que des familles de gammares, permettant la réalisation de protocole de génétique quantitative. Ces individus au pedigree et aux liens de parentés connus ont été obtenus à partir de croisements de mâles et de femelles selon un schéma particulier décrit ici pour obtenir des juvéniles frères (full-sibs), demi-frères paternels (paternal half-sibs) et demi-frères maternels (maternal half-sibs).

#### 2.3.1. Schéma de croisement :

Après stabulation, des couples de gammares en précopulat (couples), avec des femelles sélectionnées sur les critères morphologiques (développement gonadique, présence de juvéniles dans la poche marsupiale) en fin de cycle de reproduction (fin D2, juvéniles au stade 5), ont été triés, puis maintenus individuellement pour trois cycles de reproduction successifs (donc trois pontes). A la fin de chaque cycle de reproduction chaque femelle a donné naissance à un lot de juvéniles correspondant à une fratrie. L'ensemble des fratries obtenues à la fin d'un cycle à partir des différents couples correspond à une cohorte (Figure II-6).

Chaque mâle et chaque femelle a été identifié du fait de l'isolement en couple. Entre chaque cycle de reproduction, les mâles ont été redistribués aléatoirement entre les femelles, à un moment précis du cycle de reproduction des femelles. Ainsi les parents (*i.e.* le pedigree) de chaque fratrie produite sont connus (Figure II-7).

A l'issue des trois cycles, trois lots de fratries (un lot par cycle), correspondant aux cohortes 1 à 3 (Cf. *section II.2*), ont ainsi été obtenus (Figure II-6). Le pedigree des individus en fonction des cohortes est le suivant :

- Les juvéniles de la cohorte 1 sont nés d'une mère connue mais d'un père inconnu. Le père est inconnu car la fécondation a eu lieu dans le milieu avant le prélèvement. Ces mâles ne font d'ailleurs pas partie de l'échantillon de mâles intervenant dans la production des cohortes 2 et 3.
- Les juvéniles de la cohorte 2 sont nés d'un père et d'une mère connus. Les pères de ces juvéniles sont les mâles avec lesquels les femelles étaient en précopulat au moment du tri des couples au cycle 1.
- Les juvéniles de la cohorte 3 sont également nés d'un père et d'une mère connus. Ils sont en revanche issus de couples différents de ceux de la deuxième cohorte étant donné que les mâles ont été redistribués au cycle 2.

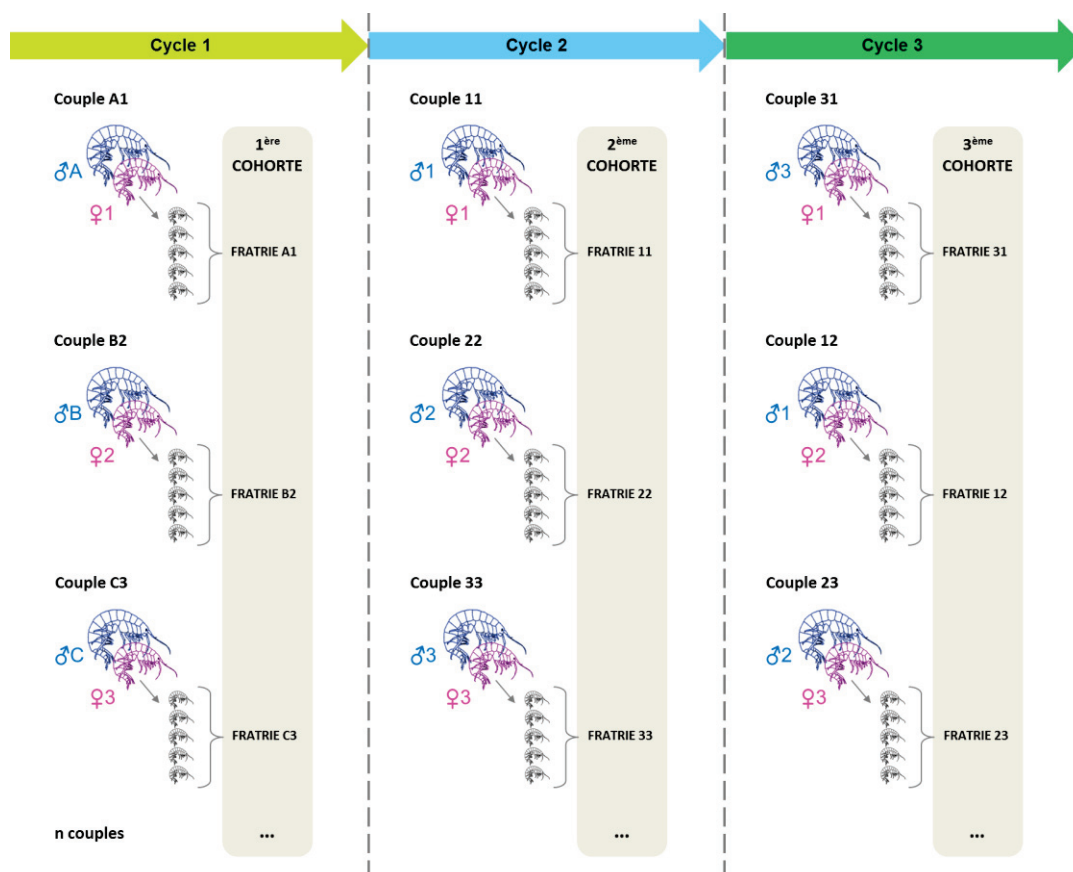


Figure II-6 : Schéma général du design de croisement mis en place. Illustration avec trois femelles. Les mâles identifiés par une lettre correspondent aux mâles inconnus ayant fécondé les femelles dans le milieu. Ces mâles sont les pères des juvéniles des fratries de la cohorte 1. Les mâles identifiés par un nombre sont les mâles connus. Les couples représentés au cycle 2 (ceux où le mâle et la femelle portent le même numéro) sont les couples qui ont été triés et isolés au début du protocole (cycle1). Ces couples sont les parents des juvéniles des fratries de la cohorte 2. Les couples représentés au cycle 2 (ceux où le mâle et la femelle portent un numéro différent) sont les parents des juvéniles des fratries de la cohorte 3. Ces couples ont été formés par redistribution aléatoire des mâles au milieu du cycle 2 (après la fécondation de la femelle du même numéro au début du cycle 2). Les femelles des trois cycles sont connues.

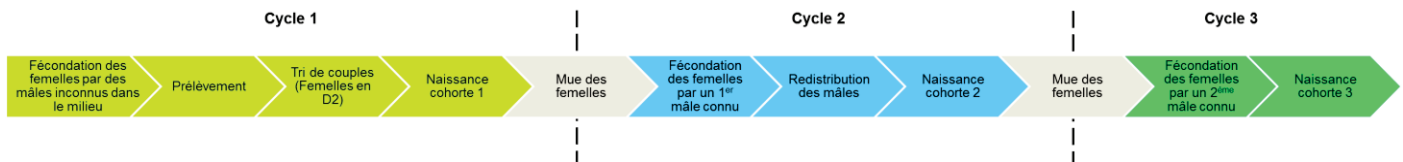


Figure II-7 : Chronologie des étapes clés du design de croisements au cours des trois cycles de reproduction connues.

### 2.3.2. Fratries, demi-fratries :

A l'issue du protocole de croisement présenté ci-dessus, chaque femelle a donc été associée avec trois mâles différents (un mâle inconnu au cycle 1, et deux mâles connus : l'un au cycle 2 et l'autre au cycle 3), et chaque mâle avec deux femelles différentes (deux femelles connues : l'une au cycle 2 et l'autre au cycle 3). Parmi les fratries produites sur l'ensemble des trois cycles, trois types de liens de parentés peuvent être distingués (Figure II-8) :

- Des « full-sibs », ou plein-frères, c'est-à-dire des gammares issus du même père et de la même mère. Chaque cohorte constitue un ensemble de full-sibs. Trois lots de full-sibs ont donc été produits.
- Des « maternal half-sibs », ou demi-fratries maternelles, c'est-à-dire des gammares nés de la même mère, mais non du même père. A partir du protocole mis en place, les maternal half-sibs correspondent à l'ensemble des trois fratries produites par chaque femelle au cours des trois cycles.
- Des « paternal half-sibs », ou demi-fratries paternelles, c'est-à-dire des gammares ayant le même père mais pas la même mère. A la différence des « maternal half-sibs », seules les fratries des cohortes 2 et 3 permettent d'obtenir des paternal half-sibs étant donné que les pères des juvéniles de la première cohorte ne sont pas connus.

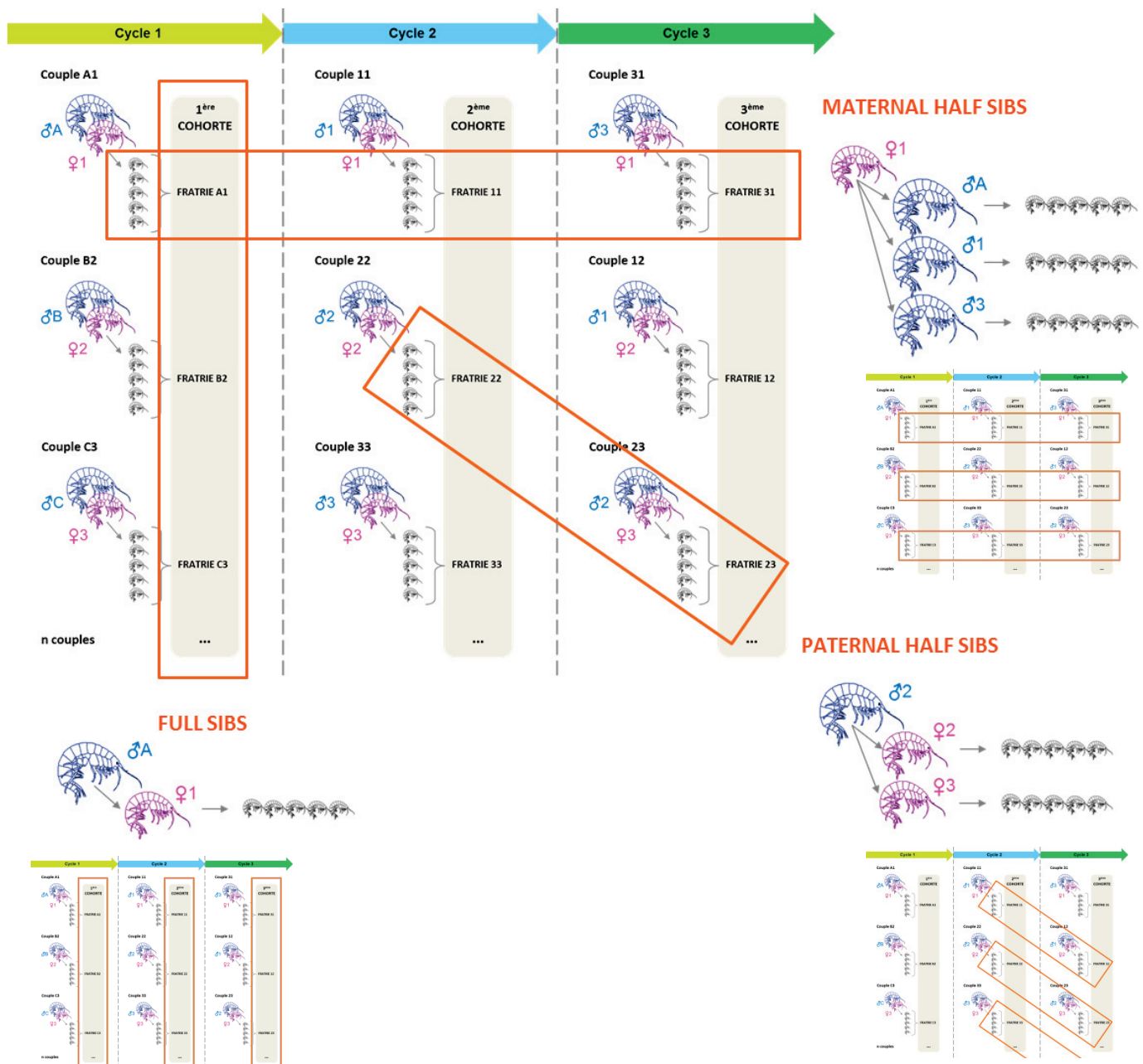


Figure II-8 : Représentation des trois types de liens de parentés obtenus à partir du schéma général de croisement.

### 3. Mesure de la sensibilité au cadmium :

Plusieurs expériences menées au cours de ces travaux ont nécessité de mesurer la sensibilité au cadmium d'organismes. Les conditions expérimentales spécifiques de chacune, ainsi que le type d'organismes exposés sont synthétisés dans le Tableau A-1 en annexe. Ce tableau indique également les chapitres dans lesquelles ces expériences sont détaillées.

### 3.1. Mesure de la sensibilité : temps-réponse, dose-réponse :

La mesure de la sensibilité au cadmium a été réalisée en suivant la survie des organismes exposés à des concentrations aiguës. En fonction de l'objectif de l'expérimentation, la sensibilité au cadmium des organismes testés a été évaluée en dose-réponse ou en temps-réponse, et les gammares exposés par pool ou individuellement. La mesure de la sensibilité en temps réponse a été souvent choisie au cours de ces travaux car elle permet une mesure individuelle de la sensibilité qui a été nécessaire, par exemple pour l'expérience de génétique quantitative.

### 3.2. Concentrations d'exposition :

Pour la mesure de la sensibilité en dose-réponse, des gammares adultes ont été exposés par pool à une gamme de concentrations de cadmium suivant une raison de deux (0, 20, 40, 80, 160, 320  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Pour la mesure de la sensibilité en temps-réponse, les gammares ont été exposés à une concentration unique de 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour des gammares adultes, et de 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour des gammares juvéniles. Ces concentrations ne correspondent pas à des doses environnementales. Elles ont été choisies de manière (1) à être suffisamment aiguës pour induire des effets létaux assez rapidement afin que la mortalité observée puisse bien être attribuée à la toxicité du cadmium et pas à des facteurs autres inhérents aux expérimentations longues (apparition de carences, mortalité dans les témoins) ; mais (2) à ne pas être trop élevées pour que la mortalité soit étalée sur plusieurs jours et permettre l'expression d'une variabilité inter-populationnelle ou interindividuelle de la sensibilité au cadmium. En tenant compte de ces critères, les concentrations ont été fixées à partir de données antérieures obtenues au laboratoire d'Ecotoxicologie d'Irstea de Lyon-Villeurbanne pour des gammares adultes (Felten et al. 2008) et juvéniles (Chaumot et al. 2009).

### 3.3. Conditions d'exposition :

Pour l'ensemble des tests de sensibilité au cadmium, les gammares adultes ont été exposés par pool de 15 ou 20 individus selon l'expérimentation, dans des béciers en polypropylène de 500 mL équipés ou non d'une surverse selon le mode de renouvellement, tandis que les juvéniles ont été exposés individuellement dans des falcons en polypropylène de 50 mL. Dans les béciers, une pièce de toile à bluter en nylon (maille de 500  $\mu\text{m}$  ou 1 mm) était disposée pour fournir une surface d'accroche permettant de limiter les agressions entre organismes et les phénomènes de cannibalisme. Les différents dispositifs expérimentaux utilisés pour les expositions au cadmium sont illustrés en Figure II-9.

Le cadmium étant un contaminant persistant très stable et non dégradable (Rao et al. 2010), les niveaux d'exposition ont été contrôlés en ajustant les concentrations nominales d'exposition, et la fréquence de renouvellement des milieux d'exposition a été choisie pour maintenir un niveau d'oxygénation suffisant. Pour cela, les milieux d'exposition ont été soit renouvelés en continu grâce à un système de pompes péristaltiques, soit renouvelés manuellement au maximum toutes les 48 heures (exposition semi-statique).

Les milieux d'exposition ont tous été préparés à partir d'un mélange de forage et d'eau osmosée d'une conductivité de 300  $\mu\text{S.cm}^{-1}$ . Cette conductivité a été choisie car elle correspond à la conductivité moyenne entre les sites d'études. La dureté correspondante est spécifiée dans le Tableau A-1. Le volume d'eau nécessaire à la préparation des milieux d'exposition était préalablement mis en bain marie et équipé de bulleur pour être à la bonne température et être saturé en oxygène au moment de la préparation et des renouvellements des milieux d'exposition. Les milieux d'exposition ont été contaminés au cadmium à partir d'une solution mère concentrée non acidifiée. La source de cadmium utilisée est du cadmium sous forme de Chlorure de cadmium (Cadmium chloride hemi(pentahydrate) :  $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ , n°CAS : 7790-78-5 ; fournisseur : Sigma–Aldrich (St. Quentin Fallavier, France)), soluble dans l'eau (solubilité dans l'eau : 133 mg/mL (source : Sigma–Aldrich). Les solutions mères ont été conservées au réfrigérateur pour une durée maximale d'un mois dans un récipient en polyéthylène fermé hermétiquement.

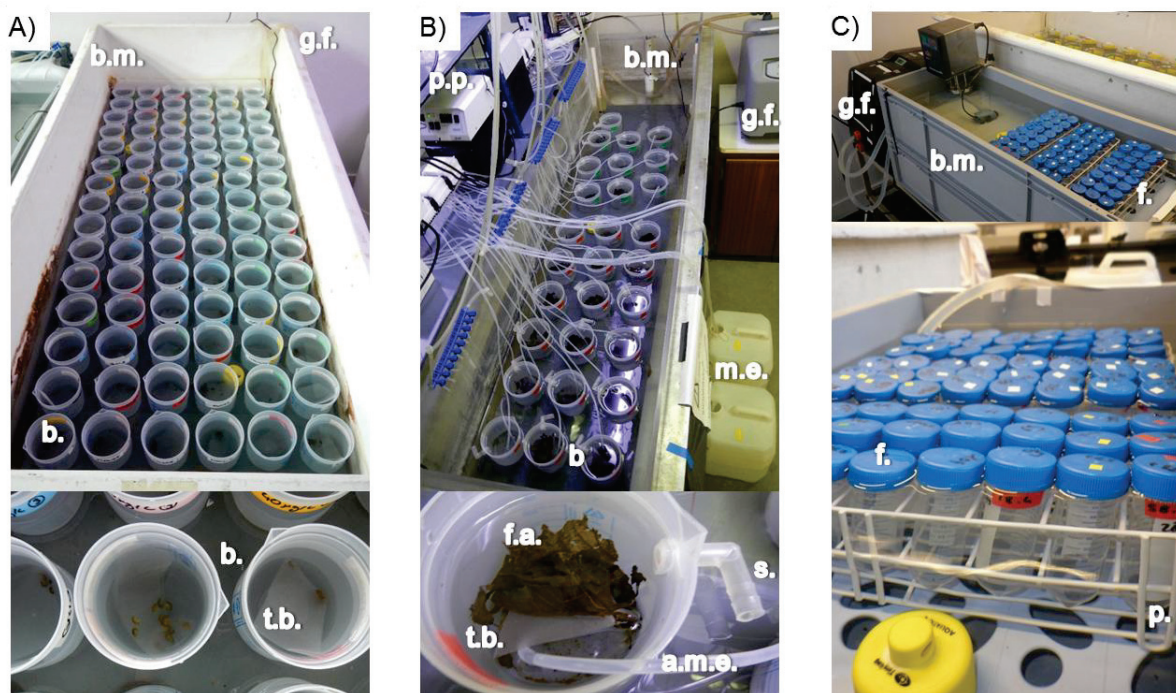


Figure II-9 : Illustration des dispositifs expérimentaux d'exposition au cadmium, exemples d'un test d'exposition de gammarus adultes en semi-statique (A) et en continue (B), et exemple d'un test d'exposition de juvéniles en semi-statique (C). a.m.e. arrivée du milieu d'exposition dans le béccher ; b. béccher d'exposition ; b.m. bain-marie thermorégulé ; f. falcon d'exposition ; f.a. feuille d'aulnes (morceaux grossiers) ; g.f. groupe froid ; m.e. milieu d'exposition ; p. portoir à falcons ; p.p. pompes péristaltiques pompant le milieu d'exposition et le distribuant dans les bécchers équipés d'une arrivée ; s. surverse des bécchers renouvelés en continue ; t.b. toile à bluter. (Photos Laboratoire d'Ecotoxicologie Irstea Lyon-Villeurbanne)

Pour garantir un niveau d'exposition homogène entre les différentes conditions d'une même expérimentation, pour une concentration donnée, le milieu d'exposition a été préparé en une seule fois pour toutes les conditions, de sorte que toutes les populations et/ou tous les individus soient exposés de la même manière au cadmium. Pour les expérimentations où certaines conditions étaient décalées dans le temps du fait de contraintes méthodologiques (pour la généralisation de la variabilité inter-population de la sensibilité au cadmium, la génétique quantitative, et la mesure de la sensibilité des descendants de parents sélectionnés/exposés), la même solution mère a été utilisée pour l'ensemble de l'expérimentation sauf lorsque la durée de celle-ci a excédé un mois. Au-delà de cette durée une deuxième solution mère a été préparée. Les milieux d'exposition étaient préparés quotidiennement pour les expositions en continue, et le jour du renouvellement pour les expositions semi-statiques d'adultes. Pour les juvéniles, un stock de milieu à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  était

préparé, puis maintenu à 12°C sans oxygénation, et utilisé jusqu'à 2 semaines après sa préparation.

Tous les tests de sensibilité au cadmium ont été réalisés à 12°C. Pour cela, les béchers et les falcons disposés dans des portoirs ont été placés dans des bains-marie thermorégulés au moyen d'un groupe froid (marque Teco) (Figure II-9). Des pompes de recirculation étaient également installées dans les bains-marie afin de faire circuler l'eau et d'obtenir une régulation de la température homogène.

Enfin, les expositions ont été conduites de façon indépendante des populations et des liens de parentés entre individus. Pour cela, les dispositifs d'exposition (béchers ou falcons) étaient distribués aléatoirement dans les bains-marie utilisés pour la thermorégulation.

### 3.4. Organismes exposés :

La sensibilité au cadmium a été évaluée sur des gammarés soit au stade adulte soit au stade juvéniles. Pour les adultes, seuls des mâles de taille homogène et sans parasites apparents ont été exposés. Ce tri a été réalisé par observation directe sur table lumineuse. Les mâles sont identifiés par l'absence de marsupium avec embryons et d'ovocytes. Il s'agit d'une méthode fiable car il y a très peu d'erreur de sexage, et car si des femelles ne présentant ni embryons ni ovocytes sont isolées avec les mâles, celles-ci se retrouvent rapidement en précopulat et sont ainsi rapidement identifiées et retirées. L'homogénéité de la taille a été contrôlée en mesurant la taille d'un sous-échantillon des organismes utilisés pour les tests. Pour cela les organismes sont photographiés à l'aide d'une loupe binoculaire équipée d'un appareil photo numérique. La taille est ensuite estimée en mesurant la distance entre la base de l'antenne 1 et la fin du troisième segment du métasome (Cf. Figure I-6) avec le logiciel d'analyse d'image SigmaScan ® Pro v5.0. Cette méthode de mesure de taille est celle appliquée tout au long de ces travaux. Elle est également décrite dans la partie matériels et méthodes de la publication n°1.

Pour les juvéniles, les individus ont été calibrés par rapport à leur âge, leur physiologie pouvant rapidement évoluer à ce stade. Tous les individus ont donc été exposés à un âge

connu. Ceci a été rendu possible en synchronisant leur sortie du marsupium avec le tri en amont de femelles au même stade du cycle de reproduction (observation directe du marsupium sur table lumineuse) (Geffard et al. 2010), et par un suivi individuel et journalier de la sortie des juvéniles du marsupium. La mesure de la sensibilité au cadmium des organismes produits au laboratoire (*i.e.* des F1) a systématiquement été réalisée sur des individus juvéniles rapidement après leur sortie du marsupium (au maximum 14 jours après), et ainsi avant l'apparition de toutes carences éventuelles liées aux limites techniques que présente l'élevage des gammares au laboratoire.

De la même manière que pour la caractérisation de la contamination métallique biodisponible (*section II.1.2*), cette standardisation des organismes exposés permet de contrôler l'effet de facteurs biotiques pouvant influencer la sensibilité au cadmium d'un individu et constituer des facteurs de confusion pour la mesure de leur sensibilité et la comparaison entre populations et entre individus.

#### **4. Mesure des traits d'histoire de vie :**

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes également intéressés aux conséquences de l'exposition long terme de la population Ardi sur des traits autres que la sensibilité au cadmium. Ainsi, dans le cadre de l'approche rétrospective (*i.e.* comparaison de la population Ardi avec des populations de référence), le taux d'alimentation et des traits d'histoire de vie ont été mesurés.

##### **4.1. Taux d'alimentation :**

Le taux d'alimentation des gammares (FR pour feeding rate) a été mesuré en fournissant *ad libitum* des disques de feuille d'aulne de 20 mm de diamètre aux organismes. Ces disques sont réalisés à l'emporte-pièce à partir de feuilles préalablement conditionnées dans le mélange d'eau de forage et d'eau osmosée, en évitant les nervures principales.

Les taux d'alimentation ont été mesurés en conditions contrôlées au laboratoire et *in situ* par encagement de gammare dans leur propre site. Dans les deux cas, pour chaque réplicat, gammare et disques étaient placés dans un système d'encagement (décrit en partie *section II.1.2*). Pour la mesure au laboratoire, ces systèmes ont été répartis dans des seaux en polypropylène de 16 L équipés d'une surverse sous aération constante, et renouvelés en continue (pompes péristaltiques) avec un mélange d'eau de forage et d'eau osmosée, placés dans un bain-marie thermorégulé à 12°C. Pour la mesure *in situ*, les systèmes ont été placés dans des caisses disposées dans les rivières comme pour la mesure de la contamination biodisponible (*section II.1.2*). Des lots de disques contrôles ont également subi le même traitement pour tenir compte de la dégradation des disques par des facteurs autres que la consommation par des gammare (action du biofilm, intrusion d'organismes dans les dispositifs d'exposition dans le cas de la mesure du taux d'alimentation *in situ* par d'encagement etc.).

Les taux d'alimentation des gammare ont été mesurés par réplicat en calculant la surface de feuille consommée par jour et par gammare ( $\text{mm}^2 \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{gammare}^{-1}$ ), selon la formule suivante, (Coulaud et al. 2011) :

$$\text{FR}_i = \frac{(S_{\text{contrôle}} - S_i)}{((l_{i,0} + l_{i,t})/2) t}$$

où  $\text{FR}_i$  correspond au taux d'alimentation du réplicat  $i$ ,  $S_{\text{contrôle}}$  à la surface des disques de feuilles issus des lots de contrôle sans gammare à la fin de l'exposition,  $S_i$  à la surface des disques de feuilles restant après l'expérience pour le réplicat  $i$ ,  $t$  correspond à la durée en jours de l'exposition,  $l_{i,0}$  et  $l_{i,t}$  correspondent au nombre de gammare respectivement au début et à la fin de l'exposition.

Le taux d'alimentation des gammare dépend de la taille des organismes ainsi que de la température. Ces relations ont été décrites par des travaux antérieurs menés au laboratoire d'Ecotoxicologie d'Irstea de Lyon-Villeurbanne (Coulaud et al. 2011, Coulaud 2012), permettant ainsi de soustraire l'effet de ces paramètres dans la mesure des taux

d'alimentation. L'effet de la taille a été contrôlé en mesurant le taux d'alimentation de gammares mâles homogènes en taille (tri sur table lumineuse). La taille des organismes a été estimée à partir d'un sous échantillon d'au moins 20 gammares pour chaque population conservé dans de l'éthanol puis photographié et mesuré comme décrit *section II.3.4*. Par ailleurs dans les cas où l'homogénéité de la taille entre populations n'est pas respectée, il est possible de corriger l'effet de la taille sur le taux d'alimentation mesuré grâce à un modèle établi par Coulaud et al. (Coulaud et al. 2011, Coulaud 2012).

L'effet de la température a aisément été contrôlé au laboratoire (thermorégulation par groupe froid et résistance thermostatique). Une sonde (Tinytag temperature logger Aquatic 2 ®) mesurant la température toutes les heures) était également placée dans le système expérimental afin d'avoir un suivi régulier et précis de la température tout au long des tests. Pour la mesure *in situ*, la température pouvant être variable entre sites et au cours de l'exposition, une sonde mesurant la température était également placée dans chaque caisse d'encagement. Les taux d'alimentation mesurés *in situ* ont été interprétés en tenant compte de l'effet de la température au cours du test (température moyenne) sur le taux d'alimentation grâce au modèle établi par Coulaud et al. (2010).

#### 4.2. Taux de croissance :

La croissance des gammares est relativement lente (de l'ordre de 1 mm/mois jusqu'à la maturité puis ralentissement). Elle suit une courbe logistique (forme sigmoïde) se caractérisant par trois phases : une première phase de croissance exponentielle au début du développement des organismes, puis une deuxième phase de croissance linéaire (autour du point d'inflexion de la courbe), et enfin une phase de croissance dite « stationnaire » au cours de laquelle la taille des organismes tend de manière asymptotique vers la taille maximale (Pöckl 1995, Coulaud et al. 2014). Ainsi, la mesure du taux de croissance a été réalisée sur des juvéniles, leur croissance étant plus forte que les adultes, et sur deux classes de taille de départ : première classe de taille de 3,8 ( $\pm 0,2$ ) mm, et deuxième classe de taille de 5,3 ( $\pm 0,3$ ) mm (moyenne et écart-type des tailles de départ moyennes des populations testées) l'objectif

étant de couvrir les deux phases de croissance des juvéniles (exponentielle et linéaire). Il a été mesuré pour cinq des populations étudiées (Ardi et quatre populations de référence Bacu, Bois, Mand, Tour) en conditions contrôlées au laboratoire à partir d'organismes préalablement stabulés pendant deux semaines (eau de forage brute, conductivité de l'ordre de  $500 \mu\text{S.cm}^{-1}$ ).

Pour les deux classes de taille 4 réplicats de 20 individus ont été exposés. Pour cela, les organismes étaient placés dans des béciers en verre contenant 500 mL de la même eau que pour la stabulation. L'eau était renouvelée en continu par des pompes péristaltiques pompant dans une réserve d'eau alimentée régulièrement et placée sous aération constante. Les béciers étaient placés dans un bain-marie thermorégulé à  $12^{\circ}\text{C}$ . La croissance étant dépendante de la température (Coulaud et al. 2011, Coulaud 2012), la régulation de la température a été réalisée de la même manière que décrit pour la mesure du taux d'alimentation afin d'avoir une température stable et homogène. Une pièce de toile à bluter en nylon (maille de  $500 \mu\text{m}$  ou  $1 \text{ mm}$ ) était également disposée dans chaque bécier. Les gammares étaient nourris *ad libitum* avec des morceaux grossiers de feuilles d'aulnes préalablement maintenues quelques jours dans de l'eau. En complément, des vers (*Tubifex sp.*) lyophilisés ont été ponctuellement distribués.

Après 24 jours pour la première classe de taille, et 19 jours pour la deuxième classe de taille, les gammares ont été mesurés et comptés. La taille des organismes a été déterminée comme décrit en *section II.3.4* (i.e. mesure de la distance la base de l'antenne 1 à la fin du métasome à partir de photographies réalisées sous loupe binoculaire). La taille des organismes au lancement de l'expérimentation (à  $t_0$ ) a été estimée à partir d'un sous échantillon d'au moins 20 gammares pour chaque population et chaque classe de taille, conservé dans de l'éthanol puis photographié et mesuré comme décrit ci-avant.

#### 4.3. Mesures démographiques *in situ* des populations :

La distribution en taille des femelles en reproduction et les relations taille-fécondité ont été obtenues à partir d'un suivi démographique réalisé entre avril et décembre 2012 sur la

population Ardi et quatre des populations référence du premier lot (Bacu, Bois, Mand, Tour) selon le protocole adapté de Coulaud (Coulaud 2012, Coulaud et al. 2014). Pour cela, 7 relevés démographiques ont été effectués au cours de cette période (Tableau II-2).

Les relevés ont été réalisés à l'aide d'un filet de Surber, en perturbant manuellement le substrat situé dans le cadre du Surber (surface de  $1/20^{\text{ème}}$  de  $\text{m}^2$ ) et en capturant dans le filet (maille de  $250 \mu\text{m}$ ) l'ensemble des organismes remis en suspension et emportés par le courant comme présenté *section II.2.1.1*. Pour chaque site, les prélèvements ont toujours été réalisés sur le même tronçon, représentatif du segment de la rivière étudiée, choisi au début du suivi.

#### 4.3.1. *Distribution en taille :*

Les substrats échantillonnés ont été choisis en fonction des substrats rencontrés au moment du prélèvement avec deux objectifs : 1) échantillonner les substrats représentatifs de l'ensemble du tronçon, pour cela les substrats majoritaires et les substrats les plus favorables à l'hébergement de gammares (bryophytes, gravier, matière organique) même s'ils représentaient une faible surface de recouvrement ont été échantillonnés ; et 2) limiter le nombre de substrats échantillonnés. Entre un et trois substrats selon la population et la période de l'année ont ainsi été prélevés (Tableau II-2). Cette méthodologie, avec un effort d'échantillonnage concentré à la fois sur les substrats favorables à la présence des gammares et sur les substrats majoritaires dans le site, permet d'estimer précisément les densités et les distributions en taille des organismes (Coulaud 2012). Pour chaque substrat, le nombre de Surber prélevés a été estimé en fonction de la densité d'individus présents dans le substrat afin d'obtenir un nombre de femelles en reproduction suffisant, sauf pour les substrats présentant de très faible densité où le nombre de Surbers prélevés a été plafonné. En fonction de la population, du substrat et de la saison, le nombre de Surbers prélevés a varié entre 2 et 25 (tableau II-2).

Après avoir enlevé les gros débris de matière organique, à l'aide d'un dégrilleur (tamis de maille de 1cm), les prélèvements réalisés pour chaque substrat étaient ensuite tamisés avec un tamis de 1,25 mm afin de ne retenir que les gammares adultes sexuellement mûres et de

relâcher les juvéniles. Les gammares retenus sur ce tamis étaient ensuite ramenés au laboratoire dans des contenants de 1 L contenant de l'eau du site placés dans des glacières munies de plaques eutectiques. De retour au laboratoire, les femelles en reproduction (*i.e.* les femelles gravides possédant des ovocytes et/ou des embryons dans le marsupium), identifiables à l'œil nu, étaient triées *in vivo* sur table lumineuse. Ce tri était effectué progressivement, petit lot par petit lot, jusqu'à avoir isolé au moins 60 femelles en reproduction. Dans certains cas, notamment pour les substrats et les périodes de l'année présentant de faibles densités de gammares, la totalité du prélèvement a été triée sans que le nombre de 60 femelles en reproduction ait pu être atteint (Tableau II-2). Pour chaque substrat, les femelles en reproduction triées ont été conservées à -20°C pour être mesurées ultérieurement. La taille de la totalité de ces femelles a ensuite été mesurée, après décongélation, selon le protocole de mesure de taille décrit en *section II.3.4*. L'ensemble des caractéristiques du suivi démographique des cinq populations, notamment les dates de prélèvement, le nombre de substrats, le nombre de Surbers par substrats ainsi que le nombre de femelles mesurées, est récapitulé en Tableau II-2.

#### 4.3.2. Fécondité des femelles in situ :

La fécondité des femelles (*i.e.* le nombre d'embryons) a été déterminée pour la population Ardi et pour les cinq populations de référence strictes (Bacu, Bois, Gala, Mand, et Tour) à partir de prélèvements d'organismes effectués entre avril et juin 2012 (Tableau II-3). Les prélèvements étaient réalisés aléatoirement sur les différents substrats du site de chaque population à l'aide d'un troubleau (maille du filet : 500 µm, base rectangulaire : 20 x 25 cm). Les gammares adultes, retenus sur un tamis de 1,25 mm, et débarrassés des débris de matière organique grossiers (dégrilleur), étaient ensuite ramenés au laboratoire dans des seaux.

La fécondité des femelles a ensuite été déterminée en comptant le nombre d'embryons contenu dans le marsupium d'un échantillon de femelles gravides isolé à partir de ces prélèvements. Les comptages ont été réalisés dans les jours suivants le prélèvement. En attendant les gammares étaient stabulés en statique dans l'eau de leur site dans des seaux

placés dans un bain-marie thermorégulé à 12°C et sous aération constante. Les gammares étaient également alimentés *ad libitum* avec des feuilles d'aulnes préalablement réhydratées. Pour chaque femelle, les embryons sont retirés manuellement du marsupium sous loupe binoculaire. Ils sont ensuite placés dans une goutte d'eau sur lame de verre et observé sous loupe binoculaire afin de les compter et de déterminer leur stade. Les stades embryonnaires ont été déterminés à partir des critères définis chez *G. fossarum* par Geffard et al. (2010) et Xuereb (2009) (Figure II-10). Les femelles dont les embryons étaient au stade 1 n'ont pas été prises en compte. Les embryons étant très fragiles, leur comptage est peu précis car ils peuvent être perdus au moment de leur sortie du marsupium (Geffard et al. 2010). De même les femelles dont les embryons étaient au stade 5 ont été exclues de l'analyse. En effet, à ce stade les juvéniles sont mobiles et peuvent sortir et entrer du marsupium en fonction des conditions du milieu (sortie si stress de la femelle par exemple). Ainsi seules les femelles dont les embryons étaient au stade 2, 3 ou 4 ont été prises en compte.

La fécondité des femelles de gammares étant corrélée à la taille (Pöckl 1993, Coulaud 2012), les femelles ont également été photographiées, puis mesurées (méthode *section II.3.4*) afin de pouvoir comparer les populations. Ainsi, nous avons également cherché à déterminer la fécondité de femelles de tailles variées afin de couvrir la gamme de taille des femelles en reproduction dans les populations et d'établir la relation taille-fécondité pour chacune des populations.

Tableau II-3 : Caractéristiques des prélèvements réalisés pour la détermination de la fécondité des populations.

| Relevé de fécondité<br>Suivi / Population     | Date prélèvement | Nombre de femelles étudiées |
|-----------------------------------------------|------------------|-----------------------------|
|                                               |                  |                             |
| Ardi<br>Bacu<br>Bois<br>Suiwi 1<br>Avril 2012 | 05.04.2012       | 25                          |
|                                               | 05.04.2012       | 20                          |
|                                               | 03.04.2012       | 18                          |
|                                               | 03.04.2012       | 24                          |
|                                               | 05.04.2012       | 25                          |
| Ardi<br>Bacu<br>Bois<br>Suiwi 2<br>Mai 2012   | 03.04.2012       | 25                          |
|                                               | 15.05.2012       | 23                          |
|                                               | 15.05.2012       | 25                          |
|                                               | -                | -                           |
|                                               | -                | -                           |
| Ardi<br>Bacu<br>Bois<br>Suiwi 3<br>Juin 2012  | 22.05.2012       | 25                          |
|                                               | 31.05.2012       | 26                          |
|                                               | -                | -                           |
|                                               | 27.06.2012       | 27                          |
|                                               | 28.06.2012       | 24                          |
| Ardi<br>Bacu<br>Bois<br>Suiwi 3<br>Juin 2012  | -                | -                           |
|                                               | 27.06.2012       | 23                          |
| Tour                                          | -                | -                           |

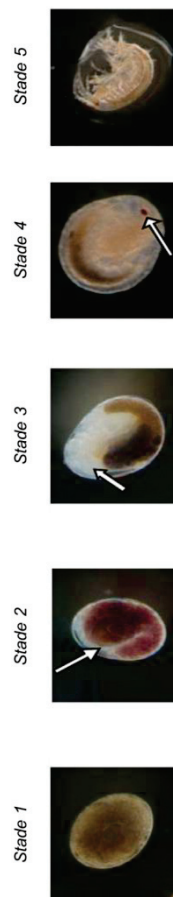


Figure II-10 : Stades embryonnaires de *G. fossarum*. Stade 1 : Embryon nouvellement fertilisé, ovale et indifférencié ; Stade 2 : Apparition de la ventroflexion ; Stade 3 : Apparition du céphalothorax et segmentation des appendices ; Stade 4 : Les yeux sont clairement visibles, et les appendices sont complètement développés ; Stade 5 : Juvénile nouvellement éclos. (D'après Xuereb 2009, Geffard et al. 2010)

Tableau II-2 : Caractéristiques du suivi démographique réalisé pour les cinq populations.

| Description du suivi<br>Suivi / Population | Date prélèvement | Nombre de substrats prélevés | Nombre de Surbers prélevés (substrats poolés) | Nombre total de femelles mesurées |
|--------------------------------------------|------------------|------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|
|                                            |                  |                              |                                               |                                   |
| Ardi<br>Bacu<br>Bois<br>Mand<br>Tour       | 05.04.2012       | 2                            | 14                                            | 151                               |
|                                            | 05.04.2012       | 1                            | 12                                            | 58                                |
|                                            | 03.04.2012       | 1                            | 11                                            | 53                                |
|                                            | 05.04.2012       | 1                            | 14                                            | 67                                |
|                                            | 03.04.2012       | 3                            | 15                                            | 98                                |
| Ardi<br>Bacu<br>Bois<br>Mand<br>Tour       | 15.05.2012       | 2                            | 19                                            | 134                               |
|                                            | 15.05.2012       | 1                            | 14                                            | 63                                |
|                                            | 21.05.2012       | 1                            | 18                                            | 32                                |
|                                            | 22.05.2012       | 1                            | 12                                            | 59                                |
|                                            | 31.05.2012       | 3                            | 28                                            | 73                                |
| Ardi<br>Bacu<br>Bois<br>Mand<br>Tour       | 27.06.2012       | 2                            | 17                                            | 135                               |
|                                            | 27.06.2012       | 1                            | 14                                            | 75                                |
|                                            | 28.06.2012       | 1                            | 13                                            | 60                                |
|                                            | 27.06.2012       | 1                            | 23                                            | 61                                |
|                                            | 27.06.2012       | 3                            | 24                                            | 49                                |
| Ardi<br>Bacu<br>Bois<br>Mand<br>Tour       | 19.07.2012       | 1                            | 12                                            | 90                                |
|                                            | 19.07.2012       | 1                            | 12                                            | 63                                |
|                                            | 23.07.2012       | 1                            | 14                                            | 59                                |
|                                            | 19.07.2012       | 1                            | 22                                            | 65                                |
|                                            | 23.07.2012       | 3                            | 25                                            | 128                               |
| Ardi<br>Bacu<br>Bois<br>Mand<br>Tour       | 31.08.2012       | 1                            | 10                                            | 63                                |
|                                            | 31.08.2012       | 1                            | 6                                             | 57                                |
|                                            | 29.08.2013       | 1                            | 15                                            | 35                                |
|                                            | 31.08.2012       | 1                            | 19                                            | 49                                |
|                                            | 29.08.2013       | 2                            | 11                                            | 97                                |
| Ardi<br>Bacu<br>Bois<br>Mand<br>Tour       | 09.10.2012       | 1                            | 15                                            | 21                                |
|                                            | 09.10.2012       | 1                            | 9                                             | 21                                |
|                                            | 09.10.2012       | 1                            | 20                                            | 24                                |
|                                            | 24.10.2012       | 1                            | 23                                            | 32                                |
|                                            | 09.10.2012       | 3                            | 16                                            | 109                               |
| Ardi<br>Bacu<br>Bois<br>Mand<br>Tour       | 10.12.2012       | 2                            | 15                                            | 72                                |
|                                            | 10.12.2012       | 1                            | 7                                             | 55                                |
|                                            | 11.12.2012       | 1                            | 14                                            | 35                                |
|                                            | 09.01.2012       | 1                            | 25                                            | 57                                |
|                                            | 11.12.2012       | 1                            | 13                                            | 79                                |



**CHAPITRE III : ETUDE DES EFFETS D'UNE EXPOSITION A LONG TERME AU Cd SUR UNE  
POPULATION DE *GAMMARUS FOSSARUM* :  
TOLERANCE AU Cd ET MODIFICATIONS DE TRAITS D'HISTOIRE DE VIE**

Ce chapitre, composé d'une publication et d'une note, regroupe un ensemble de travaux menés pour déterminer si l'exposition historique au cadmium peut induire une augmentation de la tolérance à ce métal et/ou une modification de traits autre que la sensibilité chez *G. fossarum*.

- 1- Tout d'abord nous avons caractérisé l'exposition *in situ* au cadmium de la population Ardi de façon à établir cette population naturelle de *G. fossarum* en tant que cas d'étude permettant d'étudier les effets d'une exposition à long terme à la contamination dans le milieu, et avons composé un premier lot de cinq populations de référence proches d'Ardi auxquelles comparer cette population.
- 2- Dans un deuxième temps, l'hypothèse d'une augmentation de la tolérance au cadmium de la population Ardi a été testée avec la mesure en temps-réponse de la sensibilité au cadmium de celle-ci et des cinq populations de référence sélectionnées à l'étape précédente en *jardin commun* au laboratoire. La persistance en milieu non contaminé et le caractère héritable d'une éventuelle augmentation de la tolérance ont également été évalués.
- 3- Le taux d'alimentation, le taux de croissance, la distribution de taille des femelles en reproduction, ainsi que la fécondité des femelles ont ensuite été mesurés *in situ* et/ou au laboratoire de manière à déterminer si d'autres traits d'histoire de vie que la sensibilité toxicologique peuvent être affectés par une exposition à long terme au cadmium dans le milieu.



**1. Publication n°1 : Evolution de la sensibilité au cadmium et coûts associés au sein d'une population de *Gammarus fossarum* habitant une rivière faiblement contaminée :**

**Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a *Gammarus fossarum* population inhabiting a low-level contaminated stream**

**Abstract**

Deciphering evolutionary processes occurring within long-term contaminated wild populations is essential for the ecological risk assessment of persistent chemical contaminations. Using field populations of *Gammarus*, a commonly-used genus in aquatic ecotoxicology, the present study sought to gain insights into the extent to which long-term exposure to metals in the field could effectively lead to shifts in toxicological sensitivities. For this, we identified a *Gammarus* population inhabiting a stream contaminated by cadmium (Cd). We compared the Cd-exposure and Cd-sensitivity of this population to those of five reference populations. Active biomonitoring determined in different years and seasons that significant levels of Cd were bioavailable in the contaminated site. Laboratory sensitivity tests under common garden conditions established that this long-term field exposure led to the development of a moderate Cd tolerance, which was maintained after a 3-week acclimatization in the laboratory, and transmitted to offspring produced under clean conditions. The potential physiological costs of tolerance were assessed by means of feeding rate measurements (in the laboratory and *in situ*). They revealed that, unlike for reference populations, the feeding activity of organisms from the tolerant population was greatly decreased when they were maintained under laboratory conditions, potentially indicating a high population vulnerability to environmental perturbations. Because dissolved Cd concentrations in water from the contaminated site were low (averaging  $0.045 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and below the current European environmental quality standard for Cd for inland surface waters (fixed at  $0.08 \mu\text{g L}^{-1}$  in soft water environments), this case study sheds light onto the extent to which current environmental quality standards are protective against potential adverse

outcomes of adaptive and micro-evolutionary processes occurring in contaminated environments.

### **Keywords**

Evolutionary ecotoxicology, adaptation, acclimation, cost of tolerance, gammarids, metals

## **1. Introduction :**

Aquatic animal populations that have had long-term exposure to environmental contamination can exhibit increased tolerance to toxicants through genetic adaptation or physiological acclimation (Klerks and Weis 1987, Posthuma and van Straalen 1993). Different mechanisms (genetics, epigenetics, maternal transfers) can explain transgenerational inheritance of tolerance, *i.e.*, the occurrence of modified toxicological sensitivities in offspring. The increased tolerance of individuals can be associated with fitness costs due to trade-offs in energy allocation, or genetic correlations between toxicological and fitness traits (Shirley and Sibly 1999, Xie and Klerks 2004, Agra et al. 2011). Hence, this tolerance can result in the alteration of population dynamics when life history traits are negatively impacted. A loss of genetic diversity has also been reported in chronically exposed populations in accordance with the “genetic erosion” hypothesis (van Straalen and Timmermans 2002). Therefore, unraveling evolutionary processes occurring within long-term impacted populations is important for the ecological risk assessment of persistent chemical contamination (Bickham 2011, Coutellec and Barata 2011, De Coninck et al. 2014). As underlined by Coutellec and Barata (2013), the study of evolutionary responses to aquatic pollution should be investigated under realistic conditions, by tracing back evolutionary processes in wild populations.

The freshwater amphipod *Gammarus* is an ecologically relevant model genus suitable for gaining insights into these ecotoxicological questions in the field. Indeed, previous work in evolutionary ecotoxicology has focused on among-population sensitivity to heavy metals in gammarids. These studies yielded contradictory findings on the effect of long-term exposure

to metals on the sensitivity of historically contaminated populations. For instance, a *G. pulex* population inhabiting a mining area was less susceptible to Cu and Zn than a control population was (Khan et al. 2011), while no significant difference in Cd sensitivity was found between populations of *G. fossarum* originating from historically metal-polluted and reference sites (Boets et al. 2012). In the same vein, Maltby and Crane (1994) observed a greater tolerance to metals in a *G. pulex* population from a metal contaminated site. However, it was only transitory as it was no longer observed in field animals collected 18 months later. Furthermore, these latter observations of the absence of a fixed adaptation to metals in the field agree with quantitative genetics experiments, which concluded that there was only a weak potential for genetic adaptation in one *G. fossarum* population (Chaumot et al. 2009). Overall, the failure to find a clear tendency in the adaptation of *Gammarus* field populations to metals and their ability to maintain themselves in metal-polluted environments may result from the fact that each field study only considered a single population as reference. This design does not allow isolating metallic contamination as the only factor explaining differences in sensitivity to metals between contaminated and reference populations. In addition, in these studies, a rigorous characterization of population exposure was often lacking, in terms of levels of environmental concentrations, bioavailability and stability in time (*i.e.*, episodic vs persistent contamination).

We previously investigated, at a regional scale, the suitability of an active biomonitoring approach, using the transplantation of organisms selected from a control *G. fossarum* population, to assess contaminant bioavailability (Besse et al. 2013). In that study, numerous discrepancies between bioaccumulated concentrations and the expert classification of sites by the Water Agency were observed especially for Cd. Indeed, some sites with the worst quality in terms of bioavailable Cd contamination were expected to be uncontaminated. We assumed that this could be explained by the local geochemical background. High densities of *G. fossarum* were present in one of these Cd- contaminated sites, situated at an upstream location in the Ardières River (Rhône-Alpes region, France). Hence, it gave us a rare opportunity to assess whether Cd tolerance and possible associated fitness costs can effectively develop in the field within a long-term contaminated population. To this end, the present study compare the Cd sensitivity of this contaminated population, namely Ardi, to that

of five reference *G. fossarum* populations selected in the same regional area. Using active biomonitoring, we monitored the bioavailable Cd contamination in the site inhabited by the Ardi population for different years, in different seasons to verify that the population had long-term exposure to Cd. We also validated the absence of bioavailable Cd contamination in the five reference sites. Tolerance to acute Cd exposure of size-calibrated males from the six populations was assessed under common garden conditions in the laboratory. We also tested the maintenance over time and the inheritance of Cd tolerance. For this, we determined the Cd sensitivity of males after an acclimatization period to uncontaminated conditions, and the Cd tolerance in F1 offspring reared in the laboratory. In addition, the possible costs of tolerance were investigated by means of feeding rate (FR) measurements, under *in situ* conditions through caging experiments in the site where each population originates or in the laboratory common garden. Overall, this case study provides clues about the extent to which long-term exposure in the field can effectively lead to shifts in toxicological sensitivities and population vulnerability by means of transgenerational or micro-evolutionary mechanisms.

## **2. Materials et methods :**

### **2.1. Selection of the study sites and physicochemical characterization :**

We chose to compare the Ardi population against a set of five uncontaminated populations, namely Bacu, Bois, Gala, Mand, and Tour populations. Like Ardi, these five populations inhabit streams in the upstream portion of various watersheds in the Rhone-Alpes region (Southeast of France ; GPS coordinates supplied in Table 1). Based on previous monitoring studies (Besse et al. 2013), these five sites were selected within watersheds *a priori* uncontaminated by metals. We sought to cover a large range in water hardness among the sites in order to rule out this potential confounding factor, which is known to influence crustacean physiology and phenotypic diversity (*e.g.* documented by Meyran 1997 in *Gammarus fossarum*) and which could explain differences in biological responses between Ardi and reference populations. In addition, high densities of *G. fossarum* are found over time in the six selected sites indicating the presence of stable populations rather than only

transitory drifting individuals. Water temperature was continuously measured in the 6 study sites using Tinytag temperature loggers Aquatic 2<sup>®</sup> during one year. Water physicochemical parameters were determined following French standard operating procedures (AFNOR) from water samples of the six sites, when we collected organisms for Cd toxicity tests.

The bioavailable metallic contamination was characterized according to the active biomonitoring protocol reported by Besse et al. (2013). Briefly, it consisted of transplanting size-calibrated male gammarids from a single source population (Bourbre River) after an acclimatization period in the laboratory (controlled temperature and food supply). After 7 days of exposure in the study sites, bioaccumulated concentrations of metals were measured (three replicates of five individuals). The same analytical procedure as the one reported by Besse et al. (2013) was conducted. Metals (Cd, Pb, Ni, Ag, As, Co, Cr, Cu, Se, and Zn) were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Thermo X7 Series II), after mineralization with nitric acid in a microwave oven. For Hg, samples were analyzed by automated atomic absorption spectrometry (MILESTONE, Direct Mercury Analyser 80). The limits of quantification (LQ), determined according to NFXPT90-210 (AFNOR, 1999), are detailed in Supplementary Table 1. Metal concentrations were then compared with the threshold values of contamination determined by Besse et al. (2013). These values have been updated from records in 129 sites at the French territory scale (unpublished data). Threshold values for each element are reported in Supplementary Table 1. For a given metal, concentrations above the threshold value reveal a significant bioavailable contamination of the study site (false-positive rate at 5%), whereas concentrations under the threshold value would only reflect a site conforming to the background level of concentrations recorded in French rivers following this protocol. These measurements were made in the six study sites at the time of organism sampling for Cd sensitivity tests (April 2012). We also gathered data from parallel studies following the same protocol, especially for Ardi in order to attest to a continuous bioavailable Cd contamination at this site (from October 2009 to June 2014).

**Table 1 : Location and general physicochemical characterization of the six study sites. Mean water temperatures for each season were calculated from one-year continuous records of temperature. Physicochemical parameters were assessed from a punctual sampling on April 2012.**

| Population | GPS coordinates              | Mean water temperature (°C) |             |             |             | Hardness (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> ) | pH  | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | Cl <sup>-</sup> | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | Mg <sup>2+</sup> | Ca <sup>2+</sup> | Na <sup>+</sup> | K <sup>+</sup> |
|------------|------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------------------------------|-----|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|------------------|------------------|-----------------|----------------|
|            |                              | Apr-May-Jun                 | Jul-Aug-Sep | Oct-Nov-Dec | Jan-Feb-Mar |                                                  |     |                              |                              |                               |                               |                 |                               |                  |                  |                 |                |
| Ardi       | 46°11'11.2"N<br>04°31'14.3"E | 11.5                        | 14.2        | 8.7         | 5.7         | 30                                               | 8.0 | 0.05                         | 8.2                          | 0.21                          | <30                           | 11              | 4                             | 2                | 9                | 8               | 2              |
| Bacu       | 46°03'23.9"N<br>04°28'42.7"E | 11.4                        | 14.8        | 9.1         | 5.0         | 28                                               | 8.4 | <0.02                        | 4.1                          | 0.09                          | <30                           | 7               | 8                             | 2                | 8                | 7               | 1              |
| Bois       | 45°24'04.5"N<br>05°45'36.5"E | 9.6                         | 11.6        | 8.5         | 5.4         | 203                                              | 8.3 | <0.02                        | 2.2                          | <0.03                         | 215                           | 2               | 16                            | 6                | 72               | 1               | <1             |
| Gala       | 45°16'28.0"N<br>05°07'09.4"E | 12.2                        | 15.3        | 8.9         | 4.9         | 103                                              | 8.3 | <0.02                        | 3.1                          | <0.03                         | 115                           | 6               | 4                             | 1                | 39               | 3               | 1              |
| Mand       | 45°58'38.6"N<br>05°28'24.3"E | 9.9                         | 11.7        | 9.0         | 7.2         | 213                                              | 8.3 | 0.04                         | 2.3                          | 0.1                           | 235                           | 4               | 7                             | 3                | 81               | 2               | 1              |
| Tour       | 45°34'09.9"N<br>05°27'33.9"E | 13.2                        | 16.4        | 9.0         | 5.5         | 299                                              | 8.3 | 0.12                         | 17                           | 0.4                           | 310                           | 16              | 14                            | 3                | 115              | 7               | 2              |

## 2.2. Collection and maintenance of test organisms :

*Gammarus fossarum* were sampled using a hand net by kick sampling and quickly transported to the laboratory in plastic bottles containing ambient fresh water. For the different experiments, organisms were sorted out in order to limit the influence of biotic factors other than the source population. Organisms with a visible parasite load were excluded. In each experiment only organisms in the same life-cycle stage were used. For adults, we only exposed males. Attention was paid to size homogeneity within and among populations during hand sorting of test organisms. For each experiment, the body size of exposed gammarids was measured from a subsample of 20 gammarids kept in ethanol, and photographed with a camera connected to a binocular magnifier. The body size was measured using SigmaScan® Pro v5.0 imaging software (Systat Software). The reported body size corresponded to the dorsal length between the start of the prosoma and the end of the metasoma, as described by Coulaud et al. (2011).

Exposure of adult males was started within 48 hours of collection in the field. They were maintained in the water of their own site (ambient fresh water collected during the sampling) until Cd exposure. In addition, organisms from Ardi, Bois, Mand and Tour populations, from which more animals were collected in the field, were maintained in the laboratory for 3 weeks in order to supply males for testing the effect of acclimatization to clean conditions on Cd sensitivity. During laboratory acclimatization, organisms were kept in 30-L tanks under constant aeration. They were continuously supplied with clean water, *i.e.* groundwater mixed with water demineralized by reverse osmosis, at constant water hardness ( $106 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ) and conductivity ( $300 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ ), corresponding approximately to the mean conductivity encountered in the six sampling sites. A 16/8-h light/dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at  $14^\circ\text{C}$ . Organisms were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*). This culture was also used to obtain F1 offspring, by isolating gravid pairs in amplexus in a glass aquarium under the same water conditions. After 21 days of acclimatization, pairs with females bearing embryos at embryonic development stage 5 and close to molting (Geffard et al. 2010) were isolated in order to synchronize the release of

juveniles for the four populations. All females were removed after 7 days. Juveniles released during the 7 days were then collected and used for the test 6 days later.

### 2.3. Acute Cd toxicity tests :

Cd used was provided by Sigma–Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). A random distribution of replicates and populations within experimental systems was applied in all of the three exposure experiments. For adults, tests were carried out in 500 mL polypropylene beakers containing Cd contaminated water ( $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) or clean water at  $12^{\circ}\text{C}$  for 324 h (photoperiod of 16/8-h light/dark), in replicates of 20 organisms (four replicates for the first set of exposure, and three for the exposure after acclimatization). Survivors were counted and dead animals were removed at 18, 36, 60, 84, 118, 156, 204, 258, and 324 h. Animals were fed *ad libitum* with alder leaves (*A. glutinosa*) during the experiment. A common test solution of a nominal Cd concentration of  $100\ \mu\text{g L}^{-1}$  was prepared each day from a stock solution of  $400\ \text{mg L}^{-1}$  ( $\text{CdCl}_2\cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  in demineralized water) using clean water as described in section 2.2. The water in the beakers was continuously renewed (equivalent to four times a day) by peristaltic pumps to ensure a constant Cd exposure.

Juveniles were exposed to  $20\ \mu\text{g L}^{-1}$  of Cd during semi-static exposure in 50-mL polypropylene tubes at  $12^{\circ}\text{C}$  for 258 h (photoperiod of 16/8-h light/dark). For each population, 60 juveniles were exposed individually. Survival was monitored at 18, 36, 60, 84, 118, 156, 204, and 258 h. Juveniles were not fed during the test. The test solution was renewed every 48 h from a common test solution of a nominal concentration of  $20\ \mu\text{g L}^{-1}$  of Cd. It was prepared on the day of the renewal from a stock solution of  $20\ \text{mg L}^{-1}$  of Cd ( $\text{CdCl}_2\cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  in demineralized water) using clean water (see section 2.2).

An additional assay was conducted one year later (in July 2013) with adult males from the six populations in order to confirm outcomes from the first assay. For this second assay, the procedure and the conditions were the same as previously described for adult exposure, except that we used a one-week acclimatization period, that water hardness for maintenance and exposure was  $141\ \text{mg L}^{-1}\ \text{CaCO}_3$ , that exposure was performed with three replicates of 15 individuals, and that nominal concentration of exposure was  $160\ \mu\text{g L}^{-1}$  of Cd.

#### 2.4. Feeding assays :

The feeding rate (FR) was quantified as the rate of leaf consumption, as described by Coulaud et al. (2011). The FR of males from Ardi, Bacu, Bois, and Tour populations was measured under laboratory common garden clean conditions, on two sampling dates (May and December 2012). For this, four replicates of 20 adult males, homogeneous in size, previously acclimatized for 3 weeks in the laboratory (see section 2.2.) were placed in polyvinyl-chloride cylinders (250-mL) capped at their ends with pieces of net (mesh size : 1 mm). Twenty alder leaf discs (20 mm in diameter) previously conditioned were supplied in each container. Containers were put in 30-L tanks under constant aeration, continuously supplied with the same water as for acclimatization, with a 16/8-h light/dark photoperiod, at 12°C. Two containers of only leaf material were deployed to allow correction for leaf surface loss unrelated to gammarid feeding activity. After 7 days of exposure, gammarids were counted (for survival rate assessment) and alder leaf discs were collected. Leaf discs were numerically scanned and the disc surfaces were measured using SigmaScan® Pro v5.0 imaging software (Systat Software). The FR was then calculated and expressed as a consumed surface per gammarid per day ( $\text{mm}^2 \text{ organism}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ). For the second date, the protocol was slightly shortened (4 days), and we considered four replicates of 15 organisms and 7 leaf discs for each population. The FR for the Ardi and Tour populations was also assessed *in situ* in two seasons (June and October 2013 for Ardi, and October 2013 and February 2014 for Tour) by caging male *Gammarus* in their site of origin for 7 days (four replicates, 20 organisms, 20 leaf discs). The temperature was recorded by Tinytag aquatic 2<sup>®</sup> probes every hour during the test. Full details of the *in situ* feeding biotest procedure are reported elsewhere (Coulaud et al. 2011). The size of the test organisms used in each feeding assay was assessed, as described in section 2.2.

#### 2.5. Statistical analysis :

Statistical procedures were carried out with the R software (R Core Team 2012). For Cd acute tests, the effect of the replication and source population on survival time during Cd

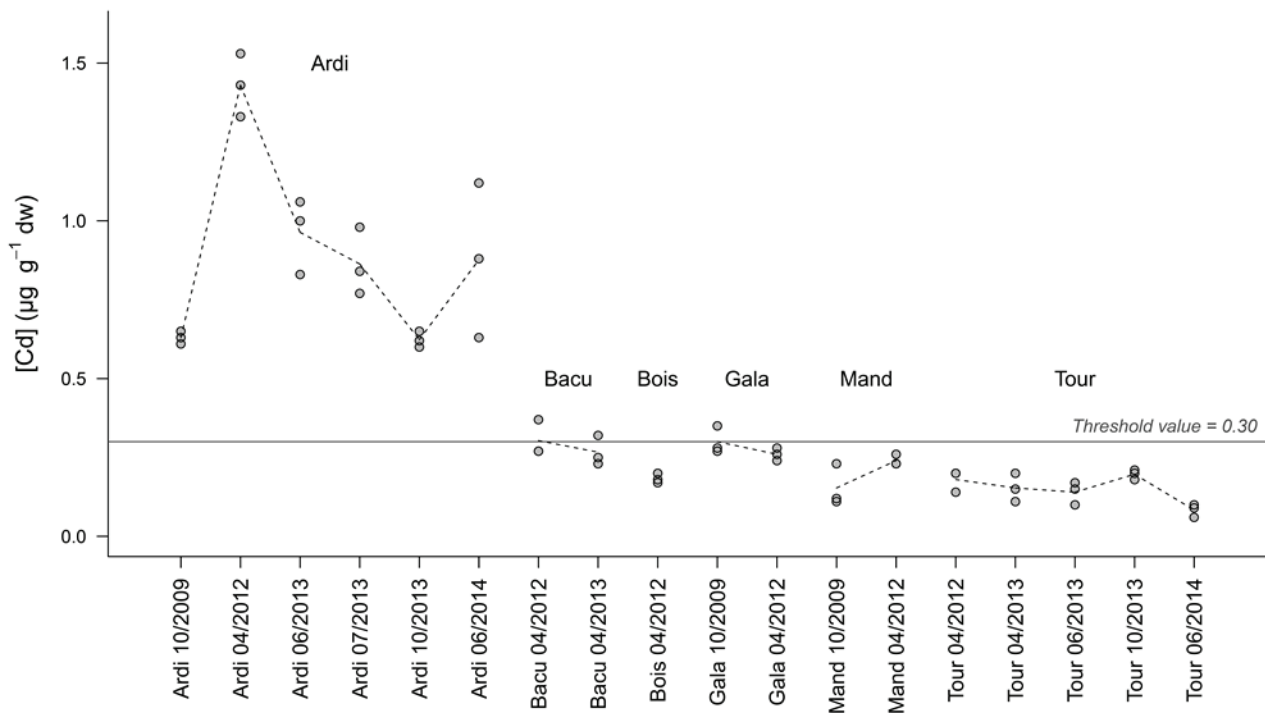
exposure was assessed taking into account right-censored data using the log-rank test as implemented in the R package Survival. Paired comparisons of survival time during Cd exposure between Ardi and each reference population were conducted by means of unilateral Wilcoxon tests. 95% confidence intervals of median LT50s were computed following a bootstrap procedure (random sampling among the different individuals of each condition). Population differences in the body size of the test organisms and FR were analyzed by ANOVA, after Shapiro-Wilk and Bartlett tests for validation of normality and homoscedasticity, respectively.

### **3. Results :**

#### **3.1. The Ardi population inhabits a site characterized by bioavailable Cd contamination :**

The physicochemical characterization of the six study sites is presented in Table 1. Temperature regimes were similar for all sites, except for a lower seasonal variability of temperature in Mand (karstic context), and colder spring and summer in Bois (altitude). In the same way, the water physicochemical characteristics in the Ardi site are within the range of variability recorded among the five reference sites. The only notable point is a weak hardness ( $30 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$  in Ardi vs a range of values from 30 to  $300 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$  for all the study sites) explained by the very low calcic concentration ; nonetheless this low hardness also occurs in the Bacu site. The Ardi and Bacu populations are indeed situated on crystalline bedrock, while the four other sites are located on limestone bedrock. The assessment of bioavailable metallic contamination (Supplementary Table 1) clearly validates that the site inhabited by the Ardi population can be considered as contaminated by Cd on the sampling date of organisms for the toxicity test. The mean level of Cd accumulated by caged gammarids transplanted for 7 days ( $1.4 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ ) is indeed five times above the threshold value defined by Besse et al. (2013) ( $0.30 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ ), threshold value defined as the 95% percentile of the distribution of the background concentrations recorded in French rivers at the national scale. This bioavailable Cd contamination in the site inhabited by the Ardi population

is detected on all dates of experiments (over 5 years, in different seasons), with accumulated Cd concentrations highly contrasting with concentrations recorded in the five reference sites (Figure 1). Concerning other metals, accumulated concentrations in the six study sites are under or very close to the 95% threshold values of significant contamination defined for these elements (Supplementary Table 1).



**Fig.1** Bioavailable Cd contamination in the sites inhabited by the six study populations (Ardi, Bacu, Bois, Gala, Mand, and Tour). Accumulated Cd concentrations in  $\mu\text{g g}^{-1}$  dw (dry weight) in caged gammarids for 7 days (one source population) are presented for campaigns on different dates (three replicates). Dashed lines link mean values between campaigns for each study site.

### 3.2. Comparison of Cd sensitivities reveals tolerance in the Ardi population :

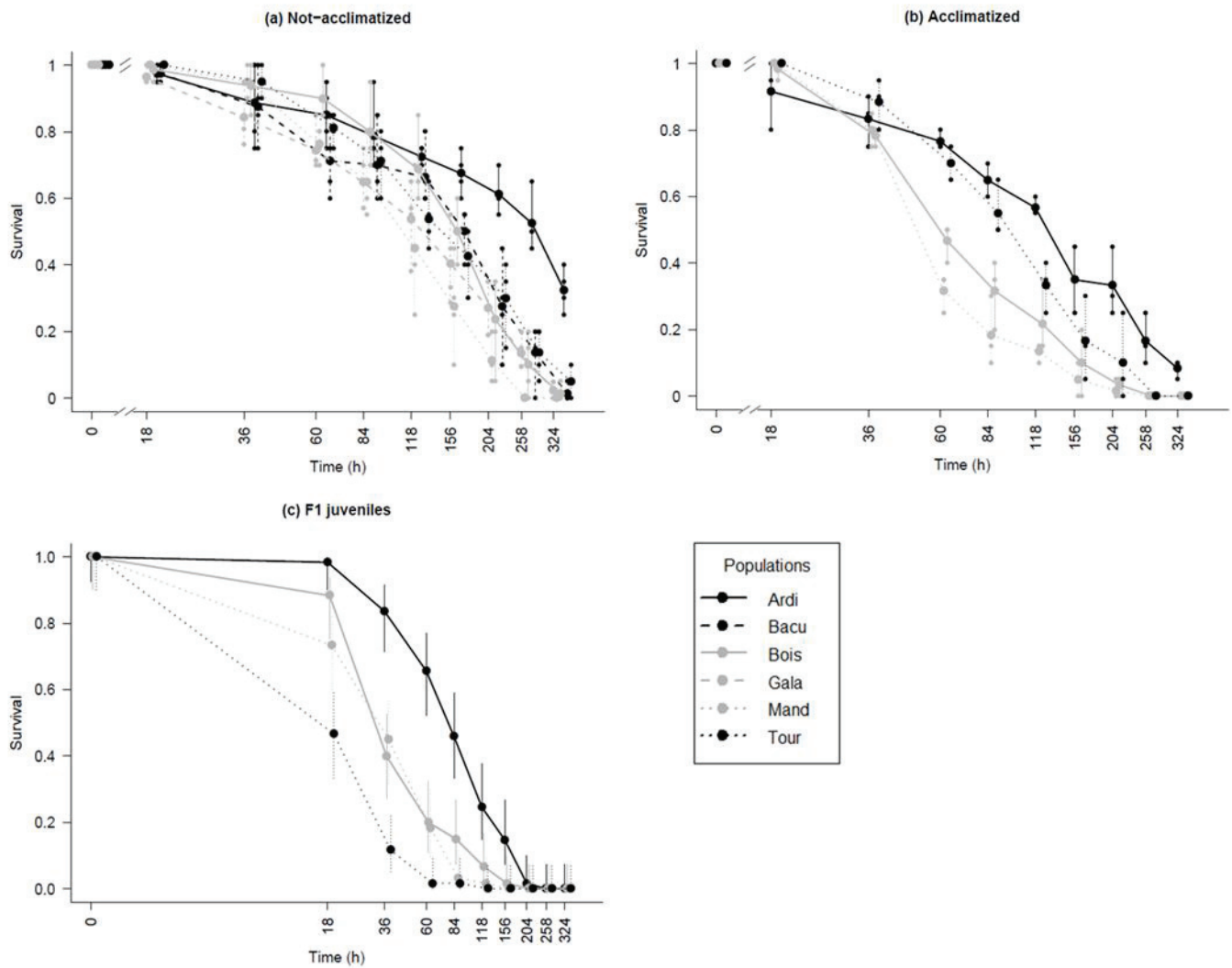
The body size of the test organisms is reported in Supplementary Table 2. No significant difference in the test organism size was detected among populations, except a slightly lower size for adults from the Ardi population (8.7 mm vs 9.5 mm for the mean size of the five reference population). Survival curves during Cd exposure in the laboratory of not-acclimatized males, 3-week acclimatized males, and F1 juveniles are presented in Figure 2. For each population, no difference among replicates was detected (log-rang test :  $p > 0.05$ ). For the three experiments, organisms from the Ardi population appeared to be more tolerant

to Cd than other populations were. Indeed, for the three types of organisms (not-acclimatized, acclimatized, and F1 juveniles), log-rank tests concluded to an effect of the source population on survival pattern (log-rank test :  $p < 10^{-13}$ ,  $p < 10^{-10}$ ,  $p < 10^{-16}$ , respectively). This population effect is still detected with a lesser extent, when the analysis is restricted to the five reference populations (log-rank test :  $p < 10^{-2}$ ,  $p < 10^{-3}$ ,  $p < 10^{-6}$ ). The median lethal times (LT50s reported in Table 2 with 95% confidence intervals) of Ardi in the three experiments (266 h, 130 h, and 79 h, respectively) were nearly twice the mean LT50s for the five uncontaminated populations (138 h, 67 h, and 27 h, respectively). Unilateral Wilcoxon tests concluded in each case that Ardi organisms have a higher median survival time than other populations, for either not-acclimatized males ( $p < 10^{-4}$ ,  $p < 10^{-4}$ ,  $p < 10^{-5}$ ,  $p < 10^{-7}$ ,  $p < 10^{-4}$  for comparison with Bacu, Bois, Gala, Mand, and Tour respectively), either acclimatized males ( $p < 10^{-4}$ ,  $p < 10^{-5}$ ,  $p=0.02$  for comparison with Bois, Mand, and Tour respectively), or F1 juveniles ( $p < 10^{-7}$ ,  $p < 10^{-8}$ ,  $p < 10^{-15}$  for comparison with Bois, Mand, and Tour respectively). Acclimatization to laboratory conditions led to a higher sensitivity to Cd exposure. This pattern was observed for all populations. The second assay conducted one year later with adults from the six populations confirms for this second date the increased Cd tolerance of organisms originating from Ardi population (Supplementary Figure 1).

**Table 2 : LT50 values and 95% confidence intervals of adults and juveniles from the different *G. fossarum* populations exposed to Cd. Survival curves are presented in Figure 2.**

| Toxicity test                                           | Population | Median LT50 | [IC 95%]     |
|---------------------------------------------------------|------------|-------------|--------------|
| Not-acclimatized (100 µg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup> |            |             |              |
|                                                         | Ardi       | 266         | [208;290]    |
|                                                         | Bacu       | 156         | [136;174]    |
|                                                         | Bois       | 156         | [136;173]    |
|                                                         | Gala       | 129         | [99.7;157]   |
|                                                         | Mand       | 109         | [92.7;128]   |
|                                                         | Tour       | 131         | [107;164]    |
| Acclimatized (100 µg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>     |            |             |              |
|                                                         | Ardi       | 130         | [105;145]    |
|                                                         | Bois       | 57.5        | [50.1;72.9]  |
|                                                         | Mand       | 50.9        | [46.7;55.6]  |
|                                                         | Tour       | 91.8        | [75.5;105.4] |
| F1 juveniles (20 µg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>      |            |             |              |
|                                                         | Ardi       | 79.0        | [66.7;101]   |
|                                                         | Bois       | 32.3        | [26.0;36.0]  |
|                                                         | Mand       | 32.8        | [29.6;41.5]  |
|                                                         | Tour       | 16.9        | [14.2;20.8]  |

<sup>a</sup> Cd nominal concentrations of test solutions used for toxicity tests



**Fig.2** Cd sensitivity of the *G. fossarum* populations. Survival during Cd exposure is presented for (a) not-acclimatized males exposed to  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , (b) three-weeks acclimatized males exposed to  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , and (c) F1 juveniles exposed to  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ . (a) and (b) : Small dots represent replicates (survival rate of 20 organisms), large dots represent mean values, vertical segments link minimum and maximum values. (c) : Dots represent mean survival rate of 60 juveniles exposed individually, lines represent binomial 95% confidence intervals.

### 3.3. The feeding rate of Ardi organisms is decreased under laboratory clean conditions :

Results of the feeding experiments under laboratory common garden conditions conducted with Ardi, Bacu, Bois, and Tour populations are presented in Figure 3A and 3B. We observed a significant variability in leaf consumption among the 4 populations for both experiments performed on the two dates, May and December 2012 (ANOVA, population

effect :  $p < 10^{-4}$ ,  $p < 10^{-2}$ , respectively). The population effect was highly diminished when Ardi was excluded from the analysis and the differences were no longer significant for one of the two dates (ANOVA, population effect :  $p = 0.02$ ,  $p > 0.1$ , for May and December 2012, respectively). In fact, Ardi had the lowest average FR among the four populations (60% lower than the average FR of reference populations). The body size of males used in feeding assays was homogenous among populations, except for the first date (May 2012) with the mean size of Ardi organisms slightly smaller than organisms from other populations (Supplementary Table 2). For a mean size of the test organisms of 10 mm, Ardi individuals were a mean 1 mm smaller than Tour individuals, the biggest of the four populations. Nonetheless, the differences observed in FR were not explained by a size effect. Indeed, size heterogeneity was not present for the second date (December 2012), while the lower feeding activity of Ardi organism was still observed. In addition, Coulaud et al. (2011) reported that a body size shifts from 1 mm makes vary the FR of males from the Tour population only by 20%, which is far from the 60% lower value recorded for the Ardi organisms.

*In situ* measurements of the FR of Ardi and Tour organisms on different dates are reported in Figure 3C. For the comparison of FR values assessed at different temperatures (different seasons, different rivers), predictions from the model determined by Coulaud et al. (2011) are represented (straight line in Figure 3C). This model allowed us to predict the FR of male gammarids from the Tour population for different temperatures, here for a size of 9.6 mm (average size of test organisms used for the *in situ* experiments). It appeared that the measurements of FR of Tour organisms on the two dates conformed to this prediction. The FRs of Ardi organisms were also in the range of this prediction. This led us to conclude that the lower FRs recorded for Ardi under the laboratory conditions were not due to among-population natural variability of baseline values, since the feeding activity of Tour and Ardi organisms were similar, when the FR is measured in their site of origin.

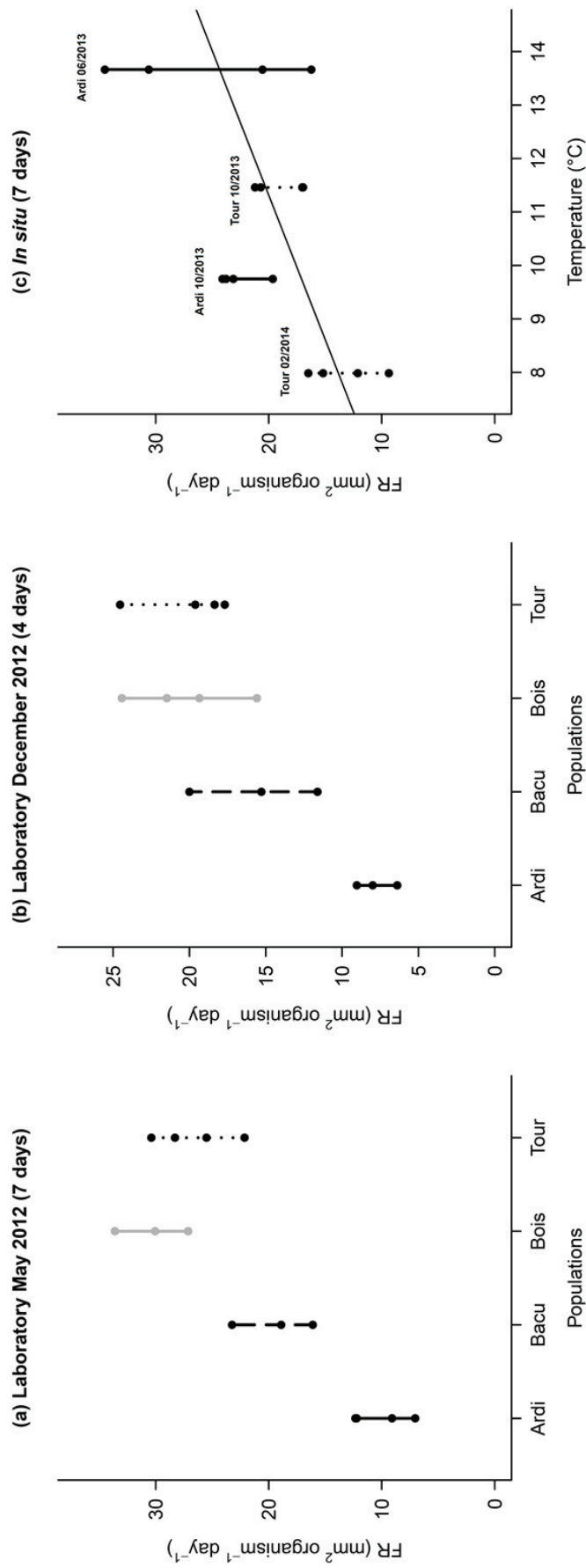


Fig.3 Feeding assays. Feeding rate (FR) was assessed (a) (b) for four populations on 2 dates in the laboratory and (c) *in situ* for Ardi and Tour populations during campaigns at different temperatures. Dots represent replicates, vertical segments link minimum and maximum values. (c) The straight line corresponds to the FR of organisms from the Tour population predicted for different temperatures by the model developed by Coulaud et al. (2011).

#### 4. Discussion :

##### 4.1. Long-term field exposure and Cd tolerance in *Gammarus* :

The biomonitoring of bioavailable metallic contamination confirmed the occurrence of a persistent bioavailable Cd contamination in the site inhabited by the Ardi population, and that the five selected reference sites are not contaminated by bioavailable Cd (in the range of the national background concentrations). This persistence in time of a significant Cd contamination in the site inhabited by the Ardi population (several years, several seasons) contrasting with weak anthropogenic pressure, is consistent with the assumption of a local natural source in a high geochemical background level for Cd in this geographic area (Besse et al. 2013). Hence, the maintenance of the Ardi *Gammarus* population constitutes a very good case for studying in the field the impacts of a long-term contamination on a population historically exposed to low levels of a specific metal, here Cd.

In our study, the comparison of Cd sensitivity among populations showed that the long term exposure of the Ardi population in the field led to the development of an increased tolerance to this metal. The use of a set of five uncontaminated populations living at sites with various physicochemical conditions allowed us to define the basal range of among-population variability in the Cd sensitivity for *G. fossarum* in this geographic area, a range from which the sensitivity of gammarids from the Ardi population is distinct. A major criticism of studies that scrutinized divergence of sensitivity in the field is that they relied solely on paired comparisons of populations (e.g., Maltby and Crane 1994, Khan et al. 2011, Feckler et al. 2012). As underlined by Feckler et al. (2012), other factors than the explanatory variable studied (e.g., land-use of habitats, physiological characteristics of organisms influenced by inter-specific interactions or physicochemical parameters such as water hardness...) could not be excluded as driving factors to explain differences in sensitivity in this design. On the contrary, our design diminishes the likelihood that the influence of any environmental factors other than Cd exposure could explain the lowest sensitivity in Ardi (e.g., potential influence of conductivity, water hardness, thermic or hydrologic regimes, on population life history). Furthermore, the Cd sensitivity of the six populations was assessed under common garden

laboratory conditions, with a strong effort to standardize test organisms (sex, size, etc). Nevertheless, despite this effort, the adult Ardi organisms used in the toxicity tests had a slightly smaller average body size (8.7 mm), with a mean of 9.5 mm for the six populations. However, this small divergence in size is not responsible for the highest Cd tolerance of Ardi organisms. Indeed, although Boets et al. (2012) observed that smaller gammarids are less sensitive to Cd, these observations were made for among-species variability of body size, and only for a large size range (from 9 to 20 mm). Moreover, during the second exposure of the six populations in July 2013 (Supplementary Figure 1), which supported again an increased tolerance of the Ardi population, organism sampling led to significant differences in average body size among the six populations (from 9 to 11 mm for the different populations ; see the legend of Supplementary Figure 1). Despite this size heterogeneity, no relationship between mean body size and the LT50s of populations could be shown. Thus the increased tolerance recorded in the Ardi population is likely only explained by exposure to Cd in the field.

We subsequently investigated the possible costs of Cd tolerance by means of FR measurements. It appeared that the FR of animals from the Ardi population was particularly low under laboratory conditions (figure 3), while baseline values are not divergent from values defined from the reference population Tour (*in situ* measurements). Feeding inhibition is a well-documented response to stress in *Gammarus* (Maltby 1999, Coulaud et al. 2011). The low FR of gammarids from the Ardi population in the laboratory thus indicates that this population was stressed by the transplantation to the laboratory. Considering 7 day feeding assays, Coulaud et al. (2011) demonstrated that the FR of organisms from Tour population was not affected by change in conductivity and that the temperature mainly explained the variability of *in situ* recorded values among different streams presenting a large range of environmental conditions. Here gammarids from the Ardi population largely deviated from this pattern, since their FR was 60% lower than the mean value for reference populations after transplantation in the laboratory for both dates of experimentation (Figure 3a and 3b). Hence we could hypothesize that the modification of the physiology supporting the Cd tolerance of the Ardi organisms makes them more vulnerable to environmental perturbation. This is consistent with the findings of Agra et al. (2011), who showed that the FR of a copper-tolerant clone of *Daphnia longispina* was lower than the average FR of sensitive clones in an

unpolluted environment. More generally, several studies have already reported modifications in life-history traits of tolerant populations under uncontaminated conditions (Postma 1995, Shirley and Sibly 1999), and an increased vulnerability to environmental stressors after long term exposure to contaminants has been documented (*e.g.*, Salice et al. 2010).

#### 4.2. Maintenance and heritability of Cd tolerance under uncontaminated conditions :

The Ardi population has been “historically” exposed to Cd ; consequently, selection of metal tolerance (genetic adaptation) could explain the observed shift in Cd sensitivity, as well as the phenomenon of acclimation during field exposure. Indeed, it has been shown that increased tolerance to metals can be rapidly induced in the laboratory by pre-exposure to sublethal concentrations (*e.g.*, Stuhlbacher and Maltby (1992) for Cd in *G. pulex* ; Khan et al. (1988) in *Palaemonetes pugi*) ; and that conversely, it can be rapidly lost after transplantation from contaminated environments to laboratory clean conditions (*e.g.*, Maltby and Crane (1994) in *G. pulex* ; Klerks and Lentz (1998) in the fish *Gambusia affinis*). These authors suggest that in such situation the increased tolerance is temporary, and is likely to be a consequence of physiological acclimation rather than genetic adaptation. The increased tolerance in the Ardi population appears to be fixed, since it was maintained after 3 weeks of acclimatization to laboratory clean conditions, and in F1 offspring reared in a clean environment. These two results argue in favor of genetic adaptation, contradicting the prediction of our previous quantitative genetic study, which concluded that there was a weak potential for genetic adaptation in *G. fossarum* populations (Chaumot et al. 2009). Nevertheless, this negative conclusion was established only for one population of *G. fossarum* (Tour). In addition, the hypothesis of acclimation cannot be fully rejected as an explanation for the tolerance of the Ardi population, since a relative loss of tolerance (decrease in LT50) of gammarids from Ardi was observed after a 3-week acclimatization under clean conditions, even if this result should be nuanced because all the populations appear to be more sensitive after laboratory maintenance (Figure 3). In the same way, even if the inheritance of Cd tolerance in F1 juveniles is consistent with a genetic basis, non-genetic processes can also

support such a transgenerational tolerance (Klerks et al. 2011). For instance, parental effects (influence of parental exposure on offspring phenotype) have already been reported by Plautz and Salice (2013) in the gastropod *Physa pomilia* in the case of offspring tolerance to Cd. Further complementary experiments (multi-generation maintenance under clean conditions, F2 production, population crossing, or quantitative genetics) are thus required to attest whether or not the tolerance of gammarids from the Ardi population is determined genetically.

#### 4.3. Value for ecological risk assessment :

Such cases of increased tolerance for metals have already been reported several times for crustaceans (reviewed in Amiard-triquet et al. 2012). LT50s of Ardi gammarids are approximately two times higher than the ones of reference populations in the different assays. This moderate shift in sensitivities falls within the range already reported for metal tolerance in gammarids. In the study of Khan et al. (2011), the LT50s of a population of *G. pulex* originating from a metal-contaminated site are about 1.5 fold higher than the LT50s of a metal-naïve population during an *in situ* exposure at sites with high Cu and Zn concentrations. Likewise, a ratio of 2 was found between Zn sensitivities of *G. pulex* organisms collected from stations contaminated or uncontaminated by metallic contamination (recorded in Spicer et al. 1998 from L. Maltby, unpublished observation). In the same way, although not statistically significant, Boets et al. (2012) obtained a ratio of 1.7 for the 96-h median lethal concentration (LC50) during Cd exposure of *G. fossarum* collected at a station contaminated by Zn and Pb. Similar results have been reported for the genus *Palaemonetes* (Crustacea Decapoda) in two different studies. They both showed that populations from metal-contaminated sites present LC50 values 1.8 and 2 fold higher than reference populations when exposed to Cd, for *P. argentine*s and *P. pugi*, respectively (Chiodi Boudet et al. 2013, Khan et al. 1988). Hence, as in previous studies on aquatic invertebrates, the shift in toxicological sensitivities induced by the long-term field exposure of the Ardi population to Cd appeared to be moderate, as regards the factor of increased tolerance that can be encountered in some

cases of adaptation to other contaminants. For example, the sensitivity to pyrethroids in *Hyallela azteca* (Crustacea Amphipoda) can differ by at least 550-fold, and these differences in sensitivity have a genetic basis (Weston et al. 2013).

On the contrary, we demonstrated that a significant cost of this moderate tolerance to metals exist in the Ardi population. Indeed, feeding inhibitions in *Gammarus*, such as the one recorded during transplantation of Ardi organisms under clean conditions, are predictive of impairments of *Gammarus* life-history traits and population dynamics (Maltby 1999, Baird et al. 2007, Coulaud et al. 2015), or of further disruption of ecosystem processes (Forrow and Maltby 2000). In that sense, an increased population vulnerability to modifications in environmental conditions seems to be one possible indirect effect of the evolution of tolerance in the Ardi population. In the same way, the size distribution in the Ardi population is characterized by a lower mean size of adult organisms compared to the one observed in the five reference populations. Demographic analyses are currently being conducted to gain insights into these alterations in life history. Thus, we suspect that major indirect ecological impacts are concomitant with the development of Cd tolerance in the Ardi population. A recent review reported that micro-evolutionary effects of Cd were demonstrated at Cd concentrations between  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $6290 \mu\text{g L}^{-1}$ , for a water hardness of  $50 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$  (De Coninck et al. 2014). This makes the lowest concentrations for which evolutionary effects have been reported for Cd be slightly above the hazardous concentration for 5% of the aquatic species ( $0.38 \mu\text{g L}^{-1}$ ), which was calculated from conventional toxicity data, reported in the European Union Risk assessment report (De Coninck et al. 2014). In the same way, the current European environmental quality standard for Cd for inland surface waters is fixed at  $0.08 \mu\text{g L}^{-1}$  in soft water environments ( $< 40 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) (European Parliament and Council of the European Union 2013). Thus current regulations appeared to be protective for micro-evolutionary effects induced by long-term exposure. But here we identified such micro-evolutionary or transgenerational processes, with possible associated ecological costs, at a site where the dissolved Cd concentration is only  $0.045 (\pm 0.01) \mu\text{g L}^{-1}$  for a water hardness of  $30 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$  (Supplementary Table 3). Hence, our results reinforce the strong recommendation of De Coninck et al. (2014) to investigate micro-evolutionary effects at

concentrations below the current proposed protective thresholds of acceptable environmental contamination.

## **5. Conclusion :**

Our study demonstrated that a moderate increase of Cd tolerance developed in a *Gammarus* population historically exposed in a field context. This shift in sensitivity is transmissible to offspring and is stable after short term laboratory acclimatization under clean conditions. Further quantitative genetic investigations are necessary for more in depth information on the nature of this acquisition of tolerance, particularly to learn about the mechanisms supporting the ability to inherit modified Cd sensitivity. Along with the development of this tolerance, there are potential ecological costs. Our study revealed that increased tolerance and associated costs evolved in a population inhabiting a site where the dissolved Cd concentration in water is 10 times lower than concentrations for which the phenomenon of micro-evolution have already been reported. Questioning the current protective thresholds of acceptable environmental contamination, this case study supports the need to improve our knowledge of the micro-evolutionary and transgenerational effects of environmental contamination.

## **Acknowledgments :**

The authors thank for financial grants the ANR (Agence Nationale de la Recherche) CESA program GAMMA 021 02 “Variability-adaptation-diversity and Ecotoxicology in gammarids” (2012-2015), and ONEMA (the French National Agency for Water and Aquatic Ecosystems) for its financial support. The authors also thank technical staff of the “Ecotoxicology laboratory” and the “Physico-chemical analysis of aquatic environments laboratory” of Irstea in Lyon, especially R. Recoura-Massaquant, G. Jubeaux, A. Larrose, J. Gahou and L. Dherret, for their assistance in the field experiments and for analyses of trace elements.

## References :

- Agra, A. R., A. M. V. M. Soares, and C. Barata. 2011. Life-history consequences of adaptation to pollution. "Daphnia longispina clones historically exposed to copper". *Ecotoxicology* 20:552-562.
- Amiard-Triquet, C., C. Cossu-Leguille and C. Mouneyrac. 2012. Biomarkers of Defense, Tolerance and Ecological consequences Pages 45-74 in Amiard-Triquet, C., J. C. Amiard, and P. S. Rainbow, *Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects*, CRC Press.
- Baird, D. J., M. N. Rubach, and P. J. Van den Brinkt. 2008. Trait-based ecological risk assessment (TERA): The new frontier?. *Integrated Environmental Assessment and Management* 4:2-3.
- Besse, J.-P., M. Coquery, C. Lopes, A. Chaumot, H. Budzinski, P. Labadie, and O. Geffard. 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Research* 47:650-660.
- Bickham, J. W. 2011. The four cornerstones of Evolutionary Toxicology. *Ecotoxicology* 20:497-502.
- Boets, P., K. Lock, P. L. M. Goethals, C. R. Janssen, and K. A. C. De Schamphelaere. 2012. A comparison of the short-term toxicity of cadmium to indigenous and alien gammarid species. *Ecotoxicology* 21:1135-1144.
- Chaumot, A., P. Gos, J. Garric, and O. Geffard. 2009. Additive vs non-additive genetic components in lethal cadmium tolerance of *Gammarus* (Crustacea): Novel light on the assessment of the potential for adaptation to contamination. *Aquatic Toxicology* 94:294-299.
- Chiodi Boudet, L., P. Polizzi, M. B. Romero, A. Robles, and M. Gerpe. 2013. Lethal and sublethal effects of cadmium in the white shrimp *Palaemonetes argentinus*: A comparison between populations from contaminated and reference sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89:52-58.
- Coulaud, R., O. Geffard, A. Vigneron, H. Quéau, A. François, and A. Chaumot. 2015. Linking feeding inhibition with reproductive impairment in *Gammarus* confirms the ecological relevance of feeding assays in environmental monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34:1031-1038.
- Coulaud, R., O. Geffard, B. Xuereb, E. Lacaze, H. Quéau, J. Garric, S. Charles, and A. Chaumot. 2011. In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research* 45:6417-6429.
- Coutellec, M.-A. and C. Barata. 2011. An introduction to evolutionary processes in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20:493-496.
- Coutellec, M.-A. and C. Barata. 2013. Special issue on long-term ecotoxicological effects: an introduction. *Ecotoxicology* 22:763-766.
- De Coninck, D. I., C. R. Janssen, and K. A. De Schamphelaere. 2014. An approach to assess the regulatory relevance of microevolutionary effects in ecological risk assessment of chemicals: A case study with cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33:453-457.

- European Parliament, Council of the European Union (2013) Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Off J Eur Union L 226:1-17.
- Feckler, A., A. Thielsch, K. Schwenk, R. Schulz, and M. Bundschuh. 2012. Differences in the sensitivity among cryptic lineages of the *Gammarus fossarum* complex. *Science of The Total Environment* 439:158-164.
- Forrow, D. M. and L. Maltby. 2000. Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:2100-2106.
- Geffard, O., B. Xuereb, A. Chaumot, A. Geffard, S. Biagianti, C. Noël, K. Abbaci, J. Garric, G. Charmantier, and M. Charmantier-Daures. 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29:2249-2259.
- Khan, A. T., J. S. Weis, and L. D'Andrea. 1988. Studies of cadmium tolerance in two populations of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 40:30-34.
- Khan, F. R., J. R. Irving, N. R. Bury, and C. Hogstrand. 2011. Differential tolerance of two *Gammarus pulex* populations transplanted from different metallogenic regions to a polymetal gradient. *Aquatic Toxicology* 102:95-103.
- Klerks, P. L. and S. A. Lentz. 1998. Resistance to lead and zinc in the western mosquitofish *Gambusia affinis* inhabiting contaminated Bayou Trepagnier. *Ecotoxicology* 7:11-17.
- Klerks, P. L. and J. S. Weis. 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review. *Environmental Pollution* 45:173-205.
- Klerks, P. L., L. Xie, and J. S. Levinton. 2011. Quantitative genetics approaches to study evolutionary processes in ecotoxicology; a perspective from research on the evolution of resistance. *Ecotoxicology* 20:513-523.
- Maltby, L. 1999. Studying stress: the importance of organism-level responses. *Ecological Applications* 9:431-440.
- Maltby, L. and M. Crane. 1994. Responses of *Gammarus pulex* (amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution* 84:45-52.
- Meyran, J.-C. 1997. Impact of water calcium on the phenotypic diversity of alpine populations of *Gammarus fossarum*. *Ecology* 78:1579-1587.
- Plautz, S. C. and C. J. Salice. 2013. Plasticity in offspring contaminant tolerance traits: developmental cadmium exposure trumps parental effects. *Ecotoxicology* 22:847-853.

- Posthuma, L. and N. M. van Straalen. 1993. Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 106:11-38.
- Postma, J. F., A. van Kleunen, and W. Admiraal. 1995b. Alterations in life-history traits of *Chironomus riparius* (diptera) obtained from metal contaminated rivers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29:469-475.
- R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Salice, C., T. Anderson, and G. Roesijadi. 2010. Adaptive responses and latent costs of multigeneration cadmium exposure in parasite resistant and susceptible strains of a freshwater snail. *Ecotoxicology* 19:1466-1475.
- Shirley, M. D. F. and R. M. Sibly. 1999. Genetic basis of a between-environment trade-off involving resistance to Cadmium in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 53:826-836.
- Spicer, J. I., D. Morritt, and L. Maltby. 1998. Effect of water-borne zinc on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) from populations that differ in their sensitivity to metal stress. *Functional Ecology* 12:242-247.
- Stuhlbacher, A. and L. Maltby. 1992. Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22:319-324.
- van Straalen, N. M. and M. J. T. N. Timmermans. 2002. Genetic Variation in Toxicant-Stressed Populations: An Evaluation of the “Genetic Erosion” Hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8:983-1002.
- Weston, D. P., H. C. Poynton, G. A. Wellborn, M. J. Lydy, B. J. Blalock, M. S. Sepulveda, and J. K. Colbourne. 2013. Multiple origins of pyrethroid insecticide resistance across the species complex of a nontarget aquatic crustacean, *Hyalella azteca*. *PNAS* 110:16532–16537.
- Xie, L. and P. L. Klerks. 2004. Fitness cost of resistance to cadmium in the least killifish (*Heterandria formosa*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:1499-1503.

## Supplementary materials :

**Supplementary Table 1. Characterization of the bioavailable metallic contamination in the six study sites. Mean accumulated concentrations of caged gammarids (transplanted for 7 days from one source population) are presented. Concentrations of metals, limits of quantifications (LQ) and threshold values (TV) of contamination are expressed in  $\mu\text{g g}^{-1}$  dw (dry weight). Detailed protocol and determination of TV are reported by Besse et al. (2013).**

| Mean metal concentrations in caged <i>Gammarus fossarum</i> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ dw ) |      |      |      |      |      |      |      |      |       |       |      |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|------|-------|
| Study site                                                                              |      | Cr   | Co   | Ni   | Cu   | Zn   | As   | Se   | Ag    | Cd    | Pb   | Hg    |
|                                                                                         | TV = | 1.0  | 0.57 | 1.0  | 83.6 | 75.5 | nd*  | nd*  | 0.19  | 0.30  | 0.61 | 0.09  |
|                                                                                         | LQ = | 0.11 | 0.11 | 0.53 | 0.27 | 1.07 | 0.10 | 2.67 | 0.053 | 0.053 | 0.11 | 0.01  |
| Study site                                                                              | Ardi | 0.45 | 0.27 | < LQ | 58.8 | 62.9 | 2.1  | < LQ | 0.20  | 1.43  | 0.65 | 0.047 |
|                                                                                         | Bacu | 0.52 | 0.23 | < LQ | 52.0 | 60.8 | 1.4  | < LQ | 0.16  | 0.30  | 0.64 | 0.047 |
|                                                                                         | Bois | 0.43 | 0.16 | 0.71 | 63.4 | 66.0 | 1.1  | < LQ | 0.21  | 0.19  | 0.13 | 0.052 |
|                                                                                         | Gala | 0.35 | 0.22 | < LQ | 59.0 | 63.5 | 1.0  | < LQ | 0.16  | 0.26  | 0.19 | 0.047 |
|                                                                                         | Mand | 0.70 | 0.21 | 0.65 | 61.1 | 64.9 | 1.3  | < LQ | 0.21  | 0.24  | 0.17 | 0.059 |
|                                                                                         | Tour | 0.56 | 0.21 | < LQ | 55.0 | 66.5 | 1.6  | < LQ | 0.17  | 0.18  | 0.31 | 0.050 |

\*nd = not determined

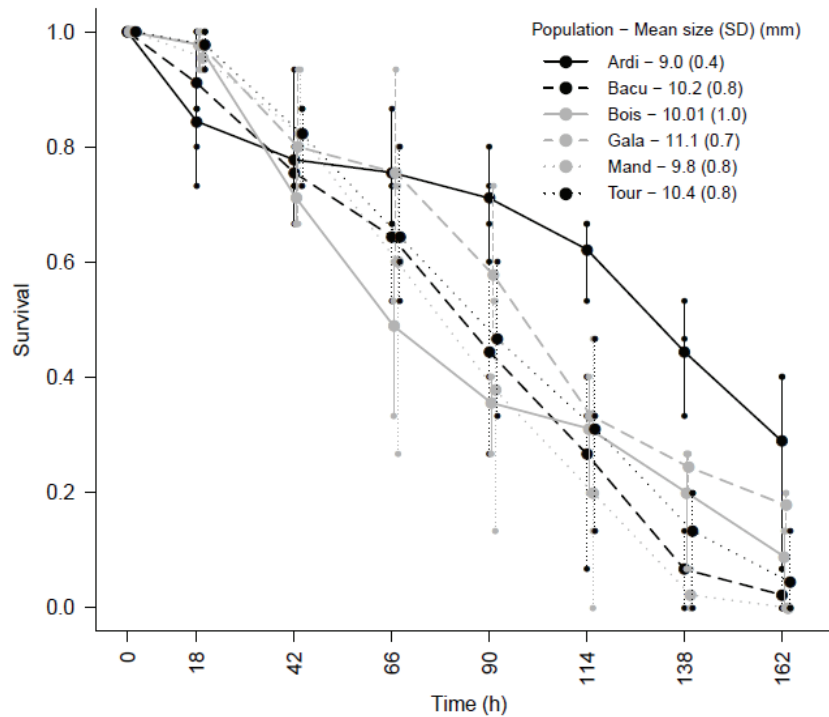
**Supplementary Table 2. Size of gammarid males used for each experiment.**

| Experiment                           | Population        | Mean size (SD) (mm) |
|--------------------------------------|-------------------|---------------------|
| <i>Acute Cd toxicity tests</i>       |                   |                     |
| Not-acclimatized                     | Ardi              | 8,7 (0,7)           |
|                                      | Bacu              | 9,7 (0,6)           |
|                                      | Bois              | 9,8 (0,7)           |
|                                      | Gala              | 9,5 (0,8)           |
|                                      | Mand              | 9,6 (0,6)           |
|                                      | Tour              | 9,6 (0,6)           |
| Acclimatized                         | Ardi              | 9,4 (0,6)           |
|                                      | Bois              | 9,9 (0,7)           |
|                                      | Mand              | 10,0 (0,8)          |
|                                      | Tour              | 10,4 (0,7)          |
| F1 juveniles                         | Ardi              | 2,0 (0,2)           |
|                                      | Bois              | 2,1 (0,1)           |
|                                      | Mand              | 2,1 (0,1)           |
|                                      | Tour              | 2,1 (0,1)           |
| <i>Feeding assays</i>                |                   |                     |
| Laboratory May 2012<br>(7 days)      | Ardi              | 9,4 (0,6)           |
|                                      | Bacu              | 10,2 (0,9)          |
|                                      | Bois              | 9,9 (0,7)           |
|                                      | Tour              | 10,4 (0,7)          |
| Laboratory December 2012<br>(4 days) | Ardi              | 10,6 (0,7)          |
|                                      | Bacu              | 10,0 (0,7)          |
|                                      | Bois              | 10,3 (1,0)          |
|                                      | Tour              | 10,4 (0,8)          |
| <i>In situ</i><br>(7 days)           | Ardi              |                     |
|                                      | 10/2013 (9,7°C)   | 9,9 (0,5)           |
|                                      | 06/2013 (13,7°C)  | 9,7 (1,1)           |
|                                      | Tour              |                     |
|                                      | 02/2014 (8,0°C)   | 9,1 (0,6)           |
|                                      | 10/2013 (11,4 °C) | 9,9 (1,1)           |

**Supplementary Table 3.** Dissolved Cd concentration in water of the site inhabited by the Ardi population on different dates.

| Sampling date | Cd dissolved in water ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |
|---------------|------------------------------------------------|
| 02/10/2009    | 0.036                                          |
| 07/10/2009    | 0.049                                          |
| 30/03/2010    | 0.059                                          |
| 25/05/2010    | 0.029                                          |
| 01/06/2010    | 0.047                                          |
| 08/06/2010    | 0.041                                          |
| 15/06/2010    | 0.056                                          |
| 22/06/2010    | 0.042                                          |

**Supplementary Figure 1.** Complementary Cd toxicity test with the *G. fossarum* populations (July 2013). One week acclimatized males were exposed to  $160 \mu\text{g Cd L}^{-1}$  (nominal concentration). Small dots represent replicates ; large dots represent the mean survival rate ; vertical segments link minimum and maximum survival rates.





## **2. Note n°1 : Mise en évidence de modifications de traits d'histoire de vie au sein de la population Ardi :**

### **1. Introduction :**

Une exposition à long terme à la contamination peut ne pas uniquement se traduire par une augmentation de la tolérance vis-à-vis des contaminants. Des traits d'histoires de vie comme l'âge ou la taille à la maturité sexuelle, la fertilité et la fécondité (Tableau I-2), la croissance ou encore la taille des individus peuvent également être affectés sans pour autant que ces modifications ne soient liées aux effets toxiques des contaminants. Parce que des modifications de ces traits d'histoire de vie peuvent affecter la dynamique et la vulnérabilité des populations concernées (Tanaka et Tatsuta 2013), et impacter des échelles biologiques supérieures (population, communauté, écosystème) (Fleeger et al. 2003, Chapman 2004), étudier les effets des expositions long terme à la contamination sur ces derniers est également important pour appréhender l'ensemble des impacts que peuvent avoir les processus évolutifs mis en place lors des expositions long terme. Des exemples ont déjà été rapportés pour des populations naturelles de crustacés exposées à une contamination métallique (Donker et al. 1993a, Jones et Hopkin 1998, Lopes et al. 2004, Agra et al. 2011, Maltby 1991).

Ainsi, l'objectif de notre étude a été d'identifier si l'exposition historique au cadmium de la population Ardi a induit des modifications de traits autres que la sensibilité au cadmium et la sensibilité au changement d'environnement révélée avec la mesure du taux d'alimentation (Publication n°1).

### **2. Matériels et méthodes :**

Des traits d'histoire de vie de la population Ardi, ainsi que des 5 populations de référence (lot 1 dans le Chapitre II), ont été mesurés et comparés afin de mettre en évidence une éventuelle divergence de la population Ardi. Trois traits d'histoire de vie en lien avec la dynamique de population ont ainsi été étudiés :

*Le taux de croissance* : Il a été mesuré au laboratoire sur deux classes de taille de juvéniles prélevés *in situ* en mars et avril 2013 et préalablement stabulés pendant deux semaines. Le test a été conduit à 12°C à une conductivité de l'ordre de 500  $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$  et pour une durée de 24 jours pour la première classe de taille ( $3,8 \pm 0,2$  mm), et de 19 jours pour la deuxième ( $5,3 \pm 0,3$  mm). Il a été mesuré pour les populations Ardi, Bacu, Bois, Mand, Tour.

*La distribution de taille des femelles en reproduction* : Elle a été obtenue à partir de 7 relevés démographiques *in situ* réalisés en avril et décembre 2012 pour les populations Ardi, Bacu, Bois, Mand, Tour.

*La fécondité des femelles* : Elle a été déterminée pour les populations Ardi, Bacu, Bois, Gala, Mand et Tour en comptant les embryons de femelles prélevées *in situ* entre avril et juin 2012. Seules les femelles dont les embryons étaient au stade 2, 3 ou 4 ont été prises en compte.

La description détaillée des protocoles mis en place est présentée dans le chapitre matériels et méthodes (*section II.4*).

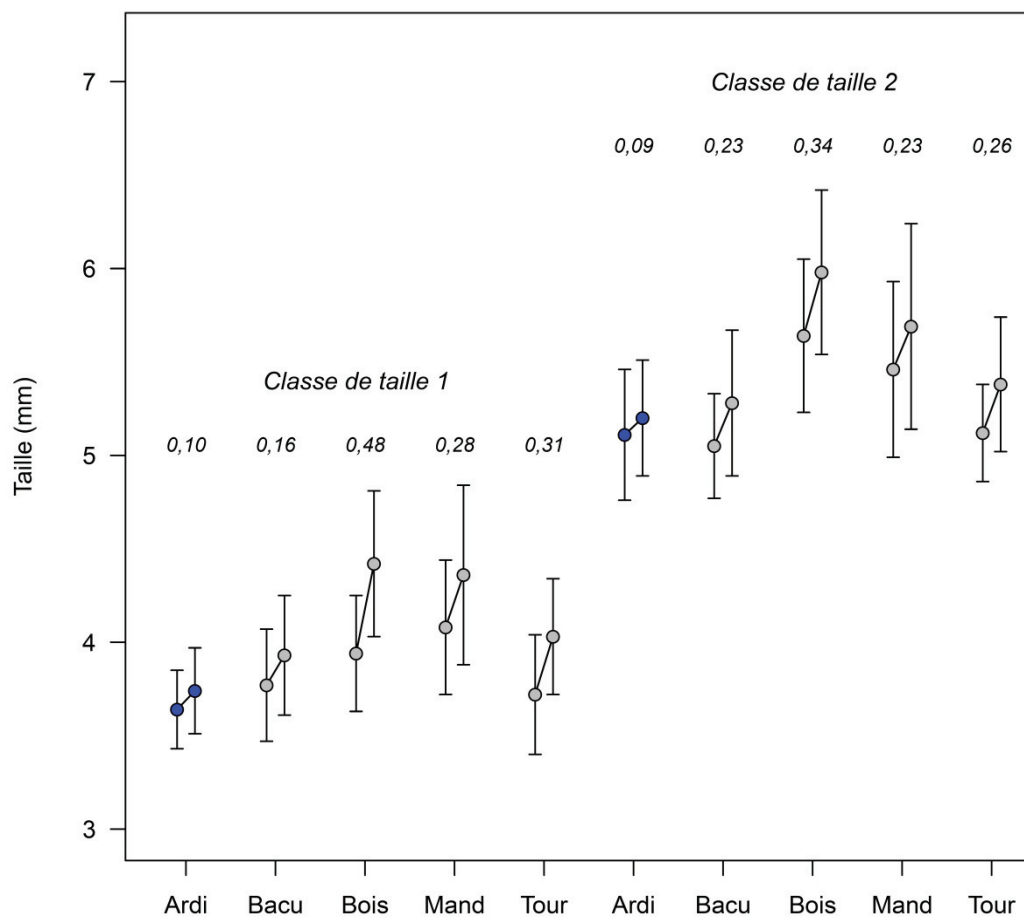
### **3. Résultats et discussion :**

#### *Taux de croissance*

Les deux classes de tailles étudiées correspondent à des classes de taille sur lesquelles des mesures du taux de croissance de juvéniles de *G. fossarum* ont déjà été réalisées au laboratoire d'Ecotoxicologie d'Irstea de Lyon-Villeurbanne (Coulaud 2012). A la fin de l'expérience le décompte des organismes a montré un très bon taux de survie pour l'ensemble des conditions (taux de survie moyen de 87%). Le Tableau A-2 présenté en annexe reprend pour chaque condition le nombre de réplicats, la taille moyenne des individus à t0, le taux de survie et la taille moyenne des individus à la fin de l'expérience, ainsi que la température moyenne enregistrée en continu pendant toute la durée du test.

Les résultats obtenus pour la mesure du taux de croissance sont présentés en Figure III-1. Pour toutes les populations et pour les deux classes de taille, le taux de croissance est

relativement faible, avec une valeur moyenne pour les populations de référence de 0,31 ( $\pm$  0,13) mm pour la classe de taille 1, et de 0,27 ( $\pm$  0,15) mm pour la classe de taille 2. Ce faible taux de croissance s'explique par la durée relativement courte de l'expérimentation par rapport à la vitesse de croissance des gammarus, et par le fait que le test a été conduit à 12°C, température pour laquelle la vitesse du taux de croissance de *G. fossarum* est modérée (Coulaud 2012). Les valeurs obtenues ici sont par ailleurs du même ordre de grandeur que les mesures obtenues par Coulaud (2012) pour les populations Ardi et Tour, ainsi que du taux de croissance prédit par le modèle établi pour *G. fossarum* par Coulaud et al. (2014).



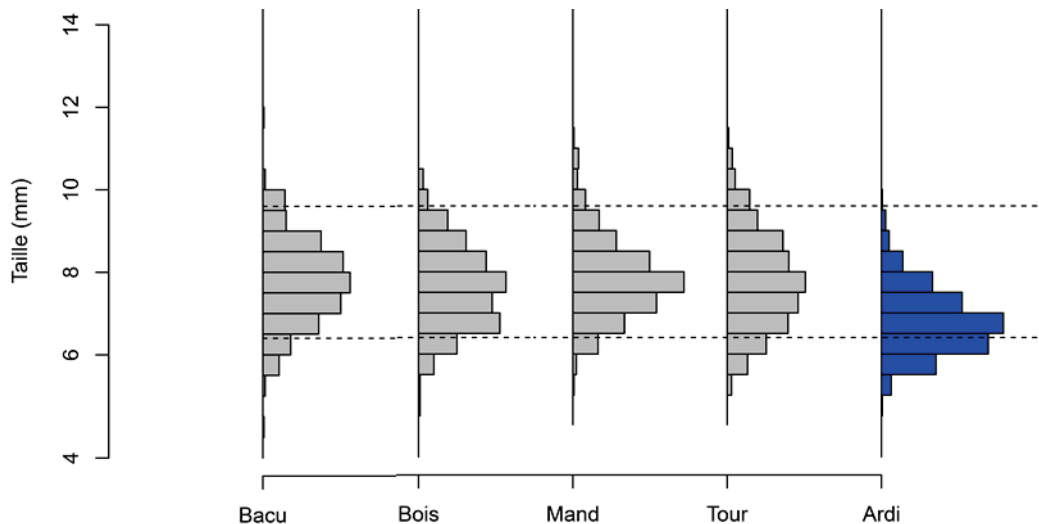
**Figure III-1 : Taux de croissance au laboratoire.** Pour chaque population, le premier point représente la taille moyenne  $\pm$  l'écart-type (mm) des individus à t0 mesurée sur un sous échantillon d'individus, et le deuxième point la taille moyenne  $\pm$  l'écart-type (mm) des individus à la fin du test soit après 24 jours pour la classe de taille 1 et après 19 jours pour la classe de taille 2. Les valeurs en italique correspondent à la moyenne (mm) des croissances individuelles mesurées au cours du test calculées en soustrayant la taille moyenne à t0 de la population et de la classe de taille appropriée, à la taille finale de chaque individu.

Comme pour le taux d'alimentation et la sensibilité au cadmium, il existe une variabilité entre les quatre populations de référence. La divergence maximale entre populations de référence, calculée en faisant le ratio du taux de croissance le plus important (population Bois) et du taux de croissance le plus faible (Bacu), est égal à 3,0 pour la classe de taille 1, et à 1,5 pour la classe de taille 2.

Par ailleurs, pour la classe de taille 1, le taux de croissance de la population Ardi diverge de celui des populations de référence par un facteur équivalent à celui constaté entre les populations de référence elles-mêmes (facteur égal à 3,0 entre Ardi et la moyenne des quatre populations de référence). Toutefois, pour les deux classes de taille, Ardi est la population présentant le taux de croissance le plus faible. Ceci est particulièrement mis en évidence avec les résultats obtenus pour la classe de taille 2 pour laquelle le gain taille de la population Ardi à la fin du test n'est que de 0,09 mm contre au minimum 0,23 mm pour les populations de référence. Il est 2,6 fois plus faible que le taux de croissance moyen des populations de référence, excédant ainsi la divergence maximale mesurée entre les populations de référence elles-mêmes. Il est également 2,5 fois inférieur au taux de croissance de la population Bacu. Ainsi, il apparaît ici que l'exposition à long terme à la contamination de la population Ardi, est induit une modification du taux de croissance, dans le sens d'une diminution, de cette population.

#### *Distribution de taille des femelles en reproduction*

Grâce aux 7 relevés démographiques un grand nombre de femelles en reproduction ont été prélevées *in situ* à différentes dates (Tableau II-2) et mesurées, permettant ainsi d'établir les distributions de taille de celles-ci pour les cinq populations étudiées présentées en Figure III-2.



**Figure III-2 : Distribution de taille des femelles en reproduction prélevées *in situ* et mesurées au cours des 7 relevés démographiques en classe de taille de 0,5 mm.**

Les distributions représentées en Figure III-2, montrent une grande similitude de la structure en taille des femelles en reproduction entre les quatre populations de référence. Elles présentent en outre une taille moyenne et un écart-type, égaux entre eux à 0,2 mm près pour ces deux valeurs statistiques.

Concernant la population Ardi, il apparaît que celle-ci présente une distribution différente de celle des populations de référence avec un décalage vers les classes de taille inférieures. Cette population présente en effet une classe modale avoisinant 6 mm tandis que pour les populations de référence, ce pic de densité s'observe plutôt pour des individus appartenant à des classes de taille avoisinant 8 mm. Ceci est également visible avec la taille moyenne des femelles en reproduction (Tableau III-1), qui pour la population Ardi est inférieure d'1 mm à celle des populations de référence. On observe par ailleurs un déficit en individus de grande taille, visible à la fois sur la Figure III-2, et avec le 95<sup>ème</sup> centile des tailles observées qui n'est que de 8,7 mm pour la population Ardi alors qu'il est compris entre 9,8 à 10,2 mm pour les populations de référence. Enfin, cette étude menée *in situ* met également en évidence que la population Ardi présente un nombre de femelles en reproduction de petites tailles plus important que les populations de référence, ce qui pourrait être le signe d'une maturité précoce (*i.e.* à une taille inférieure) au sein de cette population par rapport aux autres populations.

**Tableau III-1 : Tableau descriptif des mesures de taille de femelles en reproduction obtenues.**

| Population | Nombre total de femelles | Taille moyenne (SD) | 95 <sup>ème</sup> centile | 5 <sup>ème</sup> centile |
|------------|--------------------------|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| Ardi       | 666                      | 7,3 (0,8)           | 8,7                       | 6,2                      |
| Bacu       | 392                      | 8,3 (1,0)           | 10,1                      | 6,6                      |
| Bois       | 298                      | 8,1 (1,0)           | 9,8                       | 6,6                      |
| Mand       | 390                      | 8,3 (1,0)           | 10,0                      | 6,9                      |
| Tour       | 633                      | 8,3 (1,2)           | 10,2                      | 6,5                      |

### Fécondité

Pour chacune des 6 populations, le comptage du nombre d'embryons de femelles de tailles variées a permis de retrouver une relation positive entre la taille et la fécondité ce qui est bien connu chez les gammarès (démonstré notamment par Coulaud (2012), Coulaud et al. (2014), Pöckl (1993) chez *G. fossarum*). Les résultats obtenus sont présentés individuellement pour chaque population en Annexe en Figure A-1. Par ailleurs, les cinq populations de référence, Bacu, Bois, Gala, Mand et Tour, ne présentent pas la même relation taille-fécondité ( $p$ -value ANCOVA < 0,05) ce qui est notamment visible avec les droites différentes sur la Figure III-3. Il en va de même lorsque Ardi est intégrée à l'analyse. De plus si l'on compare la population Ardi individuellement à chacune des populations de référence, l'effet population et l'interaction taille x population sont significatifs dans certains cas et non significatifs dans d'autres, ce qui tend à indiquer que la fécondité de la population Ardi est globalement similaire à celle des populations de référence.

Toutefois, la comparaison de la fécondité des femelles de la population Ardi à celles des populations de référence n'est pas complètement valide du fait de la distribution de taille des femelles en reproduction décalée de la population Ardi. En effet, malgré un effort d'échantillonnage pour prélever des grandes femelles au sein de la population Ardi, et des petites femelles pour les populations de référence qui aurait permis de couvrir les mêmes gammes de taille, la fécondité de la population Ardi a pu être déterminée en majorité pour des petites femelles d'une taille inférieure à 7,5 mm (65 % des femelles étudiées), qui ne sont pas ou peu représentées dans les autres populations (en moyenne 14 % des femelles étudiées) comme cela est visible sur la Figure III-4.

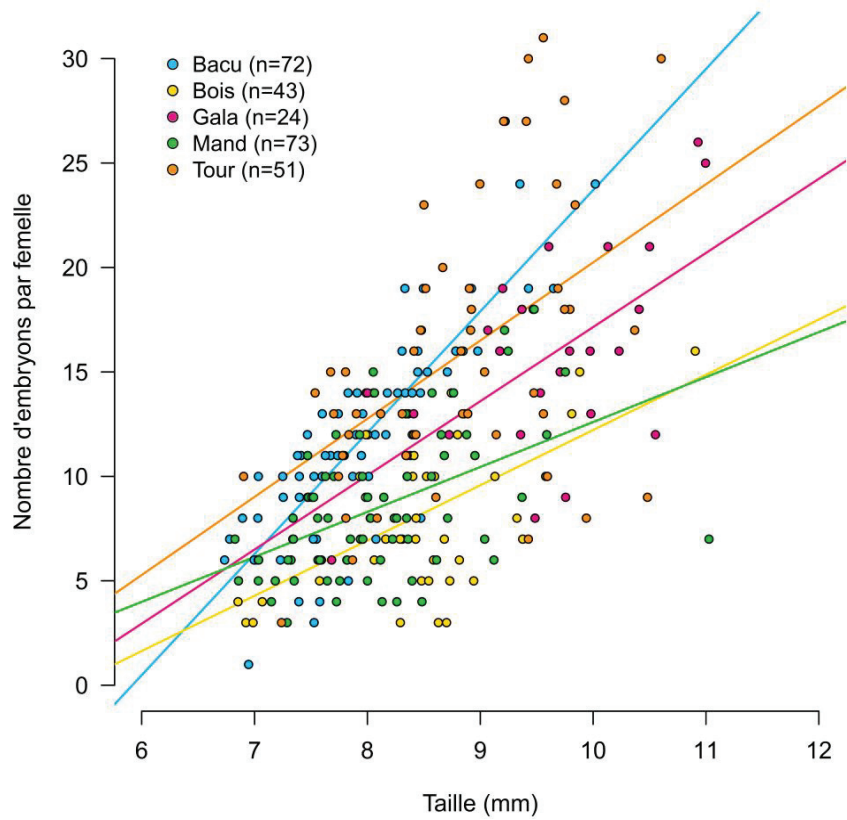


Figure III-3 : Fecondité de femelles prélevées *in situ* des cinq populations de référence étudiées.

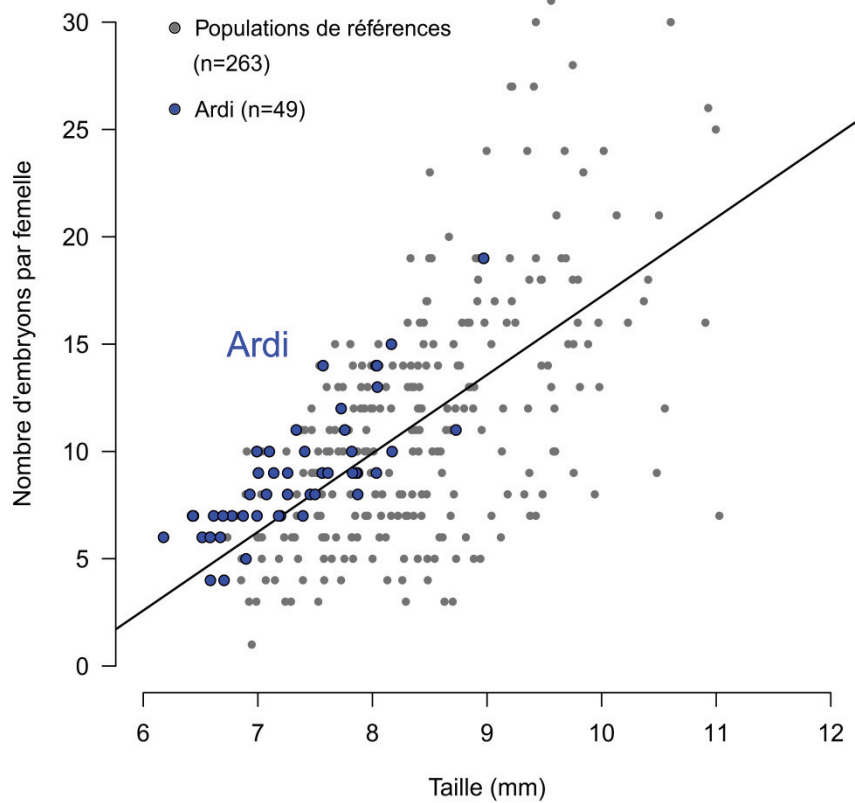
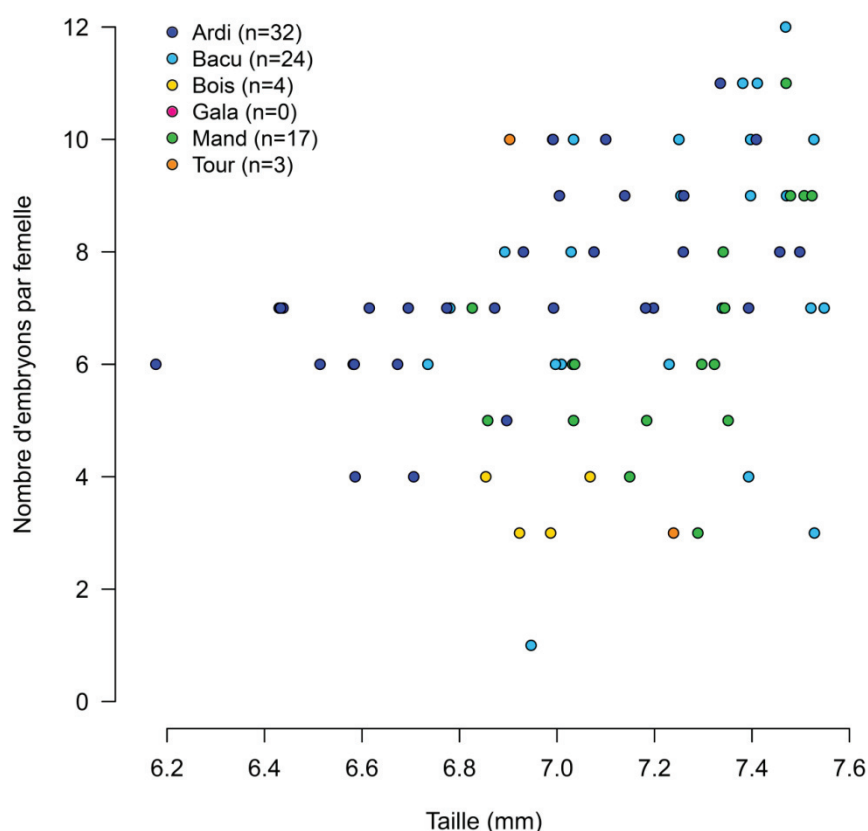


Figure III-4 : Fecondité de femelles prélevées *in situ* pour la population Ardi par rapport aux mesures réalisées pour les cinq populations de référence.

Si l'on s'intéresse maintenant à la fécondité des femelles d'une taille inférieure à 7,5 mm (Figure III-5) qui représentent la majorité des femelles en reproduction de la population Ardi (III-2), il apparaît que les femelles de la population Ardi ont une fécondité équivalente à celle des femelles de classes de taille supérieures pour les populations de référence (Figure III-5). Ainsi, il semble que pour les premières classes de taille de femelles en reproduction (avant 7 mm), la population Ardi présente une fécondité supérieure aux populations de référence.

Ces résultats sont préliminaires et des analyses plus approfondies sont nécessaires pour conclure quant à la modification de la fécondité de la population Ardi en réponse à l'exposition long terme à la contamination cadmique.



**Figure III-5 : Fécondité de femelles prélevées *in situ* d'une taille inférieure à 7,5 mm pour la population Ardi et les cinq populations de référence. Pour la population Gala, aucune femelle dont la fécondité a été étudiée n'a une taille inférieure à 7,5 mm.**

#### 4. Conclusion :

L'étude du taux de croissance, de la distribution de taille des femelles en reproduction, et de la fécondité des femelles au sein de populations naturelles a révélé une divergence de la population Ardi pour les deux premiers, une modification de la fécondité des femelles de la population Ardi restant encore à confirmer. Ainsi, ces résultats indiquent qu'une exposition à long terme au cadmium peut en plus d'une modification de la sensibilité des individus induire chez *G. fossarum* des modifications de traits d'histoires de vie en lien avec la dynamique de populations. Ces modifications peuvent être le résultat de coûts de la tolérance (Postma et al. 1995a, 1995b ; Jones et Hopkin 1998) tout comme être le signe d'une adaptation de l'histoire de vie de la population Ardi comme cela a été proposé pour l'isopode terrestre *Porcellio scaber* par Donker et al. (1993a) et l'isopode aquatique *Asellus aquaticus* par Maltby (1991). Ces deux hypothèses seront discutées au cours du Chapitre IV.



#### CHAPITRE IV : ETUDE DES MECANISMES POPULATIONNELS D'ACQUISITION DE LA TOLERANCE AU CADMIUM CHEZ *GAMMARUS FOSSARUM* :

Ce chapitre, composé de deux publications et de trois notes, regroupe un ensemble de travaux mis en place pour identifier les mécanismes populationnels soutenant, ou pouvant soutenir, l'évolution d'une tolérance (*i.e.* au sens d'une baisse de la sensibilité toxicologique) chez *G. fossarum*.

- 1- Cette phase des travaux de thèse a dans un premier temps consisté à répondre à cette problématique avec une approche *a priori* évaluant les voies possibles d'une augmentation de la tolérance au sein de populations naturelles de référence de *G. fossarum*. Deux types d'expérimentations ont été mises en place : (1) des protocoles de génétique quantitative (full-sib, half-sib designs) permettant d'estimer l'héritabilité et de décomposer la variance phénotypique de la tolérance au cadmium entre composantes génétiques et environnementales, et ainsi d'évaluer le potentiel d'adaptation génétique de *G. fossarum* à une exposition au cadmium ; et (2) une expérience de sélection et d'exposition parentale au laboratoire permettant d'évaluer de manière empirique les processus populationnels pouvant soutenir une augmentation de la tolérance au cadmium entre générations.
- 2- Dans un deuxième temps, la question des mécanismes populationnels d'acquisition de la tolérance au cadmium chez *G. fossarum* a été abordée par une approche rétrospective. Ainsi, le niveau moyen et la distribution intra-population de la sensibilité au cadmium de la population Ardi, ainsi que l'évolution de ceux-ci en conditions non contaminées, ont été étudiés à partir de juvéniles F1 produits au laboratoire à partir de couples avec différents temps de stabulation (cohortes de type 1 à 3).



## 1. Etude *a priori* à partir de populations naturelles de référence :

**Publication n°2 : Différences de sensibilité au cadmium liées à un déterminisme maternel et non héritées génétiquement au sein de populations naturelles de référence du crustacé dulçaquicole *G. fossarum*.**

**Mothers and not genes determine inherited differences in cadmium sensitivities within unexposed populations of the freshwater crustacean *Gammarus fossarum***

### **Abstract :**

Deciphering evolutionary processes occurring within long-term contaminated populations is important for the ecological risk assessment of toxic chemicals. Whereas increased tolerance to contaminants is well documented in aquatic animal populations, whether or not such phenotypic changes can occur through genetic adaptation continues to be debated for natural populations. In that sense, several studies with the freshwater crustacean *Gammarus* concluded in a weak potential for genetic adaptation to cadmium (Cd), while others reported inheritable increased tolerance in natural Cd-contaminated populations. Using quantitative genetics and artificial selection experiments, the present study sought to further assess the potential of *Gammarus* populations to genetically adapt to Cd. By combining the control of the reproductive cycle of this species in the laboratory and protocols of individual Cd exposure, we conducted paternal and maternal half sib analyses to establish the genetic and environmental sources of variance in Cd-sensitivity of neonates. Prior to experiments, computations allowed an optimization of the experimental design in order to increase the power to detect additive genetic variance. The main findings are the existence of strong between-brood variability along with weak heritability of Cd sensitivity within *Gammarus* populations. In addition, this study revealed a significant maternal effect on individual Cd sensitivity. This result sheds new light on the importance of maternal influence in micro-evolutionary processes occurring in contaminated environments.

**Keywords :**

Evolutionary ecotoxicology, adaptation, gammarids, contaminants, metals, quantitative genetics

**1. Introduction :**

Deciphering evolutionary processes occurring within long-term contaminated populations is important for the ecological risk assessment of toxic chemical contaminants (Bickham 2011, Coutellec and Barata 2011, De Coninck et al. 2014). The fact that long-term exposure to a pollutant can induce increased tolerance in aquatic animal populations is now well documented (Johnston 2011). Whether such phenomena of increased tolerance occur through genetic adaptation and/or acclimation processes has not yet been fully elucidated, especially for field studies involving natural populations. Indeed the examination of transgenerational or evolutionary responses to pollution has most often been experimentally studied in model species suitable for multi-generation exposure in laboratories (Coutellec and Barata 2013). Yet the application of quantitative genetics in an ecotoxicological framework offers an alternative strategy to track the potential of the evolution of tolerance to contaminants within field populations (Klerks et al. 2011). As exemplified with the fish sheepshead minnow (Klerks and Moreau 2001), estimating the heritability of sensitivity based on resemblances among relatives can be operated for individuals originating from natural populations. In the freshwater amphipod *Gammarus*, a highly ecologically relevant species commonly used in aquatic ecotoxicology both in the laboratory and in the field (*e.g.* reviewed in Kunz et al. 2010), previous work in evolutionary ecotoxicology has focused on the variability of the sensitivity to heavy metals, with contradictory results on the possibility for *Gammarus* populations to adapt to metals in the field (Maltby and Crane 1994, Khan et al. 2011, Boets et al. 2012). In this context, we previously conducted a sib-analysis study with *Gammarus fossarum* (Chaumot et al. 2009). This study demonstrated the existence of between brood differences in lethal tolerance to Cd, but such differences were not heritable since additive genetic variation was weak (Chaumot et al. 2009). This result predicts that

*Gammarus* populations would not likely evolve genetic resistance in a context of persistent Cd pollution. In contrast, we have recently identified a natural population of *G. fossarum* in a stream long-term contaminated by natural geochemical source of Cd. This population had developed Cd tolerance that is transmissible to offspring, even when genitors were placed in an uncontaminated environment (Vigneron et al. 2015). Moreover, that tolerance and associated costs have evolved for water Cd concentrations that are ten times lower than concentrations for which the phenomenon of micro-evolution in response to contaminants has already been reported (De Coninck et al. 2014). These findings raised questions from an applied point of view, because these concentrations are below the current regulatory protective thresholds of acceptable environmental Cd contamination (e.g. European environmental quality standard).

This recent observation of increased Cd tolerance in the field, along with the fact that the conclusion on the absence of additive genetic variance in Cd sensitivity can be disputed with regards to the lack of statistical power of the sib design employed (Chaumot et al. 2009), involve to more thoroughly reconsider whether naïve populations of *G. fossarum* have the potential to evolve genetically in response to Cd, and thus to better understand the underlying mechanism of Cd tolerance in this species. To this end, the present study adopted approaches supplying predictive measurements of the potential to adapt genetically through quantitative genetics. More specifically, considering individuals originating from two naïve populations, we employed approaches described by Klerks et al. (2011) that aimed to answer two different questions : (i) Is there an empirical response to selection for resistance to Cd? (ii) Is Cd sensitivity influenced by the pedigree of individuals and is it heritable? To answer the first question, we mimicked the first step of a selection process in a short-term artificial selection experiment with the objective of assessing the possibility of selecting tolerant individuals. To accomplish this task, the sensitivity of offspring from males having survived after a Cd exposure lethal for 80% of the population was compared to the offspring of unexposed genitors. We responded to the second question by means of sib analyses that decomposed the phenotypic variance ( $V_P$ ) of the trait “Cd-sensitivity” (individually assessed by survival time of juvenile organisms exposed to Cd) between the different causal components of variance, namely (i) additive genetic variance ( $V_A$ ), (ii) non-additive genetic variance, which includes

both dominance effects ( $V_D$ ) and epistatic interactions ( $V_I$ ), and (iii) environmental variance ( $V_E$ ) (Falconer and Mackay 1996). The comparison of Cd sensitivity in either full-sibs or paternal or maternal half-sibs therefore allowed estimating  $V_A$  and its proportionate phenotypic variance of Cd sensitivity, *i.e.* the narrow sense heritability ( $h^2$ ) of Cd sensitivity, as well as a nongenetic maternal component within environmental influences. Two different naïve populations of *G. fossarum* from uncontaminated streams were tested since heritability of a given character is specific to a particular population under particular conditions (Falconer and Mackay 1996). In addition, the experimental design was optimized (number of pairs vs number of juveniles tested per brood) by means of computations before experiments, seeking to maximize the statistical power for  $V_A$  detection. Overall, beyond the validation of the hypothesis of a weak potential for *Gammarus* populations to genetically adapt to Cd, the experimental design demonstrated an unexpected significant maternal effect on the distribution of individual Cd sensitivity within populations. This result sheds new light on the importance of maternal influence in transgenerational processes underlying evolution of tolerance to contaminants.

## **2. Materials and methods :**

### **2.1. Collection of test organisms, maintenance, and experimental conditions :**

*G. fossarum* adults were collected at an upstream location of the Bourbre River, Isère, France (45°34'09.9"N ; 05°27'33.9"E), a population denoted "Tour," which corresponds to the population used in our previous study (Chaumot et al. 2009). In addition, a second population, "Bois," was selected from at an upstream location in a tributary of the Guiers Mort River, Isère, France (45°24'04.5"N ; 05°45'36.5"E). A previous biomonitoring program demonstrated the absence of bioavailable metallic contamination in these stations, notably for Cd (Besse et al. 2013, Vigneron et al. 2015). *G. fossarum* were kick-sampled using a hand net and quickly transported to the laboratory in plastic bottles containing ambient freshwater. Before experiments, the organisms were maintained for 2 weeks in 20-L tanks under constant aeration and continuously supplied with drilled groundwater (conductivity 500  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ), a

16/8-h light/dark photoperiod, and a temperature of 12°C. They were fed *ad libitum* with conditioned alder leaves (*Alnus glutinosa*) and supplied weekly with *Tubifex* larvae.

In exposure conditions, a random spatial distribution of replicates, populations, and/or conditions within experimental systems was applied in all experiments. Cd was provided by Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). To assess offspring Cd sensitivity, the sensitivity of juveniles was assessed individually by measuring time during exposure to the lethal level of 20  $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ , by means of semi-static exposure in 50-mL polypropylene tubes (BD FalconT). Survival was monitored every day until all individuals died. The test solution was renewed every 48 h from a common test solution prepared the day of the renewal from a stock solution of 20  $\text{mg Cd L}^{-1}$  ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  in demineralized water) and with drilled groundwater mixed with osmosed water at constant conductivity (300  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ), water hardness (141 and 106  $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$  for the short-term experiment of artificial selection and sib analyses, respectively). For each experiment, juveniles were exposed at a predetermined age (see below), taking into account their date of release from the maternal brood pouch.

## 2.2. Short-term experiment of artificial selection :

The 20% most Cd-resistant male genitors within a sample of 200 mating pairs from the Tour population were selected by truncation (Falconer and Mackay 1996), during an acute exposure to Cd (80% mortality including postexposure mortality). For this, two weeks after field sampling, 200 mating pairs in the last stage of their reproductive cycle were isolated (as described in Geffard et al. (2010)) and exposed to 100  $\mu\text{g Cd L}^{-1}$  for 4 days during semistatic exposure, in replicates of ten pairs in 500-mL polypropylene beakers. The test solution was renewed every 24 h from a common solution of a nominal 100  $\mu\text{g Cd L}^{-1}$  concentration prepared every 24 h. Animals were not fed during the exposure and dead animals were removed every day. One hundred additional mating pairs were submitted to the same treatment except for Cd exposure in order to provide control genitors. Replicates were pooled after exposure in 6-L tanks and maintained under control conditions for approximately 2 months. During the first 2 weeks, juveniles present in marsupium were released by females, and the first fertilization and egg laying occurred. At this stage, the juveniles released were

removed from all conditions, and females in Cd-exposed treatment were also discarded. Afterwards, three sets of genitors denoted S-20%, C-I and C-II, were constituted : S-20% grouped males of Cd-selected individuals mated with unexposed females ; two replicates of the control condition (C-I and C-II) were formed with both unexposed males and females. An equal number of mating pairs were respected for each condition, and the two replicates of reduced control (C-I and C-II) were used to take into account the effect of a potential random drift due to the restricted number of Cd-selected individuals. One month later, the first set of juveniles produced from the first egg fertilization were released from the marsupium of females and removed from the experiment. A new fertilization by males in S-20%, C-I, and C-II conditions occurred. One month later again, the release from the females' marsupium was monitored in order to obtain the juveniles produced from this second fertilization for Cd-sensitivity assessment. This design guarantees that the juveniles tested did not experience any environmental direct or indirect influence of Cd exposure (male and female gametogenesis in clean conditions, no maternal exposure). A schematic overview of the experimental design for juvenile production is presented in Fig. S1. Offspring were therefore exposed at the juvenile stage, from 1 to 7 days old, to a lethal concentration of  $20 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ . A sample of offspring was also used as control of survival in clean conditions.

### 2.3. Breeding design for sib analysis and estimation of genetic parameters :

The same breeding protocol as described in Chaumot et al. (2009) was used. Briefly, *G. fossarum* adults were collected within both the Tour and Bois populations. Two weeks after field sampling, mating pairs with females synchronized in the last stage of their reproductive cycle were isolated until they produced three successive broods in individual 500-mL glass beakers (for approximately 2 months). The first batch of juveniles (obtained 1 week after the selection of mating pairs) was constituted from individuals with unknown fathers (fertilization in the field before sampling), the second batch (released 1 month later) corresponding to the offspring of the guarding males present when pairs were selected. After the first fertilization of females, males were randomly redistributed between beakers, so that females would be fertilized by a different male for the third brood. Thus, at the end, each

female produced juveniles from three different males, and each male identified provided offspring from two different females. This controlled mating scheme gave rise to three batches of broods for each population yielding both paternal and maternal half-siblings. Juveniles were exposed to  $20 \mu\text{g Cd L}^{-1}$  beginning the day following their release from the maternal brood pouch. The same protocol as described for the offspring in the artificial selection experiment was followed.

As detailed in Table S1, the causal components of phenotypic variance of Cd sensitivity ( $V_P$ ) can be related to the observational components of variance in the different sib designs (Falconer and Mackay 1996, Lynch and Walsh 1998), namely  $\sigma_{B-FS}$  and  $\sigma_{R-FS}$  the “brood” and residual variance components, respectively, in the full-sib designs ;  $\sigma_{S-PHS}$ ,  $\sigma_{D-PHS}$ , and  $\sigma_{R-PHS}$  the “sire”, “dam within sire,” and residual variance components, respectively, in the paternal half-sib design ; and finally  $\sigma_{D-MHS}$ ,  $\sigma_{S-MHS}$ , and  $\sigma_{R-MHS}$  the “dam”, “sire within dam,” and residual variance components, respectively, in the maternal half-sib design. Classically, we assumed that non-additive genetic variances are limited to dominance genetic variance  $V_D$ . With this experimental design (*e.g.* individual exposure), common environment influences are restricted to the marsupial incubation period. Therefore, beside a residual environmental variance ( $V_{Ew}$ ), we distinguished two components in the common environment variance ( $V_{Ec}$ ) : a maternal effect ( $V_{Em}$ ) (nongenetic influence of the mothers, which enhances the resemblance between offspring that share the same mother, whatever brood they belong to) and a brood-specific maternal effect ( $V_{Esm}$ ) (nongenetic influence of the mothers, which enhances the resemblance of the sibs of a given brood but is unrepeatable for successive broods).

Heritability was estimated from both the paternal and the maternal designs, from sire and dam components, respectively :

$$h_{PHS}^2 = 4 \frac{\sigma_{S-PHS}^2}{V_P} = \frac{V_A}{V_P} \quad [1]$$

$$h_{MHS}^2 = 4 \frac{\sigma_{D-MHS}^2}{V_P} = \frac{V_A}{V_P} + 4 \frac{V_{Em}}{V_P} \quad [2]$$

The degree of similarity between sibs was also quantified by means of intraclass correlation coefficients. Hence, full-sib correlations were calculated from the three designs as :

$$t_{FS} = \frac{\sigma_{B-FS}^2}{V_P} = \frac{1/2 V_A + 1/4 V_D + V_{Em} + V_{Esm}}{V_P} \quad [3]$$

$$t_{FS-PHS} = \frac{\sigma_{S-PHS}^2 + \sigma_{D-PHS}^2}{V_P} = \frac{1/2 V_A + 1/4 V_D + V_{Em} + V_{Esm}}{V_P} \quad [4]$$

$$t_{FS-MHS} = \frac{\sigma_{D-MHS}^2 + \sigma_{S-MHS}^2}{V_P} = \frac{1/2 V_A + 1/4 V_D + V_{Em} + V_{Esm}}{V_P}, \quad [5]$$

from the full-sib, the paternal half-sib, and the maternal half-sib designs, respectively. Paternal and maternal half-sib correlations were also calculated from the paternal half-sib and the maternal half-sib designs, respectively, as :

$$t_{PHS} = \frac{\sigma_{S-PHS}^2}{V_P} = \frac{1/4 V_A}{V_P} \quad [6]$$

$$t_{MHS} = \frac{\sigma_{D-MHS}^2}{V_P} = \frac{1/4 V_A + V_{Em}}{V_P} \quad [7]$$

Standard errors of heritability estimates and intraclass correlation coefficients were calculated as described by Lynch and Walsh (1998) for balanced designs.

#### 2.4. Computations and statistical analyses :

All statistical procedures and computations were carried out with the R software (R Development Core Team, 2012).

*Sib design optimization :* The experimental design for sib analyses was optimized based on the estimates of variance components of Cd sensitivity from the previous study conducted with the Tour population (Chaumot et al. 2009). To enhance the statistical power for detecting additive genetic variance, and thus heritability, we first aimed to maximize the number of broods tested per batch, by minimizing the number of sibs tested per brood. We therefore simulated 100 balanced full-sib designs respecting brood and residual variance estimated by Chaumot et al. (2009) with different numbers of broods (from 10 to 100). Based on the 95% confidence interval, we assessed how the precision of the estimation of the between-brood variability ( $\sigma_{B-FS}$ ) was affected by the reduction of the number of sibs tested per brood (from ten to three). This allowed setting the number of juveniles tested per brood to

conduct further experiments. Thereafter, we similarly assessed the precision of the estimate of the sire effect ( $\sigma_{S-PHS}$ ) in the paternal half-sib design for different numbers of sires tested considering different values of  $h^2$ . The distribution of  $\sigma_{S-PHS}$  estimates was established from 100 simulated datasets of paternal designs considering two mated females per male), respecting inter-brood and residual variance estimated by Chaumot et al. (2009), for different numbers of sires (10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 400) and for different values of theoretical  $h^2$  (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8).

*Statistical inference* : As in Chaumot et al. (2009), the observational variance components of Cd sensitivity of full-sibs and paternal and maternal half-sibs were estimated using variance decomposition of log-transformed survival times using linear mixed-effect models. Restricted maximum likelihood (REML) estimators and 95% confidence intervals were computed with the lme function from the nlme library within the R software. Significance of random effects (brood, sire, dam) was assessed by comparison of models through likelihood ratio tests (LRT), and the significance of fixed effects (batch) was tested by ANOVA (Pinheiro and Bates 2000). AIC and BIC criteria were also inspected, but they are not presented here because they always agreed with LRT. Hence, we tested for full-sibs the existence of differences in Cd sensitivity between broods (*i.e.* random “brood effect”) for the three batches of each population separately. The model without a brood effect was fitted using the gls function from the nlme library using the REML method. For the paternal (respectively, maternal) half-sib design, we built a model considering a random sire (respectively, dam) effect, a random dam effect nested within the sire effect (respectively, sire within the dam effect), and a residual environmental effect. The significance of the sire (respectively, dam) effect was assessed by LRT between the full model and a nested model considering only one random brood effect. The possibility of an effect induced by the fact that three batches of broods were exposed to Cd at three different dates was assessed by testing the significance of a fixed “batch effect” on Cd sensitivity.

### 3. Results :

#### 3.1. Selection of male genitors did not lead to tolerant offspring :

In the artificial selection experiment we aimed to select the 20% most Cd-tolerant male genitors within the Tour population. The Cd sensitivity of the juveniles produced by these individuals when mated for their second fertilization after Cd exposure with naïve females (*i.e.* spermatogenesis in clean conditions) was compared to control offspring from unselected males. After the first fertilization event (16 days after the end of Cd exposure), the survival of Cd-selected males was equal to 19.5%. After the second fertilization event (58 days after the end of Cd exposure), it was only equal to 12.5%. This corresponds to 64% survival between the two copulations, whereas it exceeded 85% for unselected control males. This post-exposure mortality thus implied that the percentage of males selected for their Cd resistance was not 20% as expected, but between 12.5% and 19.5%. Nonetheless, post-exposure mortality was rapidly stabilized after the first fertilization event (13% survival at 24 days after the end of Cd exposure). Finally, 42, 36, and 39 juveniles from the second batch of broods were exposed to  $20 \mu\text{g Cd L}^{-1}$  for conditions C-I, C-II, and S-20%, respectively, and 28, 20, and 26 juveniles were used as controls (*i.e.* not exposed to Cd) for the three conditions, respectively. All mortalities occurred in exposed juveniles within 6 days of Cd exposure and no mortality was observed in juveniles used as control during this time. Time-response curves (Fig. 1) are very similar for the three conditions. Nonetheless, a comparison of the survival rate at each date brought out a significant difference only at one time between the three conditions (prop.test :  $p=0.002$  at 36 h ; Fig. 1). Since only one of the two control sets of exposed juveniles deviated from the S-20% juveniles, this difference observed at one date is more likely attributable to variability due to random sampling because of a small number of males and females (16 mating pairs per condition) used to produce juveniles. In addition, the juveniles of the S-20% Cd-selected condition did not have a greater LT50 in comparison to control conditions (36.8 h versus 53.4 h for C-I and 47.1 h for C-II).

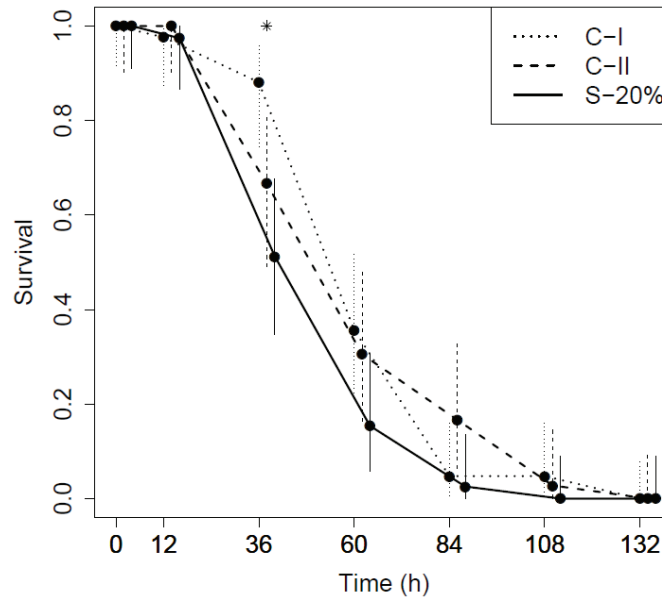
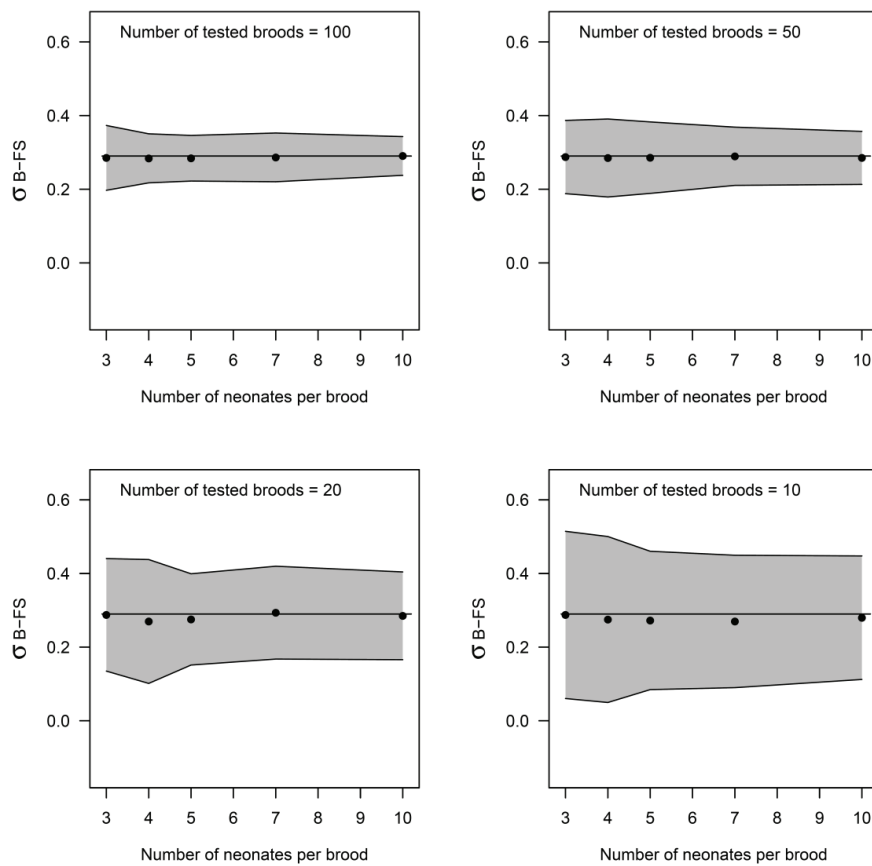


Figure 1. Artificial selection experiment. Dots represent the mean survival rates recorded for offspring from the selected and the two control conditions (S-20%, C-I, C-II) exposed to  $20 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ . Binomial 95% confidence intervals are pictured by vertical lines. Asterisk indicate time for which significant difference have been detected between the three conditions.

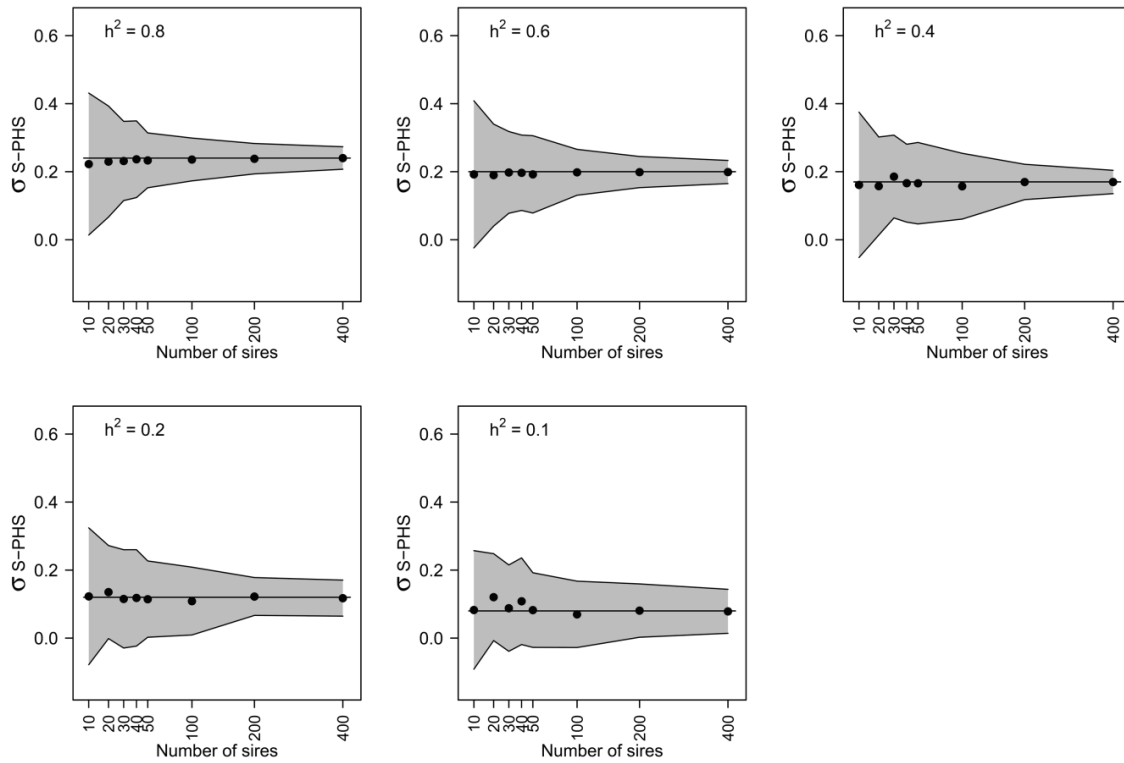
### 3.2. Sib analyses of Cd-sensitivity revealed between-brood variability, low heritability and maternal effect :

*Breeding design optimization :* The analysis of the 100 simulated full-sib datasets based on the variance components of Cd sensitivity established by Chaumot et al. (2009) indicated that the precision of the  $\sigma_{B-FS}$  REML estimator was poorly improved by increasing the number of juveniles tested per brood beyond five individuals whatever the number of broods tested (Fig. 2). This is why, contrary to our previous study, in a balanced design we exposed only five juveniles for all broods, discarding possible additional released juveniles from the experiment. This allowed testing more broods per batch and population, which increases the precision of  $\sigma_{B-FS}$  estimation (Fig. 2). Furthermore, the analysis of the 100 simulated paternal half-sib datasets (five juveniles per brood, two dams per sire), assuming different theoretical values for  $h^2$  (from 0.1 to 0.8), indicated that the precision of the  $\sigma_{S-PHS}$  REML estimator (and therefore  $h^2$  detection) was substantially improved for  $h^2$  values above 0.2 when the number of tested sires increased from 10 to 30, and to a lesser extent from 30 to

200 (Fig. 3). The precision of  $\sigma_{S-PHS}$  estimation remained only slightly improved by increasing the experimental effort (number of sires) for low values of  $h^2$  (here 0.1). From these findings, experiments were designed seeking to test at least 30 sires in paternal half-sib designs. Overall, the survival of 713 neonates was individually monitored for the Tour population and 442 for the Bois population. For most of the broods we obtained five juveniles, but incomplete broods were still included in the analysis since mixed-effect models make it possible to analyze such unbalanced data (Pinheiro and Bates 2000).



**Figure 2.** Estimation of brood component and optimization of the experimental design. 95% confidence intervals of the estimate of the brood component ( $\sigma_{B-FS}$ ), were simulated for different number of broods (10, 20, 50, 100), and for different number of neonates tested per brood (3, 4, 5, 7, 10), based on brood and total variances estimated by Chaumot et al. (2009). Dots represent average  $\sigma_{B-FS}$  calculated from 100 simulations. Solid lines represent expected value.



**Figure 3.** Estimation of the sire component and optimization of the paternal design. 95% confidence intervals of the estimate of the sire component ( $\sigma_{S-PHS}$ ) were simulated for different values of  $h^2$  (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8) and for different number of sires tested (10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 400), based on brood and total variances estimated by Chaumot et al. (2009). Dots represent average  $\sigma_{S-PHS}$  calculated from 100 simulations. Solid lines represent expected values.

*Full-sibs* : Substantial differences in tolerance to Cd were observed between broods for the two populations. Median lethal times of broods for the first batch ranged from 0.5 days to 5.5 days for the Tour population and from 0.5 days to 9.5 days for the Bois population. This brood effect (Table 1) was significant for the three batches for the Tour population and only for the first two batches for the Bois population (LRT :  $p < 0.05$ ). No significant brood effect was detected for the third Bois population batch (LRT :  $p=0.29$ ), along with a large 95% confidence interval associated with  $\sigma_{B-FS}$  (Table 1). This lack of precision of the  $\sigma_{B-FS}$  estimator is due to the low number of broods tested and the presence of incomplete broods. The degree of similarity between full-sibs, assessed with the value of  $t_{FS}$  (Table 1), is similar for the two populations for the first batch (between 25 and 30%). This indicator of full-sib resemblance is constant for the second Tour batch. Fluctuations were observed for other batches, *i.e.* an increase for the second Bois batch and decreases for the third batches of both populations. However, these values are associated with less accurate estimations of  $\sigma_{B-FS}$ .

**Table 1. Full sib analysis of the Cd sensitivity of neonates from the two populations. Here are provided REML estimators (and 95% confidence intervals) of the variance components from a linear mixed-effect model considering log-transformed lethal time of neonates as a response explained by a brood effect ( $\sigma_{B-FS}$ ) and a residual environmental variance ( $\sigma_{R-FS}$ ). The significance of the brood effect was tested by LRT (NS not significant, \* for  $p < 0.05$  and \*\* for  $p < 0.01$ ).**

| Population                      | REML estimator    |                           |                   |             | n broods<br>(n neonates) | t <sub>FS</sub> |
|---------------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|-------------|--------------------------|-----------------|
|                                 | σ <sub>B-FS</sub> |                           | σ <sub>R-FS</sub> |             |                          |                 |
| TOUR                            |                   |                           |                   |             |                          |                 |
| 1 <sup>st</sup> batch of broods | 0.40              | [0.30,0.54] **            | 0.64              | [0.58,0.70] | 53 (265)                 | 0.28            |
| 2 <sup>nd</sup> batch of broods | 0.37              | [0.28,0.49] **            | 0.54              | [0.50,0.60] | 53 (265)                 | 0.31            |
| 3 <sup>rd</sup> batch of broods | 0.22              | [0.11,0.45] *             | 0.66              | [0.59,0.74] | 38 (183)                 | 0.10            |
| BOIS                            |                   |                           |                   |             |                          |                 |
| 1 <sup>st</sup> batch of broods | 0.43              | [0.31,0.60] **            | 0.72              | [0.64,0.80] | 62 (237)                 | 0.26            |
| 2 <sup>nd</sup> batch of broods | 0.61              | [0.46,0.82] **            | 0.60              | [0.53,0.68] | 34 (159)                 | 0.51            |
| 3 <sup>rd</sup> batch of broods | 0.18              | [0.02,1.37] <sup>NS</sup> | 0.63              | [0.50,0.80] | 11 (46)                  | 0.07            |

*Batch effect* : For both the Tour and Bois populations, linear-mixed effect modeling of Cd sensitivity detected a significant fixed-batch effect (ANOVA :  $p < 10^{-4}$  and  $p = 0.0046$  for the Bois and Tour populations, respectively) but no significant interaction between batch effect and the between-brood variability (LRT :  $p = 0.6603$  and  $p = 0.387$  for the Bois and Tour populations, respectively). This indicates that there was a variation in the average level of Cd sensitivity between batches, but that the between-brood variability remained unchanged from the first to the third batch of broods. Therefore, half-sib analyses were performed including a fixed-batch effect in the mixed-effect models. It should be noted that the median lethal time for juveniles did not change monotonously from the first to the third batch (mean lethal time from the first to the third batch, 2.8, 4.1, and 3.1 for the Tour population and 4.8, 3.2, and 3.7 for the Bois population). This disqualifies any hypothesis of uncontrolled selection or depletion of genitors in laboratory conditions, which could induce increasing or decreasing Cd sensitivity in their offspring during the 3 months of the experiment.

*Half-sibs* : For the Tour population, the survival of 373 neonates was recorded in the paternal half-sib design, coming from 76 broods and resulting from the successful mating of 38 sires with two different dams. The analysis of distribution of paternal half-sib sensitivity did not detect any significant sire effect (Table 2) (LRT :  $p = 0.818$ ). This is also reflected by the low  $t_{PHS}$  and  $h^2_{PHS}$  values (Table 2). Moreover, considering formulas [4] and [6], the fact

that  $t_{FS-PHS}$  (0.236) is more than twice  $t_{PHS}$  (0.015) suggests that dominance ( $V_D$ ) and/or maternal effects ( $V_{Em}$  and  $V_{Esm}$ ) contribute to the resemblance between full-sibs. This substantial contribution of dominance and/or maternal effects is also shown by the significant dam within sire component ( $\sigma_{D-PHS}^2$ ), which is much greater than the sire component (Table 2). Concerning the maternal half-sib design, 38 dams were successfully mated with three different sires for the Tour population and the survival of 563 neonates was recorded. For this population, a significant dam effect was detected (LRT :  $p=0.01$ ) (Table 2). The dam component ( $\sigma_{D-MHS}^2$ ) estimate is equal to 0.23 and leads to a  $h_{MHS}^2$  of 0.417 ( $\pm 0.190$ ) and a  $t_{MHS}$  of 0.104 ( $\pm 0.047$ ). This higher resemblance between maternal half-sibs than paternal half-sibs ( $t_{MHS} \gg t_{PHS}$ ) suggests that maternal effects are a significant source of variation. Furthermore, the sire-within-dam component estimate is large (0.28), with a relatively low 95% confidence interval, which, when  $V_A$  is null, indicates that  $V_D$  and/or  $V_{Esm}$  also contribute substantially to the total variance (Table 2), corroborating the findings from the paternal design.

Overall, we conclude that sensitivity to Cd is not heritable in the Tour population, since the contribution of additive genetic variance to offspring Cd sensitivity determinism is weak and since this trait is governed by maternal effects and potentially by non-additive genetic components (dominance). Unfortunately, the genitors from the Bois population were difficult to maintain under laboratory conditions, and some mortality arose during the experiment, resulting in half-sib designs with a weak statistical power. Indeed, only seven sires were successfully mated with two different dams, and only ten dams were successfully mated with three different sires. Not surprisingly, the analysis of distribution of offspring Cd sensitivity failed to detect either a significant sire effect or a significant dam effect (Table S2), comparable to what was obtained by Chaumot et al. (2009).

**Table 2.** Half sib analysis of the Cd sensitivity of neonates from the Tour population, considering paternal and maternal designs. Here are provided REML estimators (and 95% confidence intervals) of the observational components of variance with significance tested by LRT (\* for  $p < 0.05$  and \*\* for  $p < 0.01$ ), along with estimated genetic parameters (SD : Standard Deviation).

| Observational variance component |                  | REML estimator [IC 95%]<br>TOUR | Sib correlations $\pm$ SD    | Estimates of heritability $\pm$ SD |
|----------------------------------|------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| PATERNAL DESIGN                  |                  | 38 sires nested with 2 dams     |                              |                                    |
| Sires                            | $\sigma_{S-PHS}$ | 0.08 <sup>NS</sup> [0.00; 6.01] | $t_{FS-PHS}$ 0.24 $\pm$ 0.08 | $h^2_{PHS}$ 0.06 $\pm$ 0.25        |
| Dams within sires                | $\sigma_{D-PHS}$ | 0.32 [0.22; 0.48]               | $t_{PHS}$ 0.01 $\pm$ 0.06    |                                    |
| Residual                         | $\sigma_{R-PHS}$ | 0.60 [0.55; 0.65]               |                              |                                    |
| MATERNAL DESIGN                  |                  | 38 dams nested with 3 sires     |                              |                                    |
| Dams                             | $\sigma_{D-MHS}$ | 0.23 * [0.14; 0.37]             | $t_{FS-MHS}$ 0.26 $\pm$ 0.05 | $h^2_{MHS}$ 0.42 $\pm$ 0.19        |
| Sires within dams                | $\sigma_{S-MHS}$ | 0.28 [0.21; 0.39]               | $t_{MHS}$ 0.10 $\pm$ 0.05    |                                    |
| Residual                         | $\sigma_{R-MHS}$ | 0.61 [0.57; 0.65]               |                              |                                    |

#### 4. Discussion :

In the artificial selection experiments we aimed to select the 20% most Cd-tolerant individuals within the Tour population, but the implementation of the protocol resulted in the selection of a smaller fraction of the population (likely closer to 10%), thus resulting in a higher selection intensity than expected. Only selected males were used and not females, to avoid the influence of a nongenetic transgenerational effect of maternal Cd exposure that could bias the evaluation of the response to genetic selection. For the same reason, we tested only the offspring produced by the second fertilization operated by males after their exposure, thus resulting from gametes produced in clean conditions. All of the juveniles used as controls during Cd tests survived for the three conditions, including the S-20% juveniles. This indicates that direct effects of parent Cd exposure on juvenile fitness were avoided because of the protocol developed. In these conditions, we observed no elevated resistance to Cd in S-20% juveniles, and so selection for Cd resistance in the Tour population appeared inoperative, at least in the first generation. This negative result is not conclusive *per se*. Indeed, false-negative detection could arise because only males were selected, potentially leading to a dilution of the frequency of resistance genes by the influx of susceptible alleles from unselected females (Hoffman and Hercus 2000, Woods and Hoffmann 2000) or because we

tested only one generation. Nevertheless, in an artificial selection experiment for Cd resistance, Xie and Klerks (2003) reported an increased resistance to Cd in the least killifish (*Heterandria formosa*) after only one generation of selection. These authors reported this rapid response for two of three selection lines, while the third selection line only showed an elevated resistance to Cd in the second generation. A false-negative case could also be that the number of individuals on which we applied the selection pressure (200 males) may have been insufficiently large to contain the rare resistance alleles from the field population in case of a major gene determinism of Cd sensitivity (Woods and Hoffmann 2000). Nevertheless, it appeared from the full-sib designs for both the Tour and Bois populations that a strong variability of Cd sensitivity can be generated even with only 50 pairs of genitors (ratio of ten between the broods' minimum and maximum median lethal times), and thus that our sample size of 200 males was sufficient. Because of these interpretation limitations, the absence of an observed response to selection is not fully conclusive by itself in terms of the possibility for a naïve *G. fossarum* population to evolve genetic resistance to Cd, but this result was corroborated by the study's quantitative genetics assay.

Indeed, sib analyses revealed that the heritability in the narrow sense of Cd sensitivity was non-significant in both the Tour and Bois populations, leading us to conclude that these populations would not have the potential to adapt genetically to Cd. This reiterates previous findings by Chaumot et al. (2009) for the Tour population. As in this previous study, the absence of paternal half-sib resemblance contrasts with the strong similarity between full-sibs. For instance, 28% and 26% of the total phenotypic variance of the first batches of broods for the Tour and Bois populations, respectively, are explained by brood similarity (Table 1). Compared to Chaumot et al. (2009), the statistical power of the experimental design for heritability detection was improved for the Tour population. Here 38 sires were tested. With this population size, simulations (Fig. 3) indicate that the low  $\sigma_{S-PHS}$  value estimated here for the Tour population is unlikely to be observed (*i.e.* outside of the 95% confidence interval for simulations) for heritability values greater than 0.2. Therefore, we can conclude that heritability in the Tour population is weak if not null. Furthermore, it appears that a substantially higher number of families would have been needed to detect a low sire component if present. Indeed, as calculated from the simulations for heritability equal to 0.1

and for a design including 400 sires (Fig. 3), a significant sire component would have been detected in only 31% of cases. Thus, the number of sires required would have been prohibitively large, since the nested design used here requires a considerable amount of experimental effort and space. This last point is a weakness of the quantitative genetics approach (Klerks et al. 2011). This failure to detect low values of heritability has also been reported by Klerks and Moreau (2001) and reviewed in Klerks et al. (2011). A possible alternative improvement of the paternal design in *Gammarus* would consist in increasing the number of dams per sire, and this could be feasible in shorter experiments than in the present study because the spermatogenesis cycle is completed in only 7 days at 12°C in this species.

In a more detailed analysis, considering that any common environmental effect was excluded as a result of the experimental protocol (individual exposure, randomized design, a single Cd solution, 1-day-old neonates), the substantial similarity recorded between full-sibs could only be explained by shared non-additive genetic features or by maternal effects (during egg production and brooding). Hence we detected a significant dam component in the maternal half-sib design that was not recorded in Chaumot et al. (2009), indicating that the design optimization was effective. The combined use of the two nested designs provided additional information compared to a simple paternal design. It has allowed us not only to show that the heritability of Cd-offspring sensitivity was low, but also that maternal effects ( $V_{Em}$ ) as well as dominance ( $V_D$ ) and/or a brood-specific maternal effect ( $V_{Esm}$ ) were substantial. As classically applied to data obtained from diallel analyses (detailed in Dawson 1965, Lynch and Walsh 1998), the results of two designs can be combined. The comparison of  $h^2_{PHS}$  and  $h^2_{MHS}$  estimators makes it possible to quantify  $V_{Em}$  (maternal effect repeatable between the successive broods of a mother), which accounts for 9% of the total variance of juvenile Cd sensitivity.

Overall, this study suggests that genetic adaptation to acute Cd stress seems unlikely to occur within naïve *G. fossarum* populations, since we did not observe a response to selection for Cd resistance, and because we confirmed that the heritability of Cd sensitivity was low. Nonetheless, this conclusion should be considered with caution before being extrapolated to chronic levels potentially present in the contaminated environment. These findings are nonetheless in line with the fact that tolerance to contaminants of field

populations cannot result solely from genetic adaptation, but also stems from acclimation (*i.e.* plastic changes) (Klerks and Weis 1987, Morgan et al. 2007) and with the observation that genetic adaptation to contaminants is infrequent (Klerks 2002, Millward and Klerks 2002, Woods and Hoffmann 2000). Hence, the hypothesis of physiological acclimation as well as the hypothesis of adaptation via rare alleles of major genes would both be admissible hypotheses to reconcile the recorded low heritability of Cd sensitivity in naïve *Gammarus* populations, and the fact that field *Gammarus* populations tolerant to Cd are still present in contaminated environments. For instance, we have recently identified a natural population of *G. fossarum* in a long-term Cd-contaminated stream, presenting Cd tolerance, which is transmissible to offspring in an uncontaminated environment (Vigneron et al. 2015). In this context, the present finding of a significant dam effect on Cd sensitivity sheds new light on the importance of maternal influence in transgenerational processes underlying the evolution of Cd tolerance in *Gammarus*. Indeed, genetic adaptation, despite low heritability of Cd offspring sensitivity and the absence of a response to selection, could take place through the selection of traits other than tolerance to the toxicant itself such as maternal effects (Gotthard and Nylin 1995, Marshall and Uller 2007). We are therefore planning to investigate the inheritance of Cd tolerance in the identified tolerant field population further. Determining the mechanisms supporting increased tolerance and potentially the inheritance of modified sensitivities in such a case study of field-exposed populations is needed to assess whether microevolutionary processes and transgenerational effects should be considered for the assessment of the ecological hazard of chemical contaminations toward aquatic environments.

### **Acknowledgments :**

This research program was funded by the ANR (Agence Nationale de la Recherche) CESA program GAMMA 021 02 “Variability-adaptation-diversity and Ecotoxicology in gammarids” (2012-2015). The authors also thank R. Recoura-Massaquant for its assistance during laboratory exposure.

**References :**

- Besse, J.-P., M. Coquery, C. Lopes, A. Chaumot, H. Budzinski, P. Labadie, and O. Geffard. 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Research* 47:650-660.
- Bickham, J. W. 2011. The four cornerstones of Evolutionary Toxicology. *Ecotoxicology* 20:497-502.
- Boets, P., K. Lock, P. L. M. Goethals, C. R. Janssen, and K. A. C. De Schamphelaere. 2012. A comparison of the short-term toxicity of cadmium to indigenous and alien gammarid species. *Ecotoxicology* 21:1135-1144.
- Chaumot, A., P. Gos, J. Garric, and O. Geffard. 2009. Additive vs non-additive genetic components in lethal cadmium tolerance of *Gammarus* (Crustacea): Novel light on the assessment of the potential for adaptation to contamination. *Aquatic Toxicology* 94:294-299.
- Coutellec, M.-A. and C. Barata. 2011. An introduction to evolutionary processes in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20:493-496.
- Coutellec, M.-A. and C. Barata. 2013. Special issue on long-term ecotoxicological effects: an introduction. *Ecotoxicology* 22:763-766.
- De Coninck, D. I., C. R. Janssen, and K. A. De Schamphelaere. 2014. An approach to assess the regulatory relevance of microevolutionary effects in ecological risk assessment of chemicals: A case study with cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33:453-457.
- Falconer, D. S. and T. F. C. Mackay. 1996. Introduction to quantitative genetics. Longman, Edinburgh.
- Geffard, O., B. Xuereb, A. Chaumot, A. Geffard, S. Biagianti, C. Noël, K. Abbaci, J. Garric, G. Charmantier, and M. Charmantier-Daures. 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29:2249-2259.
- Gotthard, K. and S. Nylin. 1995. Adaptive Plasticity and Plasticity as an Adaptation: A Selective Review of Plasticity in Animal Morphology and Life History. *Oikos* 74:3-17.
- Hoffmann, A. A. and M. J. Hercus. 2000. Environmental Stress as an Evolutionary Force. *BioScience* 50:217-226.
- Johnston, E. 2011. Tolerance to contaminants: evidence from chronically-exposed populations of aquatic organisms. Pages 25-46 in C. Amiard, P. S. Rainbow and M. Roméo, Tolerance to environmental contaminants. CRC Press, Boca Raton.
- Khan, F. R., J. R. Irving, N. R. Bury, and C. Hogstrand. 2011. Differential tolerance of two *Gammarus pulex* populations transplanted from different metallogenic regions to a polymetal gradient. *Aquatic Toxicology* 102:95-103.

- Klerks, P. L. 2002. Adaptation, Ecological Impacts, and Risk Assessment: Insights from Research at Foundry Cove, Bayou Trepagnier, and Pass Fourchon. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8:971-982.
- Klerks, P. L. and C. J. Moreau. 2001. Heritability of resistance to individual contaminants and to contaminant mixtures in the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:1746-1751.
- Klerks, P. L. and J. S. Weis. 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review. *Environmental Pollution* 45:173-205.
- Klerks, P. L., L. Xie, and J. S. Levinton. 2011. Quantitative genetics approaches to study evolutionary processes in ecotoxicology; a perspective from research on the evolution of resistance. *Ecotoxicology* 20:513-523.
- Kunz, P. Y., C. Kienle, and A. Gerhardt. 2010. *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests. Pages 1-76 in D. M. Whitacre, editor. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 205. Springer New York.
- Lynch, M. and B. Walsh. 1998. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer.
- Maltby, L. and M. Crane. 1994. Responses of *Gammarus pulex* (amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution* 84:45-52.
- Marshall, D. J. and T. Uller. 2007. When is a maternal effect adaptive? *Oikos* 116:1957-1963.
- Millward, R. N. and P. L. Klerks. 2002. Contaminant-Adaptation and Community Tolerance in Ecological Risk Assessment: Introduction. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8:921-932.
- Morgan, A. J., P. Kille, and S. R. Stürzenbaum. 2007. Microevolution and Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. *Environmental Science & Technology* 41:1085-1096.
- Pinheiro, J.C. & Bates, D.M. 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer, New-York.
- R Core Team (2012). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Vignerot, A., O. Geffard, M. Coquery, A. François, H. Quéau, and A. Chaumot. 2015. Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a *Gammarus fossarum* population inhabiting a low-level contaminated stream. *Ecotoxicology*. In Press.
- Woods, R. E. and A. Hoffmann. 2000. Evolution in toxic environments: quantitative versus major gene approaches. Pages 129-145 in J. Kammenga, and R. Laskowski, *Demography in ecotoxicology*, J. Wiley & Sons Ltd, Chichester, New York, Toronto.
- Xie, L. and P. L. Klerks. 2003. Responses to selection for cadmium resistance in the least killifish, *Heterandria formosa*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22:313-320.

## Supplementary materials :

**Table S1. Relationships between observational and causal components of variance for each kind of relatives.**  $V_A$  = additive genetic variance,  $V_D$  = dominance genetic variance,  $V_{Em}$  = maternal effects,  $V_{Esm}$  = brood-specific maternal effect,  $V_{Ew}$  = residual environmental variance.

| Relatives          | Observational component |                  | Causal components |                                                           |
|--------------------|-------------------------|------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------|
| FULL SIB           | Broods                  | $\sigma_{B-FS}$  | →                 | $\sigma_{B-FS}^2 = 1/2 V_A + 1/4 V_D + V_{Em} + V_{Esm}$  |
|                    | Residuals               | $\sigma_{R-FS}$  | →                 | $\sigma_{R-FS}^2 = 1/2 V_A + 3/4 V_D + V_{Ew}$            |
| PATERNAL HALF SIBS | Sires                   | $\sigma_{S-PHS}$ | →                 | $\sigma_{S-PHS}^2 = 1/4 V_A$                              |
|                    | Dams within sires       | $\sigma_{D-PHS}$ | →                 | $\sigma_{D-PHS}^2 = 1/4 V_A + 1/4 V_D + V_{Em} + V_{Esm}$ |
|                    | Residual                | $\sigma_{R-PHS}$ | →                 | $\sigma_{R-PHS}^2 = 1/2 V_A + 3/4 V_D + V_{Ew}$           |
| MATERNAL HALF SIBS | Dams                    | $\sigma_{D-MHS}$ | →                 | $\sigma_{D-MHS}^2 = 1/4 V_A + V_{Em}$                     |
|                    | Sires within dams       | $\sigma_{S-MHS}$ | →                 | $\sigma_{S-MHS}^2 = 1/4 V_A + 1/4 V_D + V_{Esm}$          |
|                    | Residual                | $\sigma_{R-MHS}$ | →                 | $\sigma_{R-MHS}^2 = 1/2 V_A + 3/4 V_D + V_{Ew}$           |

**Table S2. Results for the half-sib analysis for the population Bois, REML estimators (NS : not significant LRT).**

| Observational variance component |                  | REML estimator              |                |
|----------------------------------|------------------|-----------------------------|----------------|
|                                  |                  | BOIS                        |                |
| PATERNAL DESIGN                  |                  | 7 sires nested with 2 dams  |                |
| Sires                            | $\sigma_{S-PHS}$ | $5.95 \cdot 10^{-5}$ NS     | Not Determined |
| Dams within sires                | $\sigma_{D-PHS}$ | 0.50                        | [0.30; 0.86]   |
| Residual                         | $\sigma_{R-PHS}$ | 0.60                        | [0.49; 0.74]   |
| MATERNAL DESIGN                  |                  | 10 dams nested with 3 sires |                |
| Dams                             | $\sigma_{D-MHS}$ | $0.18$ NS                   | [0.03; 1.14]   |
| Sires within dams                | $\sigma_{S-MHS}$ | 0.37                        | [0.20; 0.68]   |
| Residual                         | $\sigma_{R-MHS}$ | 0.68                        | [0.59; 0.79]   |

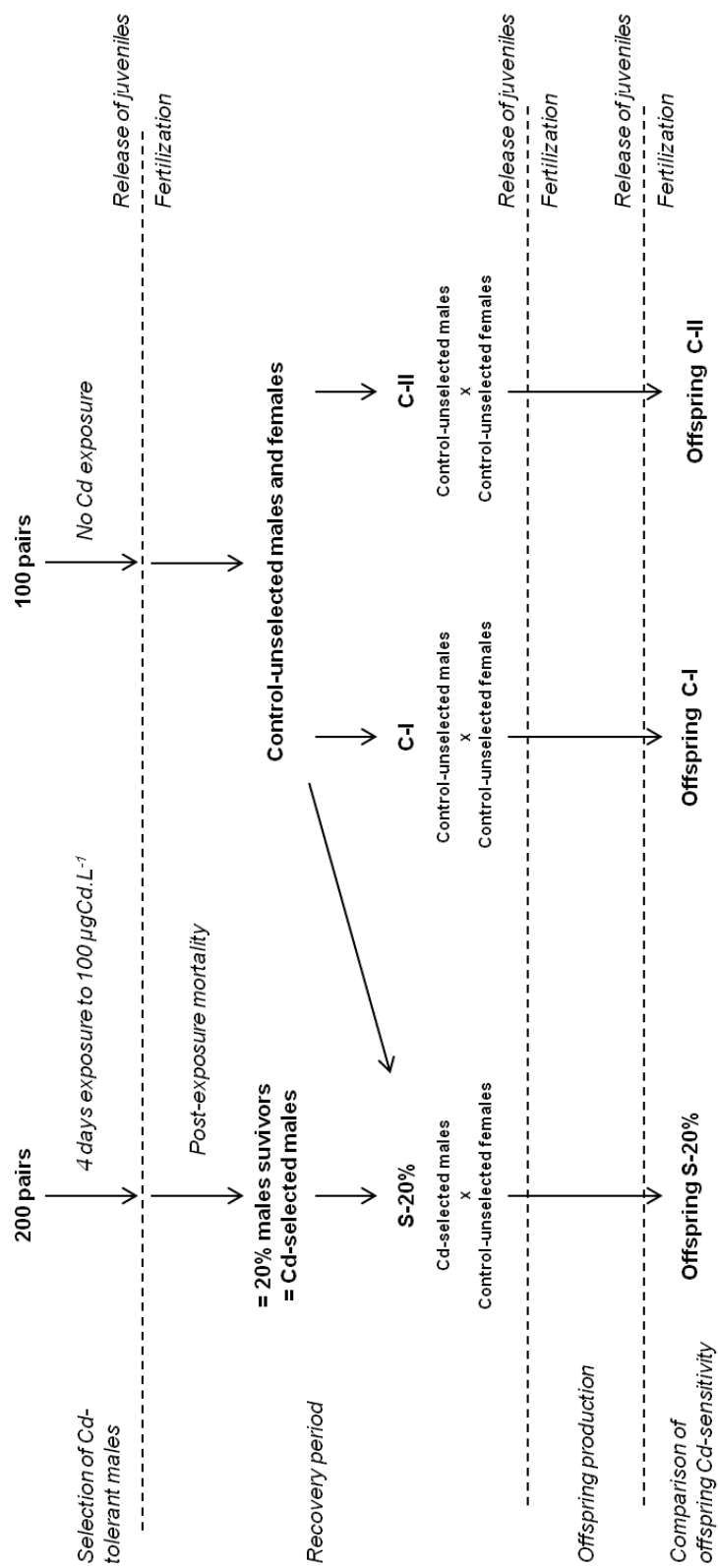


Figure S1. Schematic overview of the experimental design of the artificial selection experiment.



## **Note n°2 : Compléments à la Publication n°2 pour la partie « génétique quantitative » :**

Cette note a pour objectif d'étayer la première partie du Chapitre IV avec des figures et des éléments de discussion qui n'ont pas été intégrés à la Publication n°2.

### Représentations graphiques des résultats obtenus pour le paternal et le maternal design :

Au cours de cet article, les résultats ont en effet uniquement été présentés sous forme de tableaux synthétiques récapitulant les estimations des composantes observables de la variance obtenues avec les modèles à effets mixtes, ainsi que les valeurs des corrélations entre les fratries et demi-fratries et les valeurs d'héritabilité calculées. La Figure IV-1 présentée ici propose une représentation graphique des données de temps survie obtenues pour les demi-fratries paternelles et maternelles pour la population Tour.

Pour cette population, la réalisation du paternal design (Figure IV-1 A), a abouti pour 38 mâles qui ont pu être croisés avec succès à 2 femelles différentes. Au total 373 juvéniles répartis en 76 fratries ont été testés. Pour le maternal design (Figure IV-1 B), c'est au total 563 juvéniles issus du croisement de 38 femelles avec 3 mâles différents, soit 114 fratries, qui ont été exposés individuellement. Ces deux représentations graphiques mettant en regard les survies des demi-fratries permettent de bien visualiser l'absence d'un effet père dans la sensibilité au cadmium des juvéniles, et au contraire l'existence d'un déterminisme maternel puisque les fratries successives d'une même mère ont tendance à présenter des niveaux de sensibilité similaires. Par exemple, les femelles 13 et 31 donnent systématiquement naissance à des juvéniles relativement tolérants au cadmium tandis que les femelles 21, 24, 36, 37 et 38 ont tendance à produire des juvéniles plus sensibles que la moyenne populationnelle (Figure IV-1 B).

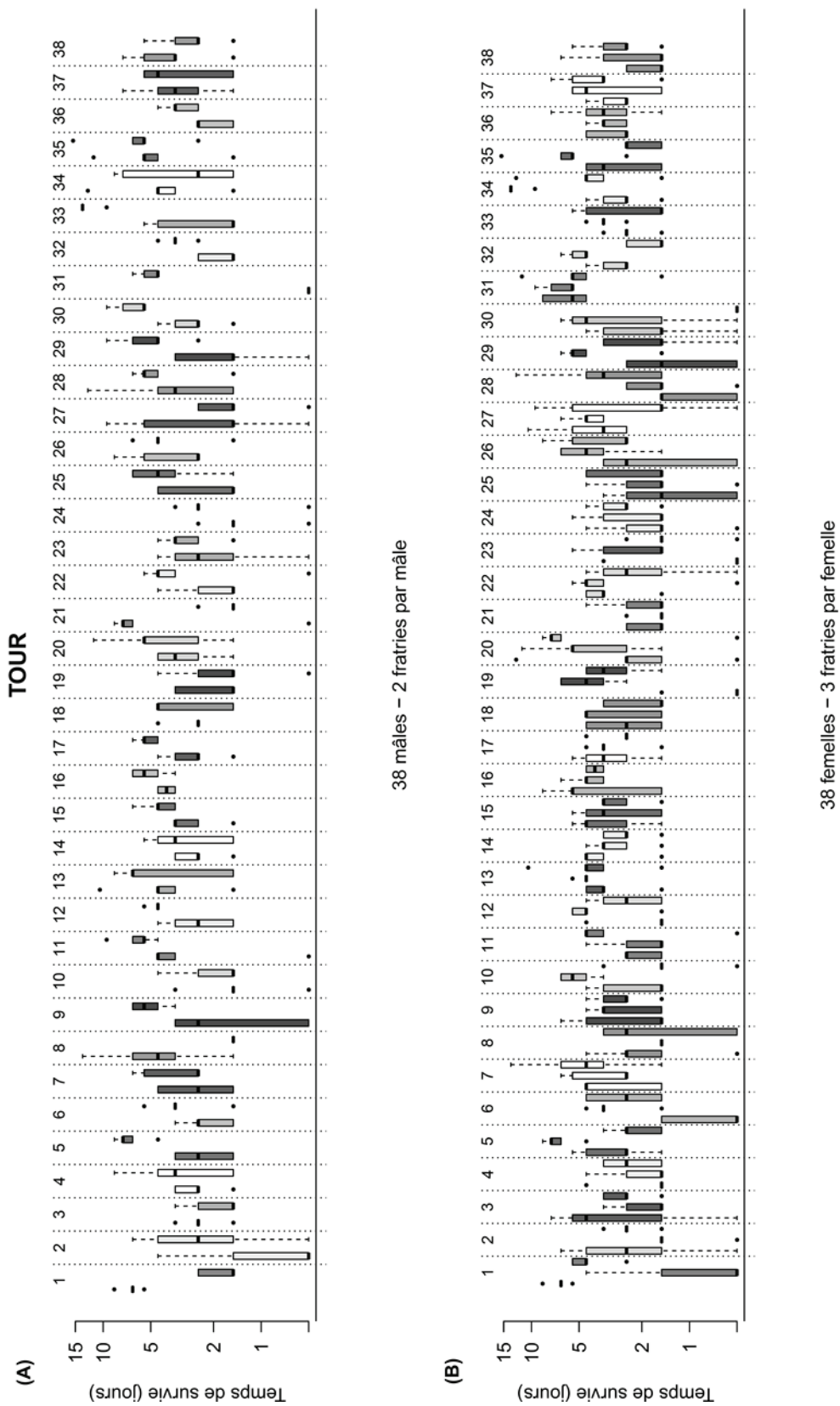


Figure IV-1 : Temps de survie des demi-fratries paternelles (A) et maternelles (B) de la population Tour exposées à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd. Les boîtes représentent les temps de survie en jours enregistrés transformés en log pour l'ensemble des juvéniles d'une même fratrie et s'étendent du premier au troisième quartile de la distribution des mesures. Le trait horizontal noir correspond à la médiane. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes des mesures ne dépassant pas 1,5 fois l'écart interquartile. Les points marginaux sortant de cette gamme sont représentés par des points noirs. Pour le paternal design (A), deux boîtes successives du même niveau de gris représentent les deux fratries d'un même père accouplé à deux mères différentes (i.e. deux demi-fratries paternelles). Pour le maternal design (B), trois boîtes successives du même niveau de gris représentent les trois fratries d'une même mère accouplée à trois pères différents (i.e. trois demi-fratries maternelles).

### Optimisation du paternal design :

Les protocoles de génétique quantitative mis en place ici ont été élaborés pour avoir une meilleure puissance statistique pour la détection de la variance génétique additive que la première étude conduite au Laboratoire d'Ecotoxicologie d'Irstea de Lyon-Villeurbanne par Chaumot et al. (2009) en optimisant le protocole. Une forte augmentation du nombre d'individus étudiés et le calcul du meilleur design (compromis entre le nombre de juvéniles, le nombre de couples nécessaires et le nombre maximum d'individus pouvant être testé contraint par le volume en matériel et en temps de l'expérimentation), nous a permis d'y parvenir et à en outre permis de mettre en évidence un effet maternel significatif. Nous avons par ailleurs soulevé que si notre design était effectivement plus puissant pour détecter une éventuelle variance additive, ici un effet père (  $\sigma_{S-PHS}$  ), un nombre prohibitif de pères (plusieurs centaines) sont nécessaires pour pouvoir détecter de faibles valeurs de  $\sigma_{S-PHS}$ . Bien que cela soit inhérent aux approches de génétique quantitative (Klerks et al. 2011), le paternal design mis en place pour *G. fossarum* pourrait être tout de même amélioré dans ce sens.

En effet, ici les paternal design ont été réalisés en n'associant chaque mâle qu'à deux femelles différentes, car le paternal et le maternal design ont été réalisés en une seule expérimentation (Cf. Chapitre II). Ainsi, pour obtenir deux demi-fratries paternelles nous avons été contraints par la durée des cycles de reproduction des femelles (35 jours à 12°C) et avons dû attendre la fin du troisième cycle au laboratoire pour obtenir la deuxième fratrie d'un même père (soit environ trois mois d'expérimentation). Nous aurions encore pu gagner en puissance statistique en associant chaque mâle à trois femelles différentes, comme cela a été fait pour le maternal design. Ceci serait possible tout en restant dans une configuration d'expérimentation avec une durée raisonnable, si ces mâles étaient associés à une nouvelle femelle tous les sept jours (durée pour une reconstitution complète du stock de spermatozoïdes, Lacaze 2011), et non plus après chaque cycle de reproduction des femelles, comme cela a été fait ici.



### Note n°3 : Etude de l'effet d'une sélection maternelle au cadmium sur la sensibilité des juvéniles :

L'expérience de sélection artificielle présentée dans la Publication n°2 est un extrait d'une expérimentation plus large menée au cours de ces travaux de thèse consistant à tester l'effet d'une sélection parentale au cadmium sur la sensibilité à ce métal de la génération suivante.

Dans l'optique de produire des juvéniles à partir de géniteurs sélectionnés par rapport à leur sensibilité au cadmium, deux lots de 200 couples de *G. fossarum* de la population Tour avec la femelle en fin de cycle de reproduction (Geffard et al. 2010) ont été exposés par réplicats de 10 couples à 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd pour le premier lot, et à 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd pour le second lot, au laboratoire pendant quatre jours. Un troisième lot de 100 couples témoins a suivi le même traitement mais n'a pas été exposé au cadmium. L'exposition de couples à 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd a été fixée pour atteindre 20% de survie en incluant la mortalité post-exposition pour les mâles. L'exposition de couples à une concentration plus faible, 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd, a quant à elle été choisie pour obtenir un niveau de sélection équivalent pour les femelles, celles-ci étant plus sensibles que les mâles. Toutefois, comme pour les mâles, le pourcentage de sélection obtenu a été plus faible que celui visé puisque 16 jours après la fin de l'exposition le taux de survie des femelles a été de 8% (19,5% pour les mâles à la même date), et de 5% à la fin de l'expérience (12,5% pour les mâles à la même date).

Quatre conditions parentales ont été constituées (Tableau récapitulatif en annexe (Tableau A-3 en annexe)). Les trois mêmes conditions que celles présentées au cours de la publication n°2, c'est-à-dire deux conditions de parents non exposés au cadmium (C-I et C-II) et une condition constituée de femelles témoins et de mâles exposés à 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd (noté S-20% dans l'article et reprise ici par la notation S-20% P). La quatrième condition, notée S-20% P&M, est quant à elle constituée de mâles et de femelles ayant tous été exposés au cadmium (à 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd pour les mâles et à 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd pour les femelles). L'effet de la sélection et de l'exposition des parents sur la sensibilité de la génération suivante a été évalué en testant la sensibilité des juvéniles de la deuxième et de la troisième cohorte produites par ces quatre conditions de parents. Celle-ci a été mesurée avec le temps de survie

de ces juvéniles à une exposition à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd. Les juvéniles de la première cohorte n'ont pas été utilisés au cours de cette expérimentation car ces derniers étaient présents dans le marsupium des femelles au moment de l'exposition. Le protocole mis en place (provenance et stabulation des organismes, conditions de stabulation et d'exposition au cadmium) est exactement le même que celui décrit dans la Publication n°2 à la différence qu'ici l'effet d'une sélection maternelle a été également évalué avec la condition S-20% P&M, et que l'effet de la sélection sur la sensibilité de la F1 n'a pas uniquement été déterminée sur la troisième cohorte produite après l'exposition mais également sur la deuxième cohorte.

La Figure IV-2 présente la sensibilité au cadmium des juvéniles des cohortes 2 et 3 produites par les quatre conditions de parents. En accord avec les résultats présentés dans la Publication n°2 pour la cohorte 3, la sensibilité au cadmium des juvéniles de la cohorte 2 issus de pères sélectionnés (Figure IV-2 A, Tableau IV-1) n'est pas différente de celle des juvéniles issus des deux conditions de parents témoins C-I et C-II confirmant ainsi qu'une exposition paternelle au cadmium n'affecte pas la sensibilité à ce métal de la génération suivante.

Concernant l'effet d'une sélection maternelle, celle-ci peut être évaluée en observant la survie des juvéniles issus de la condition parentale S-20% P&M. Bien que les deux parents aient été exposés au cadmium, il est possible de conclure quant à l'effet d'une sélection maternelle à partir de l'examen de la sensibilité des juvéniles de cette condition puisque nous avons démontré qu'une sélection paternelle n'influence pas la sensibilité au cadmium des juvéniles ni pour la deuxième ni pour la troisième cohorte. Les juvéniles de la cohorte 2 S-20% P&M présentent une tolérance au cadmium plus importante que les juvéniles des autres conditions. Ceci est observable graphiquement avec les taux de survie supérieurs (Figure IV-2 A), mais également avec les valeurs de  $LT_{50}$  (Tableau IV-1). En effet, la  $LT_{50}$  des juvéniles S-20% P&M est de 34,3 heures, soit 1,5 fois plus élevée que la  $LT_{50}$  moyenne des trois autres conditions ( $23,1 \pm 1,1$ ). Toutefois cette augmentation de la tolérance ne se retrouve pas pour la troisième cohorte. Les taux de survie des juvéniles S-20% P&M retombent à un niveau équivalent à celui des autres conditions (Figure IV-2 A), et la  $LT_{50}$  est équivalente et même inférieure à celle des juvéniles des deux conditions témoins C-I et C-II (autour de 50 heures) (Tableau IV-1).

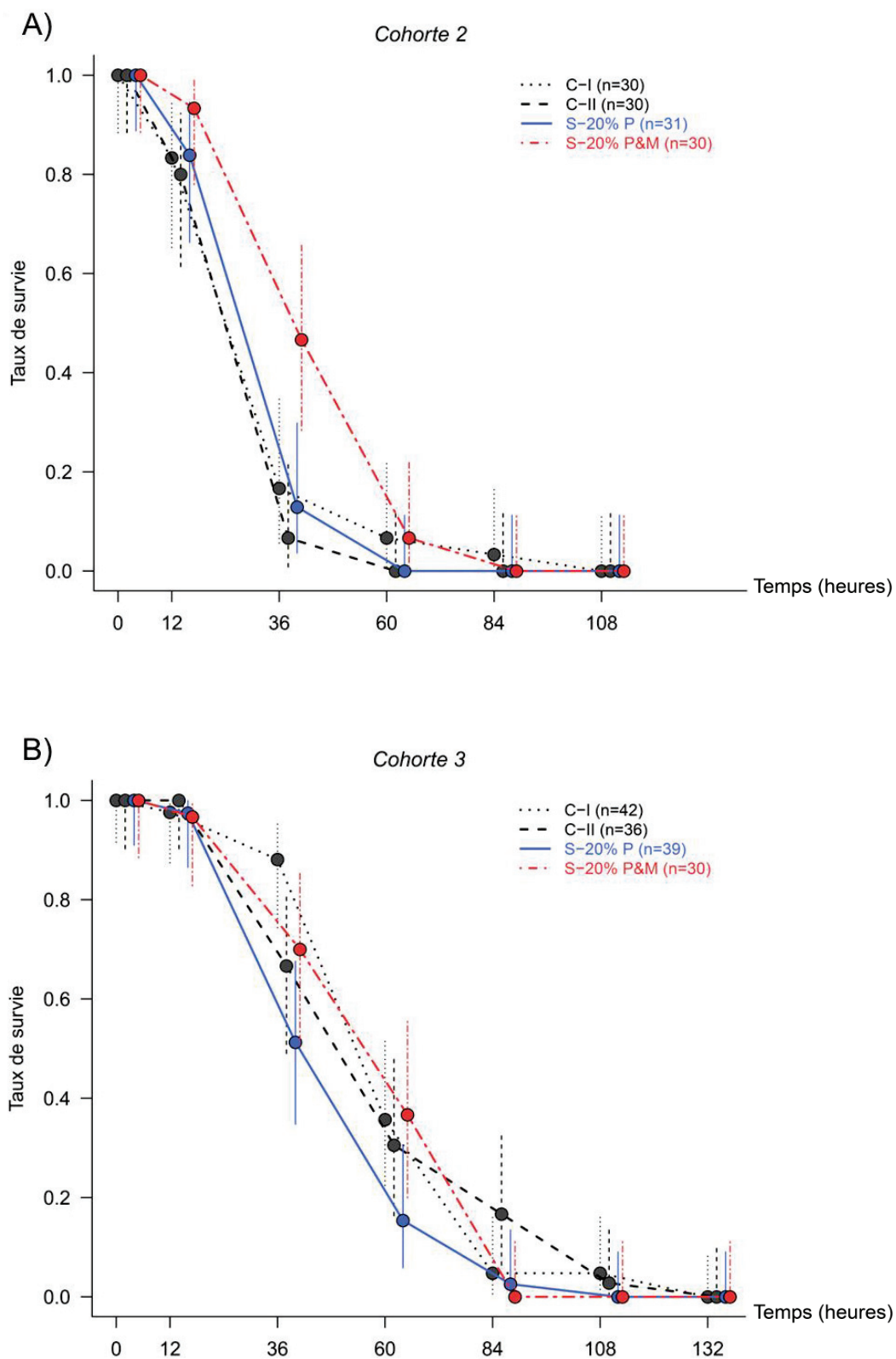


Figure IV-2 : Taux de survie des juvéniles produits par les quatre conditions parentales C-I, C-II, S-20% P et S-20% P&M à une exposition à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd. Test des juvéniles de la deuxième (A) et de la troisième (B) cohorte produites après l'exposition des parents au cadmium. Le graphique B correspond à la Figure 1 présentée dans la Publication n°2 à laquelle a été ajoutée la survie des juvéniles de la condition S-20% P&M.

Par ailleurs, il apparaît que pour toutes les conditions les juvéniles de la cohorte 2 sont plus sensibles au cadmium que ceux de la cohorte 3. Ceci s'explique par une différence d'âge à la date du test de sensibilité. Les juvéniles de la cohorte 3 ont en effet été exposés alors qu'ils étaient plus jeunes que ceux de la cohorte 2 (entre 1 à 13 jours pour les premiers contre entre 1 à 7 jours pour les seconds). Une augmentation de la sensibilité au cadmium avec l'augmentation de l'âge des juvéniles au moment de l'exposition a également été constaté pour d'autres expérimentations conduites au cours de ces travaux. Notons enfin que la survie de juvéniles témoins maintenus dans les mêmes conditions mais non exposés au traitement était de 100% à la fin de l'expérience pour toutes les conditions et pour les deux cohortes à l'exception des conditions C-II et 20% P&M de la cohorte 2 pour lesquelles elle était respectivement de 65% et 95%.

Ainsi, nous avons confirmé l'absence d'effet d'une sélection paternelle sur la sensibilité au cadmium mais surtout, nous avons mis en évidence qu'une sélection maternelle par exposition au cadmium peut effectivement induire une augmentation de la tolérance chez leurs descendants. Cependant, il apparaît que cette augmentation de la tolérance est transitoire puisqu'elle ne se retrouve plus à la troisième cohorte, ce qui indique qu'elle ne résulte pas de la sélection des femelles mais de l'exposition de celles-ci au cadmium. Elle peut par ailleurs se mettre en place rapidement puisqu'ici l'exposition maternelle n'a duré que quatre jours.

**Tableau IV-1 :  $LT_{50}$  en heures de juvéniles de la deuxième et de la troisième cohorte produites par les quatre conditions parentales C-I, C-II, S-20% P et S-20% P&M exposés à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd.  $LT_{50}$  calculées par interpolation.**

| Condition parentale | $LT_{50}$ (heure) |           |
|---------------------|-------------------|-----------|
|                     | Cohorte 2         | Cohorte 3 |
| C-I                 | 24,0              | 53,5      |
| C-II                | 21,8              | 47,1      |
| S-20% P             | 23,5              | 36,9      |
| S-20% P&M           | 34,3              | 50,4      |

## 2. Etude *a posteriori* avec le cas d'étude de la population Ardi :

**Publication n°3 : Hérité non génétique de la tolérance au cadmium d'une population naturelle de *G. fossarum* : des effets parentaux orientent la sensibilité au cadmium des juvéniles.**

**Non-genetic inheritance of increased Cd-tolerance in a natural *G. fossarum* population : Parental effects steer offspring sensitivity.**

### 1. Introduction :

Increased tolerance to contaminants in natural populations living in polluted areas can be mediated either by genetic adaptation (selection of genetically inherited tolerance), relying on microevolution processes which imply change in genotypic frequencies in the population and/or change in the DNA sequence, or by physiological acclimation, namely phenotypic plasticity which does not yield to shifts in the genetic structure of the population (Klerks and Weis 1987, Lopes et al. 2006, Medina et al. 2007). These two processes are quite different, with for instance a different persistence over time when exposure is relaxed, but because they both question the relevance of toxicity assessment established on bioassays employing organisms from reference populations, *i.e.* naive towards contaminant exposure, they fairly challenge ecological risk assessment (ERA) of chemicals. Each in its own way, they should be taken into account when translating outcomes of ecotoxicity tests in terms of environmental quality standards and they can be associated with fitness or genetic costs (Klerks and Weis 1987, Millward and Klerks 2002, Medina et al. 2007, Gall et al. 2013). Nonetheless, if many studies have reported changes of tolerance in natural animal populations for a variety of taxa, as well as for aquatic and terrestrial organisms, in most of them the question of underlying mechanism (genetic or not) is not clearly addressed (reviewed in Klerks and Lentz 1998, Belfiore and Anderson 2001, Johnston 2011) despite that it is of deep concern for ERA. Even, in the few studies addressing this issue, no consensus seems to

emerge about the genetic or non-genetic basis of tolerance to contaminants, and especially for field studies involving natural populations. For instance, some authors have reported in crustaceans a genetic basis of increased tolerance to metals for natural populations of *Daphnia longispina* (Lopes et al. 2006) and *Tisbe holothuriae* (Miliou 2000) coming from polluted sites, while Maltby and Crane (1994) reported that the metal tolerance of *Gammarus pulex* was most probably due to physiological acclimation.

*Gammarus fossarum* is a freshwater crustacean species for which many developments have been conducted in ecotoxicology (from subindividual biomarkers to population model) contributing to the use of gammarids for environmental biomonitoring (Kunz et al. 2010, Chaumot et al. 2015). Our recent work on this species has addressed the question of tolerance to metals of natural populations through *a priori* (quantitative genetics on reference populations) and retrospective (case study in contaminated field) approaches. They provided divergent results in lines with those found in the literature for crustaceans. In one hand, we have demonstrated in a quantitative genetic study, that natural non-impacted populations of *G. fossarum* does not have the potential to evolve genetically for tolerance to cadmium (Cd). Indeed, we found a weak additive genetic variance of this trait, what led us to conclude to a very low narrow sense heritability ( $h^2$ ) of Cd tolerance (Chaumot et al. 2009, Vigneron et al. submitted). In the other hand, we have identified in the same time a natural population of *G. fossarum* tolerant to Cd, and whose Cd-tolerance is transmissible to offspring produced in clean conditions in the lab (Vigneron et al. 2015).

Thus, in the present study we aimed to gain insights in the determinism of the Cd-tolerance of this population of *G. fossarum*. More precisely we tested whether or not this tolerance is due to genetic adaptation. In this way we compare the sensitivity to Cd of related individuals, *i.e.* broods, of this Cd-tolerant population and of a non-exposed population, through the realization of breeding experiment protocols. Both the average level of population's Cd-sensitivity and the intra-population distribution of Cd-sensitivity of broods were analyzed. First, it seeks to confirm the Cd-tolerance of the F1 juveniles of the Cd-tolerant population, and to establish whether this increased tolerance is explained by a simple loss of sensitive individuals compared to a non-impacted population, or to an increase of the maximum level of individual tolerance (Lopes et al. 2005). Because maintenance of the Cd-

tolerance after de-acclimation could reveal genetic adaptation (Johnston 2011, Klerks and Lentz 1998, Klerks et al. 2011, Wirgin and Waldman 2004 in Gall et al. 2013), the same protocol was conducted with laboratory-acclimated individuals maintained in clean water (*i.e.* de-acclimation (Klerks and Levinton 1989, Klerks and Lentz 1998)), to observe how the population's tolerance evolves when Cd-exposure is relaxed. Outcomes of the study led us to discuss the phenomenon of physiological acclimation and the importance of parental effects in the determination of individual sensitivity to contaminants. The hypothesis of trans-generational acclimation emerged as a reconciling hypothesis between the non-genetic basis of tolerance and the transmissibility to offspring in the *Gammarus* case. We also emphasize the scarcity of studies addressing the question of transgenerational acclimation from an ecotoxicological point of view and point out their potential implications for ERA.

## **2. Materials and methods :**

### **2.1. Field populations :**

Gammarids were collected from two different sites. Organisms of the Cd-tolerant population, denoted Ardi, were collected on a long established population which is present all the year, and has recently been the subject of a demographic follow up (Coulaud et al. 2014). It is located within an upstream location of the River Ardières, Rhône, France (46°11'11.2"N ; 04°31'14.3"E). This station is contaminated by bioavailable Cd coming from natural geochemical sources (Vigneron et al. 2015). No other bioavailable metal contamination has been detected in this site. This population has been identified as Cd-tolerant in previous work (Vigneron et al. 2015). The geochemical nature of the Cd-contamination ensures that the population Ardi has been long term exposed to Cd. Thus, the population Ardi constitutes a very suited case study to study mechanism underlying natural population's resistance to contaminants, because all conditions are met for selection and thus genetic adaptation for metal resistance to occur : bioavailable contamination, single contaminant, severity of contamination, long term and constant exposure (Klerks and Weis 1987, Roesijadi and

Fellingham 1987, Klerks et al. 1997, Klerks and Lentz 1998, Klerks et Moreau 2001, Grant 2002).

Gammarids of the reference population used as control, so-called Tour, were collected within an upstream location of the River Bourbre, Isère, France (45°34'09.9"N ; 05°27'33.9"E). This population has been used as source of organisms for numerous previous studies (e.g. Xuereb et al. 2009, Coulaud et al. 2011, Jubeaux et al. 2012, Charron et al. 2013, Trapp et al. 2014, Vigneron et al. 2015). It is also a long established population. No bioavailable metal contamination has been detected in this site (Vigneron et al. 2015), and biomonitoring of water quality (*in situ* toxicity bioassays) led us to consider the sampled population as not impacted by environmental contamination in recent years (unpublished data). Complete methodology and full results about the characterization of metallic bioavailable contamination of the two sites are detailed in Vigneron et al. (2015).

## 2.2. Broods' production :

Before the beginning of the experiment, organisms were acclimatized two weeks to controlled laboratory conditions in 30-L tanks continuously supplied with clean water (drilled groundwater mixed with osmosed water at constant conductivity : 300  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , water hardness : 141  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$ ), with a constant aeration, at a temperature of 12 °C, with a photoperiod of 16/8-h light/dark, and fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*) and a weekly supply of *Tubifex* larvae. After the acclimatization period, mating pairs with females in the last stage of their reproductive cycle (hatched juveniles in brood pouch) of the two populations were sorted. Mating pairs were identified as described by Chaumot et al. (2009), based on phenotypic features indicative of the reproductive stage of females described by Geffard et al. (2010). Each mating pair with females bearing embryos in marsupial pouch was isolated in individual 500-mL glass beakers for three successive juvenile release events occurring synchronously with female molting (approximately two months) (see Vigneron et al. submitted). They were maintained under the same conditions as for acclimatization period. The first batch of juveniles (obtained within 1 week after the selection of mating pairs) is constituted from individuals with unknown fathers (fertilization in the field before sampling),

the second batch (released one month later) corresponding to the offspring of the guarding males present when pairs were selected. After the first fertilization of females, males were randomly redistributed between beakers. Thus, at the end, each female produced juveniles from three different males. This controlled mating scheme gave rise to three batches of broods for the two populations. Hence, each batch of broods was obtained from mating pairs with a different duration of de-acclimation period from field conditions. Thus, juveniles of the first batch of broods (C1-batch of broods) were born from mating pairs with two weeks of de-acclimation (initial acclimatization period to controlled laboratory conditions) and they were already present in female marsupium as early embryonic stages at time of field sampling. Juveniles of the second batch of broods (C2-batch of broods) were born from mating pairs with six weeks of de-acclimation. At last, juveniles of the third batch of broods (C3-batch of broods) were born from mating pairs with eleven weeks of de-acclimation.

### 2.3. Cd-sensitivity of broods :

Lethal toxicity test were performed on juveniles from broods obtained for the two *G. fossarum* populations. Assays were conducted with 5 neonates (less than one day old) per brood with the same protocol of Vigneron et al. (submitted). They were exposed individually to a test solution of nominal concentration of  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  of Cd during semi-static exposure (renewing every 48h) in 50 mL polypropylene tubes (BD FalconT) with a 16/8-h light/dark photoperiod, and a temperature of  $12^{\circ}\text{C}$ . Individuals and populations were randomly distributed within experimental systems. Survival was monitored every day until all individuals die. A stock of test solution was prepared for each batch of broods of the two populations from the addition of a stock solution of nominal concentration of  $20 \text{mg L}^{-1}$  of Cd ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  in demineralized water) to clean water (drilled groundwater mixed with osmosed water, conductivity :  $300 \mu\text{S cm}^{-1}$ , water hardness :  $106 \text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$ ). Cd used was provided by Sigma–Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). A subsample of juveniles was also used as control, *i.e.* submitted to the same treatment except that no Cd was added in exposure water, when testing the C3-batch of broods of the two populations. Mortality in control juveniles was less than 10% when all mortalities have occurred in exposed juveniles.

## 2.4. Statistical analysis :

All statistical procedures were carried out with the R software (R Core Team 2012). Analyses were performed on log transformed survival times (for homoscedasticity) using linear mixed-effect models and restricted maximum likelihood fits (REML) with the lme function from the nlme library within R. All analyzed models considered log transformed individual survival time as response, and a random effect of brood as explaining variable. To assess difference in mean level of Cd-sensitivity between populations, models including an additional fixed population effect were built. Interaction between random brood effect and population effect was also included to test difference in between-brood variability between populations. The same was done with batch effect to test the influence of de-acclimation (*i.e.* C1/C2/C3) on mean level and between-brood variability of Cd-sensitivity of each population. The significance of fixed effects was tested with the anova function, while the significance of random effects was assessed by likelihood ratio test between nested models, and comparison of AIC and BIC criteria (Pinheiro and Bates 2000).

## 3. Results :

### 3.1. Differences in between-brood variability of Cd-sensitivity underlie the tolerance in C1 juveniles of the Ardi population :

Juveniles of the first batch of broods of the Ardi population were more tolerant to Cd with a mean survival time equal to 1.56 days (Table 1) compare to those of the Tour population which had a mean survival time only equal to half this value (0.80 day). This difference is statistically significant when testing, a fixed population effect on the survival time of C1-broods ( $P < 0.0001$ , Table 2). In addition the random effect of brood on survival time was significantly different between the Ardi and Tour populations (interaction  $P < 0.0001$ ). The variance of mean survival time per brood was in fact much lower in Ardi than in Tour (equal to 0.05 for Ardi and to 0.24 for Tour), indicating that the range of distribution of survival time of broods is much tighter within the population Ardi than within the population

Tour. As pointed by Figure 1 A and A', these changes in mean level of Cd-sensitivity and intra-population distribution of sensitivity in the population Ardi are explained by an absence of sensitive broods in C1-batch of broods in this population compared to the Tour population. For instance, for the Ardi C1-batch of broods, only 3.3 % of broods had a mean lethal time below three days, what is very low compared to the population Tour, for which this proportion of sensitive broods was equal to 54.7% (Table 1). Moreover, it is noticeable that the maximum brood's mean lethal time was observed in broods of the Tour population (Table 1) and not in broods of the Cd-tolerant population Ardi. These observations lead to the first conclusion that the increased tolerance to Cd in the Ardi population is not linked to an increase of the upper limit of the population tolerance with the presence of highly resistant individuals compared to the reference population. It is indeed due to a narrowing of the range of distribution of brood sensitivity within the population, with the loss of sensitive broods and the grouping of broods around the maximum level of tolerance recorded in the Tour population.

**Table 1 : Quantitative description of survival recorded for neonates exposed to  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  of Cd for the three batches of broods (C1, C2 and C3) and for the two populations Ardi and Tour. Values for the third and the fourth column have been calculated regardless of broods. Values for column 5 to 7 have been calculated taking into account broods. All values have been calculated from log transformed survival time except that the column 7 (maximum brood's mean survival time).**

| Population         | n broods<br>(n neonates) | Total variance<br>survival time* | Mean<br>survival<br>time* | Variance mean<br>survival time<br>per brood* | % of broods<br>with mean lethal<br>time < 3days | Maximum<br>brood's mean<br>survival time** |
|--------------------|--------------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>ARDI</b>        |                          |                                  |                           |                                              |                                                 |                                            |
| C1-batch of broods | 60 (283)                 | 0.18                             | 1.56                      | 0.05                                         | 3.3                                             | 7.9                                        |
| C2-batch of broods | 55 (271)                 | 0.13                             | 1.52                      | 0.06                                         | 3.6                                             | 6.9                                        |
| C3-batch of broods | 50 (240)                 | 0.33                             | 1.28                      | 0.15                                         | 22                                              | 8.7                                        |
| <b>TOUR</b>        |                          |                                  |                           |                                              |                                                 |                                            |
| C1-batch of broods | 53 (265)                 | 0.57                             | 0.80                      | 0.24                                         | 54.7                                            | 6.3                                        |
| C2-batch of broods | 53 (265)                 | 0.43                             | 1.23                      | 0.19                                         | 22.6                                            | 12.7                                       |
| C3-batch of broods | 38 (183)                 | 0.48                             | 0.91                      | 0.20                                         | 65.8                                            | 6.1                                        |

\* log(days) ; \*\* days

### 3.2. De-acclimation induces the appearance of sensitive broods in the Ardi C3-batch of broods :

For the Ardi population, the same results as for C1-batch broods have been found for C2-batch broods. Indeed, there are no significant differences between these two batches of broods, neither for the mean level of population tolerance, nor for the between-brood variability of sensitivity (fixed batch effect and interaction of batch effect with random brood effect :  $P > 0.05$  for C1- and C2-batches, Table 2). C2-batch broods of the Ardi population also still show a Cd-tolerance and a within-population distribution of broods' sensitivity different to the non-impacted population Tour (fixed and random effect "population" for C2-batch broods :  $P \leq 0.0001$ , Table 2). Thus, there is no significant effect of six weeks de-acclimation of mating pairs on the Cd-tolerance of juveniles of Ardi.

Conversely, de-acclimation of mating pairs for eleven weeks had a significant effect. The mean level of tolerance of Ardi juveniles of the C3-batch of broods significantly decreases in comparison to C1- and C2-batches (fixed batch effect  $P < 0.0001$  between C1- and C3-batch of broods or between C2- and C3-batch of broods, Table 2). The between-brood variability of survival time is as well different in this batch of broods (interaction between batch effect and random brood effect :  $P < 0.0001$  between C1- and C3-batch of broods and between C2- and C3-batch of broods, Table 2). The variance of mean survival time per brood increased from 0.05 and 0.06 respectively for C1- and C2-batch of broods to 0.15 for the C3-batch broods. It indicates that the range of distribution of C3 brood sensitivity is larger than in the two previous batches of broods. The decrease of population's level of tolerance and the inflated range of between-brood variability in Cd-tolerance are explained by the presence of sensitive broods in the C3-batch of broods (Figure 1 C), which were absent in this population in the C1- and C2-batch of broods (Figure 1 A and B). This appearance of sensitive broods in Ardi in the C3-batch of broods is also highlighted by the large increase of the percentage of broods with mean lethal time below three days, from around 3% in the C1- and C2-batch of broods to 22% in the C3-batch of broods. Thus, the pattern of Cd-sensitivity of Ardi tends to be similar to that of the Tour population. There is no difference of the distribution of broods between the two populations for the C3-batch of broods (interaction between population and

random brood effect for C3 :  $P = 0.9785$ , Table 2), and the mean level of tolerance of Ardi tends to be closer to that of Tour, despite it is still statistically different (fixed population  $P < 0.0001$ ).

Hence, the peculiar pattern of Cd-sensitivity of the population Ardi was no longer evident for broods born from the eleven weeks de-acclimated mating pairs. It indicates that the tolerance to Cd in this population is not maintained when the Cd-exposure is stopped.

**Table 2 : Results of analyses performed to test difference in mean level of Cd-sensitivity (fixed effect) and between and difference in between-brood variability (interaction with random brood effect) between batches of broods and between populations (anova and likelihood ratio test :  $* = P < 0.05$ ).**

| Population /<br>batch of broods | Effect    |                                            |
|---------------------------------|-----------|--------------------------------------------|
|                                 | Fixed     | Interaction<br>with random<br>brood effect |
| <i>BATCH EFFECT</i>             |           |                                            |
| ARDI                            |           |                                            |
| C1 - C2                         | 0.4167    | 0.9705                                     |
| C2 - C3                         | 0.0001 *  | 0.0031 *                                   |
| C1 - C3                         | <0.0001 * | 0.001 *                                    |
| TOUR                            |           |                                            |
| C1 - C2                         | <.0001 *  | 0.711                                      |
| C2 - C3                         | 0.0005 *  | 0.5564                                     |
| C1 - C3                         | 0.2563    | 0.1885                                     |
| <i>POPULATION EFFECT</i>        |           |                                            |
| ARDI vs TOUR                    |           |                                            |
| C1                              | <0.0001 * | <0.0001 *                                  |
| C2                              | <.0001 *  | 0.0001 *                                   |
| C3                              | <0.0001 * | 0.9785                                     |

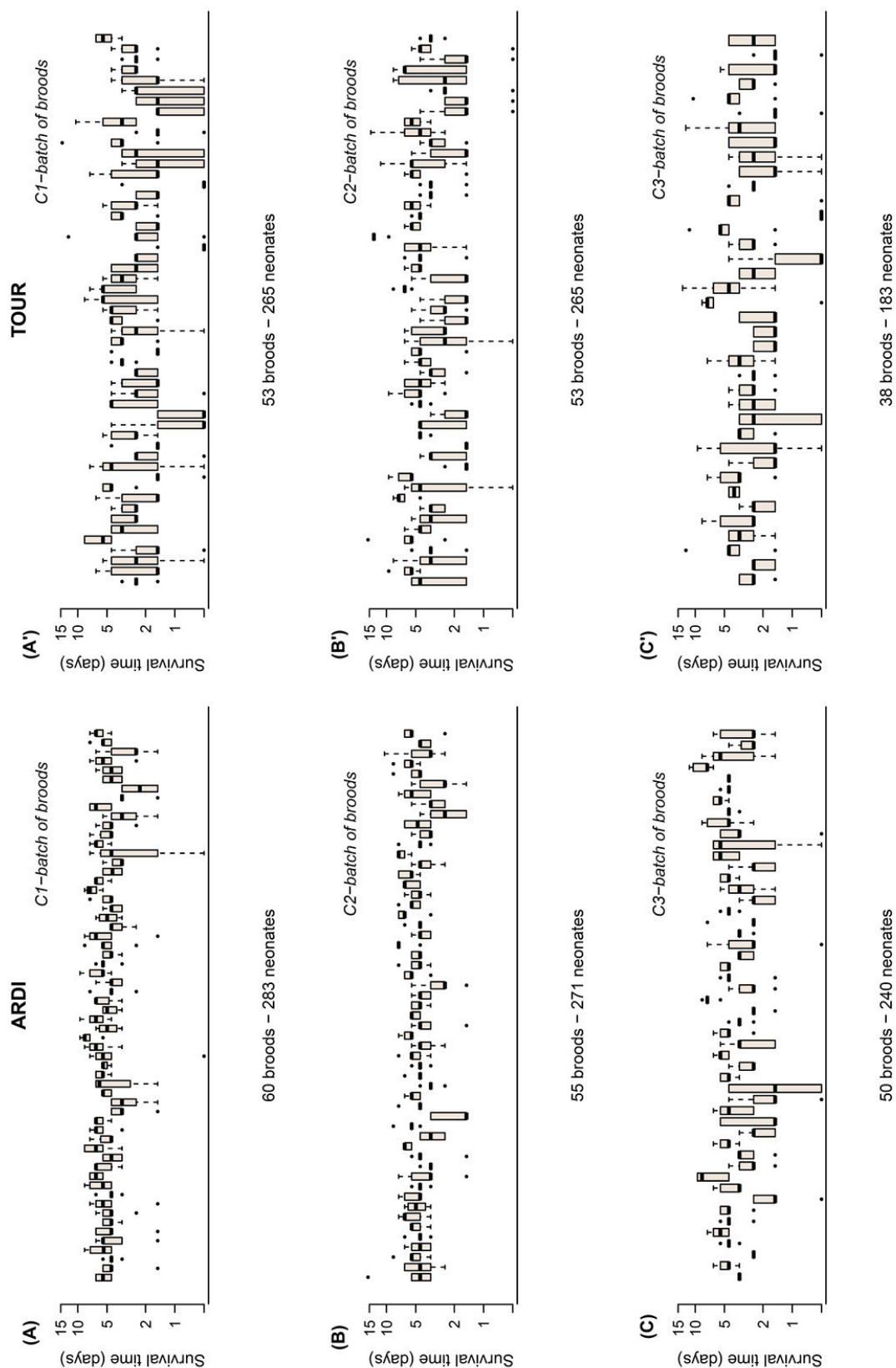


Figure 1 : Between-brood heterogeneity in Cd tolerance. Box-and-whisker plots of log transformed lethal times of neonates exposed to  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  of Cd. Panels correspond to the records of the three batches of broods (C1, C2 and C3) for the population Ardi on the left (A–C), and for the population Tour on the right (A'–C'). Boxes extend from the first to the third quartile of lethal times within each brood with a bold segment for the median lethal time ; the whiskers extend to the most extreme data points which are no more than 1.5 times the interquartile range, and dots represent outliers.

#### 4. Discussion :

##### 4.1. Juveniles of the Ardi population are more tolerant to Cd, and this tolerance is linked to the absence of sensitive broods :

Results of Cd-sensitivity of Ardi population broods , produced from mating pairs recently collected in the field (the C1-batch of broods) are in line with findings of our former work considering five reference *G. fossarum* populations as control of the shift in sensitivity recorded in Ardi (Vigneron et al. 2015). Here again, Ardi juveniles were more tolerant to Cd than their conspecifics from the Tour population, with a shift of tolerance in the same range as in that previous study. In the present study we highlighted that the Cd-tolerance of the Ardi population was linked to a narrowing of the range of distribution of Cd-sensitivity of broods within the population because of the absence of sensitive broods (*i.e.* broods with low mean survival time) and not to an increase of the upper limit of the population tolerance. Lopes et al. (2005) have already addressed this question for resistance to metal contamination for *Ceriodaphnia pulchella*. They identified that non-acclimated individuals from a population of daphnids historically stressed by metal contamination shown a higher tolerance to those contaminants. In lines with our results, they observed that sensitive individuals were absent within this tolerant population historically impacted by metals compared to reference populations. Nonetheless, their results do not allow to clearly to conclude about the presence of highly resistant individuals in this population compared to reference populations.

##### 4.2. The determinism of Cd-tolerance in the Ardi population is not genetic :

The comparison of Cd-sensitivity of successive batches of broods produced during eleven weeks of de-acclimation of mating pairs revealed here that the Cd-tolerance of the Ardi population was not due to genetic adaptation. Indeed, sensitive broods which were absent in the initial batch of broods produced from mating pair soon after field sampling were present in the C3-batch of broods. This pattern rules out the hypothesis that the Cd-tolerance of C1 broods is due to the inheritance from their parents of a genetically based tolerance,

(Posthuma and van Straalen 1993, Klerks and Lentz 1998, dans Klerks et al. 2011)). Non-genetic tolerance to contaminants, revealed by loss of difference in population sensitivity when exposure is stopped has already been reported for a lead-tolerant population of the mosquitofish *Gambusia affinis* (Klerks and Lentz 1998) and for the interpopulation differences in sensitivity to Cd of the freshwater snails *Brotia hainanensis* (Lam 1996). The non-genetic basis of Cd-tolerance within the Ardi population is also consistent with the findings of the laboratory study of Stuhlbacher and Maltby (1992) which had demonstrated the ability of *G. pulex* to develop Cd-tolerance through physiological acclimation after cadmium and zinc pre-exposure. This ability of physiological acclimation to metals of *G. pulex* was observed in the field as well, in a population which showed a decrease in tolerance to iron between two collection periods correlated with a decrease of the concentration of this metal at the sampling site (Maltby and Crane 1994). Laboratory induced physiological acclimation to metals after pre-exposure have also been reported for other crustaceans, as the Grass Shrimp *Palaemonetes pugio* (Klerks 1999), the daphnid *Daphnia magna* (Leblanc 1982, Bodar et al. 1990, Tsui and Wang 2005), or the marine copepod *Tigriopus japonicus* (Kwok et al. 2009).

The absence of genetic adaptation to Cd in the population Ardi, agrees with a lack of additive genetic variance in the trait “Cd-sensitivity” within non-impacted *G. fossarum* populations selected in the same geographical area than the Ardi population (Chaumot et al. 2009, Vigneron et al. submitted). In addition, F1 juveniles from Ardi were approximately two fold more tolerant to Cd compared to those from Tour, as the  $LT_{50}$  of the two populations were respectively 5.5 days and 2.5 days respectively for the two populations for juveniles of the C1-batch of broods. This shift in tolerance between the two populations is relatively moderate.

#### 4.3. Parental effects as a reconciling hypothesis of transgenerational transferal of Cd-tolerance and non-genetic determinism of tolerance in the Ardi population :

According to Klerks and Weis 1987, physiological acclimation does not confer tolerance to lethal concentrations upon offspring, which must also be pre-exposed to acquire

it. But in this study, we have observed that juveniles of C2-batch of broods of the Ardi population were Cd-tolerant despite they have not been pre-exposed to Cd. Considering our knowledge of reproductive cycle in female *Gammarus* (Geffard et al. 2010), we can state that juveniles from C2-batch of broods were produced from oocytes that were in the first stages of vitellogenesis when females were sampled in the field. The end of the development of these oocytes, their fertilization and the development of embryos in marsupial pouch occurred in the laboratory, *i.e.* under clean conditions free of Cd. It indicates that the tolerance to Cd in this population is not due to physiological acclimation of juveniles at each generation (suggested for *Daphnia magna* by Leblanc 1982), or developmental plasticity, *i.e.* phenotypic variation of a trait that arise during the development of an individual (Piersma and Drent 2003, Uller 2008, Plautz and Salice 2013) as suggested for Cd tolerance in *Physa pomilia* by Plautz and Salice 2013) Therefore, Cd-tolerance of the Ardi juveniles is likely due to a transgenerational acclimation, *i.e.* modification of offspring sensitivity due to parental exposure by means of non-genetic mechanisms. This form of plasticity that spans generations (Uller 2008) falls into the category of parental effects, as it constitutes a non-genotypic influence of parental phenotype or environments (here Cd exposure) on offspring phenotype (Plautz et al. 2013, Plautz and Salice (2013), Badyaev and Uller 2009).

The implication of parental effects in offspring phenotype, are well known in eco-evolutionary studies but only few studies have addressed this issue in ecotoxicology (Plautz et al. 2013). These rare studies have mostly assessed the effect of environmental factors such as food, temperature, or predator exposure but not the effect of parental exposure to contaminant (Plautz et al. 2013, Colombo et. al 2014). Yet, the implication of parental effects in offspring tolerance to metals after parental exposure has been reported in laboratory experiments for *Physa pomilia* (Plautz and Salice 2013), *Daphnia magna* (Tsui and Wang 2005), *Pimephales promelas* (Peake et al. 2004, Sellin and Kolok 2006).

Maternal transfer of contaminants to offspring (Posthuma and van Straalen 1993, Ward and Robinson 2005, Sellin and Kolok 2006), maternal transfer of RNA coding for detoxification proteins such as methallothionein or stress proteins (review in Morgan et al. 2007, Plautz and Salice 2013, Lin et al. 2000), along with epigenetic modifications, constitute alternative mechanisms potentially sustaining the transgenerational tolerance in the Ardi

population. The maternal transfer of molecular determinants of metal tolerance has been suggested for fish and *D. magna* (reviewed in Kwok et al. 2009, Plautz and Salice 2013). Interestingly, the ability of gammarids to develop Cd-tolerance through physiological acclimation resulting from an increase in the concentration of metal binding proteins have already been reported at the individual scale for *G. pulex* (Stuhlbacher and Maltby 1992). Transfer to offspring of such proteins conferring higher tolerance to individuals is thus an attractive hypothesis, which should be tested in the case of the Ardi population.

Our previous study (Vigneron et al. 2015) led us to suspect that the organisms collected in the Ardi populations are more vulnerable to environmental perturbations than conspecific animals from reference populations selected within the same geographical area. Hence, while adverse consequences of genetic adaptation to contaminants and their implications for ERA are increasingly recognized (reviewed in Medina et al. 2007), the Ardi case-study points out that the possible costs of physiological acclimation with associated trans-generational processes should be scrutinized as well. Some authors in ecology literature already highlighted that physiological acclimation, and more generally phenotypic plasticity can be accompanied by costs and trade-off (DeWitt et al. 2008, Hoffman 1995, Miner et al. 2005). For contaminants, Kwok et al. (2009) has already observed fitness costs (lower fecundity and intrinsic population growth rate) associated with Cu-physiological acclimation in Cu-tolerant individuals of the marine copepod *Tigriopus japonicus*. Complications may arise when parental effects are involved as it is the case for the Ardi population. Because of their trans-generational character, parental effects are indeed susceptible to entail costs and trade-off for parents and/or offspring and affecting negatively their fitness along generations (review in Uller 2008, Marshall and Uller 2007).

## **5. Conclusion :**

This study revealed the possibility of evolution of Cd-tolerance within natural populations of *G. fossarum* by means of transgenerational acclimation. From a broader perspective, this case-study leads to propose the occurrence of parental effects in field

exposed populations as a reconciling hypothesis between the demonstration of a non-genetic basis of tolerance to contaminants and the observation of transmissibility of tolerance from parents to offspring. Our results are in line with the suggestion that genetic adaptation to contaminants is uncommon in natural aquatic animal populations (Klerks 2002, Woods and Hoffmann 2000), and that physiological acclimation probably plays a significant role in reported cases of increased-tolerance in field populations. This case-study in *Gammarus* also emphasizes that transgenerational physiological acclimation, must be considered as a source of uncertainty for ERA as far as genetic adaptation, because it may also be relatively persistent and lead to detrimental indirect population effects.

## References :

- Badyaev, A. V. and T. Uller. 2009. Parental Effects in Ecology and Evolution: Mechanisms, Processes and Implications. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 364:1169-1177.
- Bodar, C. W. M., I. van der Sluis, J. C. P. van Montfort, P. A. Voogt, and D. I. Zandee. 1990. Cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 16:33-39.
- Charron, L., O. Geffard, A. Chaumot, R. Coulaud, H. Queau, A. Geffard, and O. Dedourge-Geffard. 2013. Effect of water quality and confounding factors on digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum*. *Environmental Science and Pollution Research* 20:9044-9056.
- Chaumot, A., P. Gos, J. Garric, and O. Geffard. 2009. Additive vs non-additive genetic components in lethal cadmium tolerance of *Gammarus* (Crustacea): Novel light on the assessment of the potential for adaptation to contamination. *Aquatic Toxicology* 94:294-299.
- Chaumot, A., O. Geffard, J. Armengaud and L. Maltby. 2015. Gammarids as a reference species for freshwater monitoring. In *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Eds: C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard and C. Mouneyrac. Publisher: Elsevier. In press.
- Colombo, V., V. J. Pettigrove, L. A. Golding, and A. A. Hoffmann. 2014. Transgenerational effects of parental nutritional status on offspring development time, survival, fecundity, and sensitivity to zinc in *Chironomus tepperi* midges. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 110:1-7.
- Coulaud, R., O. Geffard, B. Xuereb, E. Lacaze, H. Quéau, J. Garric, S. Charles, and A. Chaumot. 2011. In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research* 45:6417-6429.
- DeWitt, T. J., A. Sih, and D. S. Wilson. 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* 13:77-81.
- Geffard, O., B. Xuereb, A. Chaumot, A. Geffard, S. Biagianti, C. Noël, K. Abbaci, J. Garric, G. Charmantier, and M. Charmantier-Daures. 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29:2249-2259.
- Grant, A. 2002. Pollution-Tolerant Species and Communities: Intriguing Toys or Invaluable Monitoring Tools? *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8:955-970.
- Hoffmann, A. A. 1995. Acclimation: increasing survival at a cost. *Trends in Ecology & Evolution* 10:1-2.
- Johnston, E. 2011. Tolerance to contaminants: evidence from chronically-exposed populations of aquatic organisms. Pages 25-46 in C. Amiard, P. S. Rainbow and M. Roméo, *Tolerance to environmental contaminants*. CRC Press, Boca Raton.
- Jubeaux, G., R. Simon, A. Salvador, H. Quéau, A. Chaumot, and O. Geffard. 2012. Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. *Aquatic Toxicology* 112-113:72-82.

- Klerks, P. 1999. Acclimation to Contaminants by the Grass Shrimp *Palaemonetes pugio*: Individual Contaminants vs. Mixtures. *Ecotoxicology* 8:277-286.
- Klerks, P. and J. Levinton. 1989. Effects of Heavy Metals in a Polluted Aquatic Ecosystem. Pages 41-67 in S. A. Levin, J. R. Kelly, M. A. Harwell, and K. D. Kimball, editors. *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. Springer New York.
- Klerks, P. L. 2002. Adaptation, Ecological Impacts, and Risk Assessment: Insights from Research at Foundry Cove, Bayou Trepagnier, and Pass Fourchon. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8:971-982.
- Klerks, P. L., P. L. Leberg, R. F. Lance, D. J. McMillin, and J. C. Means. 1997. Lack of development of pollutant-resistance or genetic differentiation in darter gobies (*Gobionellus boleosoma*) inhabiting a produced-water discharge site. *Marine Environmental Research* 44:377-395.
- Klerks, P. L. and S. A. Lentz. 1998. Resistance to lead and zinc in the western mosquitofish *Gambusia affinis* inhabiting contaminated Bayou Trepagnier. *Ecotoxicology* 7:11-17.
- Klerks, P. L. and C. J. Moreau. 2001. Heritability of resistance to individual contaminants and to contaminant mixtures in the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:1746-1751.
- Klerks, P. L. and J. S. Weis. 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review. *Environmental Pollution* 45:173-205.
- Klerks, P. L., L. Xie, and J. S. Levinton. 2011. Quantitative genetics approaches to study evolutionary processes in ecotoxicology; a perspective from research on the evolution of resistance. *Ecotoxicology* 20:513-523.
- Kwok, K. W. H., E. P. M. Grist, and K. M. Y. Leung. 2009. Acclimation effect and fitness cost of copper resistance in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:358-364.
- Lam, P. K. S. 1996. Interpopulation differences in acute response of *Brotia hainanensis* (Gastropoda, Prosobranchia) to cadmium: Genetic or environmental variance? *Environmental Pollution* 94:1-7.
- LeBlanc, G. A. 1982. Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (straus) to environmental pollutants. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological* 27:309-322.
- Lin, H. C., S. C. Hsu, and P. P. Hwang. 2000. Maternal transfer of cadmium tolerance in larval *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* 57:239-248.
- Lopes, I., D. J. Baird, and R. Ribeiro. 2005. Resistance to metal contamination by historically-stressed populations of *Ceriodaphnia pulchella*: Environmental influence versus genetic determination. *Chemosphere* 61:1189-1197.
- Maltby, L. and M. Crane. 1994. Responses of *Gammarus pulex* (amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution* 84:45-52.

- Marshall, D. J. and T. Uller. 2007. When is a maternal effect adaptive? *Oikos* 116:1957-1963.
- Medina, M. H., J. A. Correa, and C. Barata. 2007. Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 67:2105-2114.
- Miner, B. G., S. E. Sultan, S. G. Morgan, D. K. Padilla, and R. A. Relyea. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* 20:685-692.
- Morgan, A. J., P. Kille, and S. R. Stürzenbaum. 2007. Microevolution and Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. *Environmental Science & Technology* 41:1085-1096.
- Peake, E. B., J. C. Locke, L. L. Tierney, and A. S. Kolok. 2004. Copper tolerance in fathead minnows: II. Maternal transfer. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:208-211.
- Piersma, T. and J. Drent. 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology & Evolution* 18:228-233.
- Pinheiro, J.C. & Bates, D.M. 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer, New-York.
- Plautz, S. C., T. Guest, M. A. Funkhouser, and C. J. Salice. 2013. Transgenerational cross-tolerance to stress: parental exposure to predators increases offspring contaminant tolerance. *Ecotoxicology* 22:854-861.
- Plautz, S. C. and C. J. Salice. 2013. Plasticity in offspring contaminant tolerance traits: developmental cadmium exposure trumps parental effects. *Ecotoxicology* 22:847-853.
- Posthuma, L. and N. M. van Straalen. 1993. Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 106:11-38.
- R Core Team (2012). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Roesijadi, G. and G. W. Fellingham. 1987. Influence of Cu, Cd, and Zn Preexposure on Hg Toxicity in the Mussel *Mytilus edulis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44:680-684.
- Sellin, M. K. and A. S. Kolok. 2006. Maternally derived Cu tolerance in larval fathead minnows: how long does it persist? *Journal of Fish Biology* 69:1570-1574.
- Stuhlbacher, A. and L. Maltby. 1992. Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22:319-324.
- Trapp, J., O. Geffard, G. Imbert, J.-C. Gaillard, A.-H. Davin, A. Chaumot, and J. Armengaud. 2014. Proteogenomics of *Gammarus fossarum* to Document the Reproductive System of Amphipods. *Molecular & Cellular Proteomics* 13:3612-3625.
- Tsui, M. T. K. and W.-X. Wang. 2005. Influences of maternal exposure on the tolerance and physiological performance of *Daphnia magna* under mercury stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:1228-1234.
- Uller, T. 2008. Developmental plasticity and the evolution of parental effects. *Trends in Ecology & Evolution* 23:432-438.

- Vignerot, A., O. Geffard, M. Coquery, A. François, H. Quéau, and A. Chaumot. 2015. Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a *Gammarus fossarum* population inhabiting a low-level contaminated stream. *Ecotoxicology*. In Press.
- Ward, T. J. and W. E. Robinson. 2005. Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:2341-2349.
- Woods, R. E. and A. Hoffmann. 2000. Evolution in toxic environments: quantitative versus major gene approaches. Pages 129-145 in J. Kammenga, and R. Laskowski, *Demography in ecotoxicology*, J. Wiley & Sons Ltd, Chichester, New York, Toronto.
- Xuereb, B., E. Lefèvre, J. Garric, and O. Geffard. 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology* 94:114-122.



#### Note n°4 : Compléments à la Publication n°3 :

La comparaison de la distribution entre fratries de la sensibilité au cadmium au sein de la population Ardi à celle au sein de la population Tour au cours de la Publication n°3 a permis de mettre en évidence que l'augmentation de la tolérance au cadmium de cette population n'était pas liée à la présence d'individus plus tolérants que ceux présents dans la population Tour mais à une modification de la distribution intra-population de la sensibilité avec une absence d'individus sensibles.

Il est également possible de comparer la distribution intra-population de la sensibilité au cadmium de la population Ardi à celle de la population Bois. Cette comparaison de la survie de la première cohorte de juvéniles nés au laboratoire des populations Ardi et Bois conduit aux mêmes observations qu'avec la population Tour. La population Ardi ne présente pas une augmentation du niveau maximal de tolérance par rapport aux populations de référence, la fratrie la plus tolérante, avec un temps moyen de survie 9,2 jours, étant observée au sein de la population Bois (Tableau IV-2). En outre les  $LT_{90}$  (*i.e.* temps léthal pour 90% pour des individus testés) de Ardi, Bois et Tour sont respectivement égales à 2,01 ; 2,14 et 1,70 (calculées à partir des survies en log). La population Ardi présente un déficit en individus sensibles. Les fratries avec une  $LT_{50}$  inférieure à 3 jours ne représentent en effet que 3,3% des fratries au sein de cette population alors qu'elles représentent la majorité des fratries pour les deux autres populations (59,7% et 69,8 % respectivement pour Bois et Tour) (Tableau IV-2). Ceci se manifeste par ailleurs au travers des  $LT_{10}$  (*i.e.* temps léthal pour 10% pour des individus testés) qui sont de 1,25 pour la population Ardi et de 0,4 et -0,69 pour Bois et Tour ( $LT_{10}$  calculées à partir des survies en log). D'autre part, les deux populations de référence Bois et Tour présentent un profil similaire (Figure IV-3), bien que Bois semble présenter un niveau de tolérance maximale supérieure, une plus faible proportion d'individus sensibles, et une plus grande variabilité intra-population et inter-fratrie de la sensibilité au cadmium (Tableau IV-2).

Ainsi, ces résultats permettent de généraliser les conclusions de la Publication n°3 et corroborent le fait que la tolérance au cadmium de la population Ardi résulte bien d'un resserrement de la distribution intra-population de la sensibilité au cadmium autour des niveaux de tolérance maximum existant au sein des populations de référence comme l'illustre la Figure IV-3.

**Tableau IV-2 : Statistiques descriptives des survies enregistrées à une exposition à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd pour la première cohorte de juvéniles produite au laboratoire à partir de couples prélevés *in situ* pour les trois populations étudiées Ardi, Bois et Tour. Les valeurs des colonnes 3 et 4 ont été calculées sans tenir compte de la structure en fratrie des données. Les colonnes 5 et 6 ont été calculées en tenant compte de la structure en fratrie des données. Les résultats présentés pour la population Ardi et Tour sont les mêmes que ceux de la Publication n°3.**

| Population | Nb fratries<br>(nb néonates) | Variance totale<br>des temps de<br>survie* | Variance de la<br>moyenne des temps<br>de survie par fratrie* | Fraties avec<br>une LT50 < 3<br>jours (%) | Temps moyen de<br>survie d'une fratrie<br>maximal (jours)** |
|------------|------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| ARDI       | 60 (283)                     | 0,18                                       | 0,05                                                          | 3,3                                       | 7,9                                                         |
| BOIS       | 62 (237)                     | 0,69                                       | 0,38                                                          | 59,7                                      | 9,2                                                         |
| TOUR       | 53 (265)                     | 0,57                                       | 0,24                                                          | 69,8                                      | 6,3                                                         |

\*log(jours) ; \*\* jours

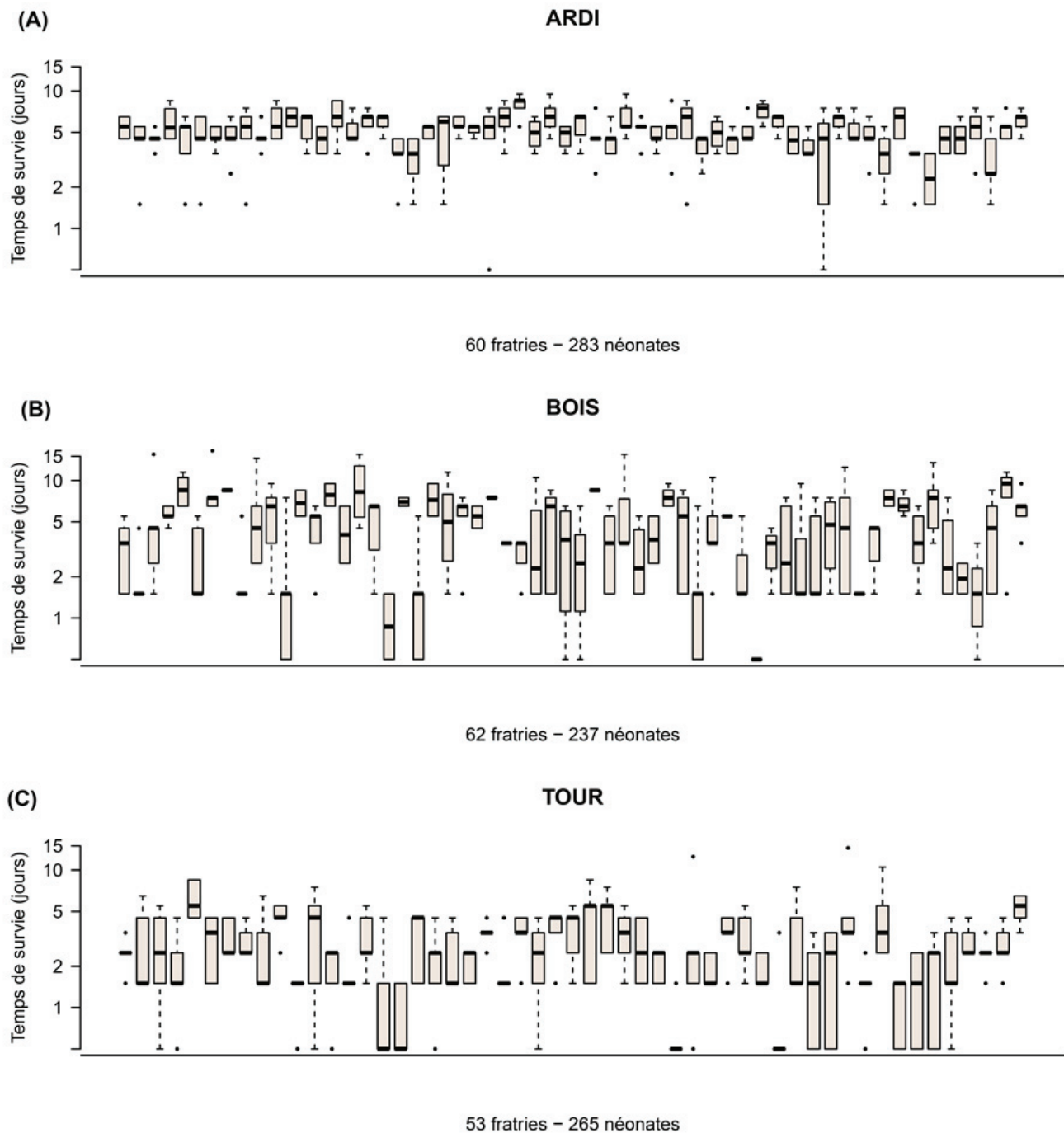


Figure IV-3 : Temps de survie de la première cohorte de fratries (full-sibs) produite au laboratoire pour les trois populations Ardi (A), Bois (B) et Tour (C) à une exposition à 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de Cd. Les boîtes représentent les temps de survie en jours enregistrés transformés en log pour l'ensemble des juvéniles d'une même fratrie et s'étendent du premier au troisième quartile de la distribution des mesures. Le trait horizontal noir correspond à la médiane. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes des mesures ne dépassant pas 1,5 fois l'écart interquartile. Les points marginaux sortant de cette gamme sont représentés par des points noirs. Les graphiques (A) et (C) présentés pour la population Ardi et Tour sont les mêmes que ceux de la Publication n°3.



## CHAPITRE V : CARACTERISATION DE LA VARIABILITE DE LA SENSIBILITE AU CADMIUM AU SEIN DU COMPLEXE D'ESPECES *GAMMARUS FOSSARUM* (NOTE N°5)

Ce chapitre, composé d'une note, présente les travaux réalisés pour évaluer la variabilité de la sensibilité au cadmium existant entre populations de gammares (complexe *Gammarus fossarum*) afin de la mettre en regard de la sensibilité de la population Ardi ; l'objectif étant d'évaluer la divergence de cette population tolérante induite par son exposition au Cd dans le milieu.

- 1- Pour cela, nous avons dans un premier temps caractérisé la variabilité de la sensibilité au cadmium de populations de gammares naïves vis-à-vis du Cd provenant de 17 rivières dispersées géographiquement dans le quart sud-est de la France. L'objectif a été de généraliser la gamme de variabilité inter-populationnelle naturelle de la sensibilité au cadmium mise en évidence dans la Publication n°2 (Chapitre III), sur un plus grand échantillon de populations et habitant des sites avec des conditions environnementales plus contrastées.
- 2- Par ailleurs, *G. fossarum*, est une morpho-espèce composée de plusieurs lignées cryptiques (*i.e.* complexe d'espèces morphologiquement indiscernables mais génétiquement très divergentes) (Müller 1998, 2000b ; Westram et al. 2011 ; Lagrue et al. 2014). Certains auteurs ont suggéré qu'il existe des différences de sensibilité aux contaminants entre lignées cryptiques du complexe *Gammarus fossarum* (Feckler et al. 2012). Ainsi, nous avons caractérisé la diversité phylogénétique de l'ensemble des populations étudiées afin d'exclure un effet de ce facteur de confusion potentiel « cryptisme » dans l'interprétation de la divergence de la population Ardi comme liée à l'exposition au Cd.



## **1. Présentation des populations d'études :**

La première étape a été de sélectionner un panel relativement large de populations de gammares, en balayant des conditions environnementales de rivières variables de façon à intégrer de la variabilité autre que liée à une exposition à une contamination cadmique (*i.e.* facteurs environnementaux et diversité phylogénétique des peuplements de gammares). Pour cela nous avons sélectionné 17 populations du groupe *G. fossarum* Tableau V-1, dispersées à une large échelle géographique, habitant des sites couvrant une grande diversité de systèmes hydrologiques (des torrents de montagne comme la population Bois, des ruisseaux comme la population Bacu, jusqu'à des rivières de plaine comme la population Ain, indiqué par les différents rangs de Strahler), et une large gamme de conditions physico-chimiques (rapporté par la conductivité). Parmi celles-ci 5 populations (Bacu, Bois, Gala, Mand et Tour) correspondent au premier lot de populations déjà étudiées au cours du Chapitre III. La contamination métallique biodisponible a été caractérisée comme décrit en matériels et méthodes et dans la Publication n°2, à partir du protocole de monitoring actif par encagement de gammares développé au laboratoire (Besse et al. 2012a). Les données de caractérisation chimiques et physico-chimiques des rivières sélectionnées sont présentées dans le Tableau V-1. Nous avons ainsi validé que les 17 populations retenues ne sont pas exposées au cadmium dans leur milieu d'origine.

**Tableau V-1 : Caractéristiques des 17 populations de référence étudiées et de la population Ardi. Les concentrations en métaux correspondent à la moyenne calculée sur 3 réplicats de 5 gammes encagées pendant 7 jours dans les sites. Les concentrations en métaux ainsi que les valeurs seuils (VS) sont exprimées en  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de poids sec de gammes. Les LQ (limites de quantification) correspondantes à chaque série d'encagement sont présentées en annexe (Tableau A-5). Le rang de Strahler est un « indicateur simple de classification de l'importance d'un cours d'eau : il démarre à la valeur 1 à la source de tout ruisseau. Les rangs de 1 à 3 caractérisent les petits cours d'eau ou têtes de bassin. Les rangs de 4 à 8 caractérisent les cours d'eau les plus larges et les fleuves. » (Besse et al. 2012a).**

| Population                                       | Rang de Strahler | Conductivité (µS.cm <sup>-1</sup> ) | Contamination métallique biodisponible (µg.g <sup>-1</sup> ) |      |      |       |       |      |      |      |      |      |      | LQ           | Date d'encagement |
|--------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|--------------|-------------------|
|                                                  |                  |                                     | Cr                                                           | Co   | Ni   | Cu    | Zn    | As   | Se   | Ag   | Cd   | Pb   |      |              |                   |
|                                                  |                  |                                     | VS = 1,0                                                     | 0,57 | 1,00 | 83,6  | 75,5  | nd*  | nd*  |      | 0,19 | 0,30 | 0,61 |              |                   |
| Ardi                                             | 1                | 117                                 | 0,38                                                         | 0,41 | 0,91 | 69,8  | 59,5  | 1,6  | 1,67 | /    | 0,86 | 0,54 | 4    | Juillet 2013 |                   |
| 1 <sup>er</sup> lot de populations de référence  |                  |                                     |                                                              |      |      |       |       |      |      |      |      |      |      |              |                   |
| Bois                                             | 1                | 372                                 | 0,43                                                         | 0,16 | 0,71 | 63,4  | 66,0  | 1,1  | < LQ | 0,21 | 0,19 | 0,13 | 2    | Avril 2012   |                   |
| Gala                                             | 1                | 361                                 | 0,35                                                         | 0,22 | < LQ | 59,0  | 63,5  | 1,0  | < LQ | 0,16 | 0,26 | 0,19 | 2    | Avril 2012   |                   |
| Mand                                             | 2                | 370                                 | 0,70                                                         | 0,21 | 0,65 | 61,1  | 64,9  | 1,3  | < LQ | 0,21 | 0,24 | 0,17 | 2    | Avril 2012   |                   |
| Tour                                             | 3                | 550                                 | 0,56                                                         | 0,21 | < LQ | 55,0  | 66,5  | 1,6  | < LQ | 0,17 | 0,18 | 0,31 | 2    | Avril 2012   |                   |
| 2 <sup>ème</sup> lot de populations de référence |                  |                                     |                                                              |      |      |       |       |      |      |      |      |      |      |              |                   |
| Ain                                              | 5                | 382                                 | <LQ                                                          | 0,33 | 0,60 | 72,71 | 69,06 | 1,96 | 2,26 | <LQ  | 0,18 | 0,22 | 5    | Octobre 2009 |                   |
| Alba                                             | 3                | 401                                 | < LQ                                                         | 0,13 | 0,68 | 52,1  | 52,8  | 1,4  | 2,33 | < LQ | 0,15 | 0,16 | 5    | Octobre 2009 |                   |
| Ange                                             | 2                | 504                                 | 0,20                                                         | 0,26 | 0,59 | 74,7  | 77,0  | 1,3  | 1,91 | < LQ | 0,15 | 0,17 | 5    | Octobre 2009 |                   |
| Cime                                             | 1                | 537                                 | 0,92                                                         | 0,40 | 1,31 | 65,0  | 68,2  | 2,1  | 2,51 | 0,25 | 0,27 | 2,24 | 2    | Avril 2012   |                   |
| Comb                                             | 1                | 479                                 | 0,43                                                         | 0,28 | <LQ  | 79,7  | 61,2  | 1,3  | 1,78 | 0,12 | 0,11 | 0,21 | 1    | Août 2013    |                   |
| Jame                                             | 4                | 617                                 | 0,55                                                         | 0,31 | <LQ  | 72,7  | 60,4  | 1,3  | 1,86 | 0,15 | 0,18 | 0,45 | 3    | Juin 2013    |                   |
| Morc                                             | 1                | 158                                 | 0,49                                                         | 0,31 | <LQ  | 80,8  | 59,0  | 1,6  | 1,54 | 0,11 | 0,19 | 0,42 | 1    | Août 2013    |                   |
| Moug                                             | 1                | 473                                 | 0,47                                                         | 0,33 | <LQ  | 83,5  | 57,4  | 1,5  | 1,71 | 0,12 | 0,14 | 0,36 | 1    | Août 2013    |                   |
| Moul                                             | 1                | 220                                 | 0,43                                                         | 0,56 | 0,54 | 74,7  | 58,4  | 1,4  | 1,74 | 0,12 | 0,14 | 0,25 | 1    | Août 2013    |                   |
| Ouch                                             | 1                | 590                                 | 0,20                                                         | 0,24 | <LQ  | 73,2  | 56,7  | 1,0  | 2,00 | 0,11 | 0,10 | 0,17 | 1    | Août 2013    |                   |
| Sera                                             | 2                | 400                                 | 0,36                                                         | 0,26 | <LQ  | 84,4  | 58,6  | 1,0  | 1,68 | 0,12 | 0,10 | 0,16 | 1    | Août 2013    |                   |
| Vare                                             | 2                | 365                                 | 0,30                                                         | 0,14 | 0,27 | 51,0  | 54,6  | 1,1  | 2,05 | < LQ | 0,18 | 0,14 | 5    | Octobre 2009 |                   |

## **2. Variabilité de la sensibilité au cadmium entre populations d'étude :**

La sensibilité au cadmium des 17 populations de référence a été évaluée lors d'une expérimentation menée en juillet 2013 dans le cadre du stage de master 1 d'Hugues Pellerin. Au cours de cette expérimentation 3 réplicats de 15 gammares mâles adultes de tailles homogènes de chaque population ont été exposés à une gamme de concentrations de cadmium suivant une raison de deux (0, 20, 40, 80, 160, 320  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd) pendant 7 jours. L'ensemble des caractéristiques techniques de cette expérimentation (durée et conditions de stabulation des organismes, température d'exposition, renouvellement des milieux d'exposition etc.) sont récapitulées dans le Tableau A-1 en annexe. Par ailleurs, la population Ardi a également été exposée selon le même protocole au cours de cette expérimentation permettant ainsi de comparer la sensibilité de cette population à celle des 17 populations de référence. Les tailles des organismes mâles sélectionnés ont été similaires entre populations puisqu'elles sont comprises entre 9,0 et 11,4 mm (Tableau V-2). Elles se situent ainsi dans une gamme de taille pour laquelle ce facteur n'est pas à l'origine d'une variabilité de la sensibilité (Boets et al. 2012, Cf. Publication n°1).

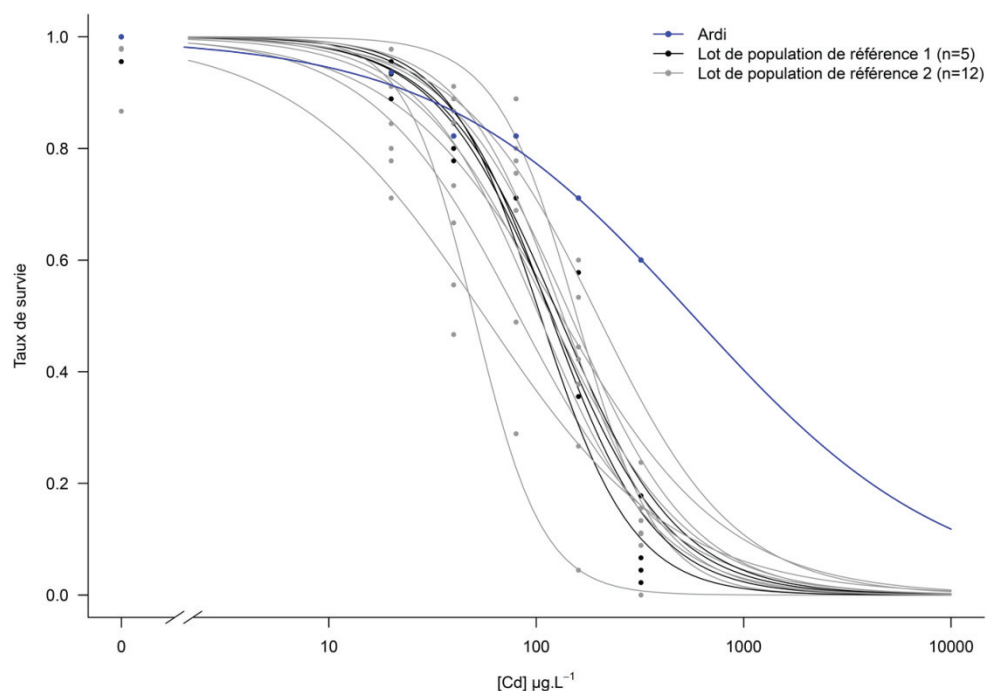
Les courbes doses-réponses et les  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  des 17 populations de référence obtenues sont présentées Figure V-1, et Tableau V-2. Alors que les  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  des 5 populations du lot 1 sont comprises entre 104,9 et 128,8  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd, celles des nouvelles populations de référence sont comprises entre 47,1 et 198,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd indiquant qu'à la fois des populations plus sensibles au cadmium (Cime, Comb, Ouch, Vare) et plus tolérantes (Alba, Ange, Moug) ont été échantillonnées. Toutefois, la sensibilité moyenne du premier lot de 5 populations de référence auquel la population Ardi a été comparée et qui a permis de mettre en évidence une tolérance au cadmium pour cette population (Chapitre II), est similaire à la sensibilité moyenne des 17 populations naïves vis-à-vis du cadmium. En effet, il présente néanmoins une  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  moyenne de 117,4 ( $\pm 8,5$ )  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd, du même ordre de grandeur que celle des 17 populations réunies qui est de 113,2 ( $\pm 38,8$ )  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd.

La mesure de la sensibilité au cadmium des 17 populations montre l'existence d'une variabilité non négligeable entre populations de référence puisque la  $CL_{50-96h}$  de la population de référence la plus sensible (Vare) est 4,2 fois plus faible que celle de la population de référence la plus tolérante (Moug). Ces résultats sont en accord avec la littérature puisque l'existence d'une variabilité intra-spécifique de la réponse au stress chimique est bien connue pour différents groupes d'espèces animales et végétales (Nowak et al. 2008). En outre, le facteur de variabilité inter-population de la sensibilité au cadmium mis en évidence ici est de l'ordre de grandeur de ceux déjà rapportés dans la littérature. Un facteur de 6 de la sensibilité au cadmium a par exemple été rapporté entre lignées du diptère *Chironomus riparius* par Nowak et al. (2008). Ces auteurs rapportent par ailleurs que ces observations sont cohérentes avec d'autres études s'intéressant à la variabilité de la sensibilité aux contaminants chez les mollusques, les collemboles, les amphibiens et les crustacés. Toutefois, la variabilité de la sensibilité au cadmium entre lignées clonales de *Daphnia magna* peut être de plusieurs dizaines et même dépasser un facteur 100 (Baird et al. 1990, 1991).

D'autre part, comme le montre la Figure V-1, la population Ardi présente une sensibilité au cadmium qui diverge de la gamme de variabilité existant entre populations naturelles non exposées à cet élément. Elle présente par exemple une  $CL_{50-96h}$  2,9 fois supérieure à celle de la population naïve la plus tolérante Moug, et 5,1 fois supérieure à la  $CL_{50-96h}$  moyenne des 17 populations tandis que celle de la population Moug n'est que 1,8 fois supérieure à cette moyenne. Ainsi, bien qu'il existe une variabilité de la sensibilité au cadmium entre populations de référence, la sensibilité de la population Ardi, apparaît comme étant divergente. La divergence de la sensibilité au cadmium de la population Ardi est néanmoins du même ordre de grandeur que la variabilité existant entre populations de référence et semble donc modérée. Ce point particulier du facteur de tolérance de la population Ardi permet d'évaluer les conséquences pour l'évaluation du risque d'une exposition à la contamination dans le milieu. Il est discuté au cours de Chapitre VI dans lequel cette question est traitée globalement en mettant en regard l'ensemble des résultats concernant la modification de sensibilité toxicologique et des traits d'histoire de vie obtenus au cours de ces travaux.

**Tableau V-2 :  $CL_{50-96h}$  et intervalle de confiance à 95% exprimés en  $\mu g.L^{-1}$  de Cd estimés avec le package drc du logiciel R. Notons que l'intervalle de confiance de l'estimation de la  $CL_{50-96h}$  de la population Ardi est relativement grand du fait qu'après quatre jours d'exposition, 50% de mortalité n'avait été atteint dans aucune des concentrations d'exposition du fait de la tolérance au cadmium importante de cette population.**

| Population                                             | $LC50_{96h}$ [IC 95%] $\mu g.L^{-1}$ de Cd |                 | Taille (mm) (SD) |       | Taux de survie témoins (%) |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------|------------------|-------|----------------------------|
| Ardi                                                   | 572,6                                      | [33,5 ; 1111,7] | 9,0              | (0,5) | 98                         |
| <i>1<sup>er</sup> lot de populations de référence</i>  |                                            |                 |                  |       |                            |
| Bacu                                                   | 117,3                                      | [94,2 ; 140,5]  | 10,2             | (0,8) | 96                         |
| Bois                                                   | 119,2                                      | [93,5 ; 144,9]  | 10,1             | (1,0) | 96                         |
| Gala                                                   | 128,8                                      | [100,1 ; 157,5] | 11,2             | (0,8) | 93                         |
| Mand                                                   | 104,9                                      | [86,0 ; 123,9]  | 9,8              | (0,8) | 98                         |
| Tour                                                   | 116,6                                      | [92,1 ; 141,0]  | 10,4             | (0,9) | 100                        |
| <i>2<sup>ème</sup> lot de populations de référence</i> |                                            |                 |                  |       |                            |
| Ain                                                    | 131,3                                      | [93,0 ; 169,6]  | 10,9             | (0,6) | 100                        |
| Alba                                                   | 156,9                                      | [129,8 ; 184,0] | 10,7             | (0,7) | 93                         |
| Ange                                                   | 147,0                                      | [112,7 ; 181,3] | 9,5              | (0,9) | 100                        |
| Cime                                                   | 50,2                                       | [42,6 ; 57,9]   | 10,7             | (0,8) | 91                         |
| Comb                                                   | 82,4                                       | [62,0 ; 102,8]  | 10,3             | (0,7) | 80                         |
| Jame                                                   | 112,1                                      | [84,3 ; 139,8]  | 11,4             | (1,0) | 91                         |
| Morc                                                   | 103,4                                      | [81,4 ; 125,4]  | 9,8              | (0,9) | 98                         |
| Moug                                                   | 198,3                                      | [141,4 ; 255,2] | 10,7             | (0,7) | 96                         |
| Moul                                                   | 117,7                                      | [89,5 ; 145,9]  | 10,5             | (1,0) | 82                         |
| Ouch                                                   | 56,2                                       | [38,5 ; 73,9]   | 10,4             | (0,9) | 100                        |
| Sera                                                   | 134,7                                      | [107,9 ; 161,6] | 10,5             | (0,9) | 98                         |
| Vare                                                   | 47,1                                       | [33,6 ; 60,7]   | 11,1             | (0,9) | 87                         |



**Figure V-1 : Courbe dose-réponse des 17 populations de référence et de la population Ardi à quatre jours d'exposition au cadmium. Courbes générées avec le package drc du logiciel R.**

### 3. Diversité phylogénétique des populations étudiées :

La diversité phylogénétique de l'ensemble des populations étudiées (Ardi et 17 références) a été caractérisée à partir du génotypage d'individus prélevés dans chacune des 18 populations entre le 20 septembre et le 3 octobre 2013. Sur site, les prélèvements ont été tamisés sur un premier tamis permettant d'enlever les gros débris de matière organique, puis sur un tamis de 1,6 mm et les organismes retenus sur ce tamis directement triés. Une centaine de gammarus mâles de taille homogène (entre 8 et 11 mm) ont ainsi été isolés (observation directe comme décrit en matériels et méthodes pour le tri des organismes exposés au cadmium), séchés sur papier absorbant, puis directement placés dans des piluliers et alcoolisés avec de l'éthanol absolu anhydre (n° CAS 64-17-5). L'éthanol contenu dans les piluliers a été remplacé une première fois de retour au laboratoire, quelques heures après le prélèvement, puis une seconde fois deux jours après le prélèvement. Cette méthode permet de maintenir la pureté de l'éthanol (visible par l'absence de coloration), les deux premiers bains d'éthanol étant dilués par l'eau contenue dans les organismes. Les échantillons ont ainsi été conservés dans de l'éthanol absolu jusqu'au génotypage entre le 7 et le 22 octobre 2013. Celui-ci a été réalisé en collaboration avec Rémi Wattier et Thierry Rigaud de l'équipe Ecologie Evolutive du laboratoire Biogéosciences de l'université de Bourgogne (Dijon) à partir de l'analyse de la séquence du COI selon le protocole décrit en matériels et méthodes (Chapitre II). Sur les 228 individus analysés répartis entre les différentes populations, 209 ont pu être génotypés, soit 91,6% (Tableau V-3). Les 209 séquences COI ainsi obtenues ont permis d'établir un arbre phylogénétique (Figure V-2), remplaçant ainsi les individus des différentes populations au regard de la diversité connue au sein du genre *Gammarus* (inclusion de séquences publiées (Weiss et al. 2014) pour chacune des trois unités cryptiques A, B et C décrites chez *G. fossarum* ainsi que des séquences disponibles pour *G. pulex*, *G. orinos*).

Tableau V-3 : Résultat du génotypage des 19 populations d'études (Ardi et 17 populations de référence). La composition phylogénétique exacte des populations est donnée en colonne 4 et 5. Les diagrammes circulaires résument la composition de lignées (définie en Figure V-2) de chacune des populations. Les parts sont proportionnelles au % d'individus de chaque lignée. Les lignées dont le pourcentage d'individus est inférieur à 15% ne sont pas représentées dans les diagrammes.

| Population                                             | Nb d'individus analysés | Nb d'individus génotypés | Lignées présentes | Proportions respectives de chaque lignée (%) |                                                                                       |
|--------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ardi</b>                                            | 24                      | 24                       | F_B1              | 100                                          |    |
| <i>1<sup>er</sup> lot de populations de référence</i>  |                         |                          |                   |                                              |                                                                                       |
| <b>Bacu</b>                                            | 12                      | 11                       | F_B1              | 100                                          |    |
| <b>Bois</b>                                            | 24                      | 22                       | F_B1 ; W          | 14 ; 86                                      |    |
| <b>Gala</b>                                            | 10                      | 9                        | W                 | 100                                          |    |
| <b>Mand</b>                                            | 12                      | 11                       | F_B2 ; F_B3       | 45 ; 55                                      |    |
| <b>Tour</b>                                            | 24                      | 21                       | F_B1 ; W          | 95 ; 5                                       |    |
| <i>2<sup>ème</sup> lot de populations de référence</i> |                         |                          |                   |                                              |                                                                                       |
| <b>Ain</b>                                             | 10                      | 10                       | F_B1              | 100                                          |   |
| <b>Alba</b>                                            | 10                      | 6                        | F_B1              | 100                                          |  |
| <b>Ange</b>                                            | 10                      | 10                       | F_B1              | 100                                          |  |
| <b>Cime</b>                                            | 12                      | 11                       | O ; P_1           | 64 ; 36                                      |  |
| <b>Comb</b>                                            | 10                      | 10                       | F_B1 ; W          | 90 ; 10                                      |  |
| <b>Jame</b>                                            | 10                      | 10                       | F_B1 ; W          | 50 ; 50                                      |  |
| <b>Morc</b>                                            | 10                      | 9                        | F_B1 ; F_C ; P_3  | 45 ; 22 ; 33                                 |  |
| <b>Moug</b>                                            | 10                      | 10                       | F_B1 ; P_3        | 70 ; 30                                      |  |
| <b>Moul</b>                                            | 10                      | 9                        | F_B1              | 100                                          |  |
| <b>Ouch</b>                                            | 10                      | 7                        | F_C ; P_3         | 71 ; 29                                      |  |
| <b>Sera</b>                                            | 10                      | 9                        | F_B1              | 100                                          |  |
| <b>Vare</b>                                            | 10                      | 10                       | F_B1 ; P_3        | 70 ; 30                                      |  |

 *G. fossarum lignée B*
 *G. fossarum lignée C*
 *G. Wautieri*
 *G. orinos*
 *G. pulex*

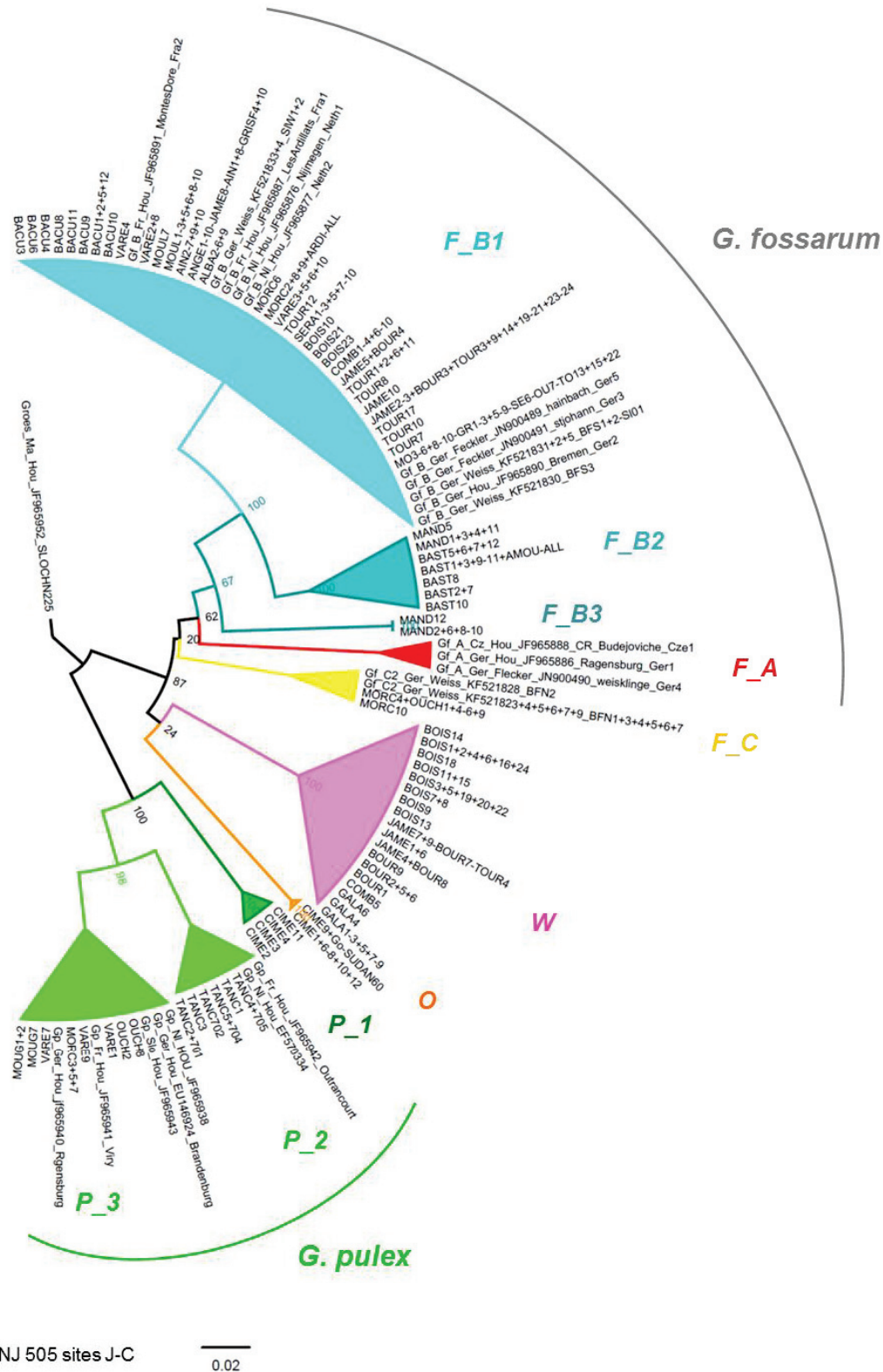


Figure V-2 : Positionnement phylogénétique (séquence du COI) des 209 individus issus des 17 populations de référence (les individus présentant le même haplotype sont regroupés sur la même branche terminale). Des séquences de la littérature pour *G. roeseli* (outgroup) ; *G. pulex* ; chacune des 3 sous-lignées cryptiques de *G. fossarum* (A, B, C), ainsi que des séquences d'individus de deux autres populations étudiées au laboratoire d'Ecotoxicologie de Lyon-Villeurbanne (Bast située dans les Cévennes et Tanc située dans le Jura) ont également été incluses. Les valeurs de bootstrap sont figurées sur les branches.

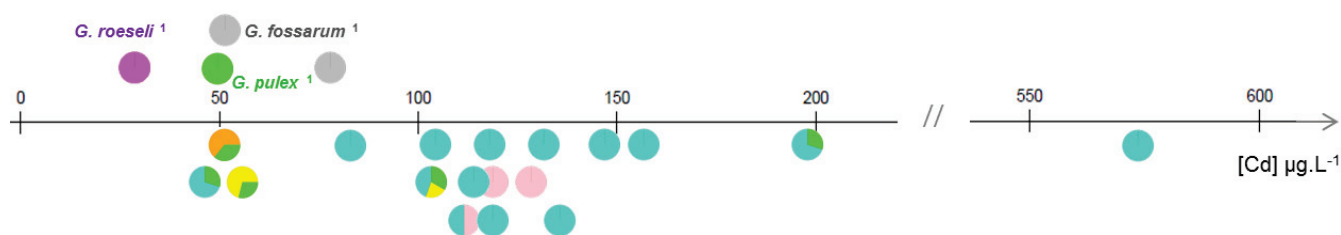
Cette caractérisation phylogénétique a révélé une forte diversité entre les 17 populations de référence, couvrant globalement l'ensemble de la diversité décrite au sein du genre de ce groupe de *Gammarus* avec des individus *pulex* et *fossarum*, et des représentants des différentes lignées cryptiques connues chez *fossarum*. Globalement, la diversité rencontrée se structure en 2 lignées de *pulex*, quelques individus *fossarum* de la lignée C, la majorité des individus *fossarum* étant de la lignée B (avec 3 sous-groupes notés ici F\_B1, F\_B2 et F\_B3). La lignée A de *G. fossarum* n'est pas représentée dans nos populations, probablement du fait de la zone géographique. Cette lignée apparaît en effet comme étant plutôt distribuée en Suisse et en Allemagne (Westram et al. 2011), plus à l'Est et au Nord que la zone couverte ici. S'ajoutent deux lignées sœurs de *G. fossarum*, avec d'une part l'espèce *G. orinos* (O) pour la population Cime, et d'autre part, des individus des populations du Dauphiné (Bois, Gala) formant un groupe très discriminé correspondant probablement à l'espèce *G. wautieri* (W) décrite dans cette région. Il ressort également de ces analyses qu'il existe un fort taux de sympatrie au sein des populations puisque 10 des 17 populations de référence sont constituées d'un mélange de lignées, avec des mélanges inter-spécifiques (par exemple *pulex/fossarum* pour les populations Morc, Moug, Ouch et Vare ; ou *orinos/pulex* pour la population Cime), mais aussi un mélange des différentes lignées cryptiques de *G. fossarum* (Comb, Morc, Jame). Ceci est en accord avec de récents travaux portant sur l'étude de la diversité cryptique au sein du complexe d'espèces *G. fossarum* et *G. pulex* (Lagrué et al. 2014).

Concernant la population Ardi, les résultats du génotypage révèlent que cette dernière est composée à 100% d'individus de la lignée B de *G. fossarum*, comme neuf des populations de référence, trois appartenant au premier lot de populations de référence (Bacu, Mand, Tour), et six au deuxième lot (Ain, Alba, Ange, Comb, Moul, Sera) (Tableau V-3 ). Ainsi, la population Ardi n'appartient pas à une lignée phylogénétique particulière divergente de celles rencontrées dans les 17 populations de référence étudiées (Figure V-5).

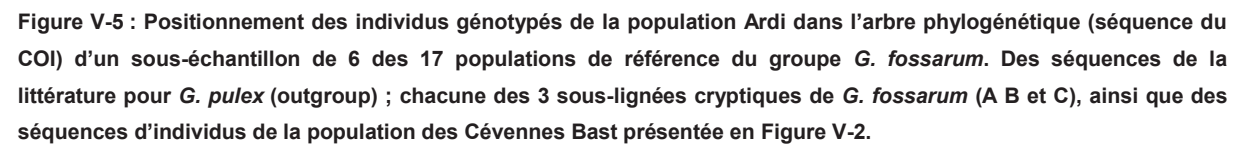
Par ailleurs, si l'on ne considère que les populations *G. fossarum* B (*i.e.* composées d'au moins 85% d'individus de cette lignée), une grande homogénéité de la sensibilité au cadmium apparaît entre les 9 populations naïves vis-à-vis du cadmium. Huit d'entre elles ont

en effet une  $CL_{50-96h}$  comprise entre 104,9 et 156,9  $\mu g.L^{-1}$  (respectivement Mand et Alba). Une seule population, Comb, semble légèrement plus sensible avec une  $CL_{50}$  de 82,4  $\mu g.L^{-1}$  de Cd (Tableau V-2). Ainsi, le facteur de tolérance entre la population la plus tolérante et la population la plus sensible est de 1,9 et la  $CL_{50-96h}$  moyenne des 9 populations de *G. fossarum* B est de 123,2 ( $\pm 22,4$ )  $\mu g.L^{-1}$  de Cd. La sensibilité au Cd de la population Ardi, est très divergente de cette gamme de variabilité de la sensibilité entre populations de *G. fossarum* B. Avec une valeur estimée de 572,6  $\mu g.L^{-1}$  de Cd sa  $CL_{50-96h}$  est 4,6 fois supérieure à la  $CL_{50-96h}$  moyenne des 9 populations de *G. fossarum* B. Par ailleurs, la population Ardi présente une tolérance au cadmium bien supérieure à toutes les autres populations, et ce quelle que soit leur composition phylogénétique (Figure V-4).

Ainsi, ces résultats qui indiquent que la population Ardi n'appartient pas à une lignée phylogénétique particulière au regard de la diversité présente dans l'ensemble des populations d'étude, démontrent que l'exposition de cette population dans le milieu est le facteur à l'origine de la divergence de sensibilité outrepassant l'influence des facteurs environnementaux et de la diversité phylogénétique.



**Figure V-4 :** Comparaison des  $CL_{50-96h}$  des 17 populations de référence et de la population Ardi en fonction de leur composition phylogénétique (définies en Figure V-2). Des  $CL_{50-96h}$  à une exposition au cadmium menée à une dureté d'eau équivalente à celle de nos tests issues de la littérature (<sup>1</sup>étude de Boets et al. 2012) sont également placés sur la partie supérieur de l'axe.





## CHAPITRE VI : SYNTHÈSE ET DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

La première partie de ce chapitre revient sur la mise en évidence des processus populationnels d'acquisition de la tolérance aux contaminants dans les milieux et plus spécifiquement sur le rôle des effets parentaux, mécanismes observés chez *G. fossarum* dans le cas de la population Ardi en situation d'une exposition long terme au cadmium. Dans un deuxième temps, les modifications de traits d'histoire de vie détectées au sein de la population Ardi sont discutées, posant ainsi la question de leur interprétation en termes de coût de la tolérance ou de valeurs adaptatives. Une dernière partie questionne l'importance de l'évolution des sensibilités toxicologiques et des traits d'histoire de vie en réponse aux expositions long terme dans l'évaluation des risques associés à la contamination chimique.



# **1. La tolérance au Cd chez *G. fossarum* : un exemple du rôle des effets parentaux dans l'acquisition populationnelle de la tolérance aux contaminants dans les milieux :**

## L'héritage non génétique de la tolérance au Cd chez *G. fossarum*

Les travaux présentés dans le Chapitre IV ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes populationnels pouvant soutenir une augmentation de la tolérance au cadmium chez *G. fossarum*. A partir de populations naïves en termes d'exposition cadmique *in situ*, l'étude *a priori* du potentiel d'adaptation génétique de la sensibilité à ce contaminant (Publication n°2) a montré à la fois empiriquement avec l'expérience de sélection, et théoriquement avec la mesure de l'héritabilité de la sensibilité au Cd, que celui-ci était faible corroborant ainsi les résultats des premières études préliminaires réalisées au laboratoire d'Irstea de Lyon Villeurbanne (Chaumot et al. 2009).

Ces résultats sont par ailleurs cohérents avec ceux obtenus sur l'étude de la nature de la tolérance de la population Ardi exposée naturellement au Cd. Nous avons en effet dans un premier temps pu mettre en évidence que cette population présente une tolérance accrue vis-à-vis du cadmium, tolérance transmissible entre générations en conditions non contaminées (démonstré à deux reprises, au cours de deux expérimentations indépendantes menées à un an d'intervalle : Publication n°1 et Publication n°3). L'étude de l'évolution du niveau moyen et de la distribution intra-population de la sensibilité au cadmium de cette population pour des cohortes successives produites au laboratoire (Publication n°3), a dans un deuxième temps révélé que la tolérance au cadmium, au sein de la population Ardi, n'était pas transmise génétiquement des parents aux descendants étant donné qu'après un certain temps passé au laboratoire celle-ci n'était plus héritée. De plus, le maintien du profil de tolérance (niveau moyen et distribution intra-population) chez des individus de « deuxième cohorte » (*i.e.* n'ayant pas été exposés au cadmium au cours de leur développement embryonnaire) indique que cette tolérance n'est pas non plus liée à un phénomène de plasticité développementale. Ainsi, nous en concluons que la tolérance au cadmium au sein de la population Ardi est transmise aux juvéniles au travers d'effets parentaux (exposition parentale).

### Les effets parentaux résultent de l'exposition au cadmium

Les couples reproducteurs prélevés dans la population Ardi mis à se reproduire au laboratoire en conditions non contaminées, cessent rapidement de produire des F1 tolérantes au cadmium (*i.e.* dès la 3<sup>ème</sup> cohorte). Ce caractère réversible de la transmission de la tolérance au sein de la population Ardi indique que l'augmentation de la tolérance au cadmium chez *G. fossarum* résulte d'un effet de l'environnement des parents, en l'occurrence de l'exposition au cadmium au sein du site abritant Ardi.

De même dans l'approche *a priori* considérant la population de référence Tour, les juvéniles produits par des femelles exposées au cadmium ont tendance à être plus tolérants que des juvéniles issus de mères non exposées. Hors, cette tendance s'observe uniquement pour la première cohorte de juvéniles testés. Dès la seconde cohorte testée, l'augmentation de la tolérance ne se retrouve plus, ce qui renforce la conclusion que la transmission de la tolérance est bien soutenue par l'exposition au cadmium via des processus pouvant s'apparenter à de l'acclimatation physiologique induisant une modification phénotypique des descendants (plasticité trans-générationnelle).

### Importance des effets maternels dans la sensibilité au cadmium

L'ensemble des observations réalisées au cours de ces travaux montrent l'importance des effets maternels dans la détermination du trait « sensibilité au cadmium » des juvéniles, et ceci pour les deux catégories d'effets maternels définis au cours de la synthèse bibliographique (*i.e.* les « effets de la mère en tant qu'environnement » et les « effets de l'environnement de la mère » Cf. p.29). Nous avons en effet mis en évidence dans la Publication n°2, que des effets maternels neutres (*i.e.* indépendants d'une exposition au cadmium), participent pour une part importante dans la détermination du niveau de sensibilité au cadmium des juvéniles au sein des populations naïves. Ils apparaissent en effet comme déterminant à hauteur de 9% la sensibilité au cadmium de juvéniles de la population Tour. Par ailleurs, une forte hétérogénéité de la sensibilité entre fratries a été montrée et s'explique par l'existence en plus de cet effet mère, soit d'effets maternels additionnels s'exprimant de façon

différentielle lors de chaque portée, soit d'un déterminisme génétique de type non-additif, sans pouvoir dissocier ces deux hypothèses au regard de nos expérimentations.

Si nous avons montré l'existence « d'un effet de la mère en tant qu'environnement », l'existence d'un effet maternel lié à l'environnement de la mère (ici l'exposition au Cd), n'a pas été totalement démontré. En effet, les expérimentations conduites au cours de ces travaux sur la population Ardi et sur les populations de référence ne permettent pas de déterminer de façon univoque l'origine paternelle et/ou maternelle des effets parentaux induits par l'exposition soutenant le caractère plastique trans-générationnel de la tolérance au cadmium chez *G. fossarum*, ceux-ci n'ayant pas été étudiés individuellement. Toutefois, à partir des résultats obtenus au cours du chapitre 4, il est possible de faire l'hypothèse d'un effet parental d'origine maternelle, et plus spécifiquement d'un effet d'une exposition maternelle au cadmium, dans l'acquisition d'une tolérance à ce métal à l'échelle populationnelle chez *G. fossarum*. Cette hypothèse est notamment soutenue par les observations suivantes :

1) *La corrélation entre la perte de tolérance et le « numéro de cohorte »*. La perte de la tolérance et la régénération d'une variabilité intra-population de la sensibilité de la population Ardi se produit en effet sur des individus de « troisième cohorte », c'est-à-dire complètement naïfs vis-à-vis du cadmium, ayant réalisé l'ensemble de leur développement embryonnaire au laboratoire et ayant été produits à partir d'ovocytes dont l'ovogénèse complète s'est également déroulée au laboratoire. Ainsi, le fait que la perte de la tolérance coïncide avec les cycles de reproduction des femelles, et que celle-ci s'estompe dès lors que l'ovogénèse a lieu en conditions non contaminées (cohorte 3), sont en faveur de l'hypothèse d'une origine maternelle de cette tolérance au cadmium. Toutefois, cette hypothèse ne peut pas être complètement validée à partir de ces seuls résultats. En effet, il y a deux facteurs confondants à cet effet cohorte (et donc aux conditions environnementales d'ovogénèse et d'embryogénèse) : la durée de stabulation (*i.e.* l'éloignement vis-à-vis de l'exposition au cadmium dans leur milieu d'origine) des femelles, ainsi que la durée de stabulation (*i.e.* l'éloignement vis-à-vis de l'exposition au cadmium dans leur milieu d'origine) des mâles.

2) *L'induction d'une tolérance par exposition maternelle au cadmium au laboratoire sur une population de référence*. L'expérience de sélection maternelle présentée dans le chapitre 4, corrobore également l'hypothèse d'un effet maternel. En effet, bien que les

résultats obtenus à partir de cette expérience doivent être considérés comme préliminaires, ceux-ci montrent qu'à la différence d'une préexposition paternelle (Publication n°2), une préexposition maternelle peut effectivement induire une augmentation de la tolérance au cadmium chez leurs descendants (Note n°3).

Ainsi, l'acquisition d'une tolérance au cadmium à l'échelle populationnelle chez *G. fossarum* résulte très probablement d'effets maternels spécifiques se mettant en place dans des conditions particulières d'environnement (« effet de l'environnement de la mère », *i.e.* le deuxième type d'effet maternel), en l'occurrence ici l'exposition au cadmium.

### Faible diversité génétique dans la population Ardillats : Une trace de la sélection des effets parentaux ?

Bien que la diversité génétique n'ait pas été étudiée en tant que telle au cours de ces travaux, le génotypage des 18 populations de *G. fossarum* a également montré une diversité génétique plus faible au sein de la population Ardi par rapport aux autres populations de gammars étudiées. Au cours de l'analyse des séquences du COI obtenue pour le génotypage, nous avons en effet observé que tous les individus génotypés de la population Ardi appartiennent à un unique haplotype alors que pour les populations de référence au minimum quatre haplotypes différents ont été retrouvés.

Un appauvrissement génétique au sein de populations exposées peut résulter de différents processus en lien avec la contamination. Différentes revues indiquent en effet que la diversité génétique d'une population exposée à un contaminant peut par exemple être affectée par des modifications du taux de mutations, une altération des processus de migration, ou encore par des phénomènes de type goulot d'étranglement liés à une mortalité due à l'exposition au contaminant (Bickham et al. 2000, Belfiore et Anderson 2001, van Straalen et Timmermans 2002, Bickham 2011). Une telle baisse de diversité génétique peut cependant également être la trace d'une sélection des génotypes tolérants à la contamination (Bickham et al. 2000, Belfiore et Anderson 2001, van Straalen et Timmermans 2002, Bickham 2011). Cela a par exemple été observé par Athrey et al. (2007) au cours d'une expérience de sélection au laboratoire de la tolérance au cadmium chez *Heterandria formosa* (poisson).

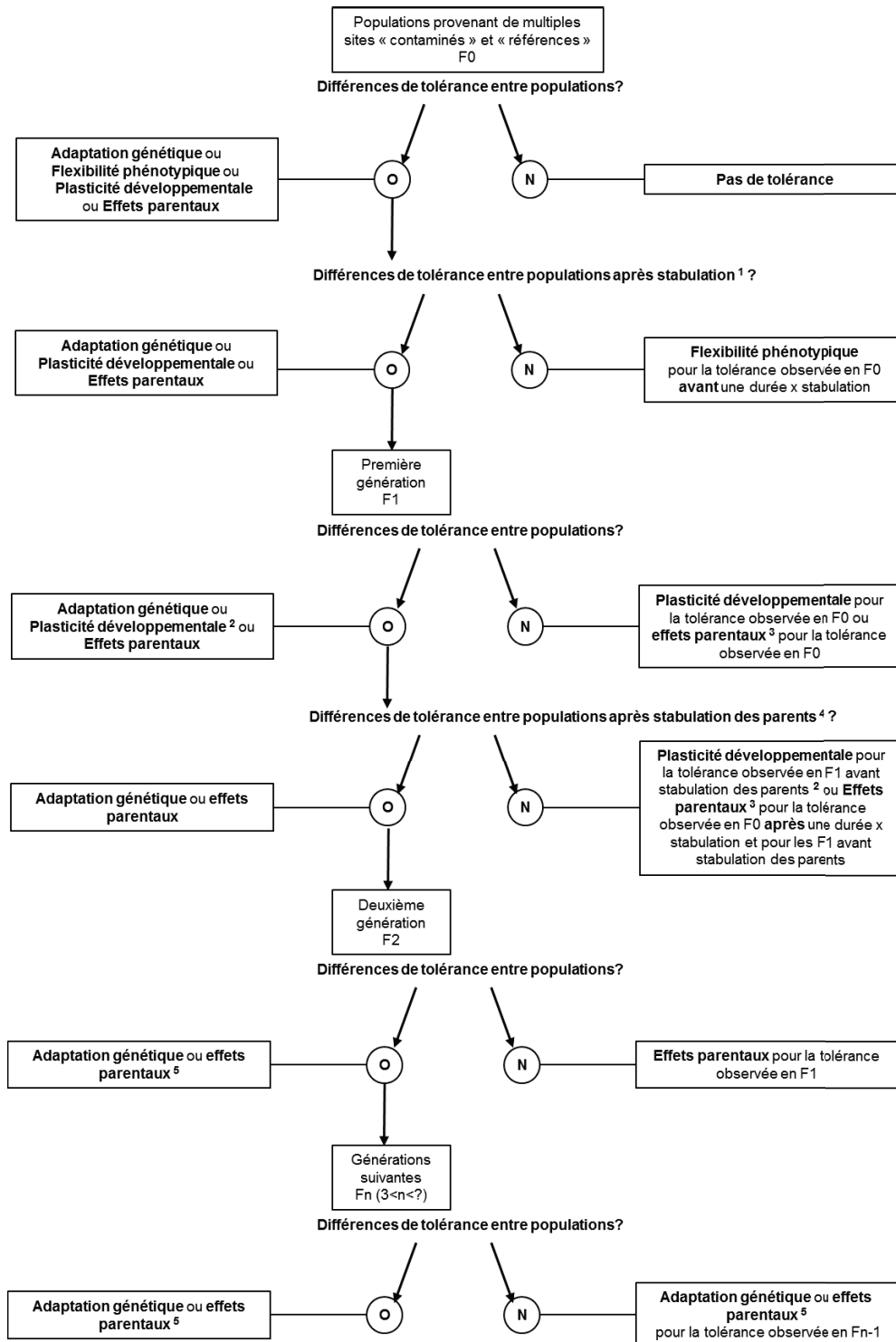
Ici, nous avons montré que le trait « sensibilité au cadmium » n'est pas héritable, et que la tolérance au cadmium de la population Ardi n'est pas non plus transmise génétiquement. Cette baisse de diversité génétique ne peut donc pas être le signe de la sélection d'individus tolérants au sein de cette population. Nous avons cependant identifié que la tolérance au cadmium de la population Ardi était transmise aux travers d'effets parentaux. Les effets parentaux, et plus spécifiquement les effets maternels, sont aujourd'hui reconnus en écologie comme étant une forme de plasticité trans-générationnelle qui, parce qu'elle peut améliorer la fitness de la génération suivante en procurant aux individus la composant un phénotype répondant aux contraintes environnementales qu'ils expérimenteront, peut être sélectionnée et constituer une adaptation en soi (Bernardo 1996, Mousseau et Fox 1998, Galloway 2005, Marshall et Uller 2007, Uller 2008). Ainsi, la baisse de diversité génétique au sein de la population Ardi pourrait être le signe d'une sélection des effets parentaux impliqués dans la tolérance au cadmium de cette population. Cette hypothèse d'une adaptation au cadmium par la sélection des effets parentaux ne contredit pas nos conclusions précédentes. En effet, au cours de ces travaux nous avons conclu à un faible potentiel d'adaptation génétique au cadmium chez *G. fossarum* étant donné que la sensibilité au cadmium est faiblement héritable. Hors c'est bien l'héritabilité du trait « sensibilité au cadmium » qui a été mesurée et pas l'héritabilité du trait « effet parental ». Il est possible qu'au sein de la population Ardi, il y ait eu une sélection non pas des individus tolérants eux-mêmes, mais des individus (notamment les femelles) aptes à influencer la sensibilité au cadmium de leurs descendants. Cette capacité à être un « bon parent », c'est-à-dire un parent engendrant des juvéniles tolérants au cadmium en conditions d'exposition cadmique pourrait être l'objet d'une sélection et expliquer la perte de diversité haplotypique retrouvée au sein de la population Ardi sur le locus COI.

Toutefois, comme nous l'avons évoqué, ces travaux n'ont pas visés à caractériser précisément la diversité génétique des populations étudiées. L'objectif du génotypage réalisé était de caractériser la composition spécifique des populations étudiées dans le but d'exclure le cryptisme comme facteur confondant, c'est pourquoi seul un marqueur génétique (COI) a été utilisé. De plus, seuls des mâles de taille homogène ont été génotypés, ce qui ne permet pas d'établir un patron génétique représentatif de la population. Ainsi, l'appauvrissement

génétique détecté au cours de ces travaux devra être confirmé. Une réduction de la variabilité génétique peut résulter des mêmes phénomènes que ceux évoqués plus haut (goulot d'étranglement, sélection) mais en lien avec des processus naturels et/ou des contraintes environnementales qu'a connu la population au cours de son histoire et indépendants de la contamination (cycles glaciaires, maladies, changement climatique, variations saisonnières, dérive génétique, flux de gènes etc.) (Bickham et al. 2000, Medina et al. 2007, Meeks et al. 2009 dans Bickham 2011). Ainsi, même si la baisse de diversité génétique était confirmée, il serait également nécessaire de s'assurer que le patron génétique observé est bien associé à l'exposition à la contamination (Medina et al. 2007, Meeks et al. 2009 dans Bickham 2011). Le fait que parmi les 18 populations génotypées, seule la population Ardi présente un niveau de diversité haplotypique aussi faible constitue cependant un indice fort mettant en cause l'exposition au cadmium (Bickham et al. 2000).

#### Mise en évidence par « breeding experiments » des processus populationnels soutenant l'augmentation de tolérance en milieux contaminés : leçons tirées de ces travaux

Les interprétations classiques des « breeding experiments », expérimentations mises en place pour identifier les processus populationnels soutenant l'augmentation d'une tolérance à un contaminant dans le milieu peuvent être remises en question (section I.4.3.1). La tolérance de la population Ardi en est un exemple. Si le schéma de décision présenté Figure I-4 avait été appliqué au cours de ces travaux, alors les effets parentaux mis en évidence ici n'auraient peut-être pas été identifiés. En effet, ce schéma indique qu'adaptation génétique et effet parentaux ne peuvent être distingués qu'à partir de l'analyse de la tolérance en F2. Hors, le cas d'étude Ardi démontre que les effets parentaux et l'adaptation génétique peuvent être distingués en F1 si la notion de réversibilité des effets parentaux est intégrée. Ainsi, à partir des résultats obtenus avec l'étude de la tolérance au cadmium de la population Ardi et de la synthèse des processus populationnels pouvant soutenir l'augmentation d'une tolérance à la contamination (synthèse p.33-34) on peut proposer un nouveau schéma (Figure VI-1) pour déterminer la nature de la tolérance à partir de ce type de protocole. A la différence du schéma



<sup>1</sup> Le temps de stabulation doit être suffisamment long. Cette durée peut dépendre de la population et du contaminant et doit être déterminée.

<sup>2</sup> La plasticité développementale peut encore être à l'origine d'une augmentation de la tolérance chez des F1 produits en conditions non contaminées au laboratoire selon s'il s'agit d'individus qui étaient déjà en cours de développement lorsque les parents ont été prélevés.

<sup>3</sup> Effets parentaux peuvent disparaître dès la F1 selon le temps de stabulation des parents. Ils peuvent s'être également manifestés mais avoir disparu au moment du test en fonction de l'âge à laquelle la F1 a été testée. Ceci s'applique quel que soit le(s) mécanisme(s) soutenant les effets parentaux.

<sup>4</sup> Le temps de stabulation doit être suffisamment long pour que les juvéniles produits n'aient pas été exposés à la contamination au cours de leur développement.

<sup>5</sup> Effets parentaux sans les effets liés aux transferts spécifiques soma-à-soma liés à l'exposition directe au contaminant, ceux-ci ne se manifestant qu'en F1. C'est-à-dire, par exemple, les effets maternels comme définis par Johnston 2011.

Note:

- Il est possible de ne pas tester l'effet de la stabulation sur la tolérance au contaminant de F0 et de tester directement la tolérance en F1. Dans ce cas, si la tolérance est perdue en F1 (s'il n'y a plus de différences entre populations contaminées et de référence), alors il est possible de dire que la tolérance observée en F0 résulte d'un mécanisme d'acclimation individuel mais il n'est pas possible de faire la distinction entre les deux sous-mécanismes que sont la flexibilité phénotypique et la plasticité développementale.
- Au-delà de la F2, le fait que la tolérance se maintienne ou disparaisse, ne permet plus de distinguer de manière robuste le mécanisme supportant la tolérance dans la population (i.e. adaptation génétique ou effets parentaux <sup>3</sup>).

**Figure VI-1 : Proposition d'amélioration du processus d'évaluation de la tolérance à la contamination de populations naturelles chroniquement exposées dans le milieu.**

original, ce schéma propose une grille d'interprétation de l'évolution de la tolérance intégrant notamment les notions (1) de réversibilité de la tolérance au sein d'une même génération, et (2) de réversibilité de la transmission de la tolérance, permettant ainsi de déterminer de manière plus précise les processus populationnels soutenant les tolérances aux contaminants observées au sein de populations naturelles.

## **2. Traits d'histoire de vie modifiés dans la population des Ardillats :**

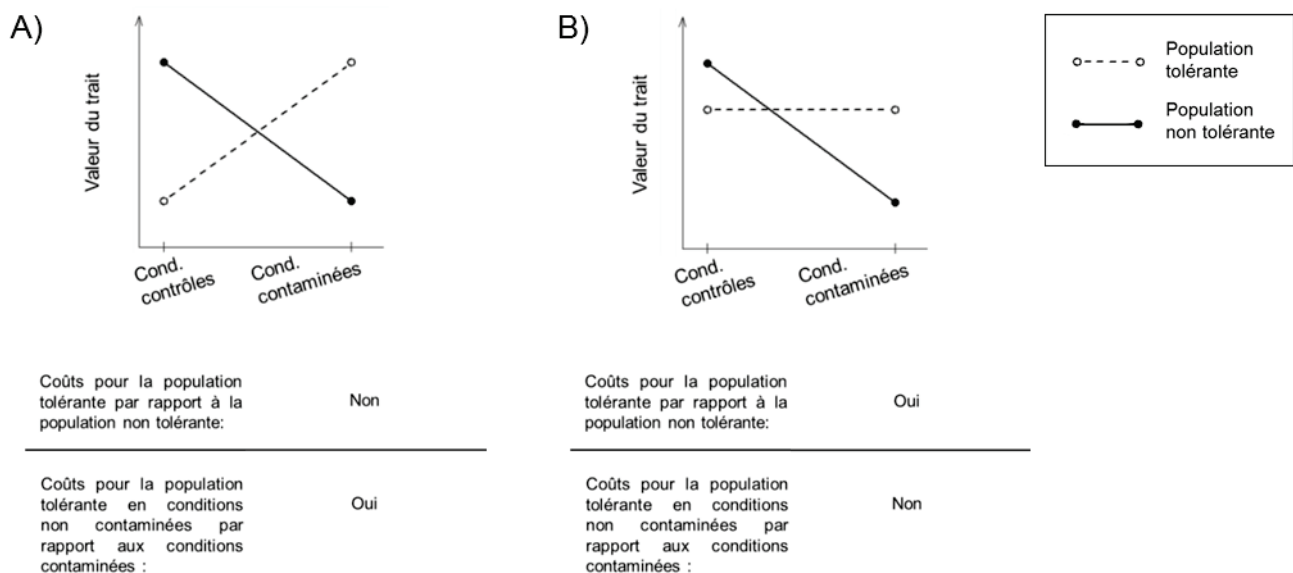
En parallèle de l'étude de l'évolution des sensibilités toxicologiques, nos travaux se sont également attachés à étudier la possibilité que d'autres traits d'histoire de vie soient affectés par l'exposition à long terme au cadmium au sein de la population Ardi. Ainsi, le taux d'alimentation, le taux de croissance, la distribution de taille des femelles en reproduction, ainsi que la fécondité des femelles ont été mesurés *in situ* et/ou au laboratoire. Les résultats présentés dans le chapitre 3 montrent que pour ces traits de vie la population Ardi se différencie des populations de référence. Elle présente notamment :

- Un taux d'alimentation plus faible au laboratoire mais pas *in situ*,
- Un taux de croissance plus faible au laboratoire,
- Une fécondité qui tend à être légèrement supérieure *in situ*, pour les femelles de petite taille
- Et un décalage dans la distribution en taille des femelles en reproduction *in situ* vers les classes de taille inférieures avec un déficit en femelles de grande taille et une proportion de femelles de petites tailles plus importante que les populations de référence.

Deux interprétations de ces modifications de traits d'histoire de vie sont possibles avec (i) l'hypothèse qu'elles résultent de coûts de la tolérance et (ii) l'hypothèse qu'elles résultent d'une adaptation de l'histoire de vie de la population Ardi en réponse à la contamination.

### Des coûts possibles de la tolérance au cadmium

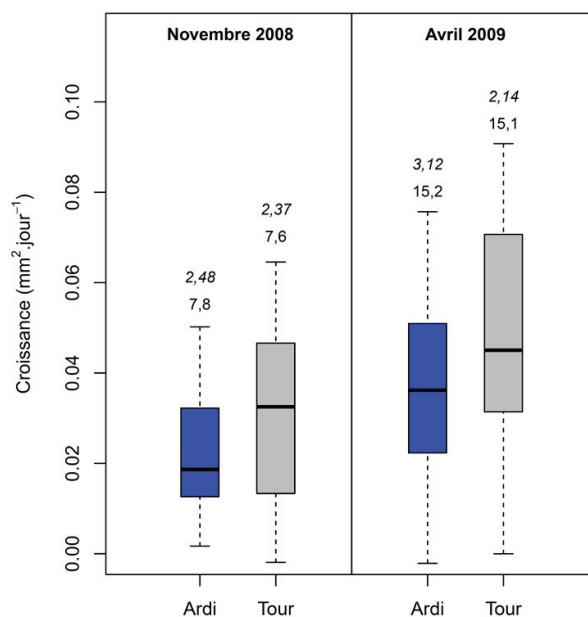
Ces modifications de traits de vie peuvent être interprétées comme le résultat d'un coût associé à l'augmentation de la tolérance au cadmium. Un des exemples est la baisse du taux d'alimentation au laboratoire de la population Ardi. Le fait que celui-ci ne soit pas plus faible lorsqu'il est mesuré *in situ* sur des individus autochtones engagés dans leur propre site, a révélé une sensibilité de la population aux changements d'environnements, guidant ainsi cette interprétation en terme de vulnérabilité populationnelle accrue en lien avec l'acquisition de cette tolérance cadmique (Figure VI-2 A).



**Figure VI-2 :** Illustration schématique du type de coût (A) que constitue la modification du taux d'alimentation, et (B) que peut constituer la modification du taux de croissance de la population Ardi par rapport aux différents scénarios possibles de manifestation de coûts de la tolérance présentés en synthèse bibliographique.

La baisse du taux de croissance de la population Ardi observée au laboratoire, à la différence du taux d'alimentation, a également été mise en évidence *in situ* au cours de travaux antérieurs en comparaison de la population Tour (Coulaud 2012) (Figure VI-3). Ce patron conforme à un coût de la tolérance (Figure VI-2 B), a été constaté dans le cas d'une tolérance aux métaux pour des populations naturelles ou à la suite d'expériences de sélection artificielle pour *Chironomus riparius* (Postma et al. 1995a, 1995b), *Daphnia magna* (Agra et

al. 2011) et pour *Drosophila melanogaster* (Shirley et Sibly 1999). La baisse du taux de croissance a été observée dans le cas d'une mesure en absence de contaminant pour les deux premiers exemples et en présence de contaminant pour le dernier et a été interprétée dans tous les cas comme étant un coût de la tolérance.



**Figure VI-3 : Mesure du taux de croissance individuel *in situ* de juvéniles de *G. fossarum* des populations Ardi et Tour encagés dans leurs propres sites à deux saisons. La croissance a été mesurée après 30 jours pour le test réalisé en novembre 2008 et après 28 jours pour celui réalisé en avril 2009. Pour chacun des tests, les mesures ont été effectuées sur des classes de tailles et des températures similaires. Les valeurs au-dessus des boîtes indiquent la taille initiale en mm des organismes mesurés sur un sous-échantillon d'individus à t0 pour celles en italique, et la température en °C pour les autres. (Données issues de Coulaud 2012)**

La diminution de la taille moyenne dans la distribution en taille des femelles en reproduction au sein de la population Ardi pourrait être un effet de la croissance plus lente et donc constituer des modifications indirectes résultant d'un coût. Une hypothèse complémentaire est que l'absence d'individus de grande taille dans la population Ardi peut résulter d'une réduction de l'espérance de vie des individus vivant dans ce milieu contaminé. Ces deux explications d'une diminution du taux de croissance ou d'une mortalité plus importante dans les grandes classes de tailles ont également été proposées pour expliquer une réduction de la taille moyenne et de la taille maximale au sein de populations naturelles de *Porcellio scaber* (isopode terrestre) exposées aux métaux (Jones et Hopkin 1998).

Des observations similaires, d'une baisse de l'espérance de vie (Xie et Klerks 2004) et d'une baisse de la taille (maximale) des individus (Jones et Hopkin 1998, Ward et Robinson 2005), ont déjà été réalisées sur des populations tolérantes aux métaux et interprétées comme des coûts liés à cette tolérance et aux processus de détoxification.

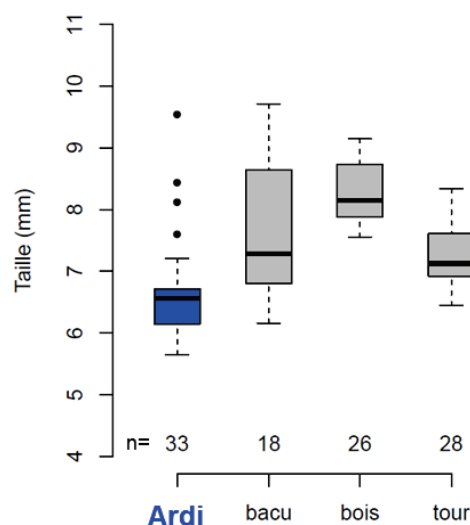
Ainsi, les modifications de traits d'histoire de vie discutées jusqu'ici semblent aller dans le sens d'une baisse globale de la fitness des individus au sein de la population Ardi et peuvent donc être interprétées comme des coûts de la tolérance au cadmium. Néanmoins l'analyse des distributions de taille des femelles en reproduction ainsi que la fécondité apporte un éclairage différent et pose la question de l'adaptation possible de l'histoire de vie de la population Ardi à la toxicité du cadmium.

#### L'hypothèse d'une adaptation de l'histoire de vie de la population Ardi en réponse à la contamination

La plus grande proportion de femelles en reproduction dans les classes de petite taille dans la population Ardi indique une maturité sexuelle des femelles plus précoce (*i.e.* à une taille inférieure) pour cette population. Afin de valider cette observation, nous avons également étudié ce trait en particulier. Au cours de ces travaux, une expérience d'élevage de F1 produits au laboratoire (conditions non contaminées) à partir de couples prélevés *in situ* a ainsi permis d'obtenir une mesure de la taille à la maturité sexuelle (*i.e.* taille à la première reproduction détectée par l'apparition d'ovocytes et/ou d'un marsupium) de femelles nées et élevées au laboratoire pour la population Ardi et trois autres populations de référence du premier lot (Figure VI-4). Bien que ces résultats doivent être considérés comme préliminaires du fait des limites actuelles de l'élevage des gammares au laboratoire (Cf. Chapitre 2), ils corroborent l'hypothèse d'une taille à la maturité plus précoce au sein de la population Ardi. Il existe une variabilité importante de la taille à la maturité sexuelle entre populations de référence, de l'ordre de grandeur du décalage de la population Ardi, aussi bien pour la mesure réalisée à partir de femelles en reproduction prélevées *in situ*, que pour la mesure au laboratoire sur des F1. Néanmoins, dans les deux cas, Ardi apparaît comme étant la

population présentant la valeur la plus faible. Ainsi, une tendance à une taille à la maturité inférieure au sein de la population Ardi semble bien se dégager.

Les femelles de petite taille de la population Ardi ont d'autre part tendance à présenter un nombre d'embryons supérieur que des femelles de même taille des autres populations. De telles modifications pour ces deux traits de vie (réduction de la taille à la maturité sexuelle et augmentation de la fécondité) ont déjà été rapportées dans la littérature et ont notamment été interprétés comme des adaptations de l'histoire de vie des populations en réponse à la contamination. Cela a par exemple été proposé dans le cas d'une exposition aux métaux chez l'isopode terrestre *Porcellio scaber* (Donker et al. 1993a), l'oligochète terrestre *Lumbricus rubellus* (Spurgeon et Hopkin 1999b), le collembole terrestre *Orchesella cincta* (Posthuma et al. 1993) pour l'avancée de la maturité sexuelle, et pour le collembole terrestre *Orchesella cincta* (Posthuma et al. 1993) pour l'augmentation de la fécondité.



**Figure VI-4 : Taille à la maturité sexuelle des femelles au sein de la population Ardi et de différentes populations de référence au laboratoire évaluée en mesurant la taille à la 1<sup>ère</sup> reproduction de femelles F1 nées élevées au laboratoire en conditions non contaminées.**

La théorie des histoires de vie prédit qu'une baisse de l'espérance de vie (notamment la survie adulte) peut s'accompagner par sélection à une maturité plus précoce et une augmentation de l'investissement dans la reproduction (Reznick et al. 1990, Posthuma et van

Straalen 1993, Jørgensen et al. 2007). Le déficit en individus de grande taille dans la population Ardi peut être le signe d'une baisse de l'espérance de vie au sein de cette population. Ainsi, en accord avec les prédictions de la théorie des histoires de vie, l'avancée de la taille à la maturité et l'augmentation de la fécondité pourrait donc constituer une adaptation de l'histoire de vie de la population Ardi à la toxicité de ce site contaminé. Edley et Law (1988), dans une expérimentation visant à étudier l'évolution des histoires de vie, ont dans ce sens observé que si les individus de grande taille sont retirés d'une population de *Daphnia magna*, alors les individus de ces populations grandissent plus lentement et se reproduisent à une taille inférieure. Reznick et al. (1990) ont fait la même observation d'une maturité sexuelle plus précoce et d'un effort reproductif plus important (poids des embryons/poids de la femelle) pour une population naturelle de guppies (*Poecilia reticulata*) pour laquelle les individus de grande taille sont prédatés.

Le fait que la modification de certains traits puisse constituer une adaptation de l'histoire de vie de la population à la contamination, n'exclut pas le fait que certaines des modifications de traits observées au sein de la population Ardi constituent bien un coût. C'est par exemple le cas pour le taux d'alimentation mais aussi pour le taux de croissance. Une réduction de la croissance peut d'ailleurs être un trade-off en lien avec un plus grand investissement dans d'autres fonctions comme la reproduction et/ou les mécanismes de défense contre les toxiques (Sibly et Calow 1989, Calow 1991, Maltby 1999, Roff 2000). Donker et al. (1993a) ont par exemple observé que les femelles de populations de *Porcellio scaber* habitants des sites impactés aux métaux (mine et fonderie) se reproduisent plus tôt, à un poids inférieur et allouent plus dans la reproduction. Une étude antérieure menée sur la même espèce sur une population naturelle habitant aussi un site impacté aux métaux (fonderie) avait également mis en évidence un effort reproductif des femelles plus important mais également un taux de croissance plus faible qu'une population de référence (Donker et al. 1993b dans Donker et al. 1993a). Par ailleurs, la taille maximum des individus de populations naturelles de l'isopode terrestre *Porcellio scaber* habitant des sites pollués aux métaux décroît de manière significative avec l'augmentation des niveaux de contamination, et les sites les plus pollués présentent des individus significativement plus petits (Jones et Hopkin 1998). Les auteurs ont alors suggéré que le coût de la détoxification des métaux

assimilés a pour conséquence une réduction des réserves énergétiques et de la taille des individus.

Analysés indépendamment les changements de certains des traits observés au cours de nos travaux sur la population Ardi peuvent être interprétés comme un coût de la tolérance. Néanmoins, appréhendés globalement ils peuvent être vus comme une adaptation de l'histoire de vie de la population. Ainsi, si ces travaux de thèse se sont essentiellement attachés à étudier les capacités d'adaptation de *G. fossarum* au cadmium au travers des modifications des sensibilités toxicologiques, la possibilité d'une adaptation à la contamination via une adaptation de l'histoire de vie et de la dynamique de population de la population Ardi n'est pas exclue. Dans ce cas la population Ardi serait tolérante au cadmium par deux types de réponses populationnelles au sens de Maltby (1991) : une réponse directe au travers l'augmentation de la tolérance, et une réponse indirecte avec l'adaptation de son histoire de vie.

### **3. Implications des modifications de sensibilité et de traits d'histoire de vie de la population Ardi pour l'évaluation du risque environnemental :**

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux permet également d'apporter des éléments de discussion quant aux implications des réponses adaptatives à la contamination pour l'évaluation du risque environnemental. Celles-ci peuvent être abordées à deux niveaux. Le premier concerne les conséquences directes liées aux modifications de sensibilité toxicologique. Le deuxième concerne les conséquences indirectes possibles liées aux modifications de traits d'histoire de vie qui peuvent avoir des impacts pour la population exposée elle-même en affectant les dynamiques populationnelles, mais aussi pour des niveaux d'organisation biologiques supérieurs.

#### **Conséquences directes de la tolérance : facteur de tolérance de la population Ardi**

L'un des objectifs de ces travaux a été d'évaluer la divergence de la tolérance au cadmium de la population Ardi par rapport à des populations de référence. Pour cela nous

avons décrit la variabilité de la sensibilité au cadmium entre populations de gammares de référence et exclu les conditions d'habitats (taille de cours d'eau, régime hydrologique, climatique etc.) et le déterminisme phylogénétique pour les lignées du groupe *fossarum* (lignées *G. fossarum*, B, C ; *G. orinos* et *G. wautieri*) comme facteurs majeurs à l'origine de la variabilité observée, (Chapitre V).

Grâce au génotypage des populations étudiées, il a également pu être établi que le facteur phylogénétique n'est pas explicatif de la tolérance au cadmium de la population Ardi. En effet, cette population n'appartient pas à une lignée cryptique de *G. fossarum* divergente des populations de référence auxquelles sa sensibilité au cadmium a été comparée. La population Ardi est en effet composée d'individus appartenant à la lignée B de *G. fossarum*, tout comme huit des populations de référence étudiées au cours de ces travaux (chapitre 5). En outre, la population Ardi est plus tolérante au cadmium (4,6 fois) que ces huit autres populations pures de la même lignée (*G. fossarum* B) (Tableau VI-1) confirmant ainsi que la population Ardi présente bien une augmentation de la tolérance au cadmium attribuable à une exposition dans le milieu et la qualité de ce cas d'étude.

Concernant le niveau de décalage de la sensibilité au cadmium de la population Ardi, celui-ci a pu être évalué en temps-réponse (Chapitre II) et en dose-réponse (chapitre V) au cours de deux expérimentations menées à un an et demi d'intervalle et mettant toutes deux en évidence l'augmentation de la tolérance au cadmium de cette population. Comme présenté dans le Tableau VI-1, les résultats des Chapitres II et V ont respectivement permis de calculer un facteur de tolérance pour la population Ardi d'un ordre de grandeur de deux pour le premier, et d'un ordre de grandeur de cinq pour le second et ceci quel que soit le sous lot de populations considéré (*i.e.* les 17 populations de référence, uniquement celles du premier lot, ou uniquement celles appartenant à la même lignée que la population Ardi). Ces facteurs de tolérance, calculés en faisant le ratio de la  $LT_{50}$  (ou  $LC_{50}$ ) de la population Ardi sur la moyenne des  $LT_{50}$  (ou  $LC_{50}$ ) des populations de référence, apparaissent dans les deux cas comme étant modérés. Ils sont en effet inférieurs à dix et font ainsi parti des facteurs de tolérance pour lesquels les facteurs de sécurité classiques appliqués en évaluation du risque (égaux à 10 pour chaque niveau) sont suffisants pour intégrer cette source de variabilité existant entre populations liée à la tolérance (Chapman et al. 1998, Forbes et Calow 2002b,

Medina et al. 2007, Berthet et al. 2011, Johnston 2011). Ces facteurs de tolérance sont toutefois modérés par rapport à certains facteurs de tolérance rapportés dans la littérature pouvant dépasser la centaine comme dans le cas de la résistance aux insecticides chez le poisson *Gambusia affinis* (Andreasen 1985) ou chez le crustacé amphipode *Hyaella azteca* (Weston et al. 2013).

**Tableau VI-1 : Facteurs de tolérance au cadmium de la population Ardi par rapport aux populations de référence calculés à partir des  $LT_{50}$  à  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd (heures) mesurées dans la publication n°2, et des  $LC_{50-96h}$  ( $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd) mesurées dans le Chapitre V.**

|                                                                                       | Valeur $LT_{50}$ (heures) ou<br>$LC_{50}$ ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Cd) | Facteur de tolérance de<br>la population Ardi |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b><math>LT_{50}</math> à <math>100 \mu\text{g.L}^{-1}</math> de Cd (Chapitre II)</b> |                                                                         |                                               |
| <i>Populations du 1<sup>er</sup> lot de populations de référence</i>                  |                                                                         |                                               |
| Moyenne des 5 populations                                                             | 136,2                                                                   | 1,9                                           |
| Minimum: population Comb                                                              | 109                                                                     | 2,4                                           |
| Maximum: population Alba                                                              | 156                                                                     | 1,7                                           |
| <b><math>LC_{50-96h}</math> (Chapitre V)</b>                                          |                                                                         |                                               |
| <i>Populations du 1<sup>er</sup> lot de populations de référence</i>                  |                                                                         |                                               |
| Moyenne des 5 populations                                                             | 117,4                                                                   | 4,9                                           |
| Minimum: population Mand                                                              | 104,9                                                                   | 5,4                                           |
| Maximum: population Gala                                                              | 128,8                                                                   | 4,4                                           |
| <i>Ensemble des 17 populations de référence</i>                                       |                                                                         |                                               |
| Moyenne des 17 populations                                                            | 113,2                                                                   | 5,1                                           |
| Minimum: population Vare                                                              | 47,1                                                                    | 12,1                                          |
| Maximum: population Alba                                                              | 156,9                                                                   | 3,6                                           |
| <i>Populations de référence appartenant à la lignée G. fossarum B</i>                 |                                                                         |                                               |
| Moyenne des 8 populations                                                             | 125,5                                                                   | 4,6                                           |
| Minimum: population Comb                                                              | 82,4                                                                    | 6,9                                           |
| Maximum: population Alba                                                              | 156,9                                                                   | 3,6                                           |

Au cours de ces travaux nous avons pu constater que la transmission de la tolérance de la population Ardi est réversible et que celle-ci pouvait se perdre dès la F1. La persistance de la tolérance est donc limitée dans le temps à l'échelle de la population. Néanmoins, la réversibilité de la tolérance pour un même individu (*i.e.* notion de flexibilité phénotypique) n'a pas été étudiée. Le fait que la tolérance soit réversible ou non pour un même individu peut

cependant avoir des implications différentes comme par exemple dans le cas d'une contamination variable dans le temps.

Ainsi, vu le niveau de divergence de la population Ardi et le fait que la tolérance soit rapidement réversible, l'augmentation de la tolérance de la population Ardi ne semble donc pas avoir d'implications directes pour l'évaluation du risque environnemental. Néanmoins, la tolérance au cadmium acquise par la population Ardi peut avoir des implications indirectes liées aux modifications des autres traits d'histoire de vies.

#### Conséquences indirectes de la tolérance : la modification des traits de vie de la population Ardi

Ces travaux de thèse ont permis d'établir que la tolérance au cadmium n'était pas le seul trait phénotypique de la population Ardi à être affecté par l'exposition à long terme de la population au cadmium. La transplantation d'individus au laboratoire a notamment mis en évidence une augmentation de la sensibilité de la population aux changements de conditions environnementales se traduisant par une baisse du taux d'alimentation en conditions de laboratoire. Coulaud et al. (2015) ont montré qu'une baisse du taux d'alimentation chez *G. fossarum* peut se traduire par une baisse des capacités de reproduction (fréquence des pontes, nombre d'embryons par portée) ce qui se répercute à l'échelle populationnelle par une baisse drastique du taux d'accroissement asymptotique de la population ( $\lambda$ ). Ils ont notamment mis en évidence qu'une inhibition du taux d'alimentation d'une population de *G. fossarum* de 10% se traduisait par une baisse de 10 % du  $\lambda$ . Au cours de nos travaux nous avons observé qu'en conditions non contaminées au laboratoire, la population Ardi présente une inhibition de 60% de son taux d'alimentation. Si effectivement, cela se traduit par une baisse de 60% du  $\lambda$ , alors le maintien à long de terme de cette population en environnement non contaminé n'est pas possible. Une baisse du taux d'alimentation peut également affecter le taux de croissance et de la même manière avoir des effets négatifs à l'échelle populationnelle chez les crustacés (Maltby 1999). En outre, étant donné le rôle clé des gammarès dans le fonctionnement des écosystèmes qu'ils occupent en tant que « déchiqueteurs » et en tant que proies, une baisse du taux d'alimentation pourrait également avoir un impact sur les processus

écologiques que sont le recyclage de la matière organique et l'entrée d'énergie dans les réseaux trophiques d'eau douce. Le décalage dans les distributions de taille observé *in situ* et notamment l'absence de grands individus, signifie que la population de *G. fossarum* Ardi représente une biomasse inférieure (pour des densités de populations comparables). Hors, les gammareux constituent des proies pour les consommateurs secondaires et sont notamment un élément important du régime alimentaire de certains poissons. Ainsi, cette perte de biomasse peut donc affecter les populations des autres espèces interagissant avec *G. fossarum* et avoir des conséquences à l'échelle de la communauté.

Concernant les autres traits d'histoire de vie de la population Ardi qui diffèrent des populations de référence, leurs modifications peuvent se traduire par des impacts sur la dynamique de population. Il est possible que l'histoire de vie divergente de la population modifie la sensibilité démographique de la population Ardi aux perturbations environnementales (parasitisme, autres toxiques etc.) et mette en danger la pérennité de la population avec les conséquences possibles à l'échelle de la communauté et de l'écosystème évoquées dans le paragraphe précédent. Le fait qu'une altération des traits d'histoire de vie peut se traduire par un impact au niveau populationnel avec une diminution du taux de croissance de la population a été démontré chez *G. fossarum* par Coulaud et al. (2014) pour des traits comme la fertilité, la survie juvénile et la survie adulte. En démontrant la sensibilité de la dynamique de population de *G. fossarum* en lien avec une altération des traits d'histoire de vie des individus, ces résultats obtenus par Coulaud et al. (2014) corroborent l'existence possible de conséquences à l'échelle populationnelle des modifications de traits constatées au sein de la population Ardi.

Enfin, si nous avons montré que la modification de la sensibilité au cadmium de la population Ardi était réversible, cette question n'a pas été traitée pour les autres traits mesurés au cours de ces travaux et il n'est pas exclu que les modifications observées puissent persister sur des durées supérieures que l'augmentation de la tolérance au cadmium.

Ainsi, l'exemple de la baisse du taux d'alimentation qui a été identifiée comme un coût de la tolérance pour la population Ardi, montre que même si la tolérance au cadmium de cette population peut paraître négligeable vu les facteurs de tolérance et vu son caractère

réversible, elle peut avoir des coûts écologiques. Il est ensuite important de noter que quelle que soit l'hypothèse explicative de ces modifications d'histoire de vie (coût de l'augmentation de la tolérance toxicologique et/ou adaptation à une baisse de l'espérance de vie), le cas de la population Ardi démontre qu'une exposition à long terme à la contamination peut avoir des conséquences écologiques indirectes importantes et donc avoir de réelles implications pour l'évaluation des risques.



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



Afin de répondre à la nécessité de caractériser et de comprendre les phénomènes d'adaptation à la contamination pour améliorer la pertinence de l'ERE, ces travaux de thèse ont eu pour objectif d'avancer dans la compréhension des effets des expositions à long terme à la contamination à l'échelle populationnelle dans le milieu. Centrés sur l'étude des capacités d'adaptation de populations naturelles de *G. fossarum* au cadmium, ils ont plus particulièrement visé à avancer dans la compréhension de l'évolution des sensibilités toxicologiques populationnelles, des processus soutenant ces modifications, et de leurs implications directes et indirectes pour l'évaluation du risque environnemental.

Le premier enjeu de ces travaux a été d'établir un design robuste permettant d'étudier ces questions dans le milieu. Ceci a été rendu possible avec l'identification d'une population exposée à long terme au cadmium, la population Ardi, et le positionnement de cette population dans la variabilité naturelle existant entre populations de gammarès. Une caractérisation rigoureuse de la contamination métallique biodisponible des sites des populations étudiées a contribué à l'établissement de ce design, en mettant tout d'abord en évidence la mono-exposition au cadmium de la population Ardi, et le caractère stable et durable de cette contamination, en faisant ainsi un cas d'étude idéal pour étudier les effets d'une exposition à long terme dans le milieu. Ce design a également permis de s'affranchir de l'effet des facteurs de confusion par la constitution d'un large échantillon de populations de référence du complexe *G. fossarum*. Par ailleurs, la caractérisation de la composition phylogénétique des populations étudiées a permis d'exclure cet autre facteur de confusion potentiel chez *G. fossarum*, (morpho-espèce composée de plusieurs lignées cryptiques) pour comprendre la divergence de cette population comme résultant de cette exposition historique *in situ*.

La caractérisation de la variabilité des sensibilités toxicologiques et des traits d'histoire de vie entre populations de référence, bien qu'elle n'ait pas fait l'objet du cœur de ces travaux, a révélé l'existence d'une variabilité non négligeable, montrant ainsi l'importance de prendre en compte la variabilité naturelle entre populations de référence, et d'intégrer les sources de variabilité comme les facteurs environnementaux et le cryptisme dans les études écotoxicologiques.

***Modification de la sensibilité toxicologique en cas d'exposition dans les milieux***

Le questionnement suivi lors de nos travaux a été de déterminer si une exposition à long terme au cadmium peut induire une augmentation de la tolérance à ce métal, et d'identifier le ou les mécanisme(s) populationnel(s) soutenant ou pouvant soutenir l'évolution de celle-ci chez *G. fossarum*. Grâce à une double approche rétrospective et *a priori*, basée sur l'étude de la population Ardi et de populations de référence, ces travaux ont permis de mettre en évidence : (1) une augmentation de la tolérance au cadmium chez la population exposée *in situ* (Chapitre 3 et 5) ; (2) une faible héritabilité de la sensibilité au cadmium au sein des populations naïves de *G. fossarum*.; et (3) un rôle majeur des effets parentaux induits par l'exposition comme mécanisme populationnel soutenant l'évolution de la tolérance dans le milieu chez cette espèce. Les résultats obtenus au cours de ces travaux ouvrent par ailleurs la question de l'origine paternelle et/ou maternelle des effets parentaux détectés. Plusieurs éléments évoqués dans la discussion tendent à montrer que la tolérance au cadmium de la population Ardi résulterait d'un effet maternel spécifique, se mettant en place en cas d'exposition.

*Perspective pour une meilleure compréhension des effets parentaux* L'origine paternelle et/ou maternelle des effets parentaux pourrait être testée en réalisant la même expérimentation que celle conduite sur la population Ardi présentée dans la Publication n°3, consistant à étudier l'évolution de la tolérance et de sa transmission au sein de F1 produites en conditions non contaminées à partir de couples maintenus pendant plus ou moins longtemps au laboratoire, mais en s'affranchissant des deux facteurs de confusion pointés au cours de la discussion : la durée de stabulation des femelles, ainsi que la durée de stabulation des mâles. Cette expérience pourrait être réalisée en croisant des mâles et des femelles avec différents temps de stabulation avec des individus de sexe opposé mais non stabulés au laboratoire. En parallèle, cette expérimentation pourrait être réalisée avec différentes températures de stabulation des parents. La durée du cycle de reproduction des femelles étant corrélée à la température, réaliser cette expérience à différentes température permettrait de produire des cohortes de type 1 à 3 mais provenant de parents ayant différents temps de stabulation. Il serait ainsi possible de faire la part entre l'effet « durée de stabulation » et l'effet « cohorte »,

ce qui n'a pas été possible ici et ce qui permettrait d'avoir des indications sur les mécanismes physiologiques individuels sous-jacents et une meilleure idée de leur persistance.

*Perspective pour la mise en évidence d'effets parentaux maternels et de leur(s) support(s)* Pour répondre à cette question de l'origine des effets parentaux, et notamment de leur origine maternelle, il serait également intéressant de directement étudier le support des effets parentaux. Des dosages de cadmium, de protéines de tolérance (métallothionéines par exemple), et/ou des facteurs codants pour celles-ci (ARNm) pourraient être effectués dans les oocytes et les embryons issus de femelles prélevées dans la population Ardi avec différents temps de stabulation en conditions non contaminées, mais aussi issus de femelles de populations de référence pré-exposées au laboratoire à différentes concentrations et pendant différentes durées au cadmium. En plus de cette étude de transferts de facteurs maternels, le rôle des marquages épigénétiques, autre support possible des effets parentaux, pourrait être traité en comparant par exemple le profil de méthylation globale de la population Ardi à celui de populations de référence (AFLP utilisant des enzymes de restrictions sensibles aux méthylations). Une autre approche serait d'analyser plus spécifiquement les profils de méthylations des gènes impliqués dans l'augmentation de la tolérance au cadmium. Cette approche est plus complexe car elle nécessite une étape préalable d'identification des protéines et des gènes impliqués dans l'augmentation de la tolérance au cadmium chez *G. fossarum*. Toutefois, de récents travaux au Laboratoire d'Ecotoxicologie d'Irstea de Lyon-Villeurbanne en partenariat avec le CEA de Marcoule, ont permis par des approches de protéogénomiques de créer une base de donnée d'ARN et de générer un large catalogue de protéines chez *G. fossarum* (Trapp et al. 2014) qui pourraient être un point de départ pour cette identification.

*Perspective pour l'étude de la sélection des effets parentaux* Au cours de ces travaux il a été montré qu'une adaptation génétique de la sensibilité au cadmium de *G. fossarum* était improbable en cas d'exposition *in situ*, mais l'hypothèse d'une adaptation à la contamination par la sélection des effets parentaux (*i.e.* d'une plasticité trans-générationnelle) a été évoquée. Cette hypothèse pourrait être testée en étudiant dans un premier temps l'héritabilité du caractère «effet parental» (test de l'héritabilité des effets maternels avec par exemple la mesure de l'héritabilité des transferts des facteurs maternels de tolérance dans le cas où ces

mécanismes auraient été mis en évidence), puis en mettant dans un deuxième temps en évidence qu'être un « bon » parent constitue une augmentation de la fitness pour les individus.

### ***Modification des histoires de vie en cas d'exposition dans les milieux***

L'étude des traits d'histoire de vie des différentes populations de *G. fossarum* a révélé que la population Ardi diverge des autres populations de référence du point de vue du taux d'alimentation, du taux de croissance, de la distribution de taille des femelles en reproduction, et possiblement de la fécondité. Si la modification du taux d'alimentation a été interprétée comme étant un coût de la tolérance, l'interprétation des modifications des autres traits est beaucoup moins claire. La possibilité que ces modifications puissent constituer des coûts de la tolérance et/ou une adaptation de l'histoire de vie de la population Ardi a ainsi été discutée dans le Chapitre VI.

*Perspective pour l'interprétation de la nature de la modification des traits d'histoire de vie* La modélisation des dynamiques de population de la population Ardi et de populations de référence peut permettre de trancher entre ces deux hypothèses (coût ou adaptation). En premier lieu elle peut permettre d'estimer l'espérance de vie des individus, et que l'hypothèse de l'adaptation de l'histoire de vie de la population Ardi repose en partie sur l'hypothèse d'une espérance de vie plus faible sur le site caractérisé ici comme contaminé (fort niveau de cadmium biodisponible). Mais aussi, elle peut permettre d'évaluer l'impact en termes de fitness populationnelle des modifications de traits observées au sein de la population Ardi. Des modèles de dynamique de population de *G. fossarum* ont déjà été développés au Laboratoire d'Ecotoxicologie de Irstea de Lyon-Villeurbanne (Coulaud et al. 2014) et peuvent être utilisés dans cet objectif. Par ailleurs, les données nécessaires à la paramétrisation d'un modèle de dynamique de population pour la population Ardi et quatre autres populations de référence sont disponibles et ont été acquises au cours de nos travaux de thèse à partir du suivi démographique réalisé pour l'étude des distributions de taille des femelles en reproduction. Cette phase de modélisation fera l'objet de prochains développements.

### ***Enseignement pour la pertinence des démarches actuelles d'ERE***

Les résultats obtenus au cours de nos travaux ont par ailleurs permis de discuter des implications des effets d'une exposition à long terme pour l'évaluation du risque environnemental. L'analyse des facteurs de tolérance au cadmium de la population Ardi a permis de relativiser la divergence de cette population par rapport à la variabilité de la sensibilité au cadmium entre populations de gammarets et a révélé que la tolérance acquise par la population Ardi ne représente pas un biais direct pour l'évaluation du risque pour ce métal puisque la divergence de la population Ardi est de l'ordre de grandeur de la variabilité considérée par les facteurs de tolérance existants. A la différence, la discussion autour des modifications des autres traits de vie de cette population (taux d'alimentation, structure des tailles de la population etc.), quelle que soit leur nature (*i.e.* coût de la tolérance ou adaptation de l'histoire de vie de la population), a conclu que celles-ci peuvent avoir des conséquences écologiques importantes et donc constituer un biais indirect pour l'évaluation du risque.

Par ailleurs, avec la mise en évidence de modifications au sein de la population Ardi exposée à une concentration de cadmium dissout dans l'eau inférieur au seuil réglementaire, ces travaux montrent (1) l'importance de prendre en compte la biodisponibilité des contaminants dans l'étude des effets d'une exposition à long terme dans le milieu, et (2) posent la question du caractère protecteur pour l'environnement des NQE actuelles. En effet, dans le cas de cette exposition long terme, il apparaît que des phénomènes micro-évolutifs peuvent se mettre en place à des niveaux d'exposition relativement faibles.

Nos travaux basés sur l'étude de populations naturelles mêlant une double approche laboratoire/terrain et couplant études *a priori* et rétrospectives ont permis d'avancer dans la compréhension à l'échelle populationnelle des effets d'une exposition à long terme en milieu contaminé avec la compréhension de l'évolution des sensibilités toxicologiques et des processus soutenant ces modifications chez *G. fossarum*. Toutefois, la population Ardi étant un cas d'étude isolé, la question de l'occurrence et de la généricité des modifications de sensibilité toxicologique et des traits d'histoire de vie enregistrés au sein de cette population en réponse à une exposition à long terme dans le milieu reste encore ouverte, pour le cadmium mais aussi pour d'autres types de contaminants (organiques).

Nos travaux contribuent à une meilleure compréhension des réponses évolutives à la contamination dans les milieux au sein de populations naturelles. Ils soulignent par ailleurs la nécessité d'intégrer les effets d'une exposition à long terme à la contamination pour une évaluation du risque plus pertinente, puisque les réponses adaptatives susceptibles d'en résulter peuvent représenter une source d'incertitude pour l'évaluation de la vulnérabilité des populations aux perturbations environnementales.

La mise en évidence du rôle des effets parentaux dans l'acquisition populationnelle d'une tolérance à un contaminant et de coûts associés met également en lumière que les réponses plastiques trans-générationnelles sont au cœur des mécanismes d'augmentation de la tolérance et doivent tout comme les réponses micro-évolutives être prise en compte. Bien que réversibles ces processus peuvent en effet affecter le phénotype des individus des générations suivantes, et ce sur des durées pouvant être longues selon les mécanismes moléculaires sous-jacents, mais également être associés à des coûts pouvant avoir des conséquences écologiques.

En outre les phénomènes de plasticité trans-générationnelle peuvent être sélectionnés et tendent de plus en plus à être reconnus comme jouant un rôle essentiel dans les réponses adaptatives aux modifications des conditions environnementales. Ils sont au cœur des nouvelles théories de l'évolution qui reconsidèrent la définition de l'adaptation et ouvrent ce concept non plus à la simple sélection et transmission d'une séquence particulière d'ADN (*i.e.* théorie synthétique de l'évolution ou synthèse néo-darwinienne), mais intègrent également l'ensemble des mécanismes d'hérédité non génétiques (théorie synthétique de l'évolution étendue) (Danchin et al. 2011).

Au-delà des perspectives propres aux travaux menés dans le cadre de cette thèse, ces travaux montrent, qu'un travail est nécessaire pour l'intégration des phénomènes d'adaptation à la contamination dans l'ERE, et notamment un grand besoin d'acquérir des connaissances plus globales et exhaustives de ces phénomènes. Il apparaît en effet indispensable de mener des études de terrain portant sur des populations naturelles et pour des espèces non modèles afin de mieux comprendre et caractériser l'ensemble de ces processus *in situ*. Il est également crucial de les quantifier, en évaluant les échelles de temps impliquées (*i.e.* la vitesse d'induction et la persistance des changements phénotypiques et des processus

populationnels supportant ces derniers), et en mesurant l'ampleur de ces changements phénotypiques (*i.e.* la taille de l'effet, facteur de tolérance), et ceci pour différentes classes de contaminants (métaux, organiques), à différentes concentrations, et pour l'ensemble des processus populationnels pouvant se mettre en place. Enfin, comprendre et évaluer les conséquences indirectes pour les populations concernées et les répercussions possibles pour des niveaux d'organisation biologique supérieurs (population, communauté), est nécessaire afin de proposer une évaluation du risque qui intègre pleinement l'ensemble des conséquences possibles des contaminations environnementales.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agra, A. R., A. M. V. M. Soares, and C. Barata. 2011. Life-history consequences of adaptation to pollution. "Daphnia longispina clones historically exposed to copper". *Ecotoxicology* 20:552-562.
- Amiard-Triquet, C. 2000. Pollution Tolerance: From Fundamental Biological Mechanisms to Ecological Consequences. Pages 1-24 in C. Amiard, P. S. Rainbow and M. Roméo, *Tolerance to environmental contaminants*. CRC Press, Boca Raton.
- Amiard-Triquet, C., C. Cossu-Leguille and C. Mouneyrac. 2012. Biomarkers of Defense, Tolerance and Ecological consequences Pages 45-74 in Amiard-Triquet, C., J. C. Amiard, and P. S. Rainbow, *Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects*, CRC Press.
- Amiard-Triquet, C. and P.S. Rainbow. 2000. Tolerance and the Trophic Transfer of Contaminants. Pages 299-332 in C. Amiard, P. S. Rainbow and M. Roméo, *Tolerance to environmental contaminants*. CRC Press, Boca Raton.
- Amiard-Triquet, C., P. S. Rainbow, and M. Roméo (Eds.). 2011. *Tolerance to environmental contaminants*. CRC Press.
- Amiard-Triquet, C. and M. Roméo. 2000. Conclusions. Pages 409-432 in C. Amiard, P. S. Rainbow and M. Roméo, *Tolerance to environmental contaminants*. CRC Press, Boca Raton.
- Andreasen, J. 1985. Insecticide resistance in mosquitofish of the Lower Rio Grande valley of Texas—An ecological hazard? *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 14:573-577.
- Arnold, S. J. 1992. Constraints on Phenotypic Evolution. *The American Naturalist* 140:S85-S107.
- Athrey, N. R. G., P. L. Leberg, and P. L. Klerks. 2007. Laboratory culturing and selection for increased resistance to cadmium reduce genetic variation in the least killifish, *Heterandria formosa*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:1916-1921.
- Badyaev, A. V. and T. Uller. 2009. Parental Effects in Ecology and Evolution: Mechanisms, Processes and Implications. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 364:1169-1177.
- Baird, D. J., I. Barber, M. Bradley, A. M. V. M. Soares, and P. Calow. 1991. A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21:257-265.
- Baird, D. J., I. Barber, and P. Calow. 1990. Clonal Variation in General Responses of *Daphnia magna* Straus to Toxic Stress. I. Chronic Life-History Effects. *Functional Ecology* 4:399-407.

- Baird, D. J., S. S. Brown, L. Lagadic, M. Liess, L. Maltby, M. Moreira-Santos, R. Schulz, and G. I. Scott. 2007. In situ-based effects measures: Determining the ecological relevance of measured responses. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3:259-267.
- Baird, D. J., M. N. Rubach, and P. J. Van den Brinkt. 2008. Trait-based ecological risk assessment (TERA): The new frontier?. *Integrated Environmental Assessment and Management* 4:2-3.
- Barata, C., D. J. Baird, A. Miñarro, and A. M. V. M. Soares. 2000. Do genotype responses always converge from lethal to nonlethal toxicant exposure levels? Hypothesis tested using clones of *Daphnia magna* straus. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:2314-2322.
- Belfiore, N. M. and S. L. Anderson. 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 489:97-122.
- Bernardo, J. 1996. Maternal Effects in Animal Ecology. *American Zoologist* 36:83-105.
- Berthet, B., K. M. Y. Leung and C. Amiard-Triquet . 2000. Inter- and Intraspecific Variability of Tolerance: Implications for Bioassays and Biomonitoring. Pages 49-84 in C. Amiard, P. S. Rainbow and M. Roméo, *Tolerance to environmental contaminants*. CRC Press, Boca Raton.
- Besse, J.-P., M. Coquery, C. Lopes, A. Chaumot, H. Budzinski, P. Labadie, and O. Geffard. 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Research* 47:650-660.
- Besse, J.-P., O. Geffard, and M. Coquery. 2012 b. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *Trends in Analytical Chemistry* 36:113-127.
- Besse, J.-P., O. Geffard, C. Lopes, A. Chaumot, and M. Coquery. 2012 a. Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales. Approche de biosurveillance active sur *Gammarus fossarum*. Irstea, 62p.
- Bickham, J. W. 2011. The four cornerstones of Evolutionary Toxicology. *Ecotoxicology* 20:497-502.
- Bodar, C. W. M., I. van der Sluis, J. C. P. van Montfort, P. A. Voogt, and D. I. Zandee. 1990. Cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 16:33-39.
- Boets, P., K. Lock, P. L. M. Goethals, C. R. Janssen, and K. A. C. De Schamphelaere. 2012. A comparison of the short-term toxicity of cadmium to indigenous and alien gammarid species. *Ecotoxicology* 21:1135-1144.
- Bonduriansky, R. and T. Day. 2008. Nongenetic inheritance and its evolutionary implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40:103-125.
- Brakefield, P. M. 2006. Evo-devo and constraints on selection. *Trends in Ecology & Evolution* 21:362-368.

- Brandon, R.N., 1990. *Adaptation and Environment*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Breitholtz, M., C. Rudén, S. Ove Hansson, and B.-E. Bengtsson. 2006. Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63:324-335.
- Brown, B. E. 1976. Observations on the tolerance of the isopod *Asellus meridianus* Rac. to copper and lead. *Water Research* 10:555-559.
- Burnett, K. G., L. J. Bain, W. S. Baldwin, G. V. Callard, S. Cohen, R. T. Di Giulio, D. H. Evans, M. Gómez-Chiarri, M. E. Hahn, C. A. Hoover, S. I. Karchner, F. Katoh, D. L. MacLatchy, W. S. Marshall, J. N. Meyer, D. E. Nacci, M. F. Oleksiak, B. B. Rees, T. D. Singer, J. J. Stegeman, D. W. Towle, P. A. Van Veld, W. K. Vogelbein, A. Whitehead, R. N. Winn, and D. L. Crawford. 2007. *Fundulus* as the premier teleost model in environmental biology: Opportunities for new insights using genomics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 2:257-286.
- Calow, P. 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100:3-6.
- Caprio, M. A. and B. E. Tabashnik. 1992. Gene Flow Accelerates Local Adaptation Among Finite Populations: Simulating the Evolution of Insecticide Resistance. *Journal of Economic Entomology* 85:611-620.
- Chapman, G. A. 1985. Acclimation as a factor influencing metal criteria. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*, 8th Ed., ASTM STP 891:119-136.
- Chapman, P. M. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin* 44:7-15.
- Chapman, P. M. 2004. Indirect effects of contaminants. *Marine Pollution Bulletin* 48:411-412.
- Chapman, P. M., A. Fairbrother, and D. Brown. 1998. A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:99-108.
- Charron, L. 2014. Biomarqueurs énergétiques chez un amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum* : Développement, lien avec le succès reproducteur et application in situ. Thèse de doctorat. Université de Reims-Champagne Ardennes.
- Charron, L., O. Geffard, A. Chaumot, R. Coulaud, H. Queau, A. Geffard, and O. Dedourge-Geffard. 2013. Effect of water quality and confounding factors on digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum*. *Environmental Science and Pollution Research* 20:9044-9056.
- Chaumot, A., O. Geffard, J. Armengaud and L. Maltby. 2015. Gammarids as a reference species for freshwater monitoring. In *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Eds: C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard and C. Mouneyrac. Publisher: Elsevier. In press.

- Chaumot, A., P. Gos, J. Garric, and O. Geffard. 2009. Additive vs non-additive genetic components in lethal cadmium tolerance of *Gammarus* (Crustacea): Novel light on the assessment of the potential for adaptation to contamination. *Aquatic Toxicology* 94:294-299.
- Chevreaux E., et Louis Fage. Fédération Française des Sociétés de Science Naturelles. Office Central de Faunistique. Faune de France: Amphipodes; Ed. Chevreaux et Louis Fage. Lechevalier, 1925.
- Chiodi Boudet, L., P. Polizzi, M. B. Romero, A. Robles, and M. Gerpe. 2013. Lethal and sublethal effects of cadmium in the white shrimp *Palaemonetes argentinus*: A comparison between populations from contaminated and reference sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89:52-58.
- Colombo, V., V. J. Pettigrove, L. A. Golding, and A. A. Hoffmann. 2014. Transgenerational effects of parental nutritional status on offspring development time, survival, fecundity, and sensitivity to zinc in *Chironomus tepperi* midges. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 110:1-7.
- Costa, D., D. Bouchon, N. M. van Straalen, J. P. Sousa, and R. Ribeiro. 2013. Copper tolerance and genetic diversity of *Porcellionides sexfasciatus* (ISOPODA) in a highly contaminated mine habitat. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32:884-888.
- Coulaud, R. (2012). Modélisation et changement d'échelles pour l'évaluation écotoxicologique : application à deux macroinvertébrés aquatiques, *Gammarus fossarum* (crustacé amphipode) et *Potamopyrgus antipodarum* (mollusque gastéropode). Thèse de doctorat. Université de Lyon 1.
- Coulaud, R., O. Geffard, A. Coquillat, H. Quéau, S. Charles, and A. Chaumot. 2014. Ecological Modeling for the Extrapolation of Ecotoxicological Effects Measured during in Situ Assays in *Gammarus*. *Environmental Science & Technology* 48:6428-6436.
- Coulaud, R., O. Geffard, A. Vigneron, H. Quéau, A. François, and A. Chaumot. 2015. Linking feeding inhibition with reproductive impairment in *Gammarus* confirms the ecological relevance of feeding assays in environmental monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 34:1031-1038.
- Coulaud, R., O. Geffard, B. Xuereb, E. Lacaze, H. Quéau, J. Garric, S. Charles, and A. Chaumot. 2011. In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research* 45:6417-6429.
- Coutellec, M.-A. and C. Barata. 2011. An introduction to evolutionary processes in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20:493-496.
- Coutellec, M.-A. and C. Barata. 2013. Special issue on long-term ecotoxicological effects: an introduction. *Ecotoxicology* 22:763-766.
- Crane, M. 1995. Effect of zinc on four populations and two generations of *Gammarus pulex* (L.). *Freshwater Biology* 33:119-126.

- Dallinger, R. and M. Höckner. 2013. Evolutionary concepts in ecotoxicology: tracing the genetic background of differential cadmium sensitivities in invertebrate lineages. *Ecotoxicology* 22:767-778.
- Danchin, É., A. Charmantier, F. A. Champagne, A. Mesoudi, B. Pujol, and S. Blanchet. 2011. Beyond DNA: integrating inclusive inheritance into an extended theory of evolution. *Nature Reviews Genetics* 12:475-486.
- Dangles, O., M. O. Gessner, F. Guerold, and E. Chauvet. 2004. Impacts of stream acidification on litter breakdown: implications for assessing ecosystem functioning. *Journal of Applied Ecology* 41:365-378.
- Darwin, C. 1906. *L'Origine des espèces* (1859 (1re éd.) — 1872 (6e éd., traduite en 1876)). Librairie C. Reinwald, Schleicher Frères éditeurs.
- De Coninck, D. I., C. R. Janssen, and K. A. De Schamphelaere. 2014. An approach to assess the regulatory relevance of microevolutionary effects in ecological risk assessment of chemicals: A case study with cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33:453-457.
- Dedourge-Geffard, O., L. Charron, C. Hofbauer, V. Gaillet, F. Palais, E. Lacaze, A. Geffard, and O. Geffard. 2013. Temporal patterns of digestive enzyme activities and feeding rate in gammarids (*Gammarus fossarum*) exposed to inland polluted waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 97:139-146.
- Dedourge-Geffard, O., F. Palais, S. Biagianti-Risbourg, O. Geffard, and A. Geffard. 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An in situ experiment. *Chemosphere* 77:1569-1576.
- DeWitt, T. J., A. Sih, and D. S. Wilson. 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* 13:77-81.
- Dixon, G. D. and J. B. Sprague. 1981. Acclimation to Copper by Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) — A Modifying Factor in Toxicity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38:880-888.
- Donker, M. H. and C. G. Bogert. 1991. Adaptation to cadmium in three populations of the isopod *Porcellio scaber*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100:143-146.
- Donker, M. H., Van Capelleveen, H. E., and van Straalen, N. M. (1993b). Metal contamination affects size-structure and life-history dynamics in isopod field populations. IN Reinhard Dallinger, Philip S. Rainbow *Ecotoxicology of metals in invertebrates*, pp. 383-399.
- Donker, M. H., C. Zonneveld, and N. M. van Straalen. 1993a. Early reproduction and increased reproductive allocation in metal-adapted populations of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Oecologia* 96:316-323.

- Dutilleul, M., J.-M. Bonzom, C. Lecomte, B. Goussen, F. Daian, S. Galas, and D. Réale. 2014. Rapid evolutionary responses of life history traits to different experimentally-induced pollutions in *Caenorhabditis elegans*. *BMC evolutionary biology* 14:252.
- Dutilleul, M., L. Lemaire, D. Réale, C. Lecomte, S. Galas, and J.-M. Bonzom. 2013. Rapid phenotypic changes in *Caenorhabditis elegans* under uranium exposure. *Ecotoxicology* 22:862-868.
- Dutilleul, M., B. Goussen, J.-M. Bonzom, S. Galas, and D. Réale. 2015. Pollution Breaks Down the Genetic Architecture of Life History Traits in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 10:e0116214.
- Edley, M. T. and R. Law. 1988. Evolution of life histories and yields in experimental populations of *Daphnia magna*. *Biological Journal of the Linnean Society* 34:309-326.
- European Parliament, Council of the European Union (2013) Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Off J Eur Union L* 226:1-17.
- Falconer, D. S. and T. F. C. Mackay. 1996. *Introduction to quantitative genetics*. Longman, Edinburgh.
- Feckler, A., A. Thielsch, K. Schwenk, R. Schulz, and M. Bundschuh. 2012. Differences in the sensitivity among cryptic lineages of the *Gammarus fossarum* complex. *Science of The Total Environment* 439:158-164.
- Felten, V., G. Charmantier, R. Mons, A. Geffard, P. Rousselle, M. Coquery, J. Garric, and O. Geffard. 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 86:413-425.
- Fialkowski, W., E. Fialkowska, B. D. Smith, and P. S. Rainbow. 2003. Biomonitoring Survey of Trace Metal Pollution in Streams of a Catchment Draining a Zinc and Lead Mining Area of Upper Silesia, Poland Using the Amphipod *Gammarus fossarum*. *International Review of Hydrobiology* 88:187-200.
- Fisker, K. V., J. G. Sørensen, C. Damgaard, K. Pedersen, and M. Holmstrup. 2011. Genetic adaptation of earthworms to copper pollution: is adaptation associated with fitness costs in *Dendrobaena octaedra*? *Ecotoxicology* 20:563-573.
- Fleeger, J. W., K. R. Carman, and R. M. Nisbet. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment* 317:207-233.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology* 3:294-299.
- Forbes, V. E. and P. Calow. 2002a. Extrapolation in Ecological Risk Assessment: Balancing Pragmatism and Precaution in Chemical Controls Legislation: Extrapolation is a practical

- necessity in ecological risk assessment, but there is much room for improvement in the extrapolation process. *BioScience* 52:249-257.
- Forbes, V. E. and P. Calow. 2002b. Population growth rate as a basis for ecological risk assessment of toxic chemicals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 357:1299-1306.
- Forbes, V. E., P. Calow, V. Grimm, T. Hayashi, T. Jager, A. Palmqvist, R. Pastorok, D. Salvito, R. Sibly, and J. Spromberg. 2010. Integrating population modeling into ecological risk assessment.
- Forrow, D. M. and L. Maltby. 2000. Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:2100-2106.
- Fraser, J., D. T. Parkin, and E. Verspoor. 1978. Tolerance to lead in the freshwater isopod *asellus aquaticus*. *Water Research* 12:637-641.
- Gall, M., S. Holmes, K. Dafforn, and E. Johnston. 2013. Differential tolerance to copper, but no evidence of population-level genetic differences in a widely-dispersing native barnacle. *Ecotoxicology* 22:929-937.
- Galloway, L. F. 2005. Maternal effects provide phenotypic adaptation to local environmental conditions. *New Phytologist* 166:93-100.
- Geffard, O. 2014. Proposition d'une espèce bio-indicatrice, *Gammarus fossarum* : Démarches, méthodes et outils pour diagnostiquer et comprendre la contamination Chimique et la toxicité des milieux aquatiques. Habilitation à Diriger des Recherches. Université de Lyon1.
- Geffard, O., Besse, J.P., Chaumot, A., François A., Gahou J., Grisot G., Lopes, C., Recoura-Massaquant R., Coquery, M. 2014. Rapport de synthèse de l'étude pilote : déploiement de l'outil gammare encagé au niveau national, résultats pour les métaux ciblés. Rapport IRSTEA-ONEMA, 60p.
- Geffard, O., B. Xuereb, A. Chaumot, A. Geffard, S. Biagianti, C. Noël, K. Abbaci, J. Garric, G. Charmantier, and M. Charmantier-Daures. 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29:2249-2259.
- Gerhardt, A. 2011. GamTox: A Low-Cost Multimetric Ecotoxicity Test with *Gammarus* spp. for In and Ex Situ Application. *International Journal of Zoology* 2011:7.
- Goedmakers, A. 1972. *Gammarus fossarum* Koch, 1835: redescription based on. *Bijdragen tot de Dierkunde* 42:125.
- Goedmakers, A. 1981. Population dynamics of three gammarid species. *Bijdragen tot de Dierkunde* 51:181-190.

- Gotthard, K. and S. Nylin. 1995. Adaptive Plasticity and Plasticity as an Adaptation: A Selective Review of Plasticity in Animal Morphology and Life History. *Oikos* 74:3-17.
- Graça, M. A. 2001. The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams-a review. *International Review of Hydrobiology* 86:383-393.
- Graça, M. A. S., C. Cressa, M. O. Gessner, M. J. Feio, K. A. Callies, and C. Barrios. 2001. Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. *Freshwater Biology* 46:947-957.
- Grant, A. 2002. Pollution-Tolerant Species and Communities: Intriguing Toys or Invaluable Monitoring Tools? *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8:955-970.
- Gregory, R. P. G. and A. D. Bradshaw. 1965. Heavy metal tolerance in populations of *Agrostis tenuis* sibth. and other grasses. *New Phytologist* 64:131-143.
- Groenendijk, D., S. M. G. Lückers, M. Plans, M. H. S. Kraak, and W. Admiraal. 2002. Dynamics of metal adaptation in riverine chironomids. *Environmental Pollution* 117:101-109.
- Harper, F. A., S. E. Smith, and M. R. Macnair. 1997. Can an increased copper requirement in copper-tolerant *Mimulus guttatus* explain the cost of tolerance? *New Phytologist* 136:455-467.
- Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Friday, May 15, 2015 . Available [www.weedscience.com](http://www.weedscience.com)
- Hemingway, J. and H. Ranson. 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annual review of entomology* 45:371-391.
- Hendry, A. P. and M. T. Kinnison. 2001. An introduction to microevolution: rate, pattern, process. *Genetica* 112-113:1-8.
- Hieber, M. and M. O. Gessner. 2002. Contribution of Stream Detritivores, Fungi, and Bacteria to Leaf Breakdown Based on Biomass Estimates. *Ecology* 83:1026-1038.
- Ho, D. H. and W. W. Burggren. 2010. Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective. *The Journal of Experimental Biology* 213:3-16.
- Hoffmann, A. A. 1995. Acclimation: increasing survival at a cost. *Trends in Ecology & Evolution* 10:1-2.
- Hoffmann, A. A. and M. J. Hercus. 2000. Environmental Stress as an Evolutionary Force. *BioScience* 50:217-226.
- Hommen, U., J. M. Baveco, N. Galic, and P. J. van den Brink. 2010. Potential application of ecological models in the European environmental risk assessment of chemicals I: Review of protection goals in EU directives and regulations. *Integrated Environmental Assessment and Management* 6:325-337.

- Howell, R. 1985. Effect of zinc on cadmium toxicity to the amphipod *Gammarus pulex*. *hydrobiologia* 123:245-249.
- Issartel, J., V. Boulo, S. Wallon, O. Geffard, and G. Charmantier. 2010. Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Chemosphere* 81:701-710.
- Jablonka, E. 2013. Epigenetic inheritance and plasticity: The responsive germline. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 111:99-107.
- Jablonka, E., B. and G. Raz. 2009. Transgenerational Epigenetic Inheritance: Prevalence, Mechanisms, and Implications for the Study of Heredity and Evolution. *The Quarterly Review of Biology* 84:131-176.
- Jansen, M., A. Coors, R. Stoks, and L. Meester. 2011. Evolutionary ecotoxicology of pesticide resistance: a case study in *Daphnia*. *Ecotoxicology* 20:543-551.
- Johannes, F., V. Colot, and R. C. Jansen. 2008. Epigenome dynamics: a quantitative genetics perspective. *Nat Rev Genet* 9:883-890.
- Johnston, E. 2011. Tolerance to contaminants: evidence from chronically-exposed populations of aquatic organisms. Pages 25-46 in C. Amiard, P. S. Rainbow and M. Roméo, *Tolerance to environmental contaminants*. CRC Press, Boca Raton.
- Jones, D. T. and S. P. Hopkin. 1998. Reduced survival and body size in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* from a metal-polluted environment. *Environmental Pollution* 99:215-223.
- Jørgensen, C., K. Enberg, E. S. Dunlop, R. Arlinghaus, D. S. Boukal, K. Brander, B. Ernande, A. G. Gårdmark, F. Johnston, S. Matsumura, H. Pardoe, K. Raab, A. Silva, A. Vainikka, U. Dieckmann, M. Heino, and A. D. Rijnsdorp. 2007. Managing Evolving Fish Stocks. *Science* 318:1247-1248.
- Jubeaux, G., R. Simon, A. Salvador, H. Quéau, A. Chaumot, and O. Geffard. 2012. Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. *Aquatic Toxicology* 112–113:72-82.
- Kammenga, J. and R. Laskowski. (2000). *Demography in ecotoxicology*. , J. Wiley & Sons Ltd, Chichester, New York, Toronto.
- Karaman, G. S. and S. Pinkster. 1977. Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). *Commissie voor de artis bibliotheek*.
- Kelly, D., J. A. Dick, and W. I. Montgomery. 2002. The functional role of *Gammarus*(Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? *hydrobiologia* 485:199-203.

- Khan, F. R., J. R. Irving, N. R. Bury, and C. Hogstrand. 2011. Differential tolerance of two *Gammarus pulex* populations transplanted from different metallogenic regions to a polymetal gradient. *Aquatic Toxicology* 102:95-103.
- Khan, A. T., J. S. Weis, and L. D'Andrea. 1988. Studies of cadmium tolerance in two populations of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 40:30-34.
- Klerks, P. 1999. Acclimation to Contaminants by the Grass Shrimp *Palaemonetes pugio*: Individual Contaminants vs. Mixtures. *Ecotoxicology* 8:277-286.
- Klerks, P. L. 2002. Adaptation, Ecological Impacts, and Risk Assessment: Insights from Research at Foundry Cove, Bayou Trepagnier, and Pass Fourchon. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8:971-982.
- Klerks, P. L., P. L. Leberg, R. F. Lance, D. J. McMillin, and J. C. Means. 1997. Lack of development of pollutant-resistance or genetic differentiation in darter gobies (*Gobionellus boleosoma*) inhabiting a produced-water discharge site. *Marine Environmental Research* 44:377-395.
- Klerks, P. L. and S. A. Lentz. 1998. Resistance to lead and zinc in the western mosquitofish *Gambusia affinis* inhabiting contaminated Bayou Trepagnier. *Ecotoxicology* 7:11-17.
- Klerks, P. L. and J. S. Levinton. 1989a. Rapid Evolution of Metal Resistance in a Benthic Oligochaete Inhabiting a Metal-polluted Site. *The Biological Bulletin* 176:135-141.
- Klerks, P. L. and J. S. Levinton. 1989b. Effects of Heavy Metals in a Polluted Aquatic Ecosystem. Pages 41-67 in S. A. Levin, J. R. Kelly, M. A. Harwell, and K. D. Kimball, editors. *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. Springer New York.
- Klerks, P. L. and J. S. Levinton. 1993. Evolution of resistance and changes in community composition in metal-polluted environments: a case study on Foundry Cove. CRC Press Inc.: Boca Raton, FL.
- Klerks, P. L. and C. J. Moreau. 2001. Heritability of resistance to individual contaminants and to contaminant mixtures in the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:1746-1751.
- Klerks, P. L. and J. S. Weis. 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review. *Environmental Pollution* 45:173-205.
- Klerks, P. L., L. Xie, and J. S. Levinton. 2011. Quantitative genetics approaches to study evolutionary processes in ecotoxicology; a perspective from research on the evolution of resistance. *Ecotoxicology* 20:513-523.
- Kunz, P. Y., C. Kienle, and A. Gerhardt. 2010. *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests. Pages 1-76 in D. M. Whitacre, editor. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 205. Springer New York.

- Kwok, K. W. H., E. P. M. Grist, and K. M. Y. Leung. 2009. Acclimation effect and fitness cost of copper resistance in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:358-364.
- Lacaze, E. (2011). Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gammarus fossarum* : développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel. Thèse de doctorat. Université de Metz.
- Lacaze, E., A. Devaux, R. Mons, S. Bony, J. Garric, A. Geffard, and O. Geffard. 2011a. DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution* 159:1682-1691.
- Lacaze, E., O. Geffard, D. Goyet, S. Bony, and A. Devaux. 2011b. Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. *Environmental Research* 111:626-634.
- Laguerre, C., R. Wattier, M. Galipaud, Z. Gauthey, J.-P. Rullmann, C. Dubreuil, T. Rigaud, and L. Bollache. 2014. Confrontation of cryptic diversity and mate discrimination within *Gammarus pulex* and *Gammarus fossarum* species complexes. *Freshwater Biology* 59:2555-2570.
- Lam, P. K. S. 1996. Interpopulation differences in acute response of *Brotia hainanensis* (Gastropoda, Prosobranchia) to cadmium: Genetic or environmental variance? *Environmental Pollution* 94:1-7.
- Lam, P. K. S. 1999. Methods for Distinguishing Genetic and Environmental Variance in Stress Tolerance. *Ecological Applications* 9:449-455.
- LeBlanc, G. A. 1982. Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (straus) to environmental pollutants. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological* 27:309-322.
- Legler, J. 2010. Epigenetics: An emerging field in environmental toxicology. *Integrated Environmental Assessment and Management* 6:314-315.
- Levinton, J. S. (1980). Genetic divergence in estuaries. In *Estuarine perspectives*. pp. 509-520. Academic Press New York.
- Levinton, J. S., E. Suatoni, W. Wallace, R. Junkins, B. Kelaher, and B. J. Allen. 2003. Rapid loss of genetically based resistance to metals after the cleanup of a Superfund site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:9889-9891.
- Lin, H. C., S. C. Hsu, and P. P. Hwang. 2000. Maternal transfer of cadmium tolerance in larval *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* 57:239-248.
- Lopes, I., D. J. Baird, and R. Ribeiro. 2004. Genetic Determination of Tolerance to Lethal and Sublethal Copper Concentrations in Field Populations of *Daphnia longispina*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46:43-51.

- Lopes, I., D. J. Baird, and R. Ribeiro. 2005. Resistance to metal contamination by historically-stressed populations of *Ceriodaphnia pulchella*: Environmental influence versus genetic determination. *Chemosphere* 61:1189-1197.
- Lopes, I., D. J. Baird, and R. Ribeiro. 2006. Genetic adaptation to metal stress by natural populations of *Daphnia longispina*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63:275-285.
- Luoma, S. N., D. J. Cain, K. Ho, and A. Hutchinson. 1983. Variable tolerance to Copper in two species from San Francisco bay. *Marine Environmental Research* 10:209-222.
- Lynch, M. and B. Walsh. 1998. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer.
- Mackie, J. A., J. S. Levinton, R. Przeslawski, D. DeLambert, and W. Wallace. 2010. Loss of evolutionary resistance by the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* to a toxic substance - cost or gene flow? *Evolution* 64:152-165.
- MacNeil, C., J. T. Dick, and R. W. Elwood. 1997. The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp.(Crustacea: Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews* 72:349-364.
- Maltby, L. 1991. Pollution as a probe of life-history adaptation in *Asellus aquaticus* (Isopoda). *Oikos* 61:11-18.
- Maltby, L. 1999. Studying stress: the importance of organism-level responses. *Ecological Applications* 9:431-440.
- Maltby, L., S. A. Clayton, R. M. Wood, and N. McLoughlin. 2002. Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:361-368.
- Maltby, L. and M. Crane. 1994. Responses of *Gammarus pulex* (amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution* 84:45-52.
- Marshall, D. J. and T. Uller. 2007. When is a maternal effect adaptive? *Oikos* 116:1957-1963.
- Martin, J. W. and G. E. Davis. 2001. An updated classification of the recent Crustacea. *Natural History Museum of Los Angeles County NO. 39 SCIENCE SERIES*:1-124.
- McCahon, C. P. and D. Pascoe. 1989. Short-term experimental acidification of a Welsh stream: Toxicity of different forms of aluminium at low pH to fish and invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18:233-242.
- McNeilly, T. and A. D. Bradshaw. 1968. Evolutionary Processes in Populations of Copper Tolerant *Agrostis tenuis* Sibth. *Evolution* 22:108-118.
- Medina, M. H., J. A. Correa, and C. Barata. 2007. Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 67:2105-2114.

- Meeks, H. N., R. K. Chesser, B. E. Rodgers, S. Gaschak, and R. J. Baker. 2009. Understanding the genetic consequences of environmental toxicant exposure: Chernobyl as a model system. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28:1982-1994.
- Messiaen, M., K. A. C. De Schamphelaere, B. T. A. Muysen, and C. R. Janssen. 2010. The micro-evolutionary potential of *Daphnia magna* population exposed to temperature and cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73:1114-1122.
- Messiaen, M., C. R. Janssen, O. Thas, and K. A. C. Schamphelaere. 2012. The potential for adaptation in a natural *Daphnia magna* population: broad and narrow-sense heritability of net reproductive rate under Cd stress at two temperatures. *Ecotoxicology* 21:1899-1910.
- Meyer, J. N. and R. T. Di Giulio. 2003. Heritable adaptation and fitness costs in killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a polluted estuary. *Ecological Applications* 13:490-503.
- Meyran, J.-C. 1997. Impact of water calcium on the phenotypic diversity of alpine populations of *Gammarus fossarum*. *Ecology* 78:1579-1587.
- Meyran, J.-C., M. Monnerot, and P. Taberlet. 1997. Taxonomic Status and Phylogenetic Relationships of Some Species of the Genus *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) Deduced from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8:1-10.
- Millward, R. N. and P. L. Klerks. 2002. Contaminant-Adaptation and Community Tolerance in Ecological Risk Assessment: Introduction. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8:921-932.
- Miner, B. G., S. E. Sultan, S. G. Morgan, D. K. Padilla, and R. A. Relyea. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* 20:685-692.
- Morgan, A. J., P. Kille, and S. R. Stürzenbaum. 2007. Microevolution and Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. *Environmental Science & Technology* 41:1085-1096.
- Mouneyrac, C., P. T. Y. Leung and K. M. Y. Leung. 2000. Cost of Tolerance. Pages 265-297 in C. Amiard, P. S. Rainbow and M. Roméo, *Tolerance to environmental contaminants*. CRC Press, Boca Raton.
- Mousseau, T. A. and C. W. Fox. 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution* 13:403-407.
- Müller, J. 1998. Genetic population structure of two cryptic *Gammarus fossarum* types across a contact zone. *Journal of Evolutionary Biology* 11:79-101.
- Müller, J. 2000. Mitochondrial DNA Variation and the Evolutionary History of Cryptic *Gammarus fossarum* Types. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15:260-268.
- Munkittrick, K. R. and D. G. Dixon. 1988. Evidence for a maternal yolk factor associated with increased tolerance and resistance of feral white sucker (*Catostomus commersoni*) to waterborne copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 15:7-20.

- Muyssen, B. T. A., C. R. Janssen, and B. T. A. Bossuyt. 2002. Tolerance and acclimation to zinc of field-collected *Daphnia magna* populations. *Aquatic Toxicology* 56:69-79.
- Naylor, C., L. Pindar, and P. Calow. 1990. Inter- and intraspecific variation in sensitivity to toxins; the effects of acidity and zinc on the freshwater crustaceans *Asellus Aquaticus* (L.) and *Gammarus pulex* (L.). *Water Research* 24:757-762.
- Nowak, C., A. Czeikowitz, C. Vogt, M. Oetken, B. Streit, and K. Schwenk. 2008. Variation in sensitivity to cadmium among genetically characterized laboratory strains of the midge *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 71:1950-1956.
- OECD (2012), *Essai n° 211 : Daphnia magna, essai de reproduction*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264185470-fr>
- OECD (2011), *Essai n° 234 : Essai de développement sexuel des poissons*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264122376-fr>
- Ormerod, S. J., P. Boole, C. P. McCahon, N. S. Weatherley, D. Pascoe, and R. W. Edwards. 1987. Short-term experimental acidification of a Welsh stream: comparing the biological effects of hydrogen ions and aluminium. *Freshwater Biology* 17:341-356.
- Pawlik-Skowrońska, B. 2003. Resistance, accumulation and allocation of zinc in two ecotypes of the green alga *Stigeoclonium tenue* Kütz. coming from habitats of different heavy metal concentrations. *Aquatic Botany* 75:189-198.
- Peake, E. B., J. C. Locke, L. L. Tierney, and A. S. Kolok. 2004. Copper tolerance in fathead minnows: II. Maternal transfer. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:208-211.
- Pfennig, D. W. and M. R. Servedio. 2013. The role of transgenerational epigenetic inheritance in diversification and speciation. *Non-Genetic Inheritance* 1:17-26.
- Piersma, T. and J. Drent. 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology & Evolution* 18:228-233.
- Pinheiro, J.C. & Bates, D.M. 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer, New-York.
- Pinkster, S. 1972. On members of the *Gammarus pulex*-group (Crustacea. *Bijdragen tot de Dierkunde* 42:165.
- Plautz, S. C., T. Guest, M. A. Funkhouser, and C. J. Salice. 2013. Transgenerational cross-tolerance to stress: parental exposure to predators increases offspring contaminant tolerance. *Ecotoxicology* 22:854-861.
- Plautz, S. C. and C. J. Salice. 2013. Plasticity in offspring contaminant tolerance traits: developmental cadmium exposure trumps parental effects. *Ecotoxicology* 22:847-853.

- Pöckl, M. 1993. Reproductive potential and lifetime potential fecundity of the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* in Austrian streams and rivers. *Freshwater Biology* 30:73-91.
- Pöckl, M. 1995. Laboratory studies on growth, feeding, moulting and mortality in the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. *Archiv fuer hydrobiologie* 134:223-253.
- Pöckl, M., B. W. Webb, and D. W. Sutcliffe. 2003. Life history and reproductive capacity of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda) under naturally fluctuating water temperatures: a simulation study. *Freshwater Biology* 48:53-66.
- Posthuma, L. and N. M. van Straalen. 1993. Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 106:11-38.
- Posthuma, L., R. A. Verweij, B. Widanarko, and C. Zonneveld. 1993. Life-History Patterns in Metal-Adapted Collembola. *Oikos* 67:235-249.
- Postma, J. F. and C. Davids. 1995. Tolerance Induction and Life Cycle Changes in Cadmium-Exposed *Chironomus riparius* (Diptera) during Consecutive Generations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30:195-202.
- Postma, J. F., S. Mol, H. Larsen, and W. Admiraal. 1995a. Life-cycle changes and zinc shortage in cadmium-tolerant midges, *chironomus riparius* (diptera), reared in the absence of cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14:117-122.
- Postma, J. F., A. van Kleunen, and W. Admiraal. 1995b. Alterations in life-history traits of *Chironomus riparius* (diptera) obtained from metal contaminated rivers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29:469-475.
- R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rainbow, P.S. and S. N. Luoma. 2011. Biodynamic Parameters of the Accumulation of Toxic Metals, Detoxification, and the Acquisition of Metal Tolerance. Pages 127-151 in C. Amiard, P. S. Rainbow and M. Roméo, *Tolerance to environmental contaminants*. CRC Press, Boca Raton.
- Ramade, F. 2007. *Introduction à l'écotoxicologie: Fondements et applications*. Lavoisier.
- Rao, K., M. Mohapatra, S. Anand, and P. Venkateswarlu. 2010. Review on cadmium removal from aqueous solutions. *International journal of engineering, Science and technology* 2.
- Reznick, D. A., H. Bryga, and J. A. Endler. 1990. Experimentally induced life-history evolution in a natural population. *Nature*:357-359.
- Ribeiro, R. and I. Lopes. 2013. Contaminant driven genetic erosion and associated hypotheses on alleles loss, reduced population growth rate and increased susceptibility to future stressors: an essay. *Ecotoxicology* 22:889-899.

- Roberts, D. A. (1996). Variations in Sensitivity to Metals in Two Freshwater Crustaceans *Asellus Aquaticus* and *Gammarus Pulex*: Observations and Mechanisms. Thèse de doctorat. University of Sheffield, Department of Animal and Plant Science.
- Roelofs, D., L. Overheij, M. E. de Boer, T. K. S. Janssens, and N. M. van Straalen. 2006. Additive genetic variation of transcriptional regulation: metallothionein expression in the soil insect *Orchesella cincta*. *Heredity* 96:85-92.
- Roesijadi, G. and G. W. Fellingham. 1987. Influence of Cu, Cd, and Zn Preexposure on Hg Toxicity in the Mussel *Mytilus edulis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44:680-684.
- Roff, D. A. 2000. Trade-offs between growth and reproduction: an analysis of the quantitative genetic evidence. *Journal of Evolutionary Biology* 13:434-445.
- Roff, D. A. 2002. Life history evolution. Sinauer associates, USA.
- Roux, A. L. 1970. Le cycle de reproduction de deux espèces étroitement parentes de crustacés amphipodes: *Gammarus pulex* et *G. fossarum*. Pages 27-49 in *Annales de limnologie*. Cambridge Univ Press.
- Roux, C. and A. L. Roux. 1967. Température et métabolisme respiratoire d'espèces sympatriques de gammarus du Groupe *Pulex* [Crustacés, Amphipodes]. Pages 3-16 in *Annales de Limnologie*. Cambridge Univ Press.
- Rözen, A. 2000. Preadapted Populations in Metal-polluted Environments. Pages 199-215 in J. Kammenga, and R. Laskowski, *Demography in ecotoxicology*, J. Wiley & Sons Ltd, Chichester, New York, Toronto.
- Salice, C., T. Anderson, and G. Roesijadi. 2010. Adaptive responses and latent costs of multigeneration cadmium exposure in parasite resistant and susceptible strains of a freshwater snail. *Ecotoxicology* 19:1466-1475.
- Schill, R., H. Görlitz, and H.-R. Köhler. 2003. Laboratory simulation of a mining accident: acute toxicity, hsc/hsp70 response, and recovery from stress in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) exposed to a pulse of cadmium. *BioMetals* 16:391-401.
- Schirling, M., D. Jungmann, V. Ladewig, K.-U. Ludwichowski, R. Nagel, H.-R. Köhler, and R. Triebkorn. 2006. Bisphenol A in Artificial Indoor Streams: II. Stress Response and Gonad Histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicology* 15:143-156.
- Sellin, M. K. and A. S. Kolok. 2006. Maternally derived Cu tolerance in larval fathead minnows: how long does it persist? *Journal of Fish Biology* 69:1570-1574.
- Shirley, M. D. F. and R. M. Sibly. 1999. Genetic basis of a between-environment trade-off involving resistance to Cadmium in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 53:826-836.
- Sibly, R. M. and P. Calow. 1989. A life-cycle theory of responses to stress. *Biological Journal of the Linnean Society* 37:101-116.

- Simon, R., G. Jubeaux, A. Chaumot, J. Lemoine, O. Geffard, and A. Salvador. 2010. Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*). *Journal of Chromatography A* 1217:5109-5115.
- Slatkin, M. 1987. Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science* 236:787-792.
- Spicer, J. I., D. Morritt, and L. Maltby. 1998. Effect of water-borne zinc on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) from populations that differ in their sensitivity to metal stress. *Functional Ecology* 12:242-247.
- Spurgeon, D. J. and S. P. Hopkin. 1999a. Life-History Patterns in Reference and Metal-Exposed Earthworm Populations. *Ecotoxicology* 8:133-141.
- Spurgeon, D. J. and S. P. Hopkin. 1999b. Tolerance to Zinc in Populations of the Earthworm *Lumbricus rubellus* from Uncontaminated and Metal-Contaminated Ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37:332-337.
- Spurgeon, D. J. and S. P. Hopkin. 2000. The development of genetically inherited resistance to zinc in laboratory-selected generations of the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* 109:193-201.
- Stearns, S.C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford university press. Oxford.
- Stuhlbacher, A. and L. Maltby. 1992. Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22:319-324.
- Sutcliffe, D. W. 2010. Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): basic processes.in *Freshwater Forum*.
- Tanaka, Y. and H. Tatsuta. 2013. Retrospective estimation of population-level effect of pollutants based on local adaptation and fitness cost of tolerance. *Ecotoxicology* 22:795-802.
- Taylor, M. and R. Feyereisen. 1996. Molecular biology and evolution of resistance of toxicants. *Molecular Biology and Evolution* 13:719-734.
- TGD 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. EUR 20418 EN/2. European Commission, Joint Research Center.
- Trapp, J., O. Geffard, G. Imbert, J.-C. Gaillard, A.-H. Davin, A. Chaumot, and J. Armengaud. 2014. Proteogenomics of *Gammarus fossarum* to Document the Reproductive System of Amphipods. *Molecular & Cellular Proteomics* 13:3612-3625.

- Tsui, M. T. K. and W.-X. Wang. 2005. Influences of maternal exposure on the tolerance and physiological performance of *Daphnia magna* under mercury stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:1228-1234.
- Uller, T. 2008. Developmental plasticity and the evolution of parental effects. *Trends in Ecology & Evolution* 23:432-438.
- Väinölä, R., J. D. S. Witt, M. Grabowski, J. H. Bradbury, K. Jazdzewski, and B. Sket. 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *hydrobiologia* 595:241-255.
- Van Capelleveen, H. E. (1985). The ecotoxicity of zinc and cadmium for terrestrial isopods. Van Capelleveen, Ecotoxicity of Heavy Metals for Terrestrial Isopods. Thèse de doctorat. Vrije Universiteit, Amsterdam.
- van Straalen, N. M. and A. Hoffmann. 2000. Review of experimental evidence for physiological costs of tolerance to toxicants. *Demography in Ecotoxicology*:147-161.
- van Straalen, N. M. and M. J. T. N. Timmermans. 2002. Genetic Variation in Toxicant-Stressed Populations: An Evaluation of the “Genetic Erosion” Hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8:983-1002.
- Vandeghechuchte, M. B. and C. R. Janssen. 2011. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20:607-624.
- Vigneron, A., O. Geffard, M. Coquery, A. François, H. Quéau, and A. Chaumot. 2015. Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a *Gammarus fossarum* population inhabiting a low-level contaminated stream. *Ecotoxicology*. In Press.
- Violle, C., M.-L. Navas, D. Vile, E. Kazakou, C. Fortunel, I. Hummel, and E. Garnier. 2007. Let the concept of trait be functional! *Oikos* 116:882-892.
- Wagner, G. P. 1988. The Significance of Developmental Constraints for Phenotypic Evolution by Natural Selection. Pages 222-229 in G. de Jong, editor. *Population Genetics and Evolution*. Springer Berlin Heidelberg.
- Ward, T. J. and W. E. Robinson. 2005. Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:2341-2349.
- Weis, J. S. 2002. Tolerance to Environmental Contaminants in the Mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8:933-953.
- Weiss, M., J. Macher, M. Seefeldt, and F. Leese. 2014. Molecular evidence for further overlooked species within the *Gammarus fossarum* complex (Crustacea: Amphipoda). *hydrobiologia* 721:165-184.
- Weston, D. P., H. C. Poynton, G. A. Wellborn, M. J. Lydy, B. J. Blalock, M. S. Sepulveda, and J. K. Colbourne. 2013. Multiple origins of pyrethroid insecticide resistance across the species complex of a nontarget aquatic crustacean, *Hyalella azteca*. *PNAS* 110:16532–16537.

- Westram, A. M., J. Jokela, C. Baumgartner, and I. Keller. 2011. Spatial Distribution of Cryptic Species Diversity in European Freshwater Amphipods (*Gammarus fossarum*) as Revealed by Pyrosequencing. PLoS ONE 6:e23879.
- Woods, R. E. and A. Hoffmann. 2000. Evolution in toxic environments: quantitative versus major gene approaches. Pages 129-145 in J. Kammenga, and R. Laskowski, Demography in ecotoxicology, J. Wiley & Sons Ltd, Chichester, New York, Toronto.
- Xie, L. and P. L. Klerks. 2003. Responses to selection for cadmium resistance in the least killifish, *Heterandria formosa*. Environmental Toxicology and Chemistry 22:313-320.
- Xie, L. and P. L. Klerks. 2004. Fitness cost of resistance to cadmium in the least killifish (*Heterandria formosa*). Environmental Toxicology and Chemistry 23:1499-1503.
- Xuereb, B. (2009). Developpement de marqueurs de neurotoxicite et de perturbations endocrines chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. Thèse de doctorat. Université Paul Verlaine.
- Xuereb, B., A. Chaumot, R. Mons, J. Garric, and O. Geffard. 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. Aquatic Toxicology 93:225-233.
- Živić, I. and Z. Marković. 2007. Distribution of the Species *Gammarus balcanicus* and *Gammarus fossarum* on the Territory of Serbia (Central Part of the Balkan Peninsula). Crustaceana 80:67-76.



## **ANNEXES**

## Chapitre II

Tableau A-1 : Présentation des différentes expérimentations de mesure de la sensibilité au cadmium réalisées et des conditions expérimentales.

| Description de l'expérimentation<br>Conditions d'exposition au Cd                                 | Comparaison de la sensibilité au Cd entre populations |                                                                 |                                                                 |                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                   | A partir d'organismes non stabulés<br>(Chapitre III)  | A partir d'organismes stabulés au laboratoire<br>(Chapitre III) | A partir de juvéniles produits au laboratoire<br>(Chapitre III) | Généralisation de la variabilité interpopulation de la sensibilité<br>(Chapitre V) |
| Durée                                                                                             | 14 j                                                  | 14 j                                                            | 9 j                                                             | 4 fois 7 j                                                                         |
| Température(s)                                                                                    | 12 °C                                                 | 12 °C                                                           | 12 °C                                                           | 12 °C                                                                              |
| Conductivité de stabulation                                                                       | /                                                     | 300 $\mu\text{S.cm}^{-1}$                                       | 300 $\mu\text{S.cm}^{-1}$                                       | 300 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ 48h avant l'exposition                                   |
| Conductivité des milieux d'expo.                                                                  | 300 $\mu\text{S.cm}^{-1}$                             | 300 $\mu\text{S.cm}^{-1}$                                       | 300 $\mu\text{S.cm}^{-1}$                                       | 300 $\mu\text{S.cm}^{-1}$                                                          |
| Dureté des milieux d'expo.<br>à 300 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (mg.L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> ) | 106                                                   | 106                                                             | 106                                                             | 141                                                                                |
| Rythme jour/huit                                                                                  | 8 h / 16 h                                            | 8 h / 16 h                                                      | 8 h / 16 h                                                      | 8 h / 16 h                                                                         |
| Renouvellement du milieu                                                                          | continu                                               | continu                                                         | 1/2 du milieu toutes les 48 h                                   | quotidien                                                                          |
| Aération                                                                                          | aucune                                                | aucune                                                          | aucune                                                          | aucune                                                                             |
| Nourrissage                                                                                       | <i>ad-libitum</i> f.a.                                | <i>ad-libitum</i> f.a.                                          | aucune                                                          | aucune                                                                             |
| Concentration de Cd                                                                               | témoin et 100 $\mu\text{g L}^{-1}$                    | 100 $\mu\text{g L}^{-1}$                                        | 20 $\mu\text{g L}^{-1}$                                         | témoin, 20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{g.L}^{-1}$                                  |
| Stabulation des organismes                                                                        | aucune                                                | 3 semaines                                                      | F1 (parents stabulés 3 semaines)                                | 3 j                                                                                |
| Organismes exposés                                                                                | ♂ adultes de taille homogène                          | ♂ adultes de taille homogène                                    | juvéniles âgés de 6 à 14 j                                      | ♂ adultes de taille homogène                                                       |
| Nombre d'organismes / réplicats                                                                   | 20                                                    | 20                                                              | 1                                                               | 15                                                                                 |
| Nombre de réplicats / conditions                                                                  | 3 (témoins) et 4 (100 $\mu\text{g L}^{-1}$ )          | 3                                                               | 60                                                              | 3                                                                                  |
| Paramètre(s) mesuré(s)<br>et temps ou fréquence                                                   | survie à 18, 36, 60, 84, 118, 156, 204, 258 et 324 h  | survie à 18, 36, 60, 84, 118, 156, 204, 258 et 324 h            | 18, 36, 60, 84, 118, 156, 204 et 258 h                          | survie quotidienne                                                                 |
| Nombre de populations testées                                                                     | 6 (Ardi + 5 références strictes)                      | 4 (Ardi + 3 références strictes)                                | 4 (Ardi + 3 références strictes)                                | 19 (Ardi + 5 références strictes + 13 références larges)                           |

f.a.: feuille d'aulnes (morceaux grossiers). Condition témoin: même milieu que les conditions contaminées mais non supplémenté en cadmium.

Tableau A-1 (suite)

| Description de l'expérimentation                                                                  | Expérience de sélection/exposition parentale de la tolérance au Cd au laboratoire                                       |                                                                                                                                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                   | Variabilité intra-population de la sensibilité au Cd<br>- Génétique quantitative -<br>(Chapitre IV)                     | Sélection des parents<br>(Chapitre IV)                                                                                                 |
| Conditions d'exposition au Cd                                                                     |                                                                                                                         | Sensibilité des juvéniles issus des parents sélectionnés<br>(Chapitre IV)                                                              |
| Durée                                                                                             | 4 mois                                                                                                                  | 3 j d'exposition, puis 2 mois de stabulation                                                                                           |
| Température(s)                                                                                    | 12 °C                                                                                                                   | 12 °C                                                                                                                                  |
| Conductivité de stabulation                                                                       | stabulation des parents à 500 $\mu\text{S.cm}^{-1}$                                                                     | stabulation des parents à 500 $\mu\text{S.cm}^{-1}$                                                                                    |
| Conductivité des milieux d'expo.                                                                  | 300 $\mu\text{S.cm}^{-1}$                                                                                               | 300 $\mu\text{S.cm}^{-1}$                                                                                                              |
| Dureté des milieux d'expo.<br>à 300 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (mg.L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> ) | 106                                                                                                                     | 141                                                                                                                                    |
| Rythme jour/huit                                                                                  | 8 h / 16 h                                                                                                              | 8 h / 16 h                                                                                                                             |
| Renouvellement du milieu                                                                          | toutes les 48 h                                                                                                         | toutes les 48 h                                                                                                                        |
| Aération                                                                                          | aucune                                                                                                                  | aucune                                                                                                                                 |
| Nourrissage                                                                                       | aucune                                                                                                                  | aucune                                                                                                                                 |
| Concentration de Cd                                                                               | témoin et 20 $\mu\text{g L}^{-1}$                                                                                       | témoin et 20 $\mu\text{g L}^{-1}$                                                                                                      |
| Stabulation des organismes                                                                        | 3 cohortes de F1 (parents stabulés pendant 15 j, 6 semaines et 3 mois)                                                  | 2 cohortes de F1 (parents sélectionnés)                                                                                                |
| Organismes exposés                                                                                | juvéniles âgés de moins de 24 h                                                                                         | juvéniles âgés de moins de 7 j                                                                                                         |
| Nombre d'organismes / réplicats                                                                   | 5 juvéniles / fratrie, nombre de fratries variable, juvéniles exposés individuellement (1949 juvéniles testés au total) | nombre de juvéniles variables (ajusté en fonction du nombre de couples après mortalité post-expo.), juvéniles exposés individuellement |
| Nombre de réplicats / conditions                                                                  | survie quotidienne                                                                                                      | survie quotidienne et suivi de la mortalité post-exposition                                                                            |
| Paramètre(s) mesuré(s) et temps ou fréquence                                                      |                                                                                                                         |                                                                                                                                        |
| Nombre de populations testées                                                                     | 3 (Ardi + 2 références strictes)                                                                                        | 1 (référence stricte)                                                                                                                  |

f.a.: feuille d'aulnes (morceaux grossiers). Condition témoin: même milieu que les conditions contaminées mais non supplémenté en cadmium.

## Chapitre III

Tableau A-2 : Caractéristiques de l'expérimentation mise en place pour la mesure de la croissance au laboratoire et résultats obtenus.

| Population                | Date de lancement | Taille à t0 (mm) | Nb de réplicats | Date d'arrêt | Taux de survie | Taille finale (SD) (mm) | Croissance (SD) (mm) | Température moyenne (SD) (°C) |
|---------------------------|-------------------|------------------|-----------------|--------------|----------------|-------------------------|----------------------|-------------------------------|
| <i>Classe de taille 1</i> |                   |                  |                 |              |                |                         |                      |                               |
| Ardi                      | 13/03/2013        | 3,64 (0,21)      | 4               | 06/04/2013   | 78             | 3,74 (0,23)             | 0,10 (0,23)          | 12,1 (0,3)                    |
| Bacu                      | 13/03/2013        | 3,77 (0,30)      | 4               | 06/04/2013   | 78             | 3,93 (0,32)             | 0,16 (0,32)          | 12,1 (0,3)                    |
| Bois                      | 13/03/2013        | 3,94 (0,31)      | 3               | 06/04/2013   | 98             | 4,42 (0,39)             | 0,48 (0,39)          | 12,1 (0,3)                    |
| Mand                      | 13/03/2013        | 4,08 (0,36)      | 3               | 06/04/2013   | 98             | 4,36 (0,48)             | 0,28 (0,48)          | 12,1 (0,3)                    |
| Tour                      | 19/03/2013        | 3,72 (0,32)      | 4               | 12/04/2013   | 94             | 4,03 (0,31)             | 0,31 (0,31)          | 12,0 (0,4)                    |
| <i>Classe de taille 2</i> |                   |                  |                 |              |                |                         |                      |                               |
| Ardi                      | 13/03/2013        | 5,11 (0,35)      | 4               | 02/04/2013   | 61             | 5,20 (0,31)             | 0,09 (0,31)          | 12,1 (0,1)                    |
| Bacu                      | 13/03/2013        | 5,05 (0,28)      | 4               | 02/04/2013   | 98             | 5,28 (0,39)             | 0,23 (0,39)          | 12,1 (0,1)                    |
| Bois                      | 13/03/2013        | 5,64 (0,41)      | 3               | 02/04/2013   | 72             | 5,98 (0,44)             | 0,34 (0,44)          | 12,1 (0,1)                    |
| Mand                      | 13/03/2013        | 5,46 (0,47)      | 4               | 02/04/2013   | 95             | 5,69 (0,55)             | 0,23 (0,55)          | 12,1 (0,1)                    |
| Tour                      | 19/03/2013        | 5,12 (0,26)      | 4               | 08/04/2013   | 100            | 5,38 (0,36)             | 0,26 (0,36)          | 12,0 (0,4)                    |

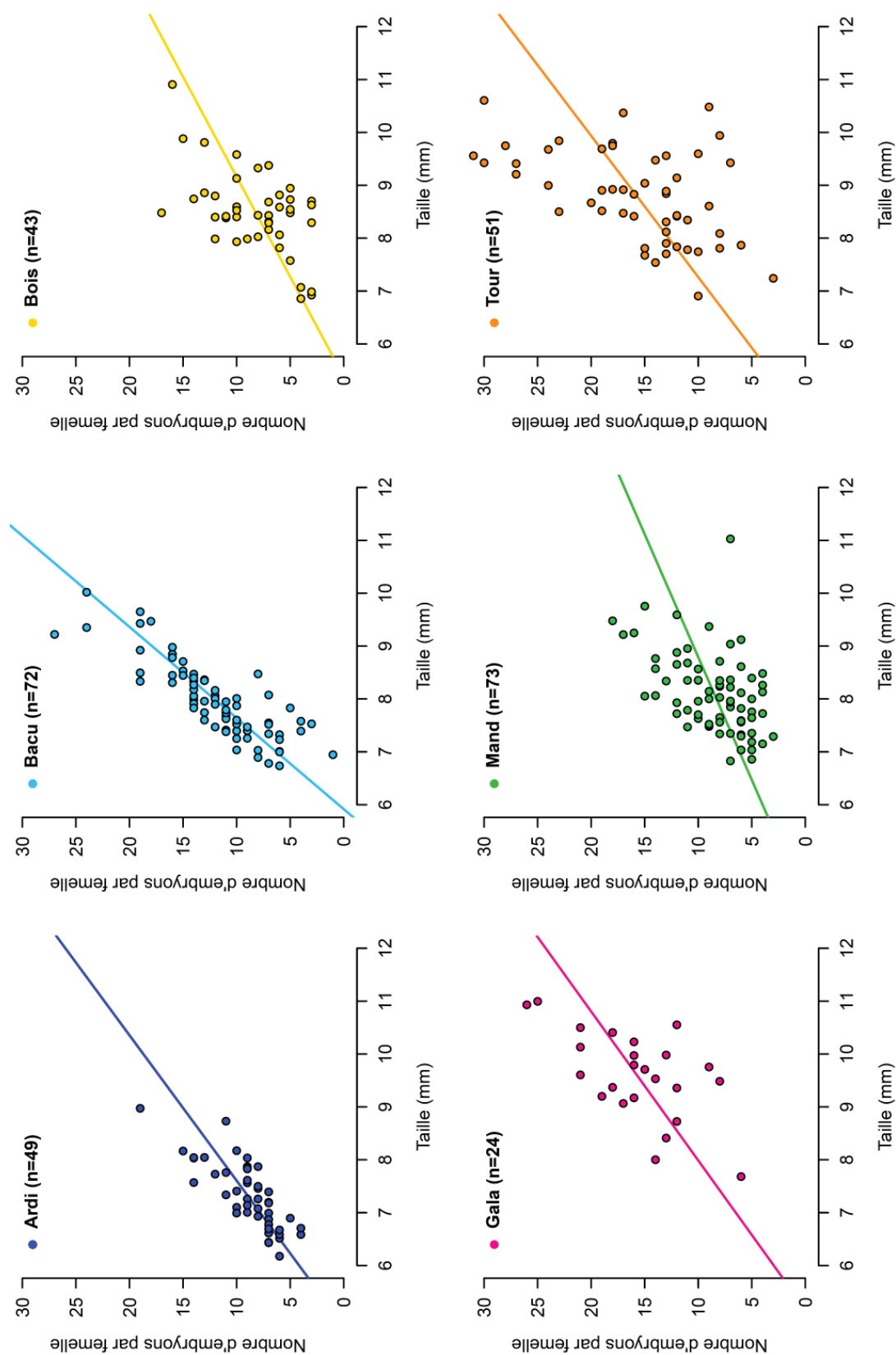


Figure A-1 : Fécondité de femelles prélevées *in situ* pour la population Ardi et cinq populations de référence présentées individuellement.

## Chapitre IV

**Tableau A-3 : Correspondance entre les quatre conditions parentales et les modalités d'exposition au cadmium des mâles et des femelles de l'expérience de sélection parentale présentée dans la Publication n°2 et la Note n°3.**

| Condition parentale | Modalité d'exposition au Cd des parents |                             |
|---------------------|-----------------------------------------|-----------------------------|
|                     | Mâles                                   | Femelles                    |
| C-I                 | Témoins                                 | Témoins                     |
| C-II                | Témoins                                 | Témoins                     |
| S-20% P             | 100 µg.L <sup>-1</sup> de Cd            | Témoins                     |
| S-20% P&M           | 100 µg.L <sup>-1</sup> de Cd            | 20 µg.L <sup>-1</sup> de Cd |

**Tableau A-4 : Nombre (n) et survie en pourcentage des juvéniles témoins produits par les quatre conditions parentales C-I, C-II, S-20% P et S-20% P&M. Ceux-ci ont subi le même traitement que les juvéniles exposés à 20 µg.L<sup>-1</sup> de Cd dont la survie est présentée en Note n°3 à la différence qu'ils n'ont pas été exposés au cadmium.**

| Condition parentale | Cohorte 2 |                | Cohorte 3 |                |
|---------------------|-----------|----------------|-----------|----------------|
|                     | n         | Taux de survie | n         | Taux de survie |
| C-I                 | 20        | 100            | 28        | 100            |
| C-II                | 20        | 65             | 20        | 100            |
| S-20% P             | 20        | 100            | 20        | 100            |
| S-20% P&M           | 20        | 95             | 26        | 100            |

## Chapitre V

**Tableau A-5 : Limites de quantification correspondantes à chaque série d'encagement présentées dans le Tableau V-1.**

|       | <b>Cr</b>  | <b>Co</b> | <b>Ni</b>  | <b>Cu</b> | <b>Zn</b> | <b>As</b>  | <b>Se</b>  | <b>Ag</b> | <b>Cd</b> | <b>Pb</b> |
|-------|------------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| n° LQ | ICP-MS-CCT | ICP-MS    | ICP-MS-CCT | ICP-MS    | ICP-MS    | ICP-MS-CCT | ICP-MS-CCT | ICP-MS    | ICP-MS    | ICP-MS    |
| 1     | 0.08       | 0.08      | 0.40       | 0.20      | 0.80      | 0.08       | 0.40       | 0.040     | 0.040     | 0.08      |
| 2     | 0.11       | 0.11      | 0.53       | 0.27      | 1.07      | 0.10       | 2.67       | 0.053     | 0.053     | 0.11      |
| 3     | 0.1        | 0.1       | 0.49       | 0.25      | 0.99      | 0.1        | 0.49       | 0.049     | 0.049     | 0.1       |
| 4     | 0.100      | 0.100     | 0.500      | 0.500     | 1.00      | 0.100      | 0.500      | 0.100     | 0.050     | 0.500     |
| 5     | 0.19       | 0.074     | 0.19       | 0.19      | 0.74      | 0.19       | 0.37       | 0.74      | 0.04      | 0.074     |





## Résumé

Comme ils conduisent à des modifications de sensibilité toxicologique et de traits d'histoire de vie au sein des populations naturelles exposées, les phénomènes d'adaptation à la contamination questionnent la pertinence de l'évaluation du risque environnemental lié au rejet de contaminants chimiques et sont devenus un champ de recherche important à développer en écotoxicologie. Centrés sur l'étude des capacités d'adaptation de l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*, les travaux présentés ici ont eu pour objectif d'avancer dans la compréhension des effets d'une exposition à long terme au cadmium à l'échelle populationnelle et en milieu naturel. En recourant à des méthodologies de biomonitoring par encagement, de culture et d'exposition au laboratoire et de suivi démographique *in situ*, une démarche couplant études *a priori* et rétrospectives sur populations naturelles, a permis d'identifier un phénomène d'augmentation de la tolérance et de modification de traits d'histoire de vie chez une population exposée historiquement au cadmium. Des approches de génétique quantitative conduites sur trois populations ont dans un deuxième temps mis en évidence (1) une faible héritabilité de la sensibilité au cadmium au sein de populations naïves ; et (2) un rôle majeur des effets parentaux induits par l'exposition comme mécanisme populationnel soutenant l'évolution de la tolérance chez cette espèce. Enfin, la caractérisation de la variabilité de la sensibilité au cadmium au sein du genre *Gammarus* (dix-sept populations) et la mise en regard de la divergence de la population tolérante vis-à-vis de cette variabilité, ont permis de discuter des implications de ces processus évolutifs induits par des expositions environnementales pour l'évaluation du risque lié aux substances chimiques. Ainsi, il apparaît nécessaire de prendre en compte les réponses adaptatives induites par la contamination des milieux comme source de variabilité et d'incertitude afin de proposer une évaluation du risque pertinente intégrant pleinement l'ensemble des impacts des contaminations environnementales sur les populations naturelles.

**Mots-clés :** Adaptation, Cadmium, Ecotoxicologie évolutive, Effets parentaux, *Gammarus fossarum*, Génétique quantitative, Populations naturelles, Tolérance, Traits d'histoire de vie.

## Abstract

Because they lead to changes in toxicological sensitivities and life history traits within field populations, evolutionary processes supporting adaptation to contamination challenge the relevance of environmental risk assessment of chemical contaminants. Hence their study becomes an important developing field of research in ecotoxicology. Focusing on the study of adaptive capacity of the freshwater amphipod *Gammarus fossarum*, this work aimed to gain insight into the effects of long term exposure to cadmium at the population scale in the field. By means of biomonitoring methodologies (caging), population demographic sampling, culture and exposure in the laboratory we identified a phenomenon of increased tolerance and modification of life history traits in a natural population historically exposed to cadmium. Quantitative genetics experiments conducted on three populations secondly demonstrated (1) a low heritability of sensitivity to cadmium in naïve populations ; and (2) a major role of parental effects induced by exposure as populational mechanism supporting the development of tolerance in this species. Finally, the characterization of the variability of cadmium sensitivity in the genus *Gammarus* (seventeen populations), and the analysis of the divergence of the tolerant population in comparison to this variability led us to discuss about the implications of these evolutionary processes induced by environmental exposure for risk assessment of chemicals. Thus, from these results it appears necessary to take into account adaptive responses induced by environmental contamination as a source of variability and uncertainty in order to provide a relevant risk assessment fully integrating all the impacts of environmental contamination on natural populations.

**keywords :** Adaptation, Cadmium, Evolutionary ecotoxicology, *Gammarus fossarum*, Life history traits, Natural populations, Parental effects, Quantitative genetics, Tolerance.