



UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ECOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE (547)

UMR-I 02 SEBIO

Unité Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : Ecotoxicologie

Présentée par

Laëtitia CHARRON

Le 4 juillet 2014

**Biomarqueurs énergétiques chez un amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum* :
Développement, lien avec le succès reproducteur et application *in situ***

JURY

Président du Jury

Jean LAROCHE - Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale

Rapporteurs

Magalie BAUDRIMONT - Professeur à l'Université de Bordeaux 1

Clothilde HEUDE - Maître de conférences - HDR à l'Université de Caen Basse-Normandie

Examineurs

Olivier GEFFARD - Chargé de Recherche à l'IRSTEA, Villeurbanne

Odile DEDOURGE-GEFFARD - Maître de conférences à l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Directeur de thèse

Alain GEFFARD - Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardenne

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais par ces quelques mots, remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail et à mon épanouissement personnel.

Je voudrais remercier en premier lieu mon directeur de thèse, Alain Geffard, directeur de l'Unité Mixte de Recherche Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques (SEBIO). Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements pour son encadrement, ses conseils, sa disponibilité, sa bonne humeur et son soutien durant ces années de travail.

Je remercie avec le même enthousiasme Odile Dedourge-Geffard et Olivier Geffard mes encadrants scientifiques. Merci pour le temps que vous m'avez accordé pour m'initier à vos spécialités respectives, les enzymes digestives et la biologie du gammare. J'ai eu la chance de profiter de vos connaissances, de vos idées et de votre expérience. Votre implication a été essentielle au cours de ce travail, merci pour tout.

Je souhaiterais ensuite remercier Magalie Baudrimont de l'Université de Bordeaux et Clothilde Heude de l'Université de Caen Basse-Normandie pour l'honneur qu'elles m'ont fait d'avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteurs. Je remercie également Jean Laroche de l'Université de Bretagne occidentale d'avoir accepté d'examiner ce travail et de participer à mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier Michel Mathieu de l'Université de Caen Basse-Normandie, Joëlle Forget-Leray de l'Université du Havre, Arnaud Chaumot de l'IRSTEA (Villeurbanne) pour leurs participations à mes comités de pilotage. Leurs conseils et leurs remarques ont structuré l'avancée de mes travaux.

Je souhaite particulièrement adresser mes remerciements aux membres du laboratoire d'écotoxicologie de l'IRSTEA (Villeurbanne). Durant ces

quelques semaines passées à Lyon, j'ai été considérée comme un membre à part entière du labo, et cet accueil m'a beaucoup touché. J'adresse un grand merci à Romain Coulaud et à Hervé Quéau pour avoir su gérer de main de maître, la partie expérimentale de mes manip. Un grand merci également à Khédidja Abbaci pour son travail et ses conseils avisés en histologie. Merci à Adeline François pour cet après-midi de terrain où j'ai pu m'essayer à la pêche aux gammars. Enfin mes remerciements vont aux thésardes Amandine Vigneron, Delphine Bertin et Judith Trapp pour leur gentillesse, leur bonne humeur et leur hospitalité.

Je souhaite également remercier le laboratoire de « Biologie des Mollusques Marins et des Ecosystèmes associés » de l'université de Caen Basse-Normandie, de m'avoir accueillie durant une semaine. Je remercie particulièrement Clothilde Heude et Kristell Kellner pour le temps qu'elles m'ont accordé pour me former à la technique immuno-histologique du PCNA.

Mes remerciements chaleureux vont évidemment aux membres du laboratoire SEBIO de Reims. Je remercie en premier lieu Sylvie Biagiatti, de m'avoir fait partager son expérience de l'enseignement. J'adresse aussi tous mes remerciements aux enseignants-chercheurs : Fabrice Arnoult, Séverine Paris-Palacios, Stéphane Betoulle, Marc Bonnard et Emilie Lance pour leurs conseils et leur aide en enseignement. Un grand merci à Aurélie Bigot, Elise David et Aurélie Vettier pour leur soutien et les moments de détente partagés ensemble. Je remercie également le personnel technique Laurence Delahaut, Véronique Gaillet, Isabelle Bonnard et Alain Beaudon pour leur aide technique et leur agréable compagnie durant toutes ces heures passées à la paillasse. Je souhaite également remercier Aurélien Bénard (vacataire) pour sa participation aux dosages biochimiques et Christophe Tierrez (stagiaire) pour son travail en histologie et immuno-histologie.

J'ai enfin une pensée amicale envers tous mes collègues doctorants et/ou post-doctorants qui m'ont accompagné durant ces années de thèse

Frédéric Palais, Mohamad Al-Mohamad, Sabrina Jolly, Virginie Maes, Mélissa Palos-Ladeiro, Lauris Evariste, Neil Wang, Elodie Kérambrun, Alban Franco, Thomas Latire, Marie-Amélie Forin-Wiart, Damien Rioult et Gabrielle Magniez. Les petits instants passés autour d'un café, d'un verre ou d'un repas ont été pour moi des moments précieux d'évasions, merci.

Je souhaite aussi adresser mes remerciements à mes amis Gaëlle Mestachvili, Marion Chasserat, Sophie-Emilie Noble, Matthieu Pichard et Bastien Castagneyrol que je ne vois pas assez mais à qui je pense souvent.

Mille mercis à mes parents et à ma sœur. A mon père pour ses conseils, et son indéfectible soutien. Merci mamie pour les provisions de gâteaux, confitures, chocolats et pour ces années passées ensemble avec papi.

Enfin, je voudrais dire merci à mon binôme Ali, qui m'accompagne depuis le début de mon aventure doctorale. Je salue ses efforts pour m'avoir soutenue, supportée et aidée au-delà du raisonnable. J'admire sa capacité de travail, son perfectionnisme et ses qualités humaines. Je ne peux que lui exprimer toute ma reconnaissance. Ce travail est aussi le tien, Ali.

SOMMAIRE

LISTE DES TRAVAUX.....	I
LISTE DES FIGURES.....	III
LISTE DES TABLEAUX	VII
AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION GENERALE.....	5
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
1. Métabolisme énergétique	11
1.1. Métabolisme énergétique et « the missing biomarker link »	11
1.2. Les biomarqueurs en relation avec le métabolisme énergétique.....	13
1.2.1. La charge énergétique en adénylates (CEA).....	13
1.2.2. Les réserves énergétiques	18
1.2.3. L'allocation énergétique cellulaire (AEC).....	22
1.2.4 Allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (AECR).....	26
1.3. Les enzymes digestives.....	29
1.3.1. Les enzymes digestives chez les invertébrés.....	30
1.3.2. Les activités enzymatiques digestives chez les amphipodes.....	31
1.3.3. Les perturbations des enzymes digestives par les contaminants.....	32
2. Influence des facteurs environnementaux et intrinsèques à l'organisme sur les marqueurs du métabolisme énergétique.....	38
2.1. La charge énergétique en adénylate	38
2.2. Les réserves énergétiques.....	40
2.3. L'allocation énergétique cellulaire.....	42
2.4. L'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction	43
2.5. Les enzymes digestives.....	46
2.5.1. Influence des facteurs abiotiques.....	46
2.5.2. Influence des facteurs biotiques.....	47
3. Le modèle biologique <i>Gammarus fossarum</i>	52
3.1. Systématique, répartition et écologie.....	52
3.2. Morphologie, clé de détermination	55
3.3. Anatomie et biologie.....	59
3.3.1. Système nerveux et appareil circulatoire	59
3.3.2. Appareil digestif et mécanismes de digestion.....	60
3.3.3. Cycle de mue et de reproduction.....	66

3.4. Espèce sentinelle	70
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	75
1. Prélèvement et maintien des organismes au laboratoire	76
1.1. Prélèvement des organismes	76
1.2. Maintien des organismes.....	77
2. Expérimentations.....	78
2.1. Expérimentations en laboratoire	79
2.1.1 Localisation des activités digestives d'intérêt	79
2.1.2. Influence du genre et du stade de mue.....	80
2.1.3. Influence de la température et de la conductivité.....	80
2.1.4. Influence d'un stress alimentaire.....	82
2.2. Expérimentations <i>in situ</i>	84
2.2.1. Méthodologie d'encagement.....	84
2.2.2. Mesures physico-chimiques.....	85
3. Méthodologies utilisées pour la mesure des biomarqueurs	86
3.1. Mesure des marqueurs individuels.....	86
3.1.1. Détermination des stades de mue des femelles	86
3.1.2. Estimation de la fertilité	86
3.1.3. Estimation de la fécondité	86
3.2. Mesure des marqueurs sub-individuels	87
3.2.1. Dosage des activités enzymatiques digestives	87
3.2.2. Dosage des réserves énergétiques.....	90
4. Traitement statistique des données.....	92
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION DES TRAVAUX	93
PARTIE 1 : CARACTERISATION ECO-PHYSIOLOGIQUE DES REPONSES DU METABOLISME ENERGETIQUE ET LIEN AVEC LA REPRODUCTION.....	93
1. Localisation des enzymes digestives (amylase, cellulase et trypsine) chez <i>Gammarus fossarum</i>	94
2. Influence des facteurs environnementaux (conductivité et température de l'eau) sur l'activité digestive et les réserves énergétiques de <i>Gammarus fossarum</i>	95
2.1. Réponses des activités enzymatiques digestives de <i>Gammarus fossarum</i>	96
2.2. Réponses des réserves énergétiques de <i>Gammarus fossarum</i>	99
3. Influence du sexe, du stade reproducteur et d'une privation alimentaire sur les activités digestives et les réserves énergétiques du gammare.....	104
Article n°1	105

4. Etude d'un lien entre le métabolisme énergétique et le succès reproducteur chez <i>Gammarus fossarum</i>	126
Article n°2	127
PARTIE 2 : REPONSE DES BIOMARQUEURS EN MILIEU NATUREL	149
1. Variations spatio-temporelles des activités enzymatiques digestives de <i>Gammarus fossarum</i> transplantés sur un bassin contaminé	150
Article n°3	151
2. Réponses des activités enzymatiques digestives chez <i>Gammarus fossarum</i> à la qualité du milieu	176
Article n°4.....	177
3. Réponses de l'énergie disponible chez <i>Gammarus fossarum</i> à la qualité du milieu	204
CHAPITRE IV : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	207
1. Réponses énergétiques étudiées : variabilité naturelle et validation du protocole d'encagement	208
1.1. Mieux connaître la variabilité naturelle des réponses suivies	208
1.2. Limiter la variabilité naturelle induite par des facteurs biotiques durant l'encagement	210
1.3. Proposer un niveau de référence et un niveau seuil au delà duquel la variation peut être attribuée à un stress de nature chimique	211
2. Les enzymes digestives par rapport aux réserves et aux taux d'alimentation .	217
2.1. Réserves énergétiques versus activités digestives.....	217
2.2. Taux d'alimentation versus activités digestives.....	218
3. Pertinence écologique des activités enzymatiques digestives : lien entre inhibition des activités et effet sur la reproduction	219
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	221

PUBLICATIONS

- (1) **L. Charron**, O. Geffard, A. Chaumot, R. Coulaud, H. Quéau, A. Geffard, O. Dedourge-Geffard (2013) Effect of water quality and confounding factors on digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum*. Environmental Science and Pollution Research 20 (12): 9044-9056.
- (2) O. Dedourge-Geffard, **L. Charron**, C. Hofbauer, V. Gaillet, F. Palais, E. Lacaze, A. Geffard, O. Geffard (2013) Temporal patterns of digestive enzyme activities and feeding rate from gammarids (*Gammarus fossarum*) exposed to inland polluted waters. Ecotoxicology and environmental Safety 97: 139-146.
- (3) **L. Charron**, O. Geffard, A. Chaumot, R. Coulaud, A. Jaffal, V. Gaillet, O. Dedourge-Geffard, A. Geffard (2014) Influence of moulting and starvation on digestive enzyme activities and energy storage of *Gammarus fossarum*. PlosOne DOI: 10.1371/journal.pone.0096393
- (4) **L. Charron**, O. Geffard, A. Chaumot, R. Coulaud, A. Jaffal, V. Gaillet, O. Dedourge-Geffard, A. Geffard (2014) Relationships between the disruption of digestive enzyme activities, energy reserves and reproductive outcomes in *Gammarus fossarum*. (En préparation)
- (5) M. Fouqueray, O. Dedourge-Geffard, N. Bossa, Nathan, P. Noury, L. Dherret, **L. Charron**, O. Geffard, J. Rose, J. Garric. Ecotoxicological effect of CeO₂ nanoparticle dietary exposure to *Gammarus fossarum*. (En préparation)

COMMUNICATIONS ORALES

- (1) A. Feurtet-Mazel, **L. Charron**, S. Mornet, M. Baudrimont, N. Mesmer-Dudons, S. Renanut (2008) Interactions entre les diatomées périphytiques du biofilm et les nanoparticules d'or : approche expérimentale de laboratoire en micro-canaux. GdR Or-Nano, Réunion plénière, 1-3 Décembre, Bordeaux (France).
- (2) **L. Charron**, O. Geffard, A. Chaumot, H. Quéau, A. Geffard, O. Dedourge-Geffard (2011) Métabolisme énergétique de *Gammarus fossarum* : Influence de paramètres biotiques (sexe et cycle de reproduction) et de la qualité du milieu. Congrès de la Société Zoologique de France, 13-16 Septembre, Nice (France).
- (3) **L. Charron**, O. Geffard, A. Chaumot, R. Coulaud, A. Geffard, O. Dedourge-Geffard (2013) Effects of food starvation on digestive activities, energy and reproduction outcomes in *Gammarus fossarum*. SETAC Europe 23RD Annual meeting, 12-16 May, Glasgow (United Kingdom).
- (4) A. Geffard, C. Amiard-Triquet, **L. Charron**, A. Chaumot, O. Dedourge-Geffard, O. Geffard, C. Mouneyrac (2013) Étude de biomarqueurs chez les invertébrés aquatiques. 23e colloque de l'ARET, 20-21 Juin, Paris (France).

- (5) **L. Charron**, A. Chaumot, O. Dedourge-Geffard, A. François, L. Fechner, O. Geffard, J. Lebrun, D. Pont, E. Tales, A. Geffard (2013) Utilisation des enzymes digestives comme biomarqueurs chez le gammare. 2^{ème} colloque des Zone Ateliers, 12-13 Décembre, Paris (France).
- (6) A. Geffard, **L. Charron**, A. Chaumot, O. Dedourge-Geffard, A. François, L. Fechner, A. Jaffal, J. Lebrun, D. Pont, H. Quéau, E. Tales, O. Geffard (2014) Utilisation des enzymes digestives comme biomarqueurs chez le gammare. Colloque annuel du Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine (PIREN Seine). 5-7 Février, Paris (France).
- (7) O. Geffard, A. Assoumani, G. Charmantier, **L. Charron**, M. Coquery, A. Dabrin, O. Dedourge-Geffard, A. Geffard, J. Issartel, A. Jaffal, A. Larrose, J. Lignot, C. Margoum, C. miege, R. Recoura-massaquant, A. Vigneron, A. Chaumot (2014) The GAMMA project : Variability, diversity and Ecotoxicology in Gammarids. 8TH International crustacean congress (ICC-8), 18-23 August, Frankfurt (Germany). (Soumise).

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

- (1) **L. Charron**, O. Geffard, A. Chaumot, H. Quéau, A. Geffard, O. Dedourge-Geffard (2011) La capacité digestive de gammares transplantés : Indicatrice d'un stress chimique dans les études *in situ* ? EcoBIM, 6-9 Juin, Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, Québec (Canada).
- (2) **L. Charron**, O. Geffard, A. Chaumot, H. Quéau, A. Geffard, O. Dedourge-Geffard (2011) La capacité digestive de gammares transplantés : Indicatrice d'un stress chimique dans les études *in situ* ? Congrès SEFA, 22 Juin, Paris (France).
- (3) M. Baudrimont, A. Feurtet-Mazel, S. Mornet, N. Mesmer-Dudons, P. Gonzalez, S. Renault, **L. Charron**, D. Gateuille, C. Dracos, O. Dedourge-Geffard, A. Geffard, O. Geffard, J. Garric, R. Maury-Brachet (2012) Toxicité et transfert trophique de nanoparticules d'or fonctionnalisées (AUNP) entre différents maillons biologiques d'eau douce. Colloque national du réseau ANTIOPEs, 19-20 Mars, Avignon (France).
- (4) **L. Charron**, O. Geffard, A. Chaumot, H. Quéau, V. Gaillet, A. Geffard, O. Dedourge-Geffard (2012) Etude de l'influence de facteurs confondants sur les activités digestives et les réserves énergétiques de *Gammarus fossarum*. EcoBIM, 5-8 Juin, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims (France).
- (5) **L. Charron**, O. Geffard, A. Chaumot, H. Quéau, V. Gaillet, A. Geffard, O. Dedourge-Geffard (2012) Etude de l'influence de facteurs confondants sur les activités digestives et les réserves énergétiques de *Gammarus fossarum*. Congrès SEFA, 4-5 Juillet, Lyon (France).
- (6) A. Feurtet-Mazel, S. Mornet, **L. Charron**, N. Mesmer-Dudons, R. Maury-Brachet and M. Baudrimont (2013) Biosynthesis of gold nanoparticles by living freshwater diatom *Eolimna minima* : potential nanofactories or contamination of aquatic ecosystems ? SETAC North America 34TH Annual Meeting, 17-21 November, Nashville (TN, USA).

LISTE DES FIGURES

AVANT-PROPOS

- Figure 1:** Partenaires impliqués dans le projet GAMMA.....2
- Figure 2:** Schéma résumant les différentes tâches du projet GAMMA.....3

INTRODUCTION GENERALE

- Figure 3 :** Chronologie des principales sources de pollution des eaux continentales dans les pays industrialisés.....5

CHAPITRE I

- Figure I-1 :** Représentation du flux d'énergie au sein d'un organisme.....12
- Figure I-2 :** Biomarqueurs en lien avec le métabolisme énergétique selon le niveau d'organisation biologique.....37
- Figure I-3 :** Aire de répartition géographique de *Gammarus fossarum*53
- Figure I-4 :** Vue latérale d'un Gammaridae55
- Figure I-5 :** Schéma d'une coupe transversale au niveau du mésosoma d'une femelle de Gammaridae56
- Figure I-6 :** Uropode 3 de *G. fossarum* (A) et *G. pulex* (B)57
- Figure I-7 :** Clef de détermination de *Gammarus fossarum*.....58
- Figure I-8 :** Coupe longitudinale de gammare illustrant les principaux organes.....59
- Figure I-9 :** Coupe transversale du mésosoma de *Gammarus fossarum* (photographie personnelle). (i) intestin (c) caecum.....61
- Figure I-10 :** Représentation schématique d'un caecum indiquant les fonctions des cellules épithéliales chez le genre *Gammarus*64
- Figure I-11 :** Système reproducteur d'un Gammaridae mâle (a) et femelle (b).....66
- Figure I-12 :** *Gammarus fossarum* mâle et femelle en précopulat67
- Figure I-13 :** Caractérisation du cycle de mue chez la femelle *Gammarus fossarum*.....68

Figure I-14 : Stades embryonnaires corrélés au stade de mue de la femelle <i>Gammarus fossarum</i>	69
Figure I-15 : Représentation du cycle de reproduction de <i>Gammarus fossarum</i>	69

CHAPITRE II

Figure II-1 : Situation géographique du site de prélèvement « La Tour du Pin » situé sur la rivière « La Bourbre ».....	76
Figure II-2 : Prélèvement (a) et tamisage (b) des organismes.....	77
Figure II-3 : Dispositif de stabulation des organismes au laboratoire	78
Figure II-4 : Dissection de <i>Gammarus fossarum</i> pour réaliser le prélèvement des caeca.....	79
Figure II-5 : Dispositif expérimental utilisé dans le cadre des études <i>in vivo</i>	81
Figure II-6 : Représentation schématique de l'échantillonnage des organismes au cours du temps en fonction des cycles de mue de <i>Gammarus fossarum</i>	83
Figure II-7 : Dispositif d'encagement <i>in situ</i> pour les organismes.....	84
Figure II-8 : Caisse contenant les dispositifs d'encagement.....	85
Figure II-9 : Méthodologie de la préparation des échantillons pour l'étude des activités enzymatiques digestives.....	87
Figure II-10 : Equation de la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique en acide 3-amino-5-nitrosalicylique..... ²	88
Figure II-11 : Réaction du substrat (BAPNA) avec l'enzyme (trypsine).....	90

CHAPITRE III

Figure III-1 : Activité enzymatique digestive de l'amylase (A), de la cellulase (B) et de la trypsine (C) mesurée chez <i>Gammarus fossarum</i> dans l'organisme entier, dans les caeca ou dans le reste de l'organisme (sans caeca).....	94
Figure III-2 : Activité de l'amylase (A) mesurée chez les gammarus mâles exposés à trois températures (7, 12 et 16°C), n=9. Activité de la cellulase (B) mesurée chez les gammarus mâles exposés à trois températures (7, 12 et 16°C) et trois conductivités (200, 500 et 800µS/cm), n=3.	97

Figure III-3 : Activités amylase (A) et cellulase (B) mesurées chez les gammares femelles aux trois stades de reproduction (B, C et D) à trois températures (7, 12 et 16°C), n=9.....	98
Figure III-4 : Energie disponible mesurée chez les gammares mâles exposés à trois conductivités (200, 500 et 800µS/cm), n=3.....	100
Figure III-5 : Energie disponible mesurée chez les gammares femelles aux trois stades de reproduction (B, C et D) à trois conductivités (200, 500 et 800µS/cm), n=9.....	100
Figure III-6 : Energie disponible (exprimée en mJ/mg de poids frais) mesurée chez les gammares exposés sur chaque site étudié.....	205

Article n°1 :

Figure 1 : Digestive enzyme activities during each stage of the reproductive cycle in females and males.	114
Figure 2 : Energy reserve levels during each stage of the reproductive cycle in females and males	115
Figure 3 : Digestive enzymes activities in <i>Gammarus fossarum</i> females (♀) and males (♂) exposed to three levels of diet stress (control, fed 7 days per week; fed 2 days per week; and fed 1 day per week) after 11 and 23 days.....	118
Figure 4 : Available energy (mJ/mg wet weight) in <i>Gammarus fossarum</i> females and males exposed to 3 levels of diet stress (control: fed 7 days per week; fed 2 days per week and fed 1 day per week) after 11 and 23 days.....	120

Article n°2 :

Figure 1 : Female reproductive cycle stages (AB, C1, C2, D1 and D2, according to Geffard et al., 2010) and sampling periods for biological response measurements in males and females during the food starvation experiment.....	132
Figure 2 : Amylase (A) and trypsin (B) activity levels in <i>Gammarus fossarum</i> exposed to 3 levels of food starvation (control: fed 7 days a week; 2/7: fed 2 days a week; 1/7: fed 1 day a week) after 11 and 43 days	137
Figure 3 : Available energy (mJ/mg wet weight) in <i>Gammarus fossarum</i> exposed to 3 levels of food starvation (controls: fed 7 days a week; 2/7: fed 2 days a week; 1/7: fed 1 day a week) after 11 and 43 days	138
Figure 4 : Mean oocyte (A) and embryo (B) numbers in <i>Gammarus fossarum</i> females exposed to 3 levels of diet starvation (control: fed 7 days a week; 2/7: fed 2 days a week; 1/7: fed 1 day a week) after 23 and 43 days, respectively.....	140

Article n°3 :

- Figure 1 :** Localization of study area and sampling stations.....157
- Figure 2 :** Spatio-temporal variations of feeding rate of *Gammarus fossarum* caged 7 days.....162
- Figure 3 :** Spatio-temporal variations of digestive enzyme activities (amylase (A), cellulase (B) and trypsin (C)) of *Gammarus fossarum* caged 7 days.....164

Article n°4

- Figure 1 :** Location of study sites in the Rhône-Alpes region (France).....182
- Figure 2 :** Digestive enzyme activities of amylase (A), cellulase (B) and trypsin (C) for all sites studied.....189
- Figure 3 :** Amylase activity measured in male gammarids exposed to three temperatures (7, 12 and 16°C).....192
- Figure 4 :** Cellulase activity measured in male gammarids exposed to three temperatures (7, 12 and 16°C) and conductivity (200, 500 and 800 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$).....193

CHAPITRE IV

- Figure IV-1 :** Activité enzymatique digestive amylase (A), cellulase (B) et trypsine (C) des gammares encagés sur des sites référence du bassin du Rhône (R1 à R5) et du bassin du Lot (Up Lot 2009 et 2010).....216
- Figure IV-2 :** Utilisation des enzymes digestives dans l'évaluation du risque environnemental.....220

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau I-1 : Relation entre conditions environnementales, traits de l'organisme et CEA.....	14
Tableau I-2 : Exemples d'études de la réponse de la CEA à la contamination chez les animaux aquatiques.....	16
Tableau I-3 : Exemples d'études de la réponse des réserves énergétiques à l'exposition à des contaminants	19
Tableau I-4 : Etudes de la réponse de l'allocation énergétique cellulaire (AEC) à l'exposition à des contaminants, les mesures sont réalisées sur des organismes entiers.....	24
Tableau I-5 : Exemples d'études des réponses de l'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (AEER) à l'exposition à des contaminants <i>in situ</i> ou en laboratoire.....	28
Tableau I-6 : Principaux composés alimentaires et enzymes digestives endogènes.....	29
Tableau I-7 : Etude de l'influence de diverses contaminations sur l'activité des enzymes digestives de crustacés.....	35
Tableau I-8 : Systématique de l'espèce modèle <i>Gammarus fossarum</i>	52
Tableau I-9 : Interprétation des fonctions des caeca hépatopancréatiques chez les amphipodes à partir d'études ultrastructurales.....	65
Tableau I-10 : Utilisation du genre <i>Gammarus</i> appliquée à l'étude de l'énergie et de son allocation à différents niveaux d'organisation biologique.....	72

CHAPITRE III

Article n°2

Table 1 : Occurrence (%) of different molt stages (AB, C1, C2, D1 and D2) in <i>Gammarus fossarum</i> females and survival rates (%) in males and females exposed to 3 levels of food starvation (control: fed 7 days a week; 2/7: fed 2 days a week; 1/7: fed 1 day a week) after 11, 23 and 43 days.....	139
Table 2 : Spearman correlation coefficient (r) between food starvation, digestive enzyme activity (amylase and trypsin) and available energy (Ea) after 11 days, and with oocyte and embryo numbers after 23 and 43 days in female <i>G. fossarum</i>	141

Article n°3

Table 1 : Summary of Cd and Zn bioaccumulation in gammarids at the five studied sites from Lacaze et al. (2011).....**158**

Table 2 : Summary of physico-chemical characteristics at the five studied sites**158**

Article n°4

Table 1 : Detailed informations on the 23 stations studied in the Rhône-Alpes region during June 2010 and mortality measured after 15 days of deployment.....**184**

Table 2 : Values of the inhibition rate of digestive enzyme activities (IDEA, see calculation in the text) in organisms exposed to the 18 impacted sites (S1–S18).....**190**

CHAPITRE IV

Tableau IV-1 : Récapitulatif des réponses des marqueurs étudiés chez *G. fossarum* soumis à l'influence de divers facteurs de confusion.....**208**

Tableau IV-2 : Réponses enzymatiques digestives mesurées chez les gammares mâles nourris *ad libitum* avec uniquement des feuilles d'aulnes (*Alnus glutinosa*) au laboratoire et sur le terrain, à l'issue de 15 jours d'exposition.....**211**

Avant-Propos

Ce travail de thèse a été principalement effectué au sein de l'Unité Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques, UMR-I 02 SEBIO sous la direction du Professeur Alain Geffard. Une collaboration étroite a été établie avec le laboratoire d'écotoxicologie de l'unité de recherche Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions (MAEP) de l'Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture à Villeurbanne (IRSTEA, Villeurbanne) sous la direction de Pascal Boistard. La responsabilité scientifique et l'encadrement de cette thèse ont été réalisés par le docteur Odile Dedourge-Geffard et le professeur Alain Geffard de l' UMR-I 02 SEBIO et par le docteur Olivier Geffard du laboratoire d'écotoxicologie de l'IRSTEA (Villeurbanne).

Cette thèse a été financée par une bourse ministérielle durant trois ans (2010-2013). En 2012 et 2013, ayant obtenu un contrat doctoral élargi à des missions d'enseignement, j'ai réalisé chaque année 64 heures d'enseignement (équivalent TD) au sein du département de Biologie-Biochimie de l'UFR Sciences Exactes et Naturelles de l'Université Reims Champagne-Ardenne. Depuis septembre 2013, j'exerce la fonction d'attachée temporaire d'enseignement et de recherche à temps complet dans la même université.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet GAMMA (2012-2015) « Variabilité-adaptation-diversité et Ecotoxicologie des Gammaridés » financé par l'Agence National de la Recherche au sein de la thématique « Contaminants et Environnement : Métrologie, Santé, Adaptabilité, Comportement et Usage » piloté par le docteur Olivier Geffard (UR MAEP, IRSTEA). L'objectif de ce projet vise à améliorer la pertinence écologique des méthodes de surveillance active dans l'évaluation de la qualité des milieux. Ainsi, la caractérisation de la variabilité des marqueurs de toxicité entre populations et espèces, doit permettre de réduire l'incertitude liée à l'utilisation de *Gammarus fossarum* comme espèce modèle pour évaluer les risques de la contamination environnementale à large échelle.

Le travail proposé doit i) établir une valeur seuil pour chaque marqueur étudié, ii) améliorer les méthodes d'encagement pour minimiser la divergence de réponse entre les organismes transplantés et autochtones, iii) proposer des modèles pour traduire les effets individuels (survie, croissance, et reproduction) en terme d'impact sur la dynamique de population, et enfin iv) proposer l'utilisation de méthodes moléculaires, cellulaires et histologiques pour étudier la mise en place de mécanismes d'adaptation et de résistance aux métaux chez *G. fossarum*.

Un consortium de quatre partenaires est impliqué dans le projet GAMMA (**Figure 1**).



Figure1 : Partenaires impliqués dans le projet GAMMA. Partenaire1 : Unité de Recherche Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions (MAEP), IRSTEA (Villeurbane). Partenaire 2 : Unité Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques, UMR I-02 SEBIO, Université de Reims. Partenaire 3 : Equipe Biomarqueurs et Bioindicateurs environnementaux (BBE), CNRS-UMR 7263 Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE), Université de Provence. Partenaire 4 : Equipe Adaptation, Ecophysiologique et Ontogénèse (AEO), UMR 5119 Ecologie des systèmes marins côtiers (ECOSYM), Université de Montpellier 2

Le projet GAMMA est structuré en 4 tâches (**Figure 2**). La première s'intéresse à la variabilité du niveau de base et de la sensibilité aux polluants de marqueurs de toxicité chez *Gammarus sp.*, ceci aussi bien en lien avec l'impact de facteurs environnementaux que du choix de la population et de l'espèce utilisée comme source d'organismes tests. La deuxième tâche vise à améliorer la représentativité des réponses mesurées sur les organismes transplantés par rapport aux organismes du milieu, ceci en adaptant la méthode d'encagement développée. Pour la troisième tâche du projet des approches aprioris et rétrospectives seront appliquées pour i) évaluer la capacité de *G. fossarum* à s'adapter à une contamination métallique et les effets indirects induits (coûts sur la fitness, perte de

diversité) et ii) étudier les mécanismes physiologiques impliqués dans ce phénomène. La quatrième et dernière tâche porte sur l'implication au niveau de la population de la variabilité observée dans les tâches 1 et 3 et des conséquences sur la vulnérabilité de la population.

Mon travail de thèse s'inscrit tout particulièrement dans la tâche 1 (en rouge, **Figure 2**).

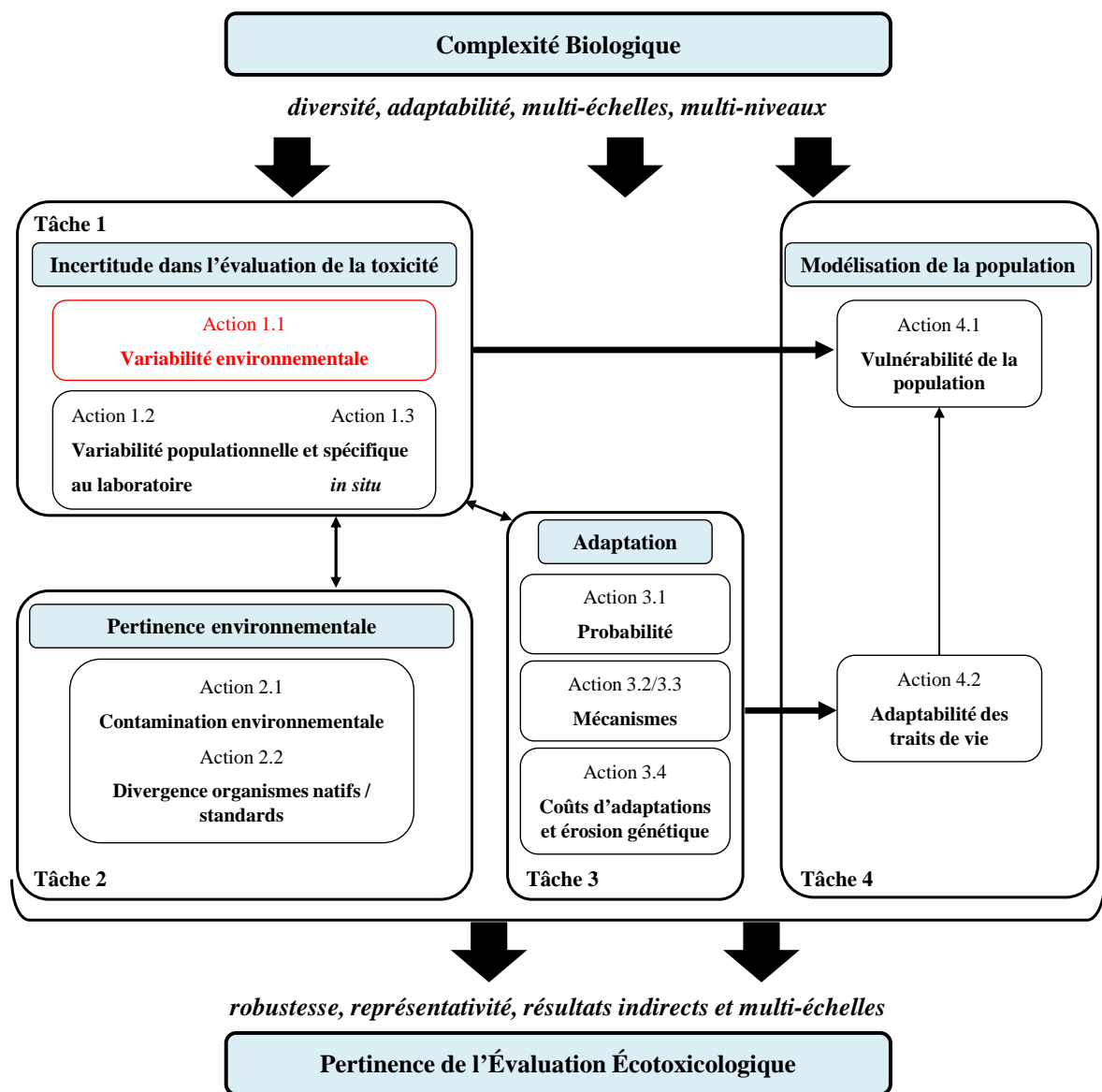


Figure 2 : Schéma résumant les différentes tâches du projet GAMMA. (Traduit et adapté du rapport ANR GAMMA)

Outre l'implication importante de cette thèse dans le projet GAMMA, j'ai également pu participer au projet TRONANO (2010-2013) « Etude du transfert trophique de nanomatériaux et des conséquences sur les organismes d'eau douce », porté par le docteur Jeanne Garric directrice du laboratoire d'écotoxicologie (UR MAEP, IRSTEA) et financé

par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) dans le cadre de l'appel à projet de recherche « environnement-santé-travail ». Dans ce projet, j'ai pu mesurer les effets de contaminations trophiques par différents types de nanoparticules métalliques (TiO₂, CeO₂ et Au) sur les activités enzymatiques digestives (amylase, cellulase et trypsine) chez *Gammarus fossarum*.

Par ailleurs, j'ai également pu participer au Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'environnement de la Seine (PIREN-Seine) (2011-2015), l'objectif global de ce groupement de recherche est de développer une vision d'ensemble du fonctionnement du système formé par le réseau hydrographique de la Seine, à partir de mesures de terrain et de modélisation. Dans ce cadre, j'ai pu réaliser plusieurs mesures d'activités enzymatiques digestives (amylase, cellulase et trypsine) chez des gammares encagés sur différents sites ateliers suivis dans ce programme.

Dans ce manuscrit, j'ai choisi de me focaliser sur les travaux et résultats s'inscrivant dans la thématique du projet GAMMA.

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Les milieux aquatiques sont depuis toujours le réceptacle des contaminants issus de l'activité anthropique. Au cours des siècles, la diversité de la nature de la contamination des milieux aquatiques n'a cessé de croître et d'évoluer au grès de l'évolution démographique de la population humaine et de ses activités (**Figure 3**).

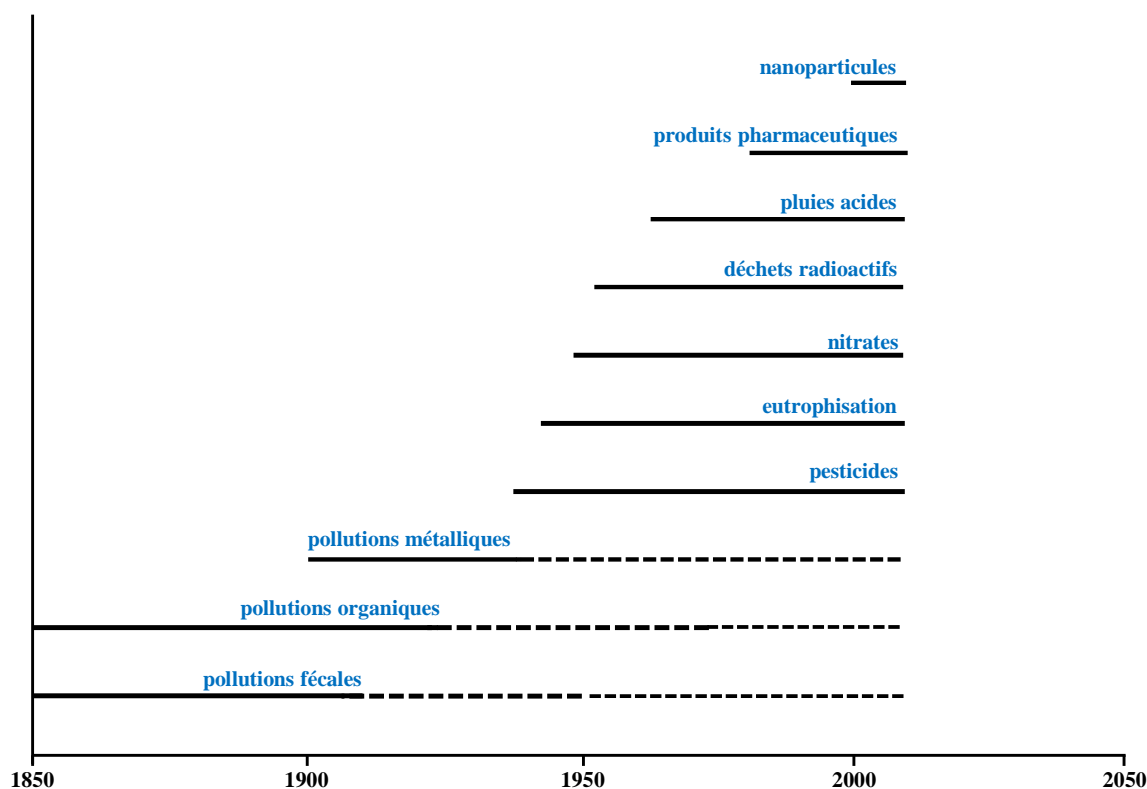


Figure 3 : Chronologie des principales sources de pollution des eaux continentales dans les pays industrialisés, modifiée d'après C. Lévêque (1996), Ecosystèmes aquatiques

La dégradation organique des eaux du XIX^e siècle est suivie de l'apparition des polluants métalliques issue du développement industriel du début du XX^e siècle. L'augmentation de l'urbanisation, de l'industrialisation et l'intensification de l'agriculture a provoqué l'accroissement des rejets ménagers agricoles et industriels. Ainsi au fil du temps et particulièrement depuis les années 1950, les niveaux de pollution chimique des eaux sont préoccupants et de nouveaux types se sont ajoutés ou ont remplacé ceux précédemment évoqués.

Au XX^e siècle la pollution des eaux de surface a été marquée par l'apparition des engrais chimiques, des pesticides, des rejets radioactifs, des polluants organiques (PolyChloroBiphényles (PCB), Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)...). Aujourd'hui, les substances médicamenteuses et les rejets de nanoparticules s'ajoutent à cette liste.

Environ 200 millions de tonnes de substances chimiques sont produites annuellement sur le marché européen (EEA, 2011). Plus de 100 000 molécules chimiques produites ou utilisées par les activités humaines sont retrouvées dans l'environnement (Depledge et Galloway, 2005). Ainsi, rares sont les milieux aquatiques épargnés par la pollution. Cependant face aux dysfonctionnements biologiques causés par la dégradation des écosystèmes, la question environnementale occupe désormais une place prépondérante dans la société. En réponse à cette demande sociétale, la législation et la réglementation se sont mises en place afin de contrôler, réguler et évaluer les risques environnementaux (USEPA, 2004).

En France, depuis la première loi sur l'eau du 16 décembre 1964, les politiques publiques ne cessent d'évoluer en faveur de la préservation des ressources en eau et des milieux aquatiques. Au niveau européen, la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) du 23 octobre 2000 (directive 2000/60) fixe pour objectif d'atteindre « un bon état chimique et écologique des masses d'eau » d'ici 2015. Ces réglementations nécessitent une augmentation des études écotoxicologiques afin de diagnostiquer et/ou prédire une dégradation potentielle de la qualité des milieux aquatiques.

L'écotoxicologie peut se définir comme une discipline qui évalue les effets des perturbations physiques et chimiques sur les êtres vivants, les voies de transfert des contaminants et leurs actions sur l'environnement (Truhaut, 1977). Cette évaluation de la qualité des milieux aquatiques repose à la fois sur une approche physico-chimique et sur une approche biologique.

L'approche physico-chimique consiste à chercher la présence de certaines molécules chimiques dans les différents compartiments de l'écosystème (colonne d'eau, sédiments et biota). Ces analyses permettent de connaître l'état ponctuel de contamination d'un milieu, de déterminer la fraction biodisponible des polluants pour les organismes et d'appréhender le cycle biogéochimique de ces composés. Cependant, bien qu'indispensable cette approche ne peut se suffire à elle-même puisque la présence de contaminants n'implique pas forcément d'effets néfastes sur les êtres vivants et le fonctionnement de l'écosystème.

De plus, les limites de cette approche sont multiples. En effet, les substances retrouvées sont celles qui ont été recherchées. Il est impossible de réaliser un screening intégral d'un échantillon. Il n'existe pas non plus de méthode analytique disponible pour chaque contaminant. Souvent les niveaux de contamination des milieux naturels sont en-dessous des limites de détection des appareils. Ainsi l'approche biologique est un complément essentiel et primordial à l'évaluation de la qualité des milieux.

L'évaluation biologique repose actuellement sur l'utilisation d'indicateurs biologiques, construits sur des critères de présence et d'abondance d'espèces de la faune et de la flore aquatique (poissons, macro-invertébrés, communautés algales...). Ces indices offrent une vision globale de l'état d'un écosystème. Cependant, ils peuvent être très sensibles aux facteurs environnementaux abiotiques et biotiques autre que la contamination telle que l'hydrodynamique du milieu, la présence de micro-habitats ou de relations de compétition ou de prédation au sein des communautés. Ces outils ne donnent aucune indication sur la source de pollution et ne permettent pas non plus de comprendre les processus toxiques. Ces indices présentent un constat de l'état d'un écosystème, en aucun cas ils n'ont un caractère précoce vis-à-vis des impacts que peuvent engendrer une contamination.

Cependant, la bioindication peut faire appel à tous les niveaux d'organisation biologique, de la molécule à la biocénose, chaque niveau ayant son propre caractère intégrateur de la contamination. Ainsi la réponse de chaque niveau d'organisation aux contaminants s'inscrit sur une échelle de temps : de la réaction enzymatique instantanée à la modification irréversible de l'écosystème (Lagadic et al., 1998, Ramade, 2007, Adam, 2011). De ce fait, une association pertinente de mesures biologiques réalisées à différents niveaux d'organisation pourrait fournir une évaluation complète de la qualité des écosystèmes.

Ainsi au niveau sub-individuel, il est possible d'étudier les effets d'une contamination à des doses faibles n'engendrant pas d'effets létaux au niveau individuel, ceci afin de caractériser les réponses impliquées dans les étapes précoces d'intoxication d'un organisme. Ces réponses sont désignées sous le terme de biomarqueur que l'on peut définir comme tous les paramètres biochimiques, moléculaires, cellulaires, histologiques ou physiologiques qui peuvent être observés ou mesurés dans les cellules, tissus, fluides corporels ou dans l'organisme entier pour mettre en évidence l'exposition ou les effets d'un ou plusieurs polluants chimiques (Depledge et Fossi, 1994, Lagadic et al., 1997). Selon De Lafontaine et al. (2000), il existe deux classes de biomarqueurs : les

biomarqueurs de défense dont la mesure traduit une exposition des organismes à au moins un contaminant et les biomarqueurs de dommage qui traduisent une atteinte biologique plus ou moins importante. Les biomarqueurs peuvent être appliqués directement sur les organismes du site d'étude ou dans le cadre d'expérimentation en laboratoire. Ces outils procurent des réponses précoces liées à la présence et aux effets d'une contamination dans un milieu. Enfin, l'étude des biomarqueurs permet d'appréhender les modes d'action des contaminants.

Le développement des indicateurs biologiques apparaît crucial pour l'évaluation précoce des risques écotoxicologiques, pourtant la mise en œuvre de ces outils a été limitée dans les démarches de contrôle de la qualité des milieux aquatiques continentaux. Aujourd'hui encore les biomarqueurs ne sont pas associés à l'application de la DCE.

Bien que certains auteurs proposent d'intégrer les biomarqueurs à l'évaluation du risque environnemental (Hagger et al., 2008), d'autres insistent sur leurs limites (Forbes et al., 2006). Deux verrous scientifiques majeurs sont évoqués dans la littérature, (i) la méconnaissance concernant la variabilité naturelle des réponses étudiées (Van der Oost et al., 2003) et (ii) le manque de pertinence écologique avéré pour un bon nombre de réponses suivies.

En effet, la plupart des réponses biologiques, y compris celles utilisées comme marqueur, sont modulées par les facteurs environnementaux (biotiques et abiotiques) non toxiques. Il est ainsi difficile de disposer de valeur de référence en condition non contaminée. Cependant, pallier cet obstacle est possible en connaissant de manière approfondie la biologie et la sensibilité du modèle biologique choisi, ceci en étudiant l'amplitude des réponses soumises aux différents facteurs environnementaux.

Par ailleurs, un biomarqueur n'a d'intérêt que s'il peut être précoce et prédictif d'un changement à l'échelle de la population (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Il apparaît donc indispensable de vérifier la relation entre les réponses des biomarqueurs et les conséquences à des niveaux d'organisation supérieurs. Le lien entre les différents niveaux d'organisation biologique peut être réalisé en s'intéressant à la fonction de reproduction. En effet, les perturbations au niveau individuel et infra-individuel ayant le plus de chance d'être liées à des effets aux niveaux d'intégration biologiques supérieurs sont celles qui vont affecter directement ou non la « fitness » de l'individu et au-delà le maintien de la population (Amiard-Triquet et al., 2013).

Parmi les éléments déterminant le succès reproducteur des organismes, on peut citer l'allocation énergétique nécessaire au maintien du métabolisme basal, à la croissance et à la reproduction; et de manière indirecte on peut également évoquer l'ensemble des processus biochimiques et physiologiques impliqués dans le métabolisme énergétique. En effet, l'exposition à des stress peut entraîner un déséquilibre de la balance énergétique de l'individu se traduisant par une hausse des dépenses énergétiques pour assurer la survie de l'organisme, au dépend de l'énergie destinée à la croissance et à la reproduction (Calow et Sibly, 1990). Plusieurs paramètres en lien avec le métabolisme énergétique et caractéristiques d'un niveau d'organisation biologique peuvent être étudiés et être mis en relation avec des critères macroscopiques représentatifs du maintien (taux de survie), de la croissance (indices de condition) ou de la reproduction (nombre d'embryons) (Amiard-Triquet et al., 2013).

Dans ce contexte, le travail proposé s'est tourné vers l'étude du métabolisme énergétique ceci afin de proposer un biomarqueur de l'assimilation de l'énergie chez un amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. La stratégie adoptée dans le but d'atteindre cet objectif a abouti à la mise en place de deux axes de travail.

Le **premier axe** basé sur des études réalisées en laboratoire présente deux volets. Le premier volet a été consacré à la caractérisation des activités enzymatiques digestives (amylase, cellulase et trypsine) et des réserves énergétiques (lipides, sucres et protéines) chez *Gammarus fossarum*. Les profils de ces réponses biologiques ont été établis chez le mâle et chez la femelle en fonction de son cycle de reproduction. Puis l'influence de paramètres abiotiques (température et conductivité) et biotiques (privation alimentaire) a été évaluée sur ces réponses. Ceci a pour objectif d'améliorer l'interprétation des réponses lors de leur application sur le terrain. Le second volet a porté sur la pertinence écologique des enzymes digestives en tant que biomarqueur. La démarche adoptée a été de montrer les conséquences d'une perturbation des réponses enzymatiques digestives sur la reproduction (fonction clef liant les réponses sub-individuelles aux niveaux d'organisation supérieurs).

Le **second axe** de l'étude a été dédié à l'application des différents outils développés dans le cadre de différentes campagnes *in situ*. Cette démarche a été empruntée pour (i) valider l'utilisation des enzymes comme biomarqueur et (ii) définir pour chaque marqueur une valeur référence et seuil traduisant un effet.

Ce manuscrit se structure en quatre chapitres. Le **chapitre I** correspond à la synthèse bibliographique qui cherche à apporter des éléments de réponse pertinents vis-à-vis du sujet de thèse. Une première partie s'intéresse à l'utilisation de biomarqueurs en relation avec le métabolisme énergétique et à l'étude des enzymes digestives en tant que réponse sensible à la contamination du milieu. Puis une seconde partie se focalise sur l'influence des facteurs environnementaux sur les réponses évoquées précédemment, en s'attachant plus particulièrement aux enzymes digestives. Enfin, une troisième partie présente le modèle biologique choisi dans notre étude, l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. Le **chapitre II** intitulé matériel et méthodes présente de manière détaillée les dispositifs expérimentaux et les protocoles utilisés pour répondre aux différentes questions abordées. Le **chapitre III** concernant les résultats des travaux se structure sous forme de publications organisées selon les deux axes de travail évoqués précédemment. Dans le **chapitre IV**, une synthèse générale reprend l'ensemble des résultats obtenus afin d'apporter des éléments de réponses aux questions formulées à l'issue de la synthèse bibliographique. Enfin, nous mettrons en perspectives les données acquises pour proposer de nouvelles pistes de recherche quant à l'étude des enzymes digestives chez les invertébrés.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Métabolisme énergétique

1.1. Métabolisme énergétique et « the missing biomarker link »

(De Coen et Janssen, 2003a)

De nombreuses réponses étudiées à de faibles niveaux d'organisation biologique se révèlent précoces et sensibles. Cependant un petit nombre de celles-ci s'avèrent prédictives quant à des effets au niveau biologique supérieur. Un des objectifs actuels est de développer des biomarqueurs dont les perturbations auront les plus fortes chances d'avoir des conséquences en cascade sur les niveaux d'organisation supra-individuels (Amiard-Triquet et al., 2013). Par conséquent, le biomarqueur d'intérêt doit traduire une perturbation de la croissance et/ou de la reproduction, fonctions biologiques déterminantes pour la « fitness » des organismes et l'état de la population (Depledge et Fossi, 1994). Les biomarqueurs en relation avec le métabolisme énergétique peuvent se révéler particulièrement pertinents étant donné le lien étroit existant entre l'énergie et l'état de santé des individus (Depledge et Fossi, 1994, De Coen et Janssen, 2003a, b).

L'acquisition de l'énergie pour les grandes fonctions biologiques (maintenance, croissance et reproduction) dépend de la disponibilité en nourriture, de l'ingestion et de l'assimilation (**Figure I-1**) (De Coen et Janssen, 1998).

Selon Calow (1991), un organisme aquatique exposé à une contamination chimique peut mettre en œuvre divers mécanismes biochimiques, physiologiques et /ou comportementaux afin de réduire son exposition aux contaminants (*e.g* réaction d'échappement ou d'évitement), son absorption (*e.g* sursécrétion de mucus au niveau des surfaces exposées, exclusion des contaminants absorbés) ou la manifestation de leurs effets toxiques (*e.g* neutralisation et/ou excrétion des polluants absorbés, réparation des dommages occasionnés). Ces mécanismes d'ajustement du métabolisme énergétique, responsables du maintien de l'homéostasie chez l'organisme (syndrome d'adaptation général) (Selye, 1976) représentent une dépense énergétique. Ainsi, la capacité à résister à un toxique représente une dépense énergétique qui implique une diminution de l'énergie allouée à la croissance et la reproduction de l'individu qui conduira à réduire la croissance et le maintien de la population (coût métabolique de la tolérance) (Calow et Sibly, 1990).

Plusieurs travaux ont mis en évidence les conséquences de modifications d'allocation énergétique sur la condition des organismes. (e.g. crustacés : De Coen et Janssen (1997b); e.g. bivalves : Smolders et al. (2004); e.g. annélides : Mouneyrac et al. (2010)). Ces changements ont également été évoqués en tant que facteur d'extinction locale des populations (Boldina-Cosqueric et al., 2010, Fossi Tankoua et al., 2010).

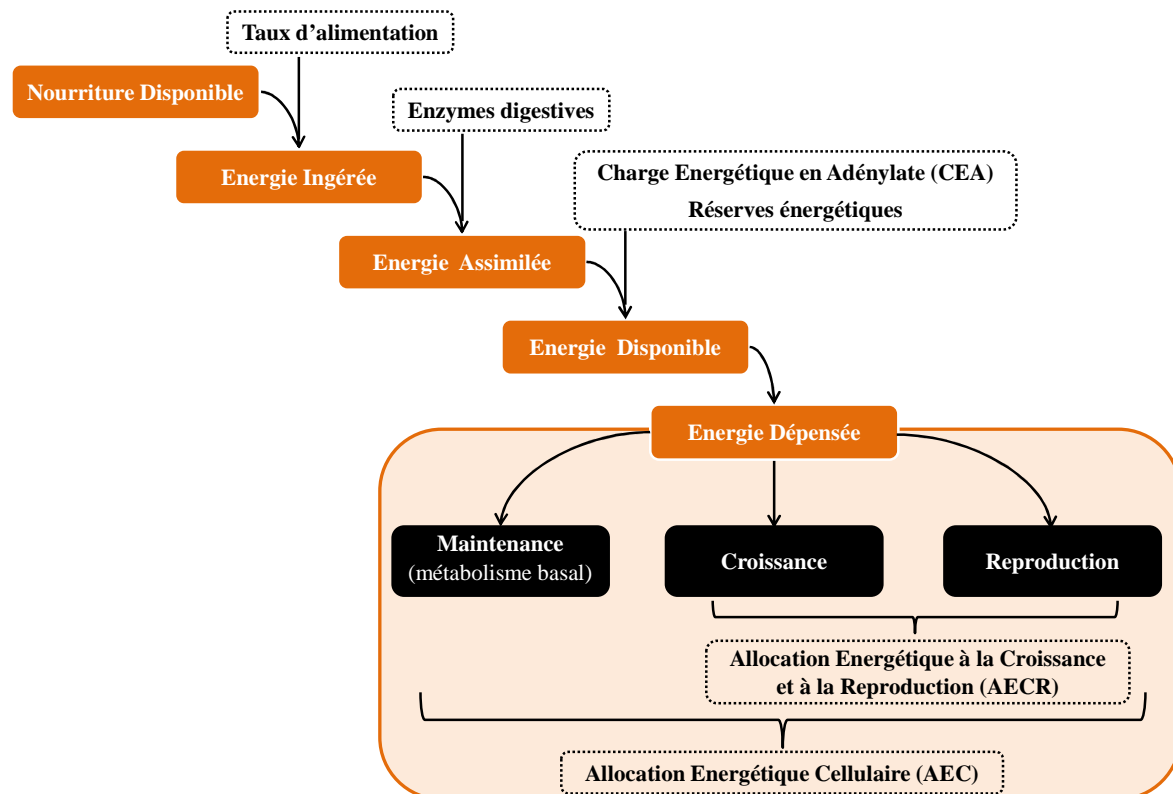


Figure I-1 : Représentation du flux d'énergie au sein d'un organisme. Modifiée d'après De Coen et Janssen (1998)

Le flux d'énergie au sein des organismes peut être évalué à différents niveaux (**Figure I-1**). Ainsi plusieurs paramètres en lien avec le métabolisme énergétique et caractéristiques d'un niveau d'organisation biologique sont disponibles (Durou et al., 2008). La charge énergétique en adénylate (CEA), les réserves énergétiques (glycogène, lipides et protéines), l'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (l'AECR), et l'allocation énergétique cellulaire (AEC) font partie des biomarqueurs énergétiques classiquement étudiés en écotoxicologie (Le Gal et al., 1997, Durou et al., 2008).

Ces marqueurs sont tous dépendants des processus d'acquisition de l'énergie conditionnés en amont par la prise de nourriture et la dégradation de celle-ci. Ainsi, l'énergie brute sous forme d'aliment (glucides, lipides et protéines) va être ingérée puis transformée en énergie assimilable sous forme de nutriments (oses, acides gras et acides aminés). Cette capacité digestive dépend notamment des activités enzymatiques digestives (Dedourge et al., 2008).

Ainsi les réponses des activités enzymatiques digestives pourraient constituer un outil complémentaire aux biomarqueurs énergétiques actuellement utilisés.

1.2. Les biomarqueurs en relation avec le métabolisme énergétique

1.2.1. La charge énergétique en adénylates (CEA)

La charge énergétique en adénylates est classiquement utilisée pour mesurer l'énergie métabolique potentiellement disponible au sein d'un organisme vivant à partir des concentrations d'adénosine tri-phosphate (ATP), d'adénosine diphosphate (ADP) et d'adénosine monophosphate (AMP) (Le Gal et al., 1997). La CEA est calculée selon la formule suivante :

$$CEA = \frac{[ATP] + (1/2) [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

Par définition, la CEA varie entre 0 (si tous les adénylates sont stockés sous forme de molécules d'AMP sans énergie) et 1 (si tous les adénylates sont stockés sous forme de molécules d'ATP riches en énergie).

Dans des conditions optimales, un équilibre peut s'établir entre la dégradation et la régénération de l'ATP, la valeur de la CEA atteint environ 0,8 (Atkinson, 1968). Les valeurs de la CEA ont été étudiées en relation avec la capacité des organismes à survivre, croître et se reproduire (**Tableau I-1**).

Tableau I-1 : Relation entre conditions environnementales, traits de l'organisme et CEA (Ivanovici, 1980b, Moal et al., 1989)

C.E.A.	Conditions environnementales	Organismes caractérisés par :
0,8 - 0,9	non-limitative (pas de stress)	- taux de croissance élevé - reproduction - viabilité
0,5 - 0,75	limitative (stress partiel)	- taux de croissance faible ou absent - pas de reproduction - viabilité maintenue
≈ 0,5	très limitative (stress sévère)	- pas de croissance - pas de reproduction - viabilité perdue même après transfert aux conditions sans stress

Ainsi une baisse de la CEA chez l'organisme correspondrait à une consommation de l'énergie liée au stress. Cependant, lorsque les capacités de l'organisme sont dépassées, les valeurs de CEA sont variables (Skjoldal et Bakke, 1978). Le stress est alors à l'origine de perturbation profonde de la physiologie de l'organisme et des mortalités à l'échelle de la population sont enregistrées (Durou et al., 2008).

Toutes les voies biochimiques des organismes sont dépendantes du pool des adénylates (AMP, ADP, ATP) pour fournir l'énergie; ainsi la CEA est un indicateur de l'état métabolique des cellules (Atkinson, 1977). La CEA apparaît comme étant un indicateur utile du statut physiologique des organismes pluricellulaires, et un indicateur potentiel de stress chez les animaux aquatiques (Ivanovici, 1980b). Cependant la grande variabilité de la CEA rapportée dans la littérature remet en cause la pertinence de ce paramètre biochimique pour l'évaluation de la qualité des milieux.

Des études utilisant la CEA ont été réalisées sur des organismes aquatiques issus de différents groupes taxonomiques (annélides, mollusques, crustacés, poissons) (Tableau I-2). Généralement la réponse du biomarqueur est réduite suite à une exposition à divers contaminants (métalliques, pesticides, PCB, hydrocarbures) (Le Gal et al., 1997). Cependant les résultats rapportés dans la littérature sont toujours conflictuels concernant la CEA (Viarengo et Canesi, 1991). Comme le montrent les travaux cités dans le **tableau I-2**,

les études menées sur la CEA révèlent des effets très variables selon les espèces considérées, les toxiques, les organes ou les tissus qui sont analysés.

Parmi les investigations entreprises chez les crustacés, un grand nombre présente des résultats peu concluants concernant l'utilisation de la CEA en tant que marqueur de l'état de santé des organismes, reflet de la qualité du milieu (Marazza et al., 1996).

Ainsi, dans une étude *in situ*, deux populations de *Crangon crangon* prélevées en milieu pollué présentaient une CEA inférieure à celle mesurée en milieu de référence. Cependant, les auteurs précisent qu'il est possible de mesurer une CEA élevée en cas de stress lié à une contamination. En effet, la charge énergétique peut être maintenue temporairement par l'intervention d'une enzyme spécifique l'AMP désaminase catalysant l'élimination de l'AMP. Ainsi les auteurs conseillent de prendre en compte la concentration intracellulaire en nucléotides adényliques (ATP+ADP+AMP) plutôt que la CEA (Sylvestre et al., 1985).

Chez les vertébrés, l'AMP désaminase est très active et limite considérablement les variations de la CEA. En revanche chez les invertébrés, les faibles capacités catalytiques de l'AMP désaminase entraînent des variations très importantes de la CEA. Ce phénomène est également évoqué par Marazza et al. (1996) chez *Palaemonetes varians* qui, suite à une exposition de 14 jours à une forte concentration de NH_3^+ (3 mg/l), a présenté des valeurs extrêmement variables, tandis qu'à une concentration inférieure (0,5 mg/l), la CEA présentait une réponse stable et faible (Marazza et al., 1996). Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Le Bras (1995) chez *Asellus aquaticus* exposés pendant 48 heures à différentes concentrations en lindane (2; 4; 8; 10 $\mu\text{g/l}$).

Plus récemment Schill et Köhler (2004) ont mesuré chez des gammarès, encagés pendant six semaines, la CEA ainsi que les teneurs en lipides et glycogène. Les résultats ont montré que les organismes, malgré les niveaux de contamination, présentaient des niveaux énergétiques suffisants pour assurer leur survie et mettre en place des mécanismes de détoxification.

Tableau I-2 : Exemples d'études de la réponse de la CEA à la contamination chez les animaux aquatiques. Modifié d'après Le Gal et al. (1997)

Polluant	Espèce	Conditions d'exposition	Tissu utilisé pour les dosages	Valeurs ou tendances de la CEA	Référence
Cadmium	<i>Palaemonetes paludosis</i>	Laboratoire : système en flux continu; 0,4, 10 et 30 µg/l pendant 2, 5, 7 et 14 jours	Queue avec exosquelette	Diminution, y compris chez les témoins, puis retour à des valeurs constantes plus faibles	(<u>Giesy et al., 1978</u>)
Cadmium	<i>Procambarus pubescens</i>	Laboratoire : système en flux continu; 10 à 30 µg/l	Muscle caudal	CEA inférieure à 0,80 à 7 jours et à 0,60 à 14 jours	(<u>Giesy et al., 1978</u>)
Toluène	<i>Cirolana borealis</i>	Laboratoire : exposition pendant 1, 2, 3, 4, 8 et 24 h à 125 et 12,5 ppm	Animal entier	CEA de 0,70 pour le témoin et 0,63 à 0,69 après 4 heures d'exposition selon la concentration	(<u>Bakke et Skjoldal, 1979</u>)
Cadmium	<i>Homarus americanus</i>	Milieu naturel	Muscles, branchies et hépatopancréas	Aucune modification	(<u>Haya et al., 1980</u>)
Hydrocarbures	<i>Pyrazus ebeninus</i>	<i>In situ</i> , encagement dans des zones polluées et témoins	Non indiqué	CEA de 0,62 et 0,69 en zones polluées, 0,80 pour les témoins	(<u>Ivanovici, 1980b</u>)
Nickel	<i>Crassostrea virginica</i>	Laboratoire : 10 semaines à 5 et 10 µg/kg	Muscle adducteur	Aucune modification	(<u>Zaroogian et al., 1982</u>)
Nickel	<i>Mytilus edulis</i>	Laboratoire : 10 semaines à 5 et 10 µg/kg	Muscle adducteur	Aucune modification de la CEA; augmentation de l'AMP; diminution de l'ATP et des rapports ATP/ADP, ATP/AMP	(<u>Zaroogian et al., 1982</u>)
Zinc	<i>Homarus americanus</i>	Laboratoire : système en flux continu	Muscles, branchies et hépatopancréas	Aucune modification	(<u>Haya et al., 1983</u>)
Endosulfan	<i>Nereis virens</i>	Laboratoire : 72 à 96 h	Animal entier	Diminution	(<u>Haya et Waiwood, 1983</u>)
Acide 2,4,5-tri chlorophénoxy acétique	<i>Patamopyrgus jenkinsi</i>	Laboratoire : chronique avec renouvellement du milieu; 5 mg/l	Animal entier	0,50 pour les individus à test brun; 0,25 pour les individus à test noir; 0,69 pour les témoins	(<u>Chaisemartin et Real, 1985</u>)
Hydrocarbures	<i>Nereis diversicolor</i>	<i>In situ</i>	Non indiqué	Aucune modification	(<u>Verschraegen et al., 1985</u>)
DDT	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Laboratoire : aiguë, 4 h ; 100 µg/l	Muscle	Diminution pour CEA, ATP, adénylates totaux et glycogène. Augmentation de l'AMP	(<u>Vetter et al., 1986</u>)

Polluant	Espèce	Conditions d'exposition	Tissu utilisé pour les dosages	Valeurs ou tendances de la CEA	Référence
Effluent papeterie	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Laboratoire : action simultanée de l'effluent et d'un manque d'oxygène pendant 4 h	Muscle	Diminution de l'ATP, des adénylates totaux et du glycogène	(Vetter et al., 1986)
Cadmium	<i>Cardium edule</i>	Laboratoire	Animal entier	Diminution de la CEA, de l'ATP et des adénylates totaux	(Buu et Le Gal, 1989)
Chrome (1480 µg/g), Cuivre (2900 µg/g), PCB (6400 µg/g)	<i>Nephtys incisa</i>	Laboratoire : sédiments prélevés dans des estuaires contaminés et témoins	Animal entier	Entre 0,86 et 0,92	(Zaroogian et Johnson, 1989a)
PAHs (142000 ng/g)	<i>Mytilus edulis</i>	Laboratoire : sédiments prélevés dans des estuaires contaminés et témoins	Muscle adducteur	Entre 0,75 et 0,87	(Zaroogian et Johnson, 1989b)
Effluent industriel	<i>Cerastoderma edule</i>	Laboratoire : transfert depuis une zone polluée	Animal entier	Diminution au cours des premières 24 h	(Picado et Le Gal, 1990)
Carbofuran	<i>Lepomis macrochirus</i>	Laboratoire : système en flux continu	Branchies, estomac, foie, muscle	Diminution dans les branchies et l'estomac; retour à la normale en fin d'exposition	(Hohreiter et al., 1991)
Fenvalerate	<i>Lepomis macrochirus</i>	Laboratoire : système en flux continu	Branchies, estomac, foie, muscle	Diminution dans les branchies, retour à la normale en fin d'exposition	(Hohreiter et al., 1991)
Lindane	<i>Asellus aquaticus</i>	Laboratoire : aigue, 48 h ; 2, 4, 8, 10 µg/l	Animal entier	0,77-0,79-0,69-0,65-0,72 pour 0, 2, 4, 8, 10 µg/l respectivement	(Le Bras, 1995)
Hydrocarbures	<i>Gammarus wilkitzkii</i>	Milieu naturel	Animal entier	CEA négative pour toutes les conditions testées	(Olsen et al., 2008)

1.2.2. Les réserves énergétiques

Pour beaucoup d'organismes, l'apport alimentaire est un évènement ponctuel permettant de répondre à une demande énergétique variable mais permanente au cours de l'existence. Ainsi la mise en réserve des nutriments énergétiques provenant de la digestion est une nécessité vitale pour assurer le maintien des différentes fonctions physiologiques de l'organisme. En cas de perturbation environnementale, l'organisme peut combattre les effets négatifs du stress par une dépense énergétique accrue. Ainsi les réserves énergétiques peuvent rendre compte de l'état physiologique d'un individu, et être des marqueurs intéressants dans le cadre d'études écotoxicologiques. L'énergie disponible chez les organismes peut être stockée sous forme de lipides, de glycogène et de protéines.

Lors d'un stress, le glycogène et les lipides sont utilisés en priorité tandis que les protéines ne sont consommées qu'en cas de stress sévère. Selon les études considérées, chez les invertébrés, les mesures des teneurs en lipides, glycogène et protéines sont étudiées soit dans l'organisme entier (Bossuyt et Janssen, 2003, Sroda et Cossu-Leguille, 2011b), soit dans des organes considérés comme ayant une fonction de stockage (gonades, muscle, manteau, hépatopancreas ou glande digestive) (Encomio et Chu, 2000, Palais et al., 2011). Ainsi la répartition des réserves énergétiques est très variable selon l'espèce considérée.

Les lipides sont généralement stockés dans les tissus adipeux, mais lorsque l'organisme en est dépourvu, comme chez les crustacés, les lipides sont stockés dans les tissus musculaires et l'hépatopancréas (O'Connor et Gilbert, 1968). Chez les crustacés décapodes la glande digestive est le premier organe de stockage des réserves, bien que la plupart des réserves soient au niveau des tissus connectifs épithélial et subépithélial (Martin, 1965). La principale source de réserve chez les gammaridés est stockée sous forme de lipides. Le glycogène est particulièrement présent au niveau de l'épiderme et de l'épithélium lors de la formation de la nouvelle cuticule. Les protéines constituent la masse musculaire des organismes, cette masse varie en fonction des besoins énergétiques de l'organisme.

Le tableau suivant présente l'effet d'un certain nombre de contaminants sur les réserves énergétiques de différentes espèces d'invertébrés aquatiques (**Tableau I-3**).

Tableau I-3 : Exemples d'études de la réponse des réserves énergétiques à l'exposition à des contaminants modifié d'après Durou et al. (2008)

Contaminant	Espèce	Conditions d'exposition	Type de réserve	Tissu utilisé pour le dosage	Réponse	Référence
[Cadmium]=0,5 à 40mg/l de 2 à 80 jours d'exposition	<i>Nereis virens</i>	Laboratoire	Glycogène	Segments postérieurs	Diminution sur une exposition longue durée	(<u>Carr et Neff, 1982</u>)
Comparaison de 2 sites (un référence et un contaminé par les hydrocarbures)	<i>Nereis virens</i>	Terrain	Glycogène, Lipides	Organisme entier	En site contaminé les organismes présentent des quantités de glycogène inférieures tandis que les quantités de lipides sont supérieures	(<u>Carr et Neff, 1984</u>)
[Pentachlorophénol]= 0,77 mg/l, exposition pendant 15, 30 et 45 jours	<i>Gammarus pseudolimnaeus</i>	Laboratoire	Glycogène, Lipides, Protéines	Organisme entier	Diminution du glycogène et des protéines à tous les temps d'échantillonnage. Diminution des lipides après 30 et 45 jours	(<u>Graney et Giesy Jr, 1986</u>)
[Lindane] = 0,056; 0,1; 0,18; 0,32; 0,56 et 0,75 mg/l à 48h et à 96h	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire	Sucres, Lipides, Protéines	Organisme entier	Même résultat à 48 et 96h: sucres et protéines augmentent puis diminuent avec la concentration de lindane, tandis que les lipides diminuent	(<u>De Coen et Janssen, 1997b</u>)
[Mercure] = 1,8; 3,2;5,6; 10;18; 24 et 32µg/l à 48h et à 96h	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire	Sucres, Lipides, Protéines	Organisme entier	A 48h: les sucres et les protéines augmentent puis chutent avec la concentration de mercure, les protéines restent stables. A96h: toutes les réserves diminuent avec la contamination	(<u>De Coen et Janssen, 1997b</u>)
[PCB]= 0,35 et 3,5µg par jour et par individus durant 8 semaines	<i>Crassostrea virginia</i>	Laboratoire	Glycogène	Muscle adducteur, manteau, gonades	Diminution dans le muscle adducteur. Pas de variation dans le manteau ou les gonades	(<u>Encomio et Chu, 2000</u>)
[Plomb]= 8; 55; 1178 et 7945mg/kg de litière à 80 jours d'exposition	<i>Porcellio scaber</i>	Laboratoire	Protéines, Glycogène	Organisme entier	Tendance à une augmentation du glycogène avec l'augmentation du plomb (plus forte chez individus pré-exposés). Protéines restent stables à toutes les concentrations chez individus non pré-exposés. Chez les pré-exposés la concentration de protéines augmente avec la concentration de plomb	(<u>Knigge et Köhler, 2000</u>)

Contaminant	Espèce	Conditions d'exposition	Type de réserve	Tissu utilisé pour le dosage	Réponse	Référence
[Endosulfan] = 0,1; 1; 10; 25; 50; 100; 250 et 500 µg/g de nourriture pendant 21 jours	<i>Porcellio dilatatus</i>	Laboratoire	Glycogène, Lipides, Protéines	Organisme entier	Le glycogène et les lipides diminuent et les protéines restent stables	(Ribeiro et al., 2001)
[Parathion] = 0,1; 1; 10; 25; 50; 100; 250 et 500 µg/g de nourriture pendant 21 jours	<i>Porcellio dilatatus</i>	Laboratoire	Glycogène, Lipides, Protéines	Organisme entier	Les 3 types de réserves diminuent	(Ribeiro et al., 2001)
[Cuivre] = 0,5; 1,5; 12; 35 et 100 µg/l	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire	Somme des réserves énergétiques (protéines, glycogène, lipides)	Organisme entier	Diminution significative des réserves énergétiques chez les spécimens de la première génération en comparaison aux spécimens de la troisième génération	(Bossuyt et Janssen, 2003)
[Cuivre] = 0,5; 1,5; 12; 35 et 100 µg/l	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire	somme des réserves énergétiques (protéines, glycogène, lipides)	Organisme entier	Augmentation des réserves au cours des générations. Au cours des générations la composition des réserves reste inchangée (70% lipides, 20% sucres, et 10% de protéines)	(Bossuyt et Janssen, 2004)
[Cadmium] = 10; 30; 100 et 300 ppb pendant 5 semaines	<i>Macoma baltica</i>	Laboratoire	Glycogène	Organisme entier	Diminution à 300ppb	(Duquesne et al., 2004)
[Zinc] = 0,1 et 1 µM, contamination du milieu et de la nourriture	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire	Protéines, Sucres, Lipides	Organisme entier	Suite à une pré-exposition de 4 jours, augmentation des réserves corrélées à la contamination du milieu et /ou à la contamination trophique	(Canli, 2005)
Comparaison de 2 sites (un référence et un contaminé notamment par des métaux) sur un an	<i>Nereis diversicolor</i>	Terrain	Glycogène et Lipides	Organisme entier	Pour chaque prélèvement (février, avril, juin et septembre) la concentration en glycogène et en lipides est supérieure pour les organismes du site référence par rapport aux organismes du site contaminé	(Durou et al., 2005)
[Fenhexamide] = 0,1; 1; 10mg/l exposition de 2, 4 et 7 jours	<i>Tubifex tubifex</i>	Laboratoire	Glycogène, Protéines	Organisme entier	Diminution du glycogène et des protéines après 2, 4 et 7 jours	(Mosleh et al., 2005)

Contaminant	Espèce	Conditions d'exposition	Type de réserve	Tissu utilisé pour le dosage	Réponse	Référence
[Cuivre] = 10 et 100 nM, contamination du milieu et de la nourriture	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire	Protéines, Sucres, Lipides	Organisme entier	Suite à une pré-exposition de 4 jours, augmentation des réserves corrélée à la contamination du milieu et/ou à la contamination trophique	(Canli, 2006)
[Fenhexamide] = 25; 62 et 125 mg/l exposition de 2, 4 et 7 jours	<i>Tubifex tubifex</i>	Laboratoire	Protéines	Organisme entier	Diminution à 4 jours 25 mg/l. Diminution à 62 et 125 mg/l à 2, 4 et 7 jours	(Mosleh et al., 2007)
[Carbofuran] = 1 et 10 µg/l durant 7 jours	<i>Hyallela castroi</i>	Laboratoire	Glycogène, Lipides, Protéines	Organisme entier	Les 3 types de réserves diminuent	(Dutra et al., 2009)
[Tébuconazole] = 0,41; 0,52; 0,71 et 1,14 mg/l durant 5 jours	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire	Glycogène, Lipides, Protéines	Organisme entier	La croissance des 3 types de réserves au cours des 5 temps d'échantillonnage est réduite corrélativement à la contamination	(Sancho et al., 2009)
[Cuivre] = 20 et 30 µg/l	<i>Gammarus roseli</i> <i>Dikerogammarus villosus</i>	Laboratoire	Protéines, Glycogène, Lipides	Organisme entier	Tendance à la baisse des protéines chez le mâle et la femelle <i>D.villosus</i> et chez la femelle <i>G.roseli</i>	(Sroda et Cossu-Leguille, 2011a)
Contamination métallique (Cd, Cu, Zn, Pb, Ni)	<i>Dreissena polymorpha</i>	Terrain (caging)	Glycogène, Lipides	Glande digestive, Gonades	Pas de lien avec le niveau de contamination des sites	(Palais et al., 2011)

1.2.3. L'allocation énergétique cellulaire (AEC)

L'allocation énergétique cellulaire est un paramètre intégrateur qui rend compte du budget énergétique cellulaire net (De Coen et Janssen, 1997b). La mesure de l'allocation énergétique cellulaire (AEC) accède au budget énergétique des organismes en mesurant les réserves énergétiques disponibles (E_a) et la consommation de l'énergie (E_c) (Olsen et al., 2007). L'énergie disponible (E_a) au sein de l'organisme représente la somme des trois types de réserves énergétiques (sucres, lipides et protéines) exprimée en équivalent énergétique (39500 mJ/mg de lipide, 24000 mJ/mg de protéine, 17500 mJ/mg de glycogène) (Gnaiger, 1983). L'énergie consommée (E_c) par l'organisme est évaluée par la mesure d'activité du système de transport des électrons au niveau mitochondriale (ETS). La mesure de l'ETS est basée sur l'activité des enzymes associées avec la phosphorylation oxydative et peut être considérée comme un bon indicateur de la consommation de l'énergie. La quantité d'oxygène consommée par l'organisme est transformée en équivalent énergétique (484 kJ/mol O_2) (Gnaiger, 1983).

L'allocation énergétique cellulaire peut être calculée de différentes manières. Les échantillons peuvent ainsi être prélevés à différents moments du test. L'AEC finale est alors calculée par intégration des changements au cours de la durée totale d'exposition comme suggéré par De Coen et Janssen (2003a).

$$AEC = \frac{\int_0^t E_a dt - \int_0^t E_c dt}{t}$$

E_a (énergie disponible) = sucres + lipides + protéines (mJ/mg de poids frais)

E_c (énergie consommée) = activité de l'ETS (mJ/mg de poids frais)

L'AEC peut également être calculée par la différence entre E_a et E_c ($AEC = E_a - E_c$) (Moolman et al., 2007) ou par le ratio E_a et E_c ($AEC = E_a/E_c$) (Verslycke et al., 2004a, Verslycke et al., 2004b, Erk et al., 2008, Bagheri et al., 2010, Erk et al., 2011).

L'AEC fournit une vision des changements causés par différents stress dans le budget énergétique des organismes. La transformation des réserves énergétiques disponibles et de l'énergie consommée en équivalent énergétique, permet de suivre leur intégration dans le

budget énergétique global et rend possible les comparaisons entre différents organismes et différents stress (De Coen et Janssen, 2003b). Par exemple, une réduction de l'AEC peut être le résultat d'une décroissance des réserves énergétiques (Ea) et/ou d'une augmentation de la consommation de l'énergie (Ec). Par conséquent, l'AEC ne fournit pas qu'une quantification du budget énergétique, mais peut également aider à élucider les différents modes d'actions des toxiques (De Coen et Janssen, 2003a).

La mesure de l'activité de l'ETS en tant que paramètre respiratoire est avantageuse car beaucoup moins difficile à mesurer que la respiration de l'organisme. L'ETS est directement lié aux processus de consommation de l'oxygène au niveau cellulaire (De Coen et Janssen, 2003a). L'AEC présente des réponses corrélées aux résultats obtenus par la technique de l'AECR (présentée chapitre I - 1.2.4) mais semble être plus sensible car plus précoce en mesurant des effets à un niveau d'organisation cellulaire (Verslycke et al., 2004b).

La méthode de l'AEC a été appliquée dans beaucoup d'études écotoxicologiques pour accéder aux effets des stress chimiques tels que les métaux, les insecticides, les biocides, (Muyssen et al., 2002, Verslycke et al., 2004b, Erk et al., 2008). De nombreuses études ont été menées chez différents groupes zoologiques. Le **tableau I-4** présente des études recensées chez des invertébrés, notamment chez des gastéropodes (Moolman et al., 2007), des bivalves (Smolders et al., 2004, Erk et al., 2011) et des insectes (Bagheri et al., 2010). Un grand nombre de ces travaux porte sur les crustacés et en particulier sur deux espèces qui sont *Daphnia magna* et *Neomysis integer*. Les résultats obtenus chez *Daphnia magna* montrent la précocité des réponses mesurées avec des chutes de l'AEC dès 48 et/ou 96 heures d'exposition à une large gamme de contaminants (i.e lindane, mercure, cadmium, dichromate de potassium, tributylétain, acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) (De Coen et Janssen, 1997b, 2003a). Par ailleurs, la pertinence écologique de l'AEC a été mise en évidence par la corrélation de la réponse sub-organismale de l'AEC avec les réponses mesurées au niveau populationnel comme le taux de croissance, le taux de reproduction, la taille moyenne d'une portée, le nombre total de jeune par femelle et la taille des adultes (De Coen et Janssen, 2003b).

Tableau I-4 : Etudes de la réponse de l'allocation énergétique cellulaire (AEC) à l'exposition à des contaminants; les mesures sont réalisées sur des organismes entiers

Contaminant	Espèce	Conditions d'exposition	Réponse	Référence
[Lindane] = 0,056; 0,1; 0,18; 0,32; 0,56 et 0,75 mg/l [Mercure] = 1,8; 3,2; 5,6; 10; 18; 24 et 32 µg/l	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire	Lindane à 96h: pour les concentrations $\geq 0,1$ 8mg/l, diminution de l'AEC et augmentation à 0,056 et 0,1mg/l Mercure à 96h: pour les concentrations $\geq 5,6$ µg/l, diminution de l'AEC et augmentation à 1,8 et 3,2 µg/l	(De Coen et Janssen, 1997b)
[Zinc] = 200; 400; 600 et 800 µg/l	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire	Après une acclimatation de 7 générations : AEC à 800 µg/l < AEC à 200; 400; et 600 µg/l	(Muysen et Janssen, 2001)
[Zinc] = 3; 80; 1000 µg/l pendant 96h	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire/ Terrain	AEC à 80µg/l > AEC à 3 et 1000 µg/l quel que soit la population testée (clone ou pas, naturelle ou pas)	(Muysen et al., 2002)
[CdCl ₂] = 0; 0,8; 8; 28; 49; 88; 158 et 282 µg/l	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire	A 48h diminution de l'AEC à toutes les concentrations, à 96h 0,8 µg/l l'AEC augmente et diminution aux autres concentrations	(De Coen et Janssen, 2003a)
[K ₂ Cr ₂ O ₇] = 0; 0,01; 0,032; 0,056; 0,18 et 0,32 mg/l			A 48h diminution AEC aux concentrations $\geq 0,032$ mg/l (sauf 0,056 mg/l), à 96h diminution de l'EAC à toutes les concentrations	
[TBT-Cl] = 0; 0,56; 1; 1,6; 3,2; 4,2 et 5,6 µg/l			A 48h et 96h diminution de l'AEC aux concentrations $\geq 1,8$ µg/l	
[Linear alkylbenzene sulfonic acid] = 0; 0,5; 1; 3; 5; 7; 10 et 15 mg/l			A 48 h diminution de l'AEC aux concentrations ≥ 7 mg/l, à 96h diminution de l'AEC aux concentrations ≥ 5 mg/l	
[Sodium pentachlorophenolate] = 0; 0,32; 0,056; 0,072; 0,1; 0,15; 0,22 et 0,32 mg/l			A 48h diminution de l'AEC uniquement à 0,22 mg/l, à 96h diminution de l'AEC à 0,22 et 0,32 mg/l	
[2,4-Dichlorophenoxyacetic acid] = 0,1; 5,6; 10; 32; 56; 100 et 150 mg/l			A 48h augmentation de l'AEC à 5,6 et 56 mg/l et diminution aux concentrations ≥ 100 mg/l, à 96h l'AEC augmente à 56mg/l et diminue aux concentrations ≥ 100 mg/l	
[TBT] = 10; 100; 1000 ng/l	<i>Neomysis integer</i>	Laboratoire	Après 96h: diminution de l'AEC pour toutes les concentrations testées mais pas d'effet doses-réponse	(Verslycke et al., 2003)
Gradient de pollution	<i>Dreissena polymorpha</i>	Terrain (caging)	AEC augmente entre 3 et 28 jours sur le site référence. L'AEC diminue entre 3 et 28 jours sur les sites contaminés	(Smolders et al., 2004)

Contaminant	Espèce	Conditions d'exposition	Réponse	Référence
[Chlorpyrifos] = 0,038; 0,056; 0,072 et 0,1 µg/l	<i>Neomysis integer</i>	Laboratoire	Diminution de l'AEC à partir de 0,038 µg/l, mais pas d'effet dose réponse (les résultats étant la moyenne des expositions à 48 et 168h)	(Verslycke et al., 2004b)
[Nonylphenol] = 0; 0,01; 1 et 100 µg/l [Methoprene] = 0; 0,01; 1 et 100 µg/l	<i>Neomysis integer</i>	Laboratoire	Après 96h d'exposition au : Méthoprène, AEC diminue entre 0 et 100 µg/L Nonylphenol, AEC augmente à 1 µg/L et diminue à 100 µg/L	(Verslycke et al., 2004b)
Suivi d'effluents métallurgiques	<i>Daphnia magna</i>	Terrain (caging)	AEC amont > AEC aval et zone intermédiaire > AEC effluent de décharge	(De Coen et al., 2006)
[Cd] = 0,51 µM; [Zn] = 0,43 µM; [Cu + Zn] = 0,51 + 0,43 µM	<i>Helisoma duryi</i> <i>Melanoides tuberculata</i>	Laboratoire	AEC diminue de manière similaire après 2 semaines d'exposition au Cd, au Zn et au mélange	(Moolman et al., 2007)
HAP	<i>Gammarus setosus</i>	Laboratoire	AEC diminue pour le mélange d'eau de mer et d'eau contaminée au HAP par rapport au contrôle	(Olsen et al., 2007)
	<i>Liocyma fluctuosa</i>		AEC stable chez les organismes exposés aux 3 types d'eaux testées	
	<i>Onisimus litoralis</i>		AEC augmente pour l'eau issue des sédiments de forage par rapport au contrôle	
[Cd] = 7,2; 23 et 38,1 µg/l et [salinité] = 5; 16 et 25 psu	<i>Neomysis integer</i>	Laboratoire	Pas d'effet Cd Effet salinité : après 1 et 4 jours l'AEC 5 psu < AEC 16 et 25 psu. Après 7 jours, absence de différence entre l'AEC 5 et 25 psu	(Erk et al., 2008)
HAP = forte dose (55 à 8 ppm); moyenne dose (10 à 2ppm); faible dose (5 à 1 ppm)	<i>Gammarus wilkitzkii</i>	Laboratoire	Après 1 mois d'exposition : pas de différence significative de l'AEC entre le contrôle et les exposés	(Olsen et al., 2008)
[Ni ²⁺] = 0; 0,125; 0,5; 1 et 2 mg/l pendant 96h	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire	AEC augmente pour l'exposition à 0,125 mg/l AEC diminue pour l'exposition à 0,5; 1; 2 mg/l	(Vandenbrouck et al., 2009)
Pyroxyfene (insecticide) = 0; 20; 60; 100; 200 et 500 mg/l	<i>Brachynema germanii</i>	Laboratoire	AEC augmente entre 0 et 100 mg/l puis l'AEC diminue pour 200 et 500 mg/l	(Bagheri et al., 2010)

1.2.4 Allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (AECR)

L'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction ou « Scope for Growth » en anglais, correspond à la quantité d'énergie disponible pour la croissance et la reproduction, une fois que les besoins énergétiques nécessaires au maintien du métabolisme basal ont été couverts (Le Gal et al., 1997). Le calcul de L'AECR peut être réalisé selon l'équation suivante (Widdows et Johnson, 1988) :

$$P = A - (R + E)$$

L'énergie utilisable (P) pour la croissance et la reproduction correspond à l'AECR. Elle est exprimée en Joules par gramme d'organisme par unité de temps.

A représente l'énergie assimilée à partir de la nourriture.

R est l'énergie utilisée pour la respiration.

E est l'énergie perdue par l'excrétion.

Si P est positive, cela indique que l'énergie est disponible pour la reproduction et la croissance de l'individu. Lorsque P est négative, cela signifie que l'organisme doit alors puiser dans ses réserves énergétiques pour assurer le maintien de son métabolisme de base (Le Gal et al., 1997).

L'AECR répond à la présence de polluants et constitue un biomarqueur potentiel de l'état de santé des organismes. L'utilisation de cet outil repose sur le fait qu'un stress lié à la dégradation de l'environnement est généralement à l'origine d'une ré-allocation des ressources énergétiques au détriment des processus de croissance ou de reproduction (Calow et Sibly, 1990). Dans un milieu pollué, la mise en place de mécanismes biochimiques et physiologiques chez les organismes va entraîner un surcoût énergétique qui se traduit la plupart du temps par des modifications de la fitness (Calow, 1991). Les études montrent que les organismes soumis à un stress chimique (métallique) produisent moins de descendants que les organismes non stressés (Maltby et Naylor, 1990, Daveikis et Alikhan, 1996). Selon Maltby (1994), l'AECR permet de rendre compte de la ré-allocation de l'énergie au sein d'un organisme soumis à une dégradation de son milieu de vie.

La réponse de l'AECR évolue de manière progressive entre l'état optimal et les conditions létales ; ainsi il existe une relation quantitative entre la concentration des contaminants dans le milieu et la valeur du marqueur mesuré chez l'organisme exposé. Selon Donkin et Widdows (1986), la réponse de l'AECR en présence de toxique se distingue nettement de sa réponse liée à la variabilité naturelle.

De part son lien direct avec la croissance et la reproduction qui sont des variables clefs dans le maintien des populations, l'AECR présente une bonne pertinence écologique. La plupart des études menées sur ce marqueur ont été réalisées chez des bivalves marins puis quelques travaux se sont intéressés aux crustacés d'eau douce (Naylor et al., 1989, Maltby et Naylor, 1990).

L'effet des différents types de contaminants testés (métaux, pesticide, HAP et PCB) entraîne chez les invertébrés une chute de l'AECR (**Tableau I-5**).

Des études de laboratoire ont été réalisées chez *Neomysis integer* exposés au chlorpyrifos (pesticide organophosphoré). Une diminution de l'AECR a été observée pour les deux plus fortes concentrations testées (0,072; 0,1 µg/l) après 168 heures d'exposition. Les auteurs suggèrent que l'effet des contaminants serait plus grand dans l'estuaire où les organismes doivent nager pour faire face aux courants, entraînant des dépenses énergétiques plus importantes que celles observées au laboratoire (Roast et al., 1999).

Au début des années 1990, des études ont été réalisées chez les gammaridés. La mesure de l'AECR chez ces organismes a été bien décrite par Naylor et al. (1989). Cette première étude réalisée en laboratoire pendant une exposition de 6 jours a montré la réduction de l'AECR associée à la concentration croissante en Zn de 0,3; 0,5 et 0,7 mg/l (Naylor et al., 1989). De la même manière après une exposition de 6 jours au Cd (10; 20; 30; 40 µg/l) l'AECR chute proportionnellement à la concentration du contaminant (Stuhlbacher et Maltby, 1992). L'étude de l'AECR a été également abordée sur le terrain en exposant des organismes encagés sur des sites de différentes qualités chimiques. Encore une fois l'AECR est significativement réduite chez les gammarex exposés à l'aval d'effluent de station d'épuration et de rejet minier par rapport à ceux exposés en amont (Maltby et al., 1990).

L'ensemble des études menées chez les crustacés a toujours souligné le fait que la réduction de l'AECR était liée à une diminution de l'absorption de la nourriture. Ainsi le

taux d'alimentation des organismes apparait aussi sensible que l'AECR et plus simple à mesurer. De nombreux auteurs utilisent ainsi le comportement alimentaire des organismes aquatiques comme indicateur de la qualité de l'eau (Maltby et Hills, 2008, Coulaud et al., 2011).

Tableau I-5 : Exemples d'études des réponses de l'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (AECR) à l'exposition à des contaminants *in situ* ou en laboratoire. Modifié d'après Durou et al. (2008)

Contaminant	Espèce	Conditions d'exposition	Réponse	Référence
Zn et pH	<i>Gammarus pulex</i>	Laboratoire pendant 6 jours, Doses : 0,3; 0,5; 0,7 mg/l ; pH = 7,6 et 5	Diminution	(<u>Naylor et al., 1989</u>)
Caging 4 sites sur 2 rivières	<i>Gammarus pulex</i>	<i>In situ</i>	Diminution	(<u>Maltby et al., 1990</u>)
Zn	<i>Gammarus pulex</i>	Laboratoire pendant 6 jours, Doses: 0,1; 0,3; 0,5 mg/l	Diminution	(<u>Maltby et al., 1990</u>)
Cd (avec ou sans préexposition (24h) au Cd ou Zn	<i>Gammarus pulex</i>	Laboratoire pendant 6 jours, Doses: 10; 20; 30; 40 µg/l	Diminution	(<u>Stuhlbacher et Maltby, 1992</u>)
Métaux, PCB, DDT, Organochlorés	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>In situ</i>	Diminution	(<u>Widdows et al., 1997</u>)
Chlorpyrifos	<i>Neomysis integer</i>	Laboratoire pendant 168 heures Doses : 0,038; 0,056; 0,072; 0,100 µg/l	Diminution	(<u>Roast et al., 1999</u>)
Biosurveillance 38 stations explorées	<i>Mytilus edulis</i>	<i>In situ</i>	Diminution, Influence HAP majoritaire	(<u>Widdows et al., 2002</u>)
Caging 5 sites sur une même rivière	<i>Dreissena polymorpha</i>	<i>In situ</i>	Diminution	(<u>Smolders et al., 2004</u>)
Chlorpyrifos	<i>Neomysis integer</i>	Laboratoire pendant 48, 96 et 168 heures Doses : 0,038; 0,056; 0,072; 0,100 µg/l	Diminution	(<u>Verslycke et al., 2004b</u>)
Métaux	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>In situ</i> et laboratoire	Diminution	(<u>Tsangaris et al., 2007</u>)

1.3. Les enzymes digestives

La nourriture ingérée par les animaux est composée de substances complexes qui doivent être ramenées à des molécules simples pouvant traverser la paroi du tube digestif pour passer dans les fluides circulants. Ce processus digestif ayant lieu au cours du déplacement des aliments dans le tube digestif est assuré par la présence d'un certain nombre d'enzymes capables d'hydrolyser les aliments (lipides, glucides et protéines) en nutriments (acides gras, oses et acides aminés).

Il est essentiel de constater que la nature des enzymes digestives est adaptée au régime alimentaire de l'organisme, ceci lui permettant d'accéder à une plus large gamme de nutriments (Dedourge et al., 2008). Les différentes catégories enzymatiques et leur substrat respectif sont détaillées dans le **tableau I-6**.

Tableau I-6 : Principaux composés alimentaires et enzymes digestives endogènes. D'après Dedourge et al. (2008)

Substrats	Enzymes	Produits finaux
GLUCIDES		
Amylose Amylopectine Glycogène	Amylase, Isomaltase, Maltase	Glucose
Cellulose	Cellulase, Cellobiase	Glucose
Chitine	Chitinase, Chitobiase	Glucosamine
Inuline	Inulinase	Fructose
Lactose	Lactase	Glucose, Galactose
Raffinose	Galactosidase, Melibiase	Glucose, Galactose, Fructose
Saccharose	Invertase	Glucose, Fructose
Tréhalose	Tréhalase	Glucose
LIPIDES		
Tryglycérides	Lipase, Co-lipase	Monoglycéride, Acide gras
Phospholipides	Phospholipase, Phosphatase	Alcool, Acide gras, Phosphate
Cholestérol esters	Cholestérol estérase	Cholestérol, Acide gras
Cires	Lipase, Estérase	Alcool monohydrique, Acide gras
PROTEINES		
Protéines	Pepsine, Trypsine, Chymotrypsine	Acides aminés
	Aminopeptidase Carboxypeptidase	
	Dipeptidase, Tripeptidase	

1.3.1. Les enzymes digestives chez les invertébrés

Les enzymes protéolitiques

Chez les invertébrés, la présence et le mode d'action des protéases sont encore partiellement connus. Des activités trypsine et chymotrypsine ont été mises en évidence dans tous les groupes à l'exception du groupe des hirudinées (Gilles et al., 2006). Chez les crustacés, la trypsine est la principale enzyme protéolytique. Elle est synthétisée massivement et peut représenter plus du tiers des protéines solubles de l'hépatopancréas. La chymotrypsine peut également être présente et participer aux processus digestifs (Muhlia-Almazán et al., 2008). La présence de pepsine est douteuse chez les crustacés. Leur tractus digestif présente un pH compris entre 5 et 8 ce qui exclut la présence d'enzyme fonctionnant à pH faible comme la pepsine (Gildberg, 1988). Cependant, un travail assez récent semble remettre en cause l'absence d'enzyme digestive fonctionnant à pH très acide chez les crustacés (Navarrete del Toro et al., 2006). La présence de carboxypeptidase a été mise en évidence chez des écrevisses du genre *Astacus* (Gates et Travis, 1973). De même la présence d'aminopeptidases et de dipeptidases chez des Pénéides (Galgani et al., 1984), des Astacides (De La Ruelle et al., 1992) et des Palaemonides (Trellu et Ceccaldi, 1976) a également été démontrée.

Les enzymes glycolitiques

Les enzymes hydrolytiques impliquées dans la digestion des sucres sont assez spécifiques, elles sont donc plus nombreuses que les lipases et les protéases. L'arsenal enzymatique existant chez les animaux pour digérer les carbohydrates est généralement incomplet. Ainsi un certain nombre d'enzyme est d'origine exogène (en provenance de bactéries, de protozoaires ou de champignons) (Gilles et al., 2006). Parmi ces enzymes exogènes indispensables à la digestion on peut noter les cellulases qui permettent l'hydrolyse des parois cellulaires végétales. Alors que chez les vertébrés les cellulases sont exclusivement exogènes, les invertébrés peuvent posséder des cellulases endogènes. Cependant dans la plupart des cas ces enzymes endogènes ne sont pas suffisantes pour réaliser une digestion effective, il existe ainsi une contribution exogène importante chez la majorité des invertébrés (Gilles et al., 2006). D'autres polyholosides, plus digestes comme les composés glucidiques de réserves (le glycogène d'origine animale et l'amidon d'origine végétale), sont hydrolysés en maltose par des amylases. Ces amylases sont ainsi retrouvées chez tous les vertébrés et invertébrés à l'exception des sangsues. Les chitinases, inulinases et

galactosidases sont également répandues chez de nombreux organismes, mais elles le sont certainement moins que les amylases et les cellulases évoquées précédemment.

D'après Ceccaldi (1998), tous les crustacés possèdent les enzymes permettant la digestion des polysaccharides. Leur bagage enzymatique se compose des amylases, des saccharases, des maltases, des laminarinases, des chitinases et des cellulases chez certaines espèces. Des travaux approfondis ont été menés sur l'amylase (Van Weel, 1960, Van Wormhoudt, 1980). L'étude du polymorphisme enzymatique interspécifique de l'amylase a été réalisée sur 40 espèces de crustacés (Van Wormhoudt et al., 1995). Selon les espèces, le nombre d'isoformes de l'amylase varie. Chez *Palaemon serratus*, deux à trois isoformes de l'amylase existent selon la provenance géographique des organismes, chez *Palaemon elegans* sept isoformes ont aussi été identifiées (Van Wormhoudt, 1980).

Les laminarinases permettant la digestion entre autre des algues brunes ont été mises en évidence chez plusieurs crustacés (Sova et al., 1970). Les chitinases ont également été étudiées chez les crustacés par Jeuniaux (1963), Brun et Wojtowicz (1976) et Muzzarelli (1977).

Les enzymes lipolytiques

La digestion des triglycérides est assurée par les lipases tandis que les autres composés sont hydrolysés par les estérases. Ces deux types d'enzymes ont été mis en évidence chez les vertébrés et les invertébrés (Dedourge et al., 2008). Cependant le caractère endogène et /ou exogène de ces enzymes chez certains organismes reste encore ignoré (Gilles et al., 2006). Il existe également des sucs aux propriétés émulsifiantes chez de nombreux invertébrés. Par exemple, chez les crustacés décapodes la N-dodécényl-sarcosyl-aurine est un émulsifiant majeur permettant l'absorption des lipides (Holwerda et Vonk, 1973). Chez les crustacés, peu d'études se focalisent sur les lipases (Berner et Hammond, 1970). La présence de plusieurs estérases a également été mise en évidence mais la spécificité de ces enzymes reste peu étudiée (Lovett et Felder, 1990b, a).

1.3.2. Les activités enzymatiques digestives chez les amphipodes

La littérature concernant les enzymes digestives chez les amphipodes semble mettre en évidence la présence d'une très large palette enzymatique chez ces organismes. Johnston et al. (2005) ont détecté sur trois amphipodes *Talorchestia marmorata*, *Talorchestia sp.* et *Keratroides vulgaris*, la présence de laminarinase, cellobiase, carboxyméthyl-cellulase,

xylanase, α et β -glucosidase et de lipase. Des activités endoglucanase et β -glucosidase ont également été détectées respectivement chez *Gammarus tigrinus* et *Gammarus lacustris* par Chamier et Willoughby (1986) et McGrath et Matthews (2000). Une activité β -galactosidase a également été mise en évidence chez *Gammarus tigrinus* (Bärlocher et Porter, 1986) et des activités amylase ont été mesurées chez *Gammarus palustris* (Borowsky et Guarna, 1989, Guarna et Borowsky, 1995). Enfin une étude plus récente a étudié l'activité amylase, endoglucanase, β -glucosidase, estérase et β -galactosidase chez *Gammarus fossarum* (Dedourge-Geffard et al., 2009).

1.3.3. Les perturbations des enzymes digestives par les contaminants

L'appareil digestif représente une des voies principales où les contaminants chimiques peuvent être pris en charge par l'organisme, notamment via les processus d'absorption, de distribution, de métabolisation, de détoxification, d'accumulation ou d'élimination. Le tractus digestif est également un site d'action potentiel pour les toxiques. En effet les polluants circulant dans la lumière du tube digestif peuvent interagir avec la surface épithéliale intestinale et interférer avec la machinerie cellulaire. Le contaminant peut également interagir avec des surfactants et/ou les enzymes digestives. Ceci peut aboutir à des modifications de l'absorption et du transport des nutriments, avec des conséquences sur l'acquisition de l'énergie.

Plusieurs travaux menés sur l'activité enzymatique digestive des invertébrés aquatiques mettent en évidence l'influence des contaminants sur la capacité digestive de ces organismes. Un polluant peut avoir une action (i) directe sur l'enzyme en modifiant ses propriétés hydrolytiques ou (ii) indirecte en influençant son taux de synthèse ou son taux de sécrétion (Yan et al., 1996). Parmi les interactions directes on peut noter le remplacement de métaux essentiels présents au niveau du site actif de l'enzyme par d'autres ions métalliques, ceux-ci pouvant également se combiner avec des groupements hydroxyl, peptidyl ou sulfidryl de la protéine (Li et al., 2008). Ces modifications de la conformation de l'enzyme peuvent se traduire par une induction de l'activité enzymatique ou plus fréquemment une inhibition de celle-ci. Cette interaction directe a été démontrée chez plusieurs espèces d'invertébrés au cours d'exposition *in vitro* où l'extrait enzymatique des organismes a été isolé avant une période d'exposition à un contaminant. Une de ces études *in vitro* menée chez des annélides, des mollusques et des échinodermes a montré l'induction puis l'inhibition d'enzymes digestives (protéases) exposées au cuivre (Chen et

al., 2002). D'autre part dans une revue de De Coen et al. (2000), les auteurs évoquent des inhibitions d'activité d'enzymes digestives (β -galactosidase, estérase, trypsine et cellulase) mesurées *in vitro* chez le micro-crustacé *Daphnia magna* suite à des expositions au CdCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, TBT, lindane, sodium pentachlorophenolate, acide alkylsulfonic et acide 2,4-dichlorophenoxyacétique. Les activités enzymatiques peuvent également être modulées différemment selon l'espèce exposée et la nature du contaminant. Hsieh et al. (2008) et Tsao et al. (2003) ont observé chez les deux gastéropodes *Haliotis sieboldii* et *Sulculus diversicolor* une induction de l'activité amylase lors d'une exposition à du manganèse, du nickel ou de l'argent, tandis qu'une exposition au cuivre, au cadmium ou au zinc a entraîné une répression de l'activité amylase.

Parallèlement à l'effet des contaminants sur la capacité hydrolytique des enzymes, l'impact des toxiques peut également se manifester au niveau de la synthèse et ou de la sécrétion des enzymes. Plusieurs études entreprises chez des bivalves ont montré des altérations morphologiques de la glande digestive (atrophie, nécrose et dégénérescence cellulaires) à l'issue d'exposition à des contaminants organiques ou métalliques (Auffret, 1988, Lowe et Clarke, 1989, Cajaraville et al., 1990). Le même type d'altération a été constaté chez les crustacés. Chez le crabe *Uca minax*, Robinson et Dillaman (1985) ont mis en évidence une altération des cellules F responsables de la synthèse des enzymes digestives chez les organismes exposés durant cinq jours à du naphthalène. D'autres études chez les crustacés ont montré le même type d'altérations ultrastructurales chez les cellules F et R responsables du stockage des réserves (Papathanassiou et King, 1986, Vogt, 1987, Nassiri et al., 2000). Des lyses de membranes nucléaires ou des précipitations de chromatine ont été observées au cours d'études histopathologiques de l'hépatopancréas chez *Gammarus fossarum* exposés à des filtres ultra-violets (3-Benzylidene Camphor) et à des sédiments multi-contaminés (Scheil et al., 2008, Mazurová et al., 2010).

En plus d'assurer les processus digestifs, l'appareil digestif des organismes soumis à une contamination est également impliqué dans des processus de détoxification (Icely et Nott, 1985, Nassiri et al., 2000). L'hépatopancréas des crustacés présente des organites cellulaires (mitochondries, lysosomes et réticulum endoplasmique) impliqués notamment dans la séquestration et la détoxification des métaux (Ahearn et al., 2004). D'après l'étude de Nassiri et al. (2000) réalisée chez l'amphipode *Orchestia gammarellus*, les métaux essentiels comme le cuivre et le zinc sont stockés dans les lysosomes sous forme chélatée, liés à des métallothionéines, tandis que le cadmium est lié à des métallothionéines

accumulées dans le cytosol. Ces auteurs ont également observé la fusion de lysosomes avec des globules lipidiques qui se retrouvent excrétés dans la lumière du tube digestif suite à l'apoptose présumée des cellules ne pouvant faire face à une trop grande accumulation de métaux. Ainsi les métaux même sous forme séquestrée dans les cellules peuvent demeurer biologiquement actifs et perturber la synthèse ou l'excrétion des enzymes. Chez la palourde *Corbicula striatella* une réduction des activités enzymatiques digestives a été mesurée suite aux expositions au cuivre et au mercure (Zambare et Mahajan, 2001). De même, chez la seiche *Sepia officinalis*, une exposition à l'argent a provoqué l'inhibition de la sécrétion des protéases (Le Bihan et al., 2004).

Outre les études au niveau infra-individuel (cellulaire, tissulaire ou de l'organe) de nombreux travaux se sont intéressés à l'étude de l'activité enzymatique digestive sur organisme entier. Le tableau suivant synthétise un certain nombre de données de la littérature concernant l'influence des contaminants chimiques sur l'activité enzymatique digestive des crustacés (**Tableau I-7**).

Tableau I-7 : Etude de l'influence de diverses contaminations sur l'activité des enzymes digestives de crustacés. Les travaux ont été réalisés en laboratoire exceptés les travaux marqués (*). Modifié d'après Dedourge-Geffard et al. (2013)

Contaminant	Espèce	Enzyme	Tissu utilisé pour le dosage	Réponse	Référence
[Cu] = 2 mg/l (11j)	<i>Artemia salina</i>	Amylase, trypsine	Organisme entier	Diminution de l'amylase (dès 24h) et de la trypsine (dès 72h)	(Alayse-Danet et al., 1979)
[Zn] = 5mg/l (11j)		Amylase, trypsine		Diminution de l'amylase (dès 72h) et de la trypsine (dès 24h)	
[Cd] = 0,8 et 570 µg/l (à 48h)	<i>Daphnia magna</i>	Cellulase, amylase, β galactosidase, estérase, trypsine	Organisme entier	Pas d'effet sur la cellulase, l'estérase et l'amylase Diminution de la β galactosidase et de la trypsine	(De Coen et Janssen, 1997a)
[Cd] = 0,8 et 570 µg/l (à 96h)				Pas d'effet sur la cellulase Augmentation de l'estérase, de l'amylase, de la β galactosidase et de la trypsine	
[Cr] = 32 et 180 µg/l (à 48h)				Pas d'effet sur la cellulase et l'estérase Augmentation de l'amylase, de la β galactosidase et de la trypsine	
[Cr] = 33 et 180 µg/l (à 96h)				Pas d'effet sur les enzymes testées	
[Hg] = 1,8 et 30 µg/l (à 48h)				Augmentation de l'amylase Pas d'effet sur la cellulase et l'estérase Diminution de la β galactosidase et de la trypsine	
[Hg] = 1,8 et 30 µg/l (à 96h)				Pas d'effet sur les enzymes testées	
[Cd] = 0,28; 0,86 et 2,56 mg/l (de 50 min à 6h)	<i>Daphnia magna</i>	Cellulase, amylase, β galactosidase, estérase, trypsine	Organisme entier	Pas d'effet sur la cellulase et l'amylase Diminution de la β galactosidase, de l'estérase, et de la trypsine	(De Coen et Janssen, 1998)
[Acide 2,4-dichlorophenoxyacétique] = 100 à 400 mg/l (de 50 min à 6 h)				Pas d'effet sur la cellulase et l'amylase Diminution de la β- galactosidase et de la trypsine Augmentation puis diminution de l'estérase	

Contaminant	Espèce	enzyme	Tissu utilisé pour le dosage	Réponse	Référence
[Acide alkylsulfonique] = 5 à 45 mg/l (à 90 min)	<i>Daphnia magna</i>	β galactosidase, estérase, trypsine	Organisme entier	Diminution des activités enzymatiques	(De Coen et Janssen, 1998)
[Lindane] = 0,5 à 6 mg/l (à 90 min)					
[Sodium pentachlorophenolate] = 0,1 à 2 mg/l (à 90min)					
[TBT] = 5 à 45 μ g/l (à 90min)					
[Cu] = 0,01 à 0,5 mg/l (7j)	<i>Macrobranchium rosenbergii</i>	Tryptase, pepsine, amylase, cellulase	Hépatopancréas	Diminution des activités enzymatiques	(Li et al., 2008)
Contexte de contamination minier	<i>Gammarus fossarum</i>	β galactosidase, estérase, trypsine, amylase, cellulase, β -glucosidase	Organisme entier	Diminution des activités enzymatiques sur les sites les plus contaminés	(Dedourge-Geffard et al., 2009) (*)
Contexte de contamination industriel	<i>Ochestia gammarella</i>	Estérase, amylase	Organisme entier	Diminution des activités enzymatiques sur les sites les plus contaminés	(Douhri et Sayah, 2010) (*)
[Ca ²⁺] / [Zn ²⁺] / [Cd ²⁺] / [Al ³⁺] / [Hg ²⁺] / [Cu ²⁺] = 1; 5 et 10 mM	<i>Farfantepenaeus subtilis</i> <i>Litopenaeus schmitti</i> <i>Litopenaeus vannamei</i>	Amylase	Intestin moyen	Chez les trois espèces : La présence de tous les ions testés inhibe l'activité de l'amylase exceptés la présence de Ca ²⁺ à 1mM qui augmente l'activité de l'enzyme	(Castro et al., 2012)
[Cu] = 0,5 à 50 μ g/l (5j)	<i>Gammarus pulex</i>	β -galactosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase	Organisme entier	Diminution des deux enzymes testées (dès 1 μ g/l pour la β -galactosidase, dès 2,5 μ g/l pour la N-acetyl- β -glucosaminidase)	(Lebrun et al., 2012)
[Cd] = 7,25; 14,5 et 29 mg/l (4j)	<i>Sinopotamon henanense</i>	Sucrase, lactase, maltase, amylase, trypsine, pepsase	Estomac, intestin, hépatopancréas	Pour toutes les enzymes (exceptée la trypsine) diminution de l'activité quel que soit le tissu Pour la trypsine, l'activité augmente à 7,25 alors qu'elle diminue à 29 mg/l	(Wu et al., 2013)

Synthèse de la partie 1

Les réponses biologiques, en relation avec le métabolisme énergétique, présentées au cours de cette première partie interviennent à différents niveaux de l'organisation biologique. Les enzymes digestives, les réserves énergétiques et la CEA sont des marqueurs sub-cellulaires ayant des réponses relativement rapides face à la contamination mais présentant une faible pertinence écologique. Les budgets énergétiques cellulaires (AEC) et ceux alloués à la croissance et à la reproduction (AECR) sont placés à un niveau d'organisation supérieur, et présentent une pertinence écologique plus élevée (**Figure I-2**). L'AEC a fait l'objet de plusieurs travaux établissant un lien entre la variation de ces réponses et des réponses à l'échelle de l'individu ayant des répercussions directes au niveau populationnel (De Coen et Janssen, 2003b). Cette démarche de couplage des biomarqueurs situés à différents niveaux d'organisation biologique semble pouvoir s'appliquer aux réponses liées avec le métabolisme énergétique et permet de valider la pertinence écologique des biomarqueurs étudiés.

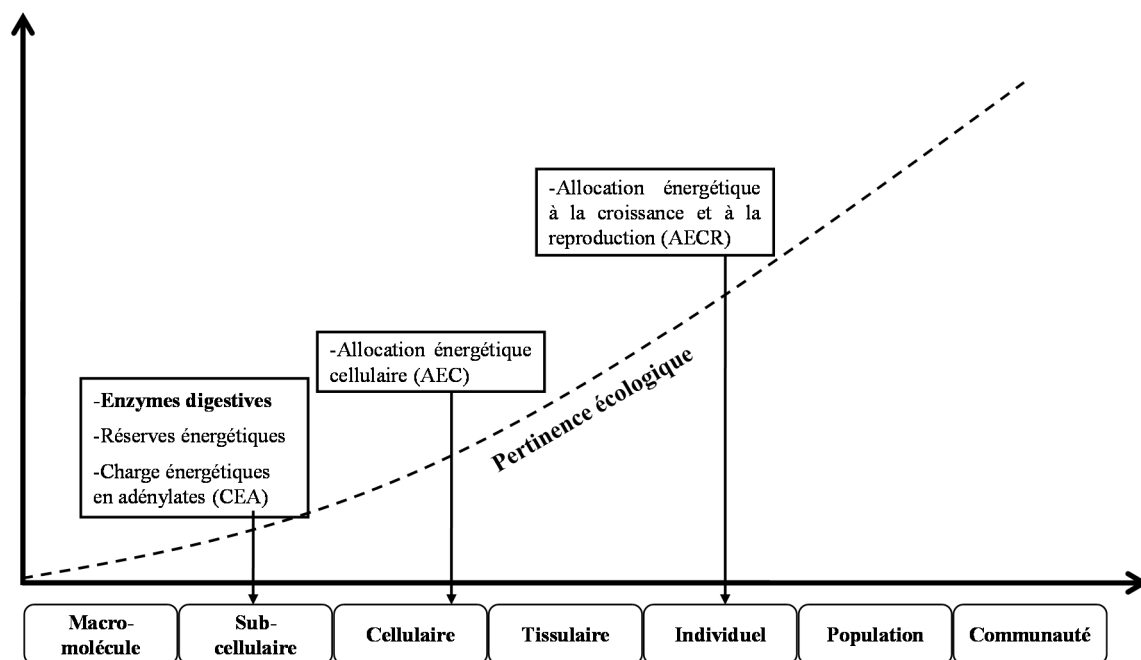


Figure I-2: Biomarqueurs en lien avec le métabolisme énergétique selon le niveau d'organisation biologique. Modifiée d'après Durou et al. (2008)

2. Influence des facteurs environnementaux et intrinsèques à l'organisme sur les marqueurs du métabolisme énergétique

Une des principales limites dans l'utilisation des biomarqueurs réside sans doute dans la variabilité adaptative des réponses biologiques soumises aux changements. En effet, un des verrous scientifiques dans l'interprétation des données se situe dans la difficulté à discriminer les modulations dites « naturelles » des réponses, de celles liées à un stress chimique.

En effet, l'ensemble des réponses biologiques acquises au cours de travaux réalisés sur des organismes en conditions naturelles ou contrôlées est soumis à l'influence de facteurs appelés « facteurs de confusion ». Ces facteurs peuvent être de natures abiotiques (la température, la salinité, le pH, le taux d'oxygène...) et/ou biotiques (le sexe, le stade de développement, la taille, la privation alimentaire...).

D'après la littérature, les biomarqueurs en relation avec le métabolisme énergétique évoqués dans la partie précédente n'échappent pas à l'influence de ces facteurs de confusion.

2.1. La charge énergétique en adénylate

D'après Giesy et al. (1981) la CEA possède quatre propriétés permettant de détecter les stress sublétaux et leur sévérité chez les organismes. La CEA présente un caractère universel puisqu'elle peut être mesurée chez tous les organismes vivants ; elle est intégratrice du métabolisme puisqu'elle prend en considération les processus d'anabolisme et de catabolisme. Elle a également la particularité de donner une valeur chiffrée associée à un état physiologique de l'organisme. Et surtout elle a une réactivité aux stress. Tous types de stress peuvent modifier la CEA en augmentant l'utilisation de l'énergie et en s'associant aux mécanismes de défense. Ainsi, de nombreux facteurs environnementaux (température, oxygène, salinité...) ou propres à l'organisme (sexe, âge...) peuvent moduler la CEA.

Parmi ces facteurs, la **variation saisonnière** a été de nombreuses fois considérée chez les mollusques, car le cycle de reproduction de ces organismes est synchronisé avec celui des saisons. Ainsi chez des bivalves d'eau douce, *Anodonta imbecillis* et *Corbicula fluminea* ou d'eau de mer *Crassostrea gigas*, les observations sont identiques : la CEA est élevée avant la période de reproduction et diminue particulièrement au moment de la ponte, traduisant un épuisement de l'organisme lié à la gamétogénèse (Giesy et Dickson, 1981,

Moal et al., 1987, Moal et al., 1989, Moal et al., 1991). Les résultats concernant l'effet saisonnier sur la variation du CEA chez le crustacé *Procambarus acutus acutus* montrent une augmentation de la CEA pendant la période de reproduction, ce qui a été interprété comme une demande énergétique accrue liée au comportement sexuel (l'accouplement et les combats entre mâles) (Dickson et Giesy, 1982). Il semble apparaître que l'étude des variations saisonnières du CEA n'est pas associée directement avec les conditions environnementales mais plutôt avec l'état physiologique des organismes.

Concernant l'effet de **la privation alimentaire** chez les mollusques, les résultats semblent assez variables. D'après les résultats obtenus chez *Crasostrea gigas*, les huîtres nourries présentent une CEA supérieure aux organismes non nourris (Moal et al., 1991, Delaporte et al., 2006). Cependant chez la moule *Mytilus edulis*, Wijsman (1976) n'a pas observé de différence de la CEA entre organismes nourris ou non. Chez les crustacés *Procambarus clarkii* et *Orconectes inermis*, une privation alimentaire de 45 jours n'a pas entraîné de modification de la CEA.

D'autre part, d'après les travaux de Wijsman (1976), **l'anoxie** influence de manière importante les valeurs de la CEA chez *Mytilus edulis*. Dans le muscle, la CEA passe de 0,91 en condition aérobie à 0,24 en anaérobie. Barthel (1984) a montré la même chute de la CEA chez trois espèces de bivalves face à l'anoxie. Cependant, la réaction peut être différente selon l'espèce considérée. Ellington (1981) a ainsi observé chez l'anémone *Bunodosoma cavernata*, en condition d'anoxie, une chute rapide de la CEA puis une stabilité, comme si l'organisme s'accommodait du stress en se maintenant dans un état métabolique de survie.

D'autres études s'intéressant aux effets de **la température** et de **la salinité** ont mis en évidence des modulations de la CEA. Ivanovici (1980a) a pu observer chez le gastéropode *Pyrazus ebeninus* en laboratoire, une chute de la CEA après 24 heures d'exposition à une salinité inférieure à 20‰ et une CEA 20% plus faible à 29°C par rapport à 20°C. Rainer et al. (1979) ont également mis en évidence chez trois espèces de mollusques estuariens une diminution moyenne de 17% de la CEA lorsque les organismes passaient d'une salinité de 35‰ à 10‰. Il apparaît également que certaines espèces issues du même milieu répondent de manière différente au même stress. Barthel (1984) a ainsi mis en évidence qu'une augmentation de 5 à 15°C entraîne une augmentation de la CEA chez *Macoma calcarea* et une diminution chez *Astarte borealis*. Plus récemment, Ivanina et al. (2013) n'ont pas

observé de différence de CEA chez *Crassostrea virginica* et *Mercenaria mercenaria* liée aux températures testées (22 et 27°C). Chez le crustacé *Macrobrachium nipponense*, Wang et al. (2006) n'ont pas observé de corrélation entre la variation du CEA et celle de la température.

Enfin, chez les crustacés **la mue** est un évènement qui semble perturber la CEA, en effet chez *Macrobrachium nipponense*, les valeurs de CEA sont plus élevées au stade A (0,88) et au stade D2 (0,89) respectivement après et avant la mue. Les valeurs les plus faibles sont quant à elles observées à l'intermue C (0,68) (Wang et al., 2003). L'effet du **pH** a été étudié chez la crevette *Penaeus chinensis* et les résultats observés montrent que la CEA est plus élevée pour un pH supérieur à 6 et inférieur à 8,5. Le pH semble jouer sur la consommation ou la production d'énergie chez l'organisme. Malgré des sensibilités interspécifiques *a priori* différentes, Dickson et Giesy (1981) n'ont pas observé de différence de CEA entre cinq espèces de crevettes échantillonnées dans cinq habitats différents. Parallèlement aux facteurs déjà évoqués, Marazza et al. (1996) citent plusieurs facteurs pouvant influencer le CEA dont le **temps d'exposition** des organismes à un stress, leur classe d'**âge** et leur **histoire de vie**.

2.2. Les réserves énergétiques

Les trois différents types de réserves énergétiques (lipides, sucres et protéines) peuvent varier de façon différente en fonction de l'organisme (sexe, stade de développement...) et de paramètres environnementaux (disponibilité en nourriture, température...). Les études s'intéressant aux réserves énergétiques chez les crustacés ont mis en évidence une forte influence de certains paramètres.

Le **sexe** et le **cycle reproducteur** des organismes influencent de manière importante les réserves énergétiques. Chez le crabe *Ocypode quadrata*, la variation du glycogène au cours d'une année montre chez le mâle une augmentation de celui-ci en hiver dans l'hépatopancréas, tandis que chez la femelle le glycogène augmente dans le muscle au printemps puis chute dans les gonades en été. Le stockage et la consommation du glycogène dépend de l'intensité de l'activité au cours de l'année (Vinagre et al., 2007). Chez *Gammarus roeseli*, la quantité moyenne de lipides est supérieure chez les femelles par rapport aux mâles et celle-ci est corrélée négativement à la **température** (Sroda et Cossu-Leguille, 2011b, Gismondi et al., 2012a). Ainsi des facteurs abiotiques influencent plus ou moins directement les réserves énergétiques. Par exemple, l'analyse des réserves

énergétiques de trois espèces de crevette vivant dans la même zone géographique mais à des **profondeurs différentes** a révélé que les deux espèces vivant à moins grande profondeur (*Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris*) présentent des quantités de glycogène, de lipides et de protéines supérieures à la troisième espèce (*Nephrops norvegicus*) (Rosa et Nunes, 2002). Cette précédente étude montre également que pour les trois espèces étudiées la composition biochimique des organismes est synchronisée avec une **activité saisonnière** liée à la disponibilité en nourriture. En effet chez les trois espèces de crevette la quantité de protéines des individus est corrélée positivement à la **disponibilité en nourriture** (Rosa et Nunes, 2002). Parallèlement, chez *Nephrops norvegicus* en hiver, les organismes présentent un faible taux de glycogène associé à un système digestif vide. Rosa et Nunes (2003) soulignent également que la maturation gonadique et la période de reproduction des organismes sont directement influencées par l'activité alimentaire saisonnière. Des observations réalisées chez deux espèces d'amphipodes du genre *Hyalella* coexistant dans le même habitat ont montré que leurs réserves énergétiques au cours de l'année reflètent (i) une différence dans leur régime alimentaire et (ii) un cycle de reproduction décalé dans le temps (Dutra et al., 2007). *Hyalella castroi* présente ainsi un niveau de glycogène plus faible que *Hyalella pleoacuta*, cette différence peut être liée au régime alimentaire riche en protéines de la première espèce vivant à proximité du sédiment et de la matière organique déposée. La seconde espèce évolue dans la colonne d'eau et se nourrit davantage de végétaux. Par ailleurs, un pic de polysaccharides apparaît en automne chez les femelles *Hyalella pleoacuta* et en hiver chez les femelles *Hyalella castroi*. Cette variation correspond à la période de reproduction de chacune des deux espèces. Ceci montre bien la relation intime existant entre la nourriture, le cycle reproducteur et les réponses énergétiques des organismes (Dutra et al., 2007). D'autres résultats soulignent le lien entre les réserves et la privation alimentaire. Par exemple, chez les crustacés, la chute des protéines est souvent associée à la perte de la masse musculaire en période de jeûne (Barclay et al., 1983). De même, l'accumulation des réserves lipidiques chez les femelles est souvent corrélée avec la maturation ovarienne notamment chez les gammaridés (Clarke et al., 1985). Ainsi, d'après l'étude de Dutra et al. (2008) menée chez l'amphipode *Hyalella curvispina*, les réserves lipidiques chez cet organisme sont allouées préférentiellement à la reproduction tandis que le glycogène et les protéines serviraient lors d'activités intenses ou pour permettre l'adaptation à des variations de conditions environnementales. Chez les gammaridés, Sroda et Cossu-Leguille (2011b) et Gismondi et al. (2012a) ont montré que chez *Gammarus*

roeseli les réserves énergétiques sont élevées (i) en automne lors de la chute des feuilles qui constituent un apport alimentaire non négligeable, et (ii) en hiver où le métabolisme soumis à de faibles températures est réduit et consomme peu d'énergie. Au printemps et en été durant la période où la reproduction est la plus fréquente, la demande énergétique est importante et les réserves chutent considérablement.

Enfin, selon Gismondi et al. (2012b), de nombreuses études ont souligné l'effet des **parasites** en tant que facteurs de confusion sur la physiologie des organismes infectés vivant en eau douce. Une première étude chez le bivalve *Dreissena polymorpha* a montré que des parasites avaient des effets sur le système lysosomal et sur les lipides neutres (Minguez et al., 2009). Une seconde étude de terrain, réalisée chez ce bivalve a également montré que le parasitisme semblait avoir un effet significatif sur les réserves énergétiques de la femelle et que ce stress pouvait s'associer à l'impact de la qualité des sites (Minguez et al., 2012). Chez les arthropodes, le comportement alimentaire des organismes peut être également affecté par des parasites tels que *Pomphorhynchus laevis* (McCahon et al., 1991, Pascoe et al., 1995). Plaistow et al. (2001) ont observé chez des gammarés parasités par *Pomphorhynchus laevis* une baisse significative des réserves lipidiques uniquement chez les gammarés femelles gravides et une augmentation du glycogène quel que soit le sexe et le stade reproducteur considéré.

2.3. L'allocation énergétique cellulaire

Des études ont abordé la variation « naturelle » de l'AEC chez les invertébrés aquatiques. Les premiers résultats obtenus par Verslycke et Janssen (2002) sur l'impact de trois facteurs abiotiques (température, concentration en oxygène dissout et salinité) sur l'AEC de *Neomysis integer* ont montré une corrélation négative entre l'augmentation de **température** et les valeurs de l'AEC. D'après les auteurs, cet effet de la température est lié au changement rapide de ce paramètre au cours de l'expérience (d'une durée de 4 jours) qui n'est pas représentatif de la variation naturelle subie par les organismes en milieu naturelle. Ainsi chez *Neomysis integer*, le métabolisme énergétique n'est pas significativement affecté par les facteurs abiotiques testés ni par leurs interactions. Une seconde étude concernant l'AEC chez *Neomysis integer* a démontré que la **variation saisonnière** a une influence sur le marqueur (Verslycke et al., 2004a). Les valeurs de l'AEC au printemps sont significativement supérieures à celles mesurées en hiver. Cet effet saisonnier serait directement lié au cycle reproducteur des organismes qui est arrêté

durant l'hiver et qui reprend au printemps. Ainsi la chute de l'AEC durant la période hivernale traduirait l'absence de besoin énergétique pour la reproduction (Verslycke et al., 2004a). De la même manière une étude menée sur un cycle de vie (2 ans) de l'espèce *Onisimus litoralis* a montré des valeurs de l'AEC supérieures en été, ce qui correspond à la période où les femelles sont gravides (Nygård et al., 2010). Selon les auteurs de cette étude, l'AEC repose sur des réponses modulées de manière différente en fonction de l'espèce considérée, ceci entravant la généralisation rapide de l'utilisation de l'AEC en tant que biomarqueur. Cette idée est confirmée par les résultats de Erk et al. (2011) qui ont mis en évidence une influence différente de la **salinité** sur l'AEC de deux populations de *Mytilus galloprovincialis*. Les moules provenant d'un site estuarien présentent une AEC plus faible que les moules provenant d'un site côtier. Par conséquent la quantité d'énergie disponible pour la croissance, la reproduction ou les mécanismes de défense est inférieure chez les moules de l'estuaire par rapport à celles de la côte. Ainsi des organismes ayant des conditions de vie non optimales peuvent présenter une plus grande sensibilité aux stress.

2.4. L'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction

Parmi les facteurs pouvant moduler la réponse de l'AEER chez les organismes aquatiques, la **température** de l'eau fut abordée à plusieurs reprises et semble fournir des résultats différents selon l'espèce considérée et la gamme de température testée. Chez les mollusques bivalves plusieurs travaux semblent démontrer la tolérance de certaines espèces. Il n'y a pas de différence de l'AEER chez *Argopecten purpuratus* à 10 et 18°C (González et al., 2002), ce qui semble être confirmé par Navarro et al. (2000). L'AEER de *Brachiodontes pharaonis* ne semble pas non plus affectée par une gamme de température comprise entre 11 et 20°C (Sarà et al., 2008). Ces résultats s'opposent cependant à ceux obtenus par Sobral et Widdows (1997) qui ont mis en évidence une chute marquée de l'AEER avec des valeurs de 3,9 à 20°C et de -0,3 à 32°C chez *Ruditapes decussatus*. Cependant, nous pouvons souligner que la température maximale testée dans cette étude est bien supérieure à celles que ces organismes peuvent rencontrer dans leur milieu de vie. Chez des crustacés copépodes, *Acartia bifilosa* et *Acartia discaudata*, une étude a mis en évidence des réponses différentes de l'AEER en fonction des différentes températures rencontrées au cours de l'année (5°C en hiver, 10°C au printemps et à l'automne; 20°C en été). *A. bifilosa* présente une AEER supérieure à 10°C comparativement à 5 et 20°C, tandis que *A. discaudata* présente une AEER corrélée avec l'augmentation de température. Cette évolution de l'AEER chez ces deux espèces semble modulée avec leur comportement

annuel, puisque *A. bifilosa* entre en diapause durant l'été ce qui laisse supposer que ses besoins énergétiques soient plus faibles durant cette période de chaleur que ceux de *A. discaudata* qui est en pleine activité à ce moment de l'année (Chinnery et Williams, 2003). L'influence du **pH** sur l'AEER a été évoquée chez *Gammarus pulex*. Naylor et al. (1989) ont ainsi mis en évidence une AEER plus faible chez des organismes exposés à un pH de 5 en comparaison à ceux exposés à un pH de 7,6. La **privation alimentaire** semble influencer l'AEER chez l'ensemble des organismes étudiés (mollusques et crustacés). Chez *Ruditapes decussatus*, les expériences menées en laboratoire ont montré une augmentation de l'AEER significative avec la quantité de nourriture proposée (Albentosa et al., 1996). L'AEER peut également être influencée par la qualité de la nourriture. Navarro et al. (2000) ont mis en évidence chez *Argopecten purpuratus* des niveaux d'AEER supérieurs chez des organismes nourris avec un régime de microalgues supplémenté en lipides par rapport à ceux nourris avec des microalgues supplémentés en carbohydrates. Ces derniers organismes présentent eux même une AEER supérieure à celle des organismes nourris uniquement avec des microalgues. Chez les crustacés, Smolders et al. (2005) ont également montré une augmentation de l'AEER hyperbolique avec la quantité de nourriture fournie à *Daphnia magna* durant 15 jours. D'autre part, plusieurs études ont montré que les valeurs de l'AEER étaient représentatives de la tolérance des organismes exposés à la **salinité**. Le mollusque *Brachidontes pharonis* présente une AEER positive pour une gamme de salinité comprise entre 25 et 60 ‰ à 20°C (Sarà et al., 2008). Normant et Lamprecht (2006) ont testé l'effet d'une gamme de salinité (5 à 30 ‰) sur *Gammarus oceanicus* provenant de la mer Baltique ayant une salinité de 7‰. Les valeurs maximales d'AEER ont été mesurées chez les organismes exposés à la plus faible salinité tandis que ces valeurs étaient réduites de 50% pour ceux exposés aux salinités les plus fortes. Dans cette étude, la baisse de l'AEER en condition de salinité extrême est liée à une baisse de 47% de la prise alimentaire. Parallèlement, Guerin et Stickle (1992) ont mis en évidence des valeurs maximales d'AEER différentes pour deux populations de *Callinectes sapidus*. La population vivant en eau saumâtre présente une AEER maximale pour une salinité de 10 à 25‰, tandis que la population vivant en eau salée présente une AEER maximale à une salinité de 35 à 50‰. Les auteurs ont également noté que les larves de cette espèce peuvent vivre dans les deux milieux. Il semble donc que l'AEER soit soumise à l'acclimatation des organismes et que pour une même espèce les conditions optimales soient variables. Aussi, la **quantité d'oxygène** présente dans le milieu a été considérée dans plusieurs travaux menés sur l'AEER. Wu et Or (2005) ont exposé l'amphipode *Melita*

longidactyla à plusieurs concentrations d'oxygène dissout (2,8; 3,5; 4,5 et 7,5 mg/l) sur plusieurs semaines. Les résultats montrent que les organismes placés pendant une semaine à 3,5 et 4,5 mg/l d'oxygène dissout puis replacés en normoxie ne montrent pas de changement de l'AECR par rapport aux organismes toujours placés en normoxie. Cependant, il apparaît que les organismes exposés durant trois semaines à 3,5 mg/l d'oxygène présentent une diminution significative de l'AECR. Cette diminution de l'AECR peut être liée à la chute du taux d'alimentation des organismes soumis à l'anoxie. En effet, Maltby et al. (1990) ont montré chez *Gammarus pulex*, une réduction de 70 % de la prise de nourriture chez des gammarus exposés durant 6 jours à une concentration en oxygène dissout égale à 5 mg/l. La chute de l'AECR liée au manque ou à l'absence d'oxygène dans le milieu a également été mise en évidence chez *Callinectes sapidus* et *Stramonita haemastoma* (Das et Stickle, 1993). Deux études menées sur des mollusques bivalves abordent les **variations saisonnières** de l'AECR. D'après Thompson (1984) une population de *Mytilus edulis* en zone subarctique présente une AECR positive toute l'année avec des valeurs plus élevées en hiver et au printemps. Cette variation de l'AECR au cours de l'année chez les bivalves a également été mise en évidence par Helson et Gardner (2007). Dans cette étude, les auteurs mettent en relation la variation des quantités de seston disponible dans le milieu au cours de l'année avec la modulation de l'état énergétique des organismes (Helson et Gardner, 2007). Il est ainsi important de considérer d'une part les périodes d'acquisition et de stockage de l'énergie et d'autre part les périodes d'utilisation de celle-ci.

2.5. Les enzymes digestives

2.5.1. Influence des facteurs abiotiques

De manière générale, la quantité d'enzymes produites chez les organismes est positivement corrélée avec la **température** (Galgani, 1985, Brock et al., 1986). Cependant, la réponse des enzymes digestives par rapport à la température du milieu est spécifique selon l'enzyme et l'espèce considérées. Une étude expérimentale de Galgani (1985) sur l'activité des protéases digestives chez *Penaeus japonicus* a montré (i) une augmentation globale des activités corrélée à l'augmentation de la température du milieu, (ii) l'existence de diverses voies possibles de régulation des enzymes. Tandis que la trypsine présente des modifications de son activité catalytique, la leucine aminopeptidase présente un taux de synthèse différentiel de ces isoenzymes. Des régulations identiques de la trypsine ont été mentionnées chez *Actinia equina* (Van Praët, 1982). L' α -amylase et la lactate deshydrogénases présentent le même mécanisme chez *Palaemon serratus* (Van Wormhoudt, 1980, Thébault et al., 1980). La synthèse d'isoenzyme « froide » ou « chaude » (en relation avec la température du milieu) a également été décrite pour la leucine aminopeptidase chez l'annélide *Scolecopsis fuliginosa* (Guérin et Kerambrun, 1982). Par ailleurs, l'étude de l'effet de la température du milieu sur l'activité digestive a été souvent menée de manière indirecte en considérant l'effet des variations saisonnières sur les enzymes. Plusieurs suivis de variations saisonnières ont ainsi été effectués chez les bivalves (Ibarrola et al., 1998, Palais et al., 2012) et les crustacés (Stuart et al., 1985, Guarna et Borowsky, 1995). Il semblerait que chez les bivalves, l'activité soit souvent corrélée à la température du milieu. Ibarrola et al. (1998) ont observé chez *Cerastoderma edule* des activités enzymatiques digestives plus faibles au mois de février et plus élevées au mois de mai, respectivement lorsque les températures des eaux sont à leur minimum et à leur maximum. Chez les crustacés, Guarna et Borowsky (1995) n'ont pas pu mettre en évidence d'effet de la température, du pH ou de la salinité sur les isoenzymes de l'amylase chez *Gammarus palustris*. Stuart et al. (1985) ont pu observer une modulation saisonnière des activités enzymatiques chez *Corophium volutator* liée à la variation de la ressource alimentaire. Cependant, chez certaines espèces, la température peut avoir une influence considérable. Par exemple, entre la mer de Chine et la mer Jaune, chez le copépode *Calanus sinicus*, Han et al. (2002) ont montré une corrélation négative entre les niveaux d'activités amylase et protéase et la température de l'eau. Cette espèce qui entre en diapause lorsque la température du milieu excède 25°C présente alors des niveaux

d'activités enzymatiques faibles. Des résultats similaires ont été observés durant l'estivage du concombre de mer *Apostichopus japonicus* (Gao et al., 2009).

Chez les crustacés pénéidés, les activités enzymatiques digestives sont aussi modulées par un **rythme circadien** lié à la photopériode qui change selon la saison. En hiver chez *Palaemon serratus* quand les photopériodes sont inférieures à 12h, l'activité enzymatique présente un pic diurne et nocturne. En été, où les photopériodes sont plus longues, des pics d'activité secondaires apparaissent parallèlement aux pics principaux (Van Wormhoudt, 1977). Néanmoins, ce rythme diurne n'a pas été clairement établi chez de nombreuses espèces. L'activité des enzymes digestives peut également être modulée par la lumière. **L'intensité lumineuse** peut avoir des effets stimulant ou inhibant selon les enzymes et les iso-enzymes considérées chez *Palaemon serratus* (Trellu et Ceccaldi, 1980). Selon Van Wormhoudt et Malcoste (1976) la longueur d'onde de l'éclairage a une influence sur l'activité des enzymes digestives, chez *Palaemon serratus*. Ainsi, les **longueurs d'onde** vertes stimulent les activités tandis que les rouges les inhibent.

2.5.2. Influence des facteurs biotiques

La quantité et la qualité de la nourriture

La production des enzymes digestives est intimement liée au **régime alimentaire** des organismes. Plusieurs exemples chez les crustacés montrent que le niveau des activités des enzymes digestives est fonction de la présence du substrat dans l'alimentation (Gaudy et Boucher, 1983, McClintock et al., 1991, Brêthes et al., 1994, Ceccaldi, 1998, Moss et al., 2001, Johnston et al., 2005). Chez différentes espèces de crabes, Johnston et Freeman (2005) ont observé des activités enzymatiques digestives adaptées au régime alimentaire des organismes. Par exemple, *Petrolisthes elongatus* qui consomme principalement des algues brunes présente des activités laminarase et β -galactosidase élevées, tandis que *Nectocarcinus tuberculosus* présente une activité chitinase importante lui permettant de digérer les carapaces des invertébrés consommés. Bien que de nombreuses données semblent étayer l'hypothèse d'une corrélation positive entre la présence d'un substrat et l'activation de l'activité enzymatique associée, il existe quelques données contradictoires pour différentes espèces de crustacés (Kumlu et Jones, 1997, Gutow et al., 2006). Hassett et Landry (1983) ont observé chez des copépodes *Calanus pacificus*, soumis à différents niveaux de nourriture (diatomées), que les niveaux d'activités enzymatiques glycolytiques (cellobiase et maltase) étaient les plus élevés pour les organismes acclimatés aux plus

faibles concentrations de nourriture. De même Ong et Johnston (2006) n'ont pas observé de différence entre les activités enzymatiques digestives des crevettes *Penaeus monodon* nourries et non nourries durant 8 heures. Ces résultats suggèrent (i) qu'une sécrétion enzymatique maximisée permettrait d'optimiser la digestion et l'absorption du composé peu présent dans la nourriture de l'organisme, (ii) que le maintien d'une activité enzymatique digestive en absence de nourriture puisse permettre une assimilation immédiate et efficace de la nourriture lorsqu'elle se présentera. De la même manière, Rodriguez et al. (1994) ont observé une augmentation de la trypsine chez *Penaeus japonicus* quand les organismes sont nourris avec une alimentation pauvre en protéines. Cependant les effets du **jeûne** sur les crustacés semblent donner lieu à des résultats contradictoires selon l'espèce considérée. En effet chez *Penaeus vannamei* une privation alimentaire de 120 heures a engendré une chute significative des activités de la trypsine et de la chymotrypsine (Muhlia-Almazan et García-Carreño, 2002).

Chez les mollusques, les organismes semblent aussi pouvoir adapter leur activité enzymatique digestive en fonction de la nourriture disponible dans le milieu (Labarta et al., 2002). Plusieurs études suggèrent que chez les organismes subissant un stress nutritionnel les activités enzymatiques digestives sont plus fortes que chez les individus non stressés (Ibarrola et al., 1998, Palais et al., 2012).

Chez les invertébrés, les **variations ontogéniques** entraînent des modifications morphologiques, physiologiques et comportementales importantes. Ainsi, au cours de ces changements de stade, les régimes alimentaires et les activités enzymatiques digestives peuvent être modifiés (Le Vay et al., 2001, Johnston et al., 2004). En effet, chez les décapodes, le développement du tractus digestif et de l'hépatopancréas présente une influence considérable sur l'activité des enzymes digestives (Lovett et Felder, 1990a, b, Kamarudin et al., 1994, Jones et al., 1997, Dai et al., 2009). Johnston (2003) a observé une décroissance de l'activité amylase et une augmentation de l'activité trypsine chez *Jasus edwardsii* entre les stades juvéniles et adulte. Cependant, l'auteur ne relie pas ce changement à l'alimentation, puisque durant les stades précoces le juvénile ne s'alimente pas. Ce changement serait plutôt lié à des variations associées aux processus de développement de l'organisme. Une autre étude sur des juvéniles de crevettes *Litopenaeus vannamei* a mis en évidence une corrélation positive entre les activités amylase, chymotrypsine et lipase et le poids des individus (Gamboa-delgado et al., 2003). Une différence inter-sexe a également été évoquée par Gaudy et Boucher (1983) qui ont

constaté des différences au niveau de l'activité amylase chez les copépodes. Des activités amylase supérieures ont été observées chez les femelles ovigères qui s'alimentent davantage en algues pour satisfaire leurs besoins nutritionnels importants en phosphore.

Parallèlement aux phénomènes de métamorphose que l'on peut rencontrer chez les juvéniles, la **mue** chez les arthropodes adultes représente également un évènement majeur qui bouleverse les activités enzymatiques digestives (Van Wormhoudt, 1983, Al-Mohanna et Nott, 1989, Fernández et al., 1997, Muhlia-Almazan et García-Carreño, 2002). Chez les crustacés femelles matures, la mue est liée à la **reproduction** et au processus de vitellogénèse. Le lien entre le contrôle endocrine de la mue et son influence sur la synthèse des enzymes digestives n'a pas encore été établi notamment chez les crustacés (Dall et al., 1990). Plusieurs auteurs ont déjà montré des variations des activités enzymatiques digestives en fonction des cycles de mue et de reproduction chez différentes espèces de crevettes : *Palaemon serratus* (Van Wormhoudt, 1980), *Penaeus notialis* (Fernández et al., 1997), *Callinectes arcuatus* (Vega-Villasante et al., 1999), *Artemesia longinaris* (Fernández Gimenez et al., 2002), *Marsupenaeus japonicus* (Zilli et al., 2003) et *Farfantepenaeus duorarum* (Aragón-Axomulco et al., 2012). Ces variations différentes selon les enzymes considérées sont très probablement relatives à l'activité alimentaire des organismes. Cependant, juste avant la mue, quel que soit le crustacé considéré, le décollement de la cuticule entraîne la perte de la capacité à saisir et à ingérer la nourriture. De manière concomitante à ce phénomène, il semble que toutes les activités enzymatiques digestives chutent (Fernández Gimenez et al., 2001, Muhlia-Almazan et García-Carreño, 2002).

Enfin, selon Saffo (1992), l'**endosymbiose** peut profondément affecter l'écologie, la physiologie, le développement et le comportement des hôtes invertébrés. Dans le tractus digestif des organismes, la présence de micro-organismes (bactéries et champignons) qui participent à la digestion de certains composés alimentaires est bien connue (Gilles et al., 2006). La production endogène de cellulase chez plusieurs invertébrés aquatiques a été confirmée (Tanimura et al., 2013). Chez les crustacés, plusieurs études ont démontré la présence de cellulase endogène (Byrne et al., 1999, Gonzalez-Pena et al., 2002, Pavasovic et al., 2004, Johnston et Freeman, 2005). Chez les gammares, il semble que la présence de micro-organismes qui participent à la digestion soit démontrée (Monk, 1977, Bärlocher, 1982, Bärlocher et Porter, 1986). Néanmoins, une partie des études menées montre également la participation d'enzyme endogène dans le processus de digestion de la

cellulase (Monk, 1977, McGrath et Matthews, 2000, Zimmer et Bartholmé, 2003). D'autre part, la présence d'enzymes exogènes liées à la consommation de proies vivantes participe aux processus de digestion chez le prédateur. Ceci a été abordé récemment chez le crustacé *Scylla serrata* à différents stades de développement (Serrano Jr, 2012, 2013).

Synthèse de la partie 2

Il apparaît clairement qu'indépendamment de tout effet de contamination et quel que soit le biomarqueur considéré, des facteurs intrinsèques comme l'âge ou l'état reproducteur mais également des facteurs environnementaux tels que la température ou le niveau d'oxygénation influencent les réponses des biomarqueurs énergétiques (Durou et al., 2008). Ainsi même si les biomarqueurs sont largement étudiés dans le cadre de l'évaluation de la qualité des eaux, l'étude de l'influence des facteurs pouvant être de confusion est indispensable pour aboutir à une interprétation fiable de la mesure des biomarqueurs. Parmi la multitude de facteurs de confusion, la variation saisonnière semble être un paramètre particulièrement étudié. Cette variation représente à la fois l'influence de facteurs biotiques et abiotiques puisqu'elle fait intervenir des facteurs physiologiques (maturation, cycle de reproduction) et environnementaux (variation de température, d'oxygène, de nourriture). L'influence de chacun de ces facteurs sur les réponses biologiques peut être mesurée par des expérimentations en laboratoire. Cependant, une connaissance approfondie de l'organisme étudié est un prérequis essentiel.

3. Le modèle biologique *Gammarus fossarum*

3.1. Systématique, répartition et écologie

La systématique de *Gammarus fossarum* est présentée dans le tableau suivant (**Tableau I-8**) :

Tableau I-8 : Systématique de l'espèce modèle *Gammarus fossarum*

Règne	Animal
Embranchement	Arthropodes
Sous-embranchement	Crustacés
Classe	Malacostracés
Sous-classe	Péracarides
Ordre	Amphipodes
Famille	Gammaridae
Genre	<i>Gammarus</i>
Espèce	<i>fossarum</i> (Koch, 1835)

Au sein de l'ordre des amphipodes, la famille des Gammaridae comporte plus de 4500 espèces appartenant à 1000 genres environ. Parmi les Gammaridae, le genre *Gammarus* comporte plus de cent espèces d'eau douce (Karaman et Pinkster, 1977) dont *Gammarus fossarum*.

Gammarus fossarum est une espèce dulçaquicole largement répandue en Europe, mais également au nord de l'Asie Mineure (Karaman et Pinkster, 1977). D'après Barnard et Barnard (1983), l'aire de répartition de cette espèce s'étend principalement en Europe centrale (**Figure I-3**). Cependant, des études récentes ont mis en évidence une répartition plus vaste de *Gammarus fossarum* (Zivic et Markovic, 2007).

Les faibles exigences des gammars vis-à-vis de la qualité physico-chimique expliquent leur large répartition au sein des écosystèmes européens. Ces organismes peuvent vivre dans des eaux dont la température est comprise entre 0 et 25°C et peuvent supporter des concentrations relativement faibles en oxygène. Cependant, une concentration minimale en oxygène est nécessaire à leur survie (Maltby, 1995) puisqu'ils ne possèdent pas de voie métabolique anaérobie.

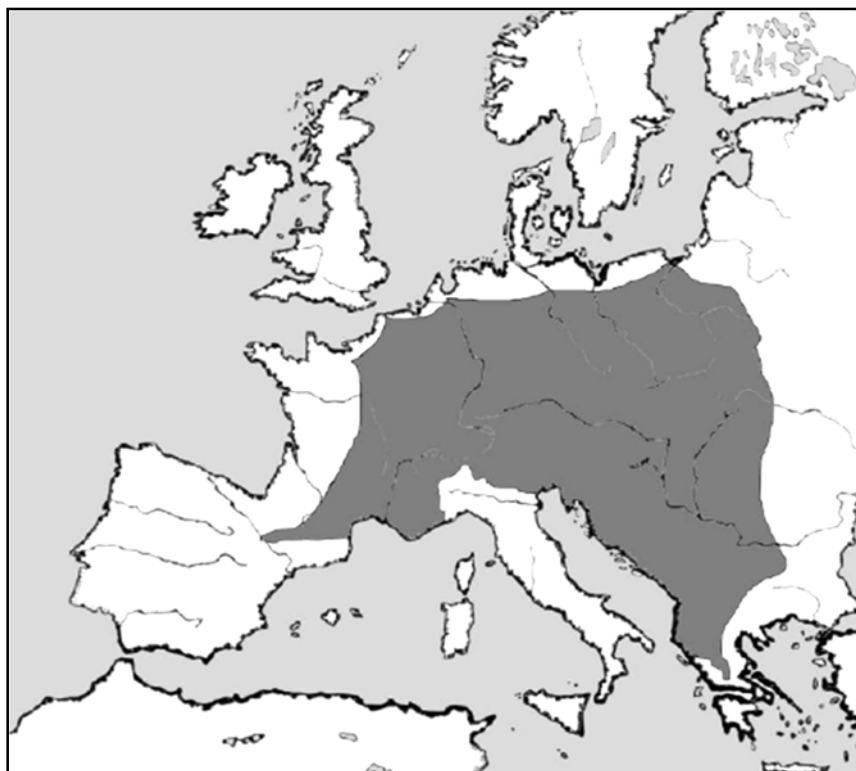


Figure I-3 : Aire de répartition géographique de *Gammarus fossarum* (Barnard et Barnard, 1983)

G. fossarum est présent dans les rivières et les ruisseaux caractérisés par un fort courant (milieux lotiques). Le gammare est également peu exigeant concernant la nature du substrat présent dans son habitat. On le trouve aussi bien en présence des substrats fins que grossiers. Néanmoins, il est souvent associé à la végétation et aux débris organiques (feuilles, mousses, racines) où il trouve nourriture, abris et supports pour s'accrocher (Haeckel et al., 1973). Dans certains cas la densité des gammares peut atteindre plusieurs milliers d'individus par m².

Le genre *Gammarus* est classé dans le groupe fonctionnel trophique des décheteteurs. Plusieurs constats permettent de confirmer que la ressource alimentaire « feuille » a une place majeure pour beaucoup d'espèces appartenant à ce genre. Par exemple, *Gammarus pulex* est capable de vivre et de croître en se nourrissant de feuilles stériles (Nilsson, 1974, Willoughby et Sutcliffe, 1976, Sutcliffe et al., 1981). Malgré tout, il a été noté que les gammares montrent une appétence supérieure pour des feuilles colonisées par la microflore bactériologique par rapport aux feuilles stériles. Par ailleurs, le bagage enzymatique digestif de ces organismes semble tout à fait adapté à la consommation de feuilles.

Chamier et Willoughby (1986) ont démontré chez *Gammarus pulex* la présence d'enzymes endogènes impliquées dans la dégradation de la paroi cellulosique des cellules végétales et fongiques.

Malgré cette capacité à se sustenter de feuilles, les gammaridae d'eau douce semblent en milieu naturel habitués à se nourrir de composés divers. De nombreux travaux ont mis en évidence le caractère opportuniste du genre *Gammarus* dans son alimentation (Willoughby et Sutcliffe, 1976, Macneil et al., 1997, 1999, Cruz-Rivera et Hay, 2000, Dick et al., 2002, Kelly et al., 2002). D'autres auteurs ont également mentionné la consommation de fèces (Willoughby et Sutcliffe, 1976) ainsi qu'une tendance à un comportement cannibale (Dick, 1995, Macneil et al., 1997, 1999). D'après Felten et al. (2008b), le régime alimentaire de *G. fossarum* est composé de débris végétaux fins et grossiers, de bryophytes, de diatomées, d'algues filamenteuses et de fractions animales. D'après Dangles (2000) cette espèce n'est qu'à 50% déchiquettrice. Il semblerait ainsi que les feuilles ne soient pas suffisantes pour combler les besoins nutritionnels des gammaridae ce qui suggère que ces organismes présentent plutôt un régime omnivore, utilisant des ressources alimentaires très variées afin d'augmenter leur « fitness » (DeLong et al., 1993, Felten, 2003).

3.2. Morphologie, clé de détermination

Comme chez l'ensemble des crustacés, les amphipodes du genre *Gammarus* présentent un corps métamérisés recouvert d'un exosquelette calcifié, des appendices articulés et deux paires d'antennes. Les amphipodes présentent une symétrie bilatérale, un corps aplati latéralement présentant une convexité dorsale régulière.

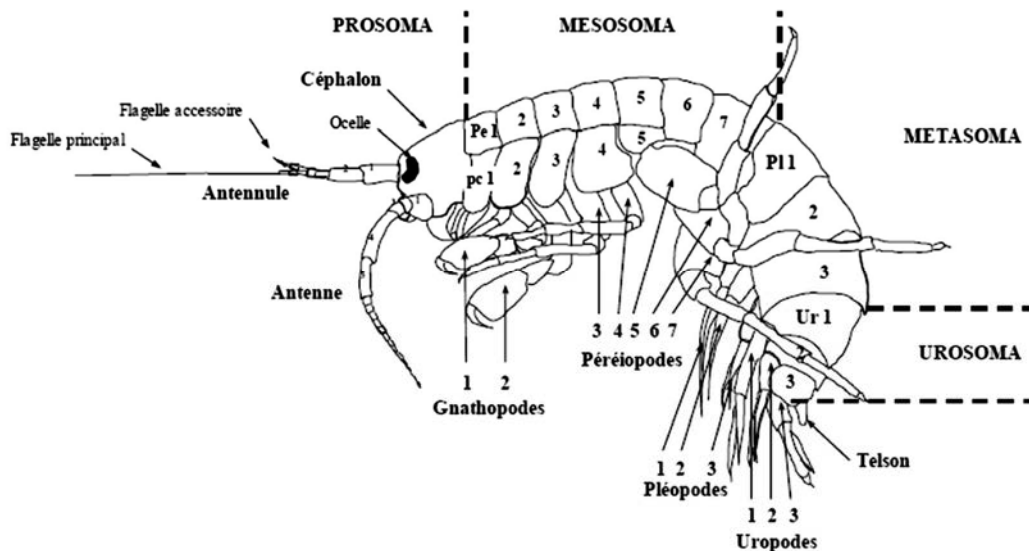


Figure I-4 : Vue latérale d'un Gammaridae, adaptée d'après Chevreaux et Fage (1970) et Roux (1970)

Pc 1-7 : plaques coxales 1-7; **Pe 1-7** : périomères 1-7; **Pl 1-3** : pléomères 1-3; **Ur 1-3** : uromères 1-3

Les amphipodes disposent d'une morphologie particulière, quatre régions ont été décrites (de l'avant vers l'arrière) : le **prosoma** qui correspond à la tête de l'organisme, le **mésosoma** qui reprend le thorax, puis le **métasoma** et l'**urosoma** qui composent l'abdomen (**Figure I-4**).

Le **prosoma** est composé d'une seule pièce, le céphalon, qui résulte de la fusion des métamères le constituant. Le céphalon porte latéralement deux gros yeux réniformes, sessiles et non mobiles appelés ocelles. Sur la partie supérieure du prosoma, à l'avant, s'insèrent une paire d'antennule et une paire d'antenne. Contrairement aux antennules les antennes sont des appendices sensoriels. Toujours à l'avant du prosoma, sur la partie inférieure, sont disposés cinq appendices masticateurs qui sont le labre, les mandibules, le labium, les maxillules et les maxilles.

Le **mésosoma** est composé de 7 métamères présentant chacun une paire d'appendices (péréiopodes) uniramés et articulés. Les deux premières paires sont les gnathopodes 1 et 2. Ces appendices ont un rôle essentiel dans la préhension. Les cinq autres paires de péréiopodes 3 à 7 ont une fonction exclusivement natatoire.

Les gnathopodes et péréiopodes sont composés des articles suivants (de la base à l'extrémité) : le coxopodite, le basipodite, l'ischiopodite, le méropodite, le carpopodite, le propodite, et le dactylopodite (griffe) (**Figure I-5**).

Chez la femelle gammaridae uniquement, la deuxième paire de gnathopodes ainsi que les péréiopodes 3, 4 et 5 portent des expansions lamelleuses au niveau des coxopodites nommés oostégites. Ces lamelles constituent le pourtour de la chambre incubatrice où les œufs fécondés pourront se développer jusqu'à l'éclosion. Cette cavité ventrale est également appelée marsupium. On trouve également dans cet espace confiné les branchies qui se positionnent entre la face ventrale et les appendices (**Figure I-5**).

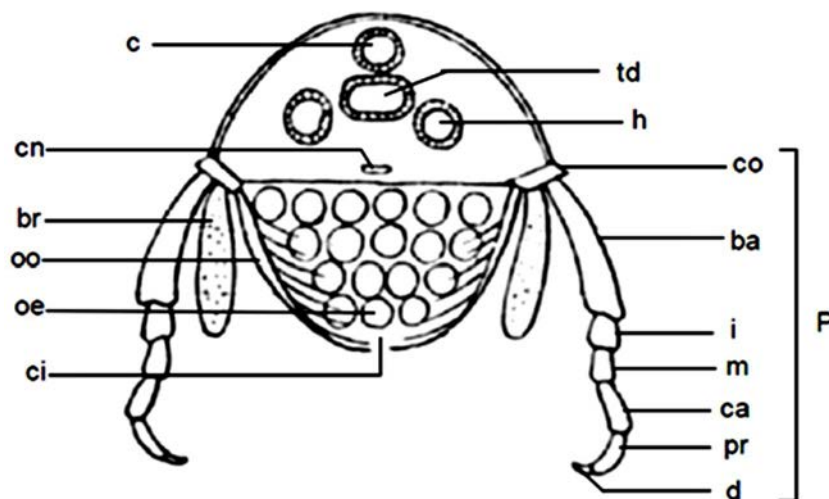


Figure I-5 : Schéma d'une coupe transversale au niveau du mésosoma d'une femelle de Gammaridae, adapté d'après Chevreaux et Fage (1970) et Xuereb (2009)

ba : basipodite; **br** : branchie; **c** : cœur; **ca** : carpopodite; **ci** : chambre incubatrice; **cn** : chaîne nerveuse; **co** : coxopodite; **d** : dactylopodite; **h** : caecum hépatique; **i** : ischiopodite; **m** : méropodite; **oe** : œufs; **oo** : oostégite; **pr** : propodite; **P** : péréiopode; **td** : tube digestif

Le **métasoma** est constitué de trois segments portant chacun une paire d'appendices biramés, les pléopodes. Ces appendices perpétuellement animés de mouvements synchronisés sont impliqués dans la locomotion mais également dans la ventilation des surfaces branchiales. Chez les femelles, les pléopodes ventilent aussi le marsupium.

L'**urosoma** se compose de trois segments chacun pourvus d'une paire d'uropodes biramés. Les uropodes ont une partie interne nommée endopodite plus courte que la partie externe appelée exopodite. Chez *Gammarus fossarum* l'uropode 3 possède des endopodites ayant une taille supérieure au 1/3 de l'endopodite (**Figure I-6**). Animé de mouvements saccadés, l'urosoma participe à la propulsion de l'organisme dans le milieu aquatique.

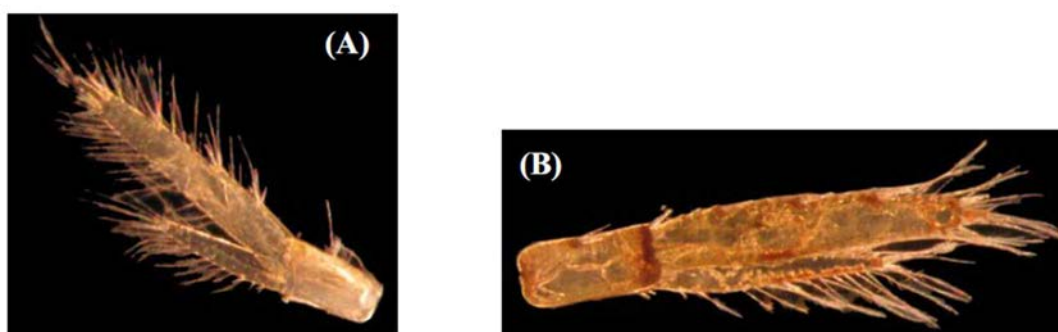


Figure I-6 : Uropode 3 de *G. fossarum* (A) et *G. pulex* (B) (Photographie: Herve Quéau - Guillaume Jubeaux / IRSTEA Villeurbanne)

La clef de détermination proposée (**Figure I-7**) présente les gammaridae communément rencontrés dans les milieux aquatiques européens. En France, *G. fossarum* et *G. pulex* sont considérés comme autochtones tandis que *G. roeseli*, *G. dubeni*, *G. tigrinus* et *G. lacustris* sont des espèces ayant plus ou moins récemment colonisé les systèmes aquatiques français (Adam, 2008). Parmi les espèces invasives, *Dikerogammarus villosus* est de plus en plus présent en Europe de l'ouest, sa présence entraîne la disparition des espèces autochtones. Cette espèce est actuellement trouvée sur le Rhône et la Saône (Bollache, 2003).

L'espèce *Gammarus fossarum* se caractérise par une cuticule non carénée et l'absence de rayures sur le corps. Elle présente très peu d'épines ou de soies sauf sur les antennes et l'extrémité de l'urosoma, de petites ocelles ovales et une rame interne faisant 1/3 de la rame externe au niveau de l'uropode 3 (**Figure I-6**) et enfin de longues soies insérées sur les antennes (Roux, 1970, Xuereb, 2009, Lacaze, 2011).

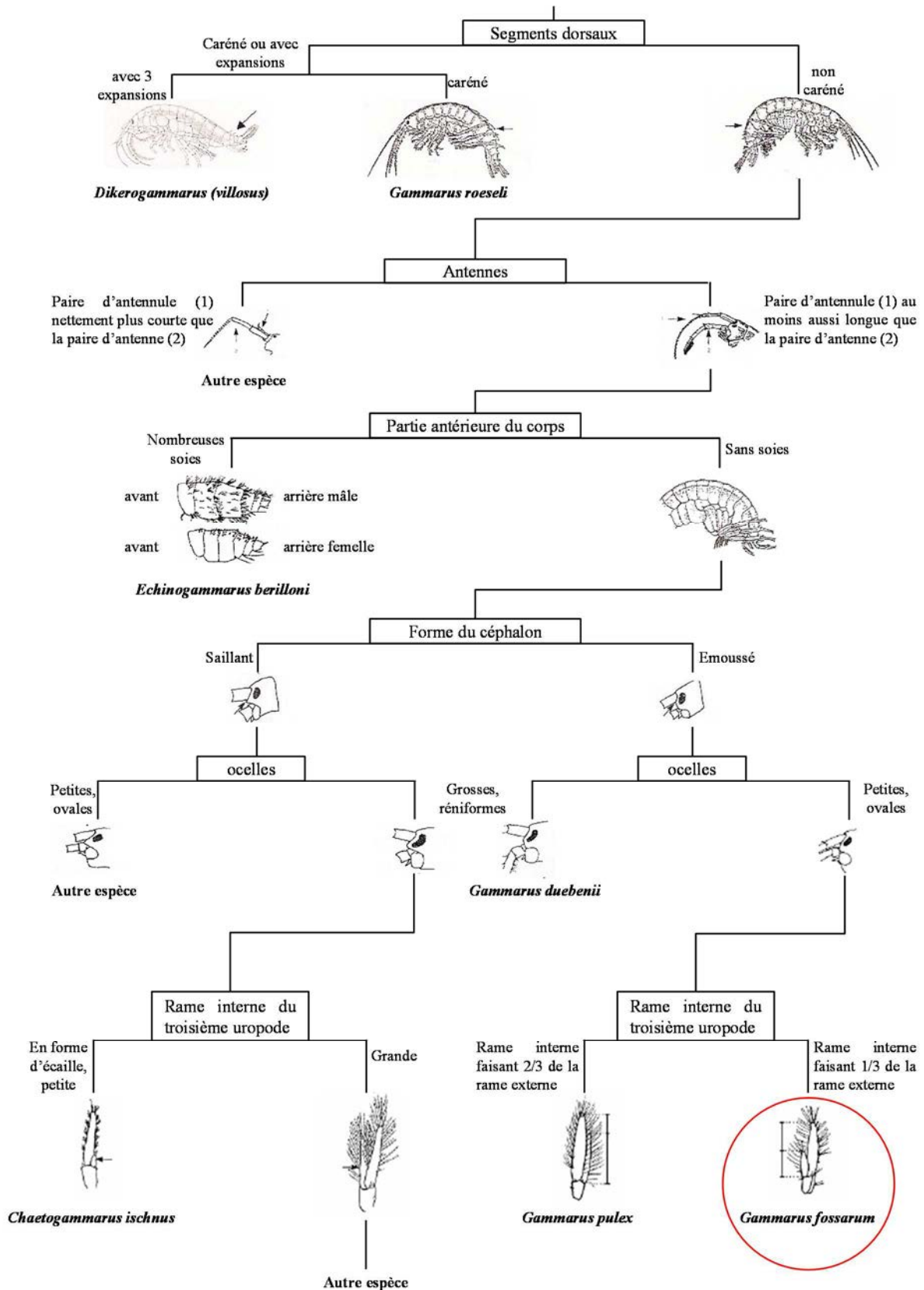


Figure I-7 : Clef de détermination de *Gammarus fossarum* (Felten, 2003)

3.3. Anatomie et biologie

3.3.1. Système nerveux et appareil circulatoire

Le système nerveux est constitué d'un protocérébrum ou cerveau relié à une longue chaîne nerveuse qui s'étend tout le long de la partie ventrale de l'organisme (**Figure I-8**). Au niveau du céphalon et de l'urosoma les ganglions nerveux sont fusionnés respectivement en masse suboesophagique et urosomique. Les ganglions sont reliés par des connexions nerveuses intersegmentaires et les appendices sont desservis par des filets nerveux (Chevreux et Fage, 1970, Schmitz, 1992, Felten, 2003).

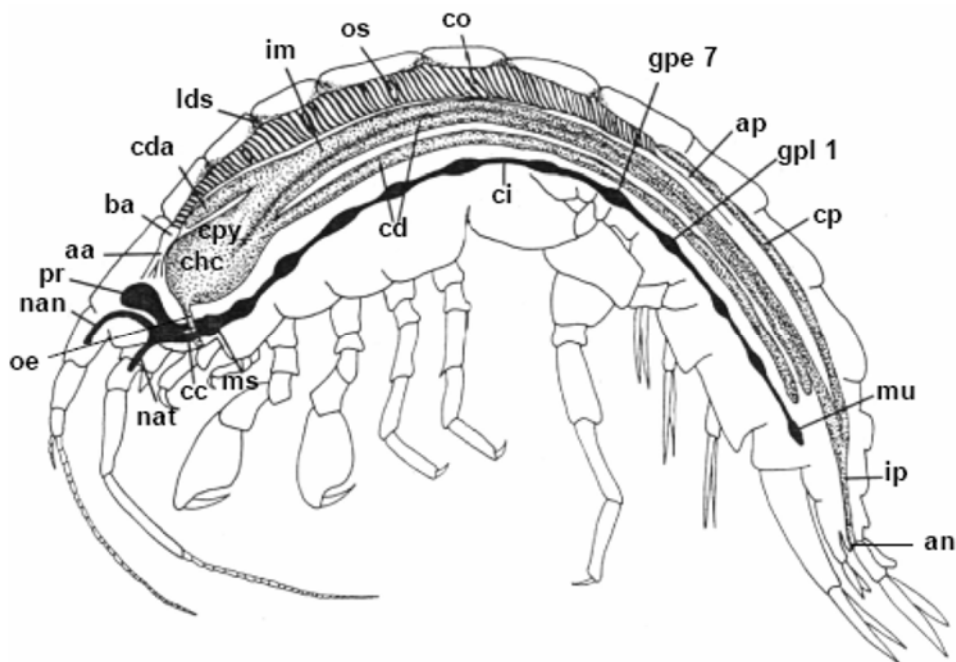


Figure I-8 : Coupe longitudinale de gammare illustrant les principaux organes (Schmitz, 1992)

aa : aorte antérieure; **an** : anus; **ap** : aorte postérieure; **ba** : bulbe artériel; **cc** : connexion circumoesophagiale; **cd** : caecum digestifs; **cda** : caecum dorsal antérieur; **chc** : chambre cardiaque; **ci** : connexion intersegmentaire; **co** : cœur; **cp** : caecum postérieur; **cpy** : chambre pylorique; **gpe 7** : ganglion péronique 7; **gpl 1** : ganglion pléonique 1; **im** : intestin moyen; **ip** : intestin postérieur; **lds** : ligament dorsal suspendu; **mu** : masse urosomique (fusion des ganglions abdominaux 4-6); **ms** : masse suboesophagique; **nan** : nerf antennulaire; **nat** : nerf antennaire; **oe** : oesophage; **pr** : protocérébrum

La circulation hémolympatique repose sur un cœur qui consiste en un tube ouvert à ses deux extrémités, ce système est situé en position dorsale. Le cœur est entouré d'un sac rempli d'hémolymphe nommé péricarde ou hémocoèle qui parcourt toute la longueur du mésosome (Felten, 2003).

L'hémolymphe est en contact direct avec les organes du corps. Ce liquide extra-cellulaire qui circule à travers tout l'organisme remplit de nombreuses fonctions. L'hémolymphe assure l'acheminement des éléments nutritifs vers les sites de métabolisation, mais également le transport des hormones et des produits d'excrétions (Chapman, 1998). Enfin, l'hémolymphe est un milieu où l'osmolarité est constante (environ 300 mOsmol) ce qui permet une répartition équilibrée de l'eau et des ions dans les cellules.

3.3.2. Appareil digestif et mécanismes de digestion

Anatomie du canal alimentaire

Chez *Gammarus pulex* le canal alimentaire peut être considéré en 3 parties : l'intestin antérieur (stomodéum), l'intestin moyen (mésentéron), et l'intestin postérieur (proctodéum). Les deux extrémités de l'intestin (stomodéum et proctodéum) sont intérieurement couvertes de cuticule, contrairement à l'intestin moyen (mésentéron). L'intestin antérieur inclut la bouche, l'œsophage et l'estomac. La bouche est une petite ouverture entourée de mandibules, maxilles et maxillipèdes, qui conduit à un œsophage tubulaire étroit qui s'ouvre vers la partie ventrale de l'estomac. L'estomac est divisible en deux parties : une partie antérieure appelée chambre cardiaque et une partie postérieure nommée chambre pylorique.

La chambre cardiaque sert de zone de broyage des aliments, en effet la nourriture semi-mastiquée arrive dans cet organe qui est muni de nombreuses structures (des crêtes chitineuses, des dents et des épines) permettant une digestion mécanique des aliments.

La chambre pylorique se compose de deux portions, une partie dorsale reliant la chambre cardiaque à l'intestin moyen et une partie ventrale où se trouve le filtre gastrique. Ce filtre ne laisse passer que les particules les plus fines du bol alimentaire. Il semblerait que comme pour les décapodes le trajet des particules alimentaires soit complexe au sein de l'estomac (Grassé, 1994a). Ainsi, les particules qui ne sont pas suffisamment broyées sont renvoyées vers la chambre cardiaque pour un nouveau broyage. Les particules assez fines à l'issue de cette digestion primaire sont dirigées vers l'intestin moyen.

L'intestin moyen s'étend du deuxième segment du mésosoma au premier segment du métasoma. Selon Agrawal (1965) et Correia et al. (2002), deux paires de caecum se positionnent ventralement de part et d'autre de l'intestin moyen au niveau de la jonction entre la chambre pylorique de l'estomac et le début de l'intestin moyen (**Figure I-9**). Cependant, selon d'autres auteurs les caecum se rejoignent dans la chambre cardiaque (Schultz, 1976, Schmitz, 1992). Selon Agrawal (1965), chez *Gammarus pulex*, les deux caecums situés le plus près de l'intestin s'achèvent au quatrième segment du métasoma tandis que ceux positionnés plus bas se terminent au niveau du sixième segment du métasoma. Les caeca ventraux sont les principaux sites de la digestion secondaire, et leur structure et fonction seront développées ci-après.

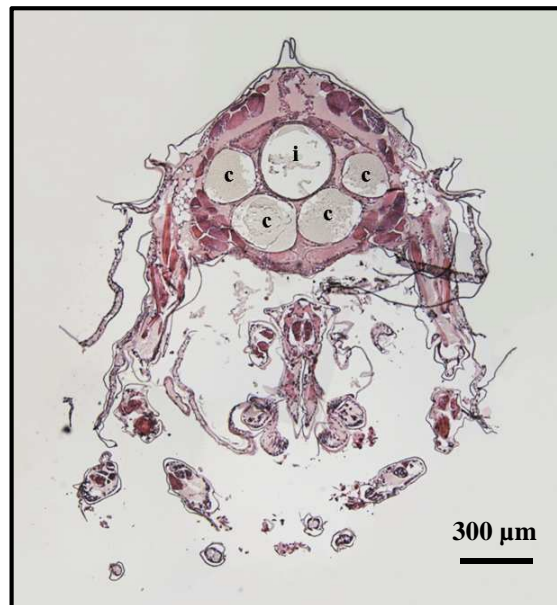


Figure I-9 : Coupe transversale du mésosoma de *Gammarus fossarum* (photographie personnelle). (i) intestin (c) caecum

Il existe également un caecum antérieur dorsal qui est ouvert sur le début de l'intestin moyen et qui se positionne au niveau antérieur au-dessus de l'estomac. Plusieurs études menées chez différentes espèces d'amphipodes semblent montrer que la contribution du caecum antérieur dorsal est très réduite dans les processus de digestion et d'absorption comparativement aux caeca ventraux (Icely et Nott, 1985). Certains auteurs évoquent un rôle possible dans la réabsorption de sels (Schmitz, 1967, Schultz, 1976, Johnston et al., 2004).

Au niveau de l'intestin postérieur (cinquième segment du métasoma), on trouve également une nouvelle paire dorsale de caeca postérieurs. Ces structures ne seraient pas impliquées

dans la digestion et l'absorption des nutriments et auraient un rôle limité dans le stockage du glycogène (Icely et Nott, 1985). Cependant, chez *Orchestia cavimani*, ces caeca auraient une fonction dans la réabsorption de fluides et d'ions (Graf et Michaut, 1980). Chez d'autres espèces comme *Gammarus pulex*, ces structures sont impliquées dans le métabolisme du calcium (Graf, 1964). L'intestin postérieur se termine par un anus positionné en dessous du telson.

Mécanisme de digestion et ultrastructure des caeca hépatopancréatiques

À l'issue du passage dans l'estomac les aliments sont triés et les éléments organiques nutritifs sont transférés dans les caeca tandis que les particules résiduelles passent dans l'intestin moyen et inférieur pour être éliminées.

Chez les décapodes, la glande digestive également appelée hépatopancréas est l'organe majeur de la digestion. Chez les amphipodes, cet organe est remplacé par les caeca hépatopancréatiques qui ont une structure tubulaire bordée de cellules épithéliales reposant sur une membrane basale entourée par un réseau musculaire recouvert de tissu conjonctif (Schmitz et Scherrey, 1983). Ces cellules épithéliales sont impliquées dans la digestion de la nourriture et dans l'assimilation des nutriments (Agrawal, 1965, Schmitz et Scherrey, 1983). En effet, cet épithélium constitue l'unique barrière physique entre le contenu alimentaire présent dans la lumière des caeca et l'hémolymphe dans l'hémocoèle (Kutlu et al., 2002).

Des études histologiques menées sur différents genres d'amphipodes ont montré quatre types cellulaires (E, F, R et B) constitutifs de l'épithélium de ces tubules (**Figure I-10**). Comme chez les décapodes, ces types cellulaires sont répartis en trois zones formant un continuum (Correia et al., 2002, Kutlu et al., 2002).

(i) La partie distale ou zone germinale, où chaque tubule est caractérisé par des cellules E (embryonnaire) sans vacuole, relativement petites et indifférenciées. L'activité mitotique de ces cellules permet la régénération du caecum (Musko, 1988). Ces cellules E vont se différencier dans la partie intermédiaire du caecum.

(ii) La partie intermédiaire du tubule hépatopancréatique présente deux types cellulaires, les cellules F et les cellules R, qui sont différenciés au stade mature. Selon Schultz (1976) et Schmitz (1992), les cellules F sont impliquées dans la synthèse enzymatique, bien que chez certains amphipodes (*Gammarus locusta*, *Orchestia platensis* et *Gammarus roselli*) la

digestion intracellulaire puisse se produire dans ces cellules. Les cellules R présentent d'abondantes vacuoles souvent riches en lipides. La structure de ces cellules semble indiquer une certaine spécialisation dans le stockage des réserves (Moritz et al., 1973, Schultz, 1976, Schmitz, 1992). Les cellules F et R ont également la capacité de stocker et de recycler des métaux (Icely et Nott, 1985, Weeks, 1992, Nassiri et al., 2000). De nombreux travaux ont pu mettre en évidence des changements ultrastructuraux de ces cellules lorsque les organismes sont exposés à une contamination métallique (Papathanassiou et King, 1986, Vogt, 1987, de Nicola et al., 1993, Nassiri et al., 2000, Kutlu et al., 2002).

(iii) La zone la plus antérieure du caecum correspond à la zone la plus mature présentant un nombre important de grosses cellules vacuolisées de type B. Ce type cellulaire est présent tout le long du tubule, cependant il semblerait que dans la partie antérieure du caecum l'augmentation du nombre de cellule de type B soit corrélée positivement avec la diminution du nombre de cellule de type F. La zone apicale de chaque caecum correspond chez les amphipodes à une portion principalement dédiée aux processus de digestion intracellulaire (Moritz et al., 1973, Icely et Nott, 1985, Musko, 1988), et à la sécrétion enzymatique (Schultz, 1976). Plusieurs auteurs pensent que comme chez les décapodes, les cellules de type B se développeraient à partir de cellules F par un phénomène d'élargissement de la vacuole centrale (Schultz, 1976, Icely et Nott, 1985, Musko, 1988).

Chez les crustacés, la sécrétion des enzymes par les cellules digestives du caecum, peut emprunter différents processus. Dans beaucoup de cas la sécrétion est holocrine et le contenu de la cellule est entièrement déversé dans le lumen. Ce mode de sécrétion est fréquent dans la partie antérieure du tubule où les cellules matures dégènèrent. La sécrétion mérocrine (par diffusion ou exocytose) ou apocrine (par fragmentation du pôle apical) est également décrite dans le tubule pour une production enzymatique constante.

Les différents types cellulaires présents dans les caeca des amphipodes ont été recensés par Icely et Nott (1985) (**Tableau I-9**). Les études ultrastructurales illustrent les fonctions des types cellulaires rencontrés dans les caeca.

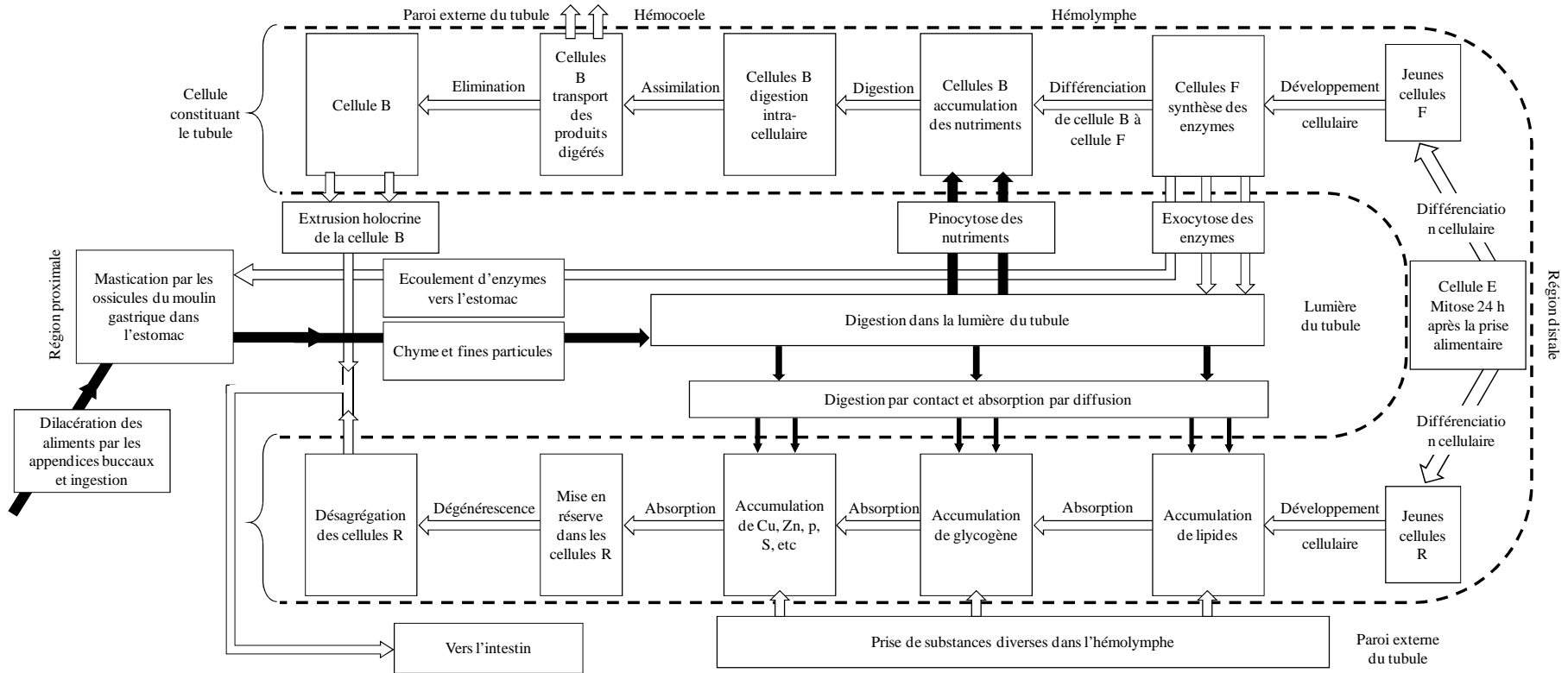


Figure I-10 : Représentation schématique d'un caecum indiquant les fonctions des cellules épithéliales chez le genre *Gammarus*. Modifiée d'après Grassé (1994b)

Tableau I-9: Interprétation des fonctions des caeca hépatopancréatiques chez les amphipodes à partir d'études ultrastructurales, d'après Icely et Nott (1985)

++ : concentration forte; + : concentration modérée; - : non observé; * : non décrit.

Espèce	Zone de production des protéines			Localisation des réserves						Source		
				Lipides			Glycogène				Métaux	
<i>Corophium volutator</i>	R/F++	B+		R/F++	B-		R/F++	B+		Cu: R/F++	B-	(<u>Icely et Nott, 1980, 1984</u>)
<i>Stegocephaloides christianiensis</i>	R/F++	B+		R/F++	B-		R/F*	B+		Fe: R/F++	B-	(<u>Moore et Rainbow, 1984</u>)
										Ca: R/F++	B-	
<i>Orchestia platensis</i>	R+	F++	B+	R++	F+	B+	R++	F+	B+			(<u>Moritz et al., 1973</u>)
<i>Gammarus locusta</i>	R+	F++	B+	R++	F+	B+	R++	F+	B+			(<u>Moritz et al., 1973</u>)
<i>Gammarus minus</i>	R+	F++	B+	R++	F+	B+	R-	F-	B-			(<u>Schultz, 1976</u>)
<i>Talitrus saltator</i>	R+	F++	B*	R++	F+	B*	R++	F+	B*			(<u>Storch et Burkhardt, 1984</u>)

3.3.3. Cycle de mue et de reproduction

Anatomie du système reproducteur

Chez le mâle (**Figure I-11 a**), l'appareil reproducteur est composé de 2 longs tubules situés au-dessus de l'intestin. Chacun des tubules est divisé en trois parties, le testicule, la vésicule séminale et le canal déférent. Chacun des canaux déférents aboutit au niveau ventral du péreiomère 7 et forme une ouverture nommée papille génitale.

Chez la femelle (**Figure I-11 b**), la position de l'appareil reproducteur est identique à celui du mâle, deux ovaires sont placés au-dessus de l'intestin. Au niveau du péreiomère 5, un oviducte se détache de chaque ovaire pour rejoindre la face ventrale de l'animal. Chaque oviducte aboutit à la base des oostégites. Ainsi lors de la ponte, les œufs sont déposés dans le marsupium formé par les oostégites, où le développement embryonnaire s'effectue jusqu'à l'éclosion.

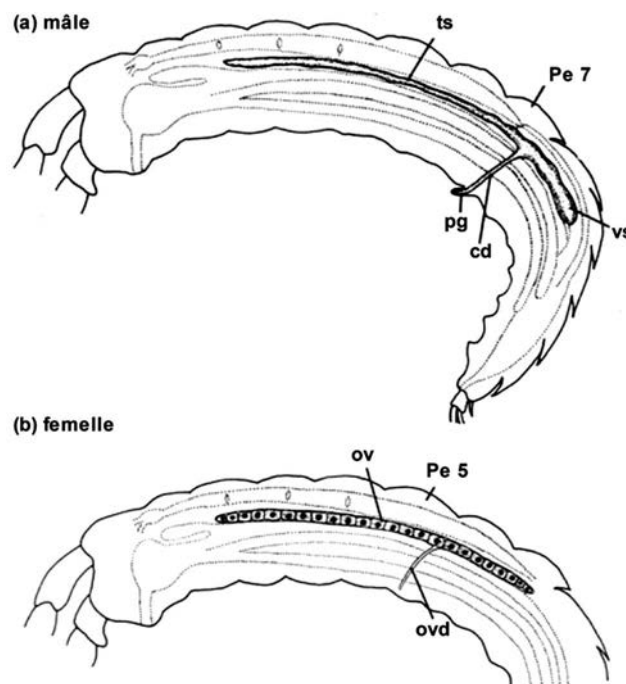


Figure I-11 : Système reproducteur d'un Gammaridae mâle (a) et femelle (b) (Schmitz, 1992)
cd : canal déférent; ov : ovaire; ovd : oviducte; Pe 5 : 7 : péreiomère 5 : 7; pg : papille génitale; vs :
vésicule séminale ; ts : testicule

La différenciation mâle-femelle peut être réalisée en appréciant certains détails morphologiques comme la présence d'oostégites sur la face ventrale des femelles adultes ou la présence de papilles génitales sur la face ventrale des individus mâles. D'autres critères plus subjectifs peuvent également apporter une indication sur le sexe des organismes, par exemple la présence d'antennes plus allongées ou des gnathopodes 2 plus robustes sont des caractères retrouvés chez les mâles (Chevreux et Fage, 1970, Schmitz, 1992).

La reproduction

Gammarus fossarum est un organisme itéropare à reproduction sexuée. La reproduction de cet amphipode est continue mais à fréquence variable au cours de l'année. L'activité sexuelle du gammare est fortement ralentie durant la période hivernale et atteint son maximum en avril-mai. Selon Sutcliffe (1992), le principal stimulus déclencheur de ce phénomène serait lié à une modification de la photopériode plutôt qu'à un changement de température. Cependant la température optimale de fécondité pour *Gammarus fossarum* est de 12,1°C (Pöckl et Humpesch, 1990).

Quelques jours avant la ponte, le mâle s'agrippe sur le dos de la femelle au moyen de ses gnathopodes, et la maintient en place sous son corps. Le couple est alors en amplexus précopulatoire également appelé précopulat (**Figure I-12**). Cette posture permet au mâle de continuer à nager pour se nourrir tout en maintenant la femelle prête à muer (Sutcliffe, 1993, Bollache et Cézilly, 2004).



Figure I-12 : *Gammarus fossarum* mâle et femelle en précopulat (Photographie: Herve Quéau / IRSTEA Villeurbanne)

Immédiatement après la mue, l'ovulation des femelles a lieu et le mâle se positionne alors ventralement, de façon à positionner ses papilles génitales face au marsupium de la femelle. De cette façon, le sperme est déposé sur les œufs fraîchement pondus. L'expulsion des œufs vers la poche marsupiale est rendue possible par la présence d'un oviducte relativement flexible. Aussitôt l'exuvie de la femelle éjectée, et après plusieurs fécondations de la poche ventrale effectuées en quelques heures, le mâle et la femelle se séparent (Sutcliffe, 1993). Une fois les œufs fécondés, la femelle sécrète une gélatine protectrice. Le sac gélatineux ainsi formé contenant les œufs est retenu dans la poche incubatrice ventrale de la femelle (Sutcliffe, 1992). Le nombre d'œufs est globalement corrélé avec la taille de la femelle. Chez *G. pulex* il est en moyenne de 16 œufs par femelle (Hynes, 1955, Welton, 1979).

Chez la femelle *G. fossarum*, les cycles de mue et de reproduction ont été caractérisés précisément (Geffard et al., 2010). Le cycle de mue dure environ 30 jours à 12°C, chez la femelle adulte et se découpe en 6 stades. La détermination des stades se base sur l'observation microscopique du développement de la nouvelle cuticule et du décollement de l'ancienne au niveau de la griffe des péréiopodes 3 et 4 (Figure I-13). Les deux premiers stades (A et B) correspondent à la période de post-mue, les deux stades suivants (C1 et C2) à la période d'intermue et les deux derniers (D1 et D2) à la pré-mue.

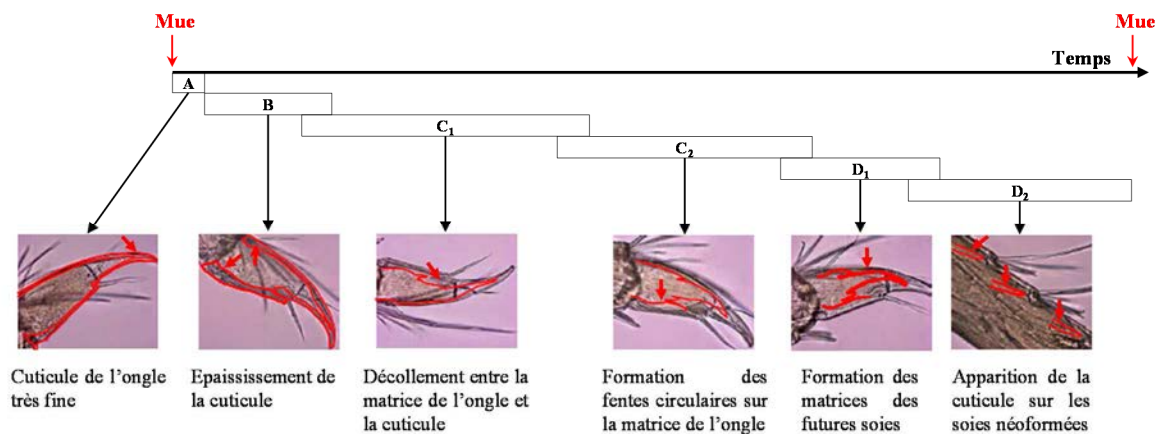


Figure I-13 : Caractérisation du cycle de mue chez la femelle *Gammarus fossarum* (Geffard et al., 2010)

Chez les femelles sexuellement actives, la maturation des gonades (vitellogénèse) et le développement des embryons (embryogénèse) se déroulent de manière parfaitement synchrone à chaque cycle d'inter-mue (**Figure I-14**).

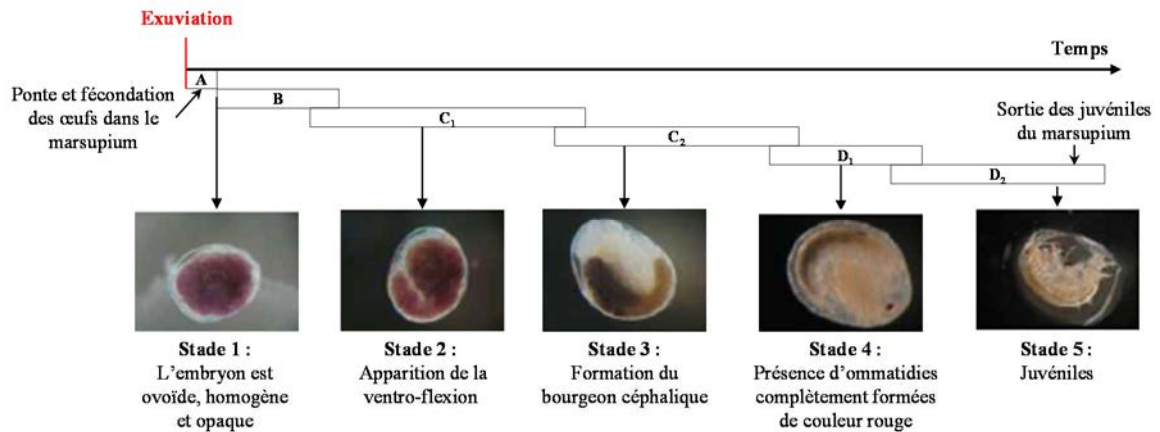


Figure I-14 : Stades embryonnaires corrélés au stade de mue de la femelle *Gammarus fossarum* (Xuereb, 2009)

Les juvéniles éclos de la ponte précédente, sortent du marsupium peu de temps avant l'exuviation de leur mère. Suite à cette exuviation, la femelle pond une nouvelle portée d'ovocytes matures qui sera aussitôt fécondée par un mâle. Parallèlement dans la gonade, un nouveau lot d'ovocytes primaires entre en vitellogénèse. L'exuviation peut être considérée comme le point de départ et d'aboutissement de la maturation gonadique ainsi que du développement embryon-larvaire dans le marsupium (**Figure I-15**).

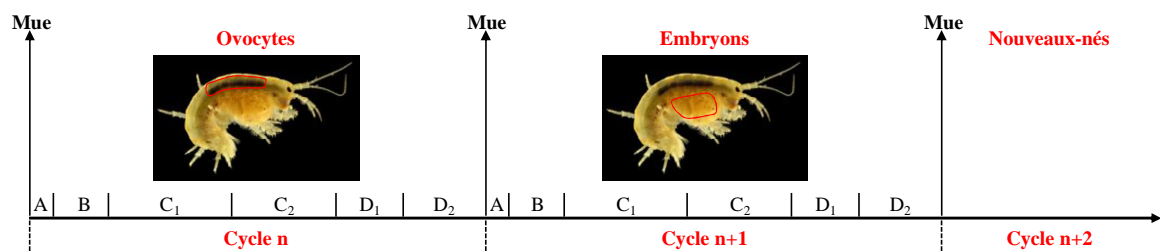


Figure I-15 : Représentation du cycle de reproduction de *Gammarus fossarum* Développement des gonades lors du premier cycle de mue puis développement embryonnaire au cours du second cycle de mue et libération des juvéniles à la fin du second cycle

3.4. Espèce sentinelle

Les amphipodes sont très fréquemment choisis comme espèce sentinelle pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes aquatiques (Rinderhagen et al., 2000). En effet, ces organismes répondent à de nombreux critères techniques, méthodologiques et écologiques qui les rendent particulièrement intéressants pour mener des travaux expérimentaux.

La pertinence écologique du gammare

Les gammares se trouvent dans un très grand nombre de systèmes aquatiques (marins et terrestres). Ces organismes sont ubiquistes (Hynes, 1955, Karaman et Pinkster, 1977) et présents sur une vaste aire de répartition (Karaman et Pinkster, 1977, Zivic et Markovic, 2007) où ils sont souvent en forte densité (Obrdlík, 1972, Welton, 1979). Leur régime alimentaire omnivore à tendance détritivore leur offre une position centrale dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes. A la fois impliqué dans la dégradation de la matière organique grossière et source de nourriture pour de nombreux vertébrés (amphibien, poissons, oiseaux), le gammare est souvent une espèce clef du réseau trophique qu'il occupe (MacNeil, 1997, Kelly et al., 2002).

Des caractéristiques biologiques intéressantes

Contrairement à beaucoup de macroinvertébrés, le gammare présente un cycle de vie relativement long (quelques années) et exclusivement aquatique. Ainsi ces organismes ont la capacité d'intégrer les flux de contamination qui se succèdent dans le milieu au cours du temps. De nombreuses études sont disponibles sur les gammares. Leur physiologie et leur comportement sont relativement bien connus et ils peuvent être utilisés dans le cadre de la bioindication (**Tableau I-10**).

De nombreux avantages logistiques

Le prélèvement, la manipulation de ces organismes et leur maintien au laboratoire sont relativement aisés. Il est possible de les échantillonner durant toute l'année. De plus une simple observation à la loupe binoculaire permet de déterminer l'espèce, le sexe et le stade de reproduction de l'individu. Ainsi les gammares sont aussi bien utilisés au laboratoire que sur le terrain (Coulaud et al., 2011, Besse et al., 2013).

Une espèce sensible

Ces organismes présentent également une sensibilité importante aux contaminants. Les gammares sont fréquemment utilisés en tant que bioindicateur de la qualité des milieux. En effet leur présence ou leur absence, leur densité et leur dynamique de population sont des paramètres étudiés dans le cadre de l'évaluation de la qualité des milieux dulçaquicoles, notamment au travers du système des saprobies et le ratio *Gammarus/Asellus* (Rinderhagen et al., 2000). Les effets des contaminants ont été largement abordés chez le gammare à différents niveaux d'organisation biologique (**Tableau I-10**).

Tableau I-10 : Utilisation du genre *Gammarus* appliquée à l'étude de l'énergie et de son allocation à différents niveaux d'organisation biologique

Niveau d'organisation biologique	Paramètre biologique	Contaminant	Exposition	Espèce	Référence
Sub-individuel	CEA	Hydrocarbure	<i>In situ</i>	<i>G.wilkitzkii</i>	(Olsen et al., 2008)
Sub-individuel	Protéines, Lipides, Glycogène	Pentachlorophénol	Laboratoire	<i>G.pseudolimnaeus</i>	(Graney et Giesy Jr, 1986)
Sub-individuel	Protéines, Lipides, Glycogène	Cu	Laboratoire	<i>G.roseli</i>	(Sroda et Cossu-Leguille, 2011a)
Sub-individuel	Enzymes digestives	Contamination minière	<i>In situ</i>	<i>G. fossarum</i>	(Dedourge-Geffard et al., 2009)
Sub-individuel	Enzymes digestives	Cu	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Lebrun et al., 2012)
Sub-individuel	AEC	HAP	Laboratoire	<i>G.setosus</i>	(Olsen et al., 2007)
Sub-individuel	AEC	HAP	Laboratoire	<i>G.wilkitzkii</i>	(Olsen et al., 2008)
Individuel	AECR	Zn et pH	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Naylor et al., 1989)
Individuel	AECR	Zn	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Maltby et Naylor, 1990)
Individuel	AECR	Eaux usées	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Maltby et al., 1990)
Individuel	AECR	Cd	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Stuhlbacher et Maltby, 1992)
Individuel	Mortalité	Thiodan	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Cengiz et Unlu, 1999)
Individuel	Mortalité	Sélénate de sodium	Laboratoire	<i>G. pseudolimnaeus</i>	(Brix et al., 2001)
Individuel	Mortalité	Carbaryl	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Ashauer et al., 2007)
Individuel	Mortalité	Thiacloprid	laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Beketov et Liess, 2008a)
Individuel	Mortalité	Pesticides	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Beketov et Liess, 2008b)
Individuel	Mortalité	Cypermethrine, Propiconazole, Tébuconazole	laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Adam et al., 2009)
Individuel	Mortalité	Cadmium	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Chaumot et al., 2009)
Individuel	Mortalité	Cadmium, Ivermectine	Laboratoire	<i>G. pulex</i> et <i>G. fossarum</i>	(Alonso et al., 2010)
Individuel	Mortalité	Carburofan, Malathion, dichlorophenol ... (12 composants)	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Ashauer et al., 2011)
Individuel	Mortalité, Reproduction	Bisphenol A, Ethinylestradiol	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Watts et al., 2001)
Individuel	Mortalité, Reproduction	Chlorobiphenyl	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Bloor et Banks, 2006)

Niveau d'organisation biologique	Paramètre biologique	Contaminant	Exposition	Espèce	Référence
Individuel	Mortalité; Croissance	Nitrate	Laboratoire	<i>G. pseudolimnaeus</i>	(Stelzer et Joachim, 2010)
Individuel	Survie, Taux d'alimentation, Locomotion, Respiration	Cadmium	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Felten et al., 2008a)
Individuel	Respiration	Cuivre, Effluents industriels	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Gerhardt, 1996, Gerhardt et al., 1998)
Individuel	Respiration	Stress acide	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Felten et Guerold, 2001)
Individuel	Croissance	3,4 dichloroaniline	Mésocosme	<i>G. pulex</i>	(Taylor et al., 1994)
Individuel	Reproduction	Effluent de station d'épuration	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Gross et al., 2001)
Individuel	Reproduction	Esfenvarelate	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Cold et Forbes, 2004)
Individuel	Reproduction	Ammonium	Laboratoire	<i>G. sp.</i>	(Prenter et al., 2004)
Individuel	Reproduction	Effluent de station d'épuration	<i>In situ</i>	<i>G. fossarum</i>	(Schirling et al., 2005)
Individuel	Reproduction	Cadmium, methomyl, nonylphénol	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Geffard et al., 2010)
Populationnel	Densités	Contamination agricole	Microcosme	<i>G. pulex</i>	(Liess et Schulz, 1999)
Populationnel	Densité de population, Nombre de femelles en reproduction	Station d'épuration	Microcosme	<i>G. fossarum</i>	(Bundschuh et Schulz, 2011)
Populationnel	Occurrence de l'intersexualité	Effluent de station d'épuration	<i>In situ</i>	<i>G. fossarum</i>	(Ladewig et al., 2006)
Populationnel	Densité	Cuivre	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Maund et al., 1992)
Populationnel	Densité	Rejets agricoles	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Schulz et Liess, 1999)
Populationnel	Densité, Sex-ratio	Ethinylestradiol	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Watts et al., 2002)

4. Objectifs du travail de la thèse

Le but des travaux menés durant cette thèse a été de développer chez *Gammarus fossarum* un outil de diagnostic facilement applicable et interprétable qui puisse être utilisé dans le cadre de la surveillance de la qualité biologique des milieux aquatiques d'eau douce.

La synthèse bibliographique a présenté les biomarqueurs relatifs au métabolisme énergétique et a souligné les difficultés d'interprétation des réponses biologiques soumises aux facteurs environnementaux (température, salinité, oxygène...) et biotiques (sexe, statut reproducteur...). Ce constat fait apparaître la nécessité de caractériser la variation naturelle des réponses pour une interprétation fiable et robuste du biomarqueur. Ainsi le **premier objectif** a été de répondre à la question suivante :

Quelle est l'influence des facteurs biotiques et abiotiques sur les réponses biologiques abordées (enzymes digestives et réserves énergétiques) ?

L'étude bibliographique a également évoqué le lien entre l'acquisition de l'énergie, le fonctionnement du métabolisme énergétique et le maintien des populations. Cependant la valeur prédictive des réponses du métabolisme énergétique situé au niveau sub-individuel doit être démontrée par rapport aux effets au niveau individuel et supra-individuel. Le second objectif a été de mettre en évidence la pertinence écologique des marqueurs étudiés en répondant à la problématique suivante :

Peut-on faire le lien entre une perturbation de ces réponses sub-individuelles et des effets sur la descendance ?

Enfin, d'après la littérature, les marqueurs suivis répondent potentiellement à une large gamme de contaminants. Il convient donc pour finaliser la validation de l'utilisation des enzymes digestives comme biomarqueurs chez le gammare, d'éprouver la sensibilité de nos outils lors d'applications en milieu naturel. Ainsi notre **dernier objectif** a été de répondre à la question suivante :

Quels sont les réponses de ces marqueurs dans le cadre d'applications *in situ* menées par des approches actives ?

Chapitre II

Matériel et méthodes

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre s'articule en trois parties :

(i) Une première partie présente les procédures de prélèvement et de maintien des organismes étudiés durant la thèse.

(ii) Une seconde partie présente les différents plans expérimentaux suivis.

L'ensemble de ces procédures expérimentales ont été réalisées par l'équipe de l'IRSTEA à Villeurbanne.

(iii) La troisième partie du chapitre s'intéresse aux méthodologies utilisées pour la mesure des différents marqueurs biologiques étudiés.

1. Prélèvement et maintien des organismes au laboratoire

1.1. Prélèvement des organismes

Dans le cadre des expérimentations prévues, les gammarus ont été collectés sur un site situé en amont du bassin de « La Bourbre » au niveau de la commune de « La Tour du Pin » (longitude 5°27'34 E et latitude 45°27'34 N, Isère, France) (**Figure II-1**). Ce site a été retenu pour (i) son faible niveau de contamination (mesurée dans l'eau, les sédiments et le biota); (ii) l'abondance forte et exclusive de *Gammarus fossarum*; (iii) ses caractéristiques hydrologiques (hauteur d'eau et débit) permettant d'effectuer des prélèvements tout au long de l'année.

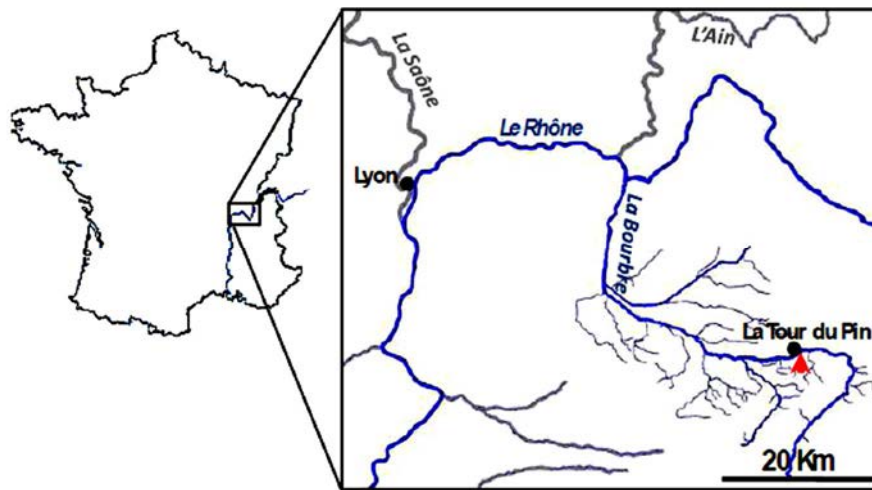


Figure II-1: Situation géographique du site de prélèvement « La Tour du Pin » situé sur la rivière « La Bourbre » (Benoit Xuereb / IRSTEA Villeurbanne)

Les différents échantillonnages de *Gammarus fossarum* ont été réalisés à l'aide d'un troubleau (base rectangulaire 25x18; maille 630 mm) suivant la méthode du « kick sampling ». Cette technique de prélèvement consiste à remuer le substrat avec le pied pour provoquer la fuite des organismes qui emportés par le courant vont se retrouver piégés dans le filet du troubleau placé un peu à l'aval (**Figure II-2 a**).

Le tri des organismes est effectué sur place, les organismes récoltés sont placés sur une colonne de tamis de mailles comprises entre 375 μm et 2,5 mm. Afin de ne récupérer que des gammarus adultes de taille homogène, seuls les individus retenus entre les tamis de maille 2 et 2,5mm sont sélectionnés (**Figure II-2, b**). Les organismes sont par la suite stockés dans des récipients en polyéthylène contenant l'eau de la rivière. Le transport des

organismes au laboratoire est réalisé en plaçant les récipients dans des glacières pour limiter les changements de température.



Figure II-2 : Prélèvement (a) et tamisage (b) des organismes (Photographies Emilie Lacaze-IRSTEA Villeurbanne)

1.2. Maintien des organismes

Arrivés au laboratoire, les échantillons sont à nouveau triés afin d'éliminer les graviers, les débris organiques et les espèces non désirées pour conserver uniquement l'espèce recherchée *Gammarus fossarum*. Les gammares sont ensuite maintenus en stabulation durant une période minimale de 10 jours.

Les organismes sont placés dans des aquariums de 30 litres maintenus à une température de $12 \pm 1^\circ \text{C}$ dans un bain marie thermorégulé contenant de l'eau du site de prélèvement. Grâce à un système de goutte à goutte, le milieu de stabulation est progressivement renouvelé par un mélange d'eau issue d'un forage et d'eau osmosée. Cette eau présente une conductivité de $600 \pm 50 \mu\text{S/cm}$ (correspondant aux valeurs moyennes mesurées sur le site de prélèvement) et un pH compris entre 7,4 et 7,8. L'oxygène dissout est maintenu à saturation dans les aquariums par un bullage permanent. La photopériode est fixée à 14 heures de jour et 10 heures de nuit avec une intensité lumineuse de 750 lux. La **figure II-3** présente le dispositif de stabulation.

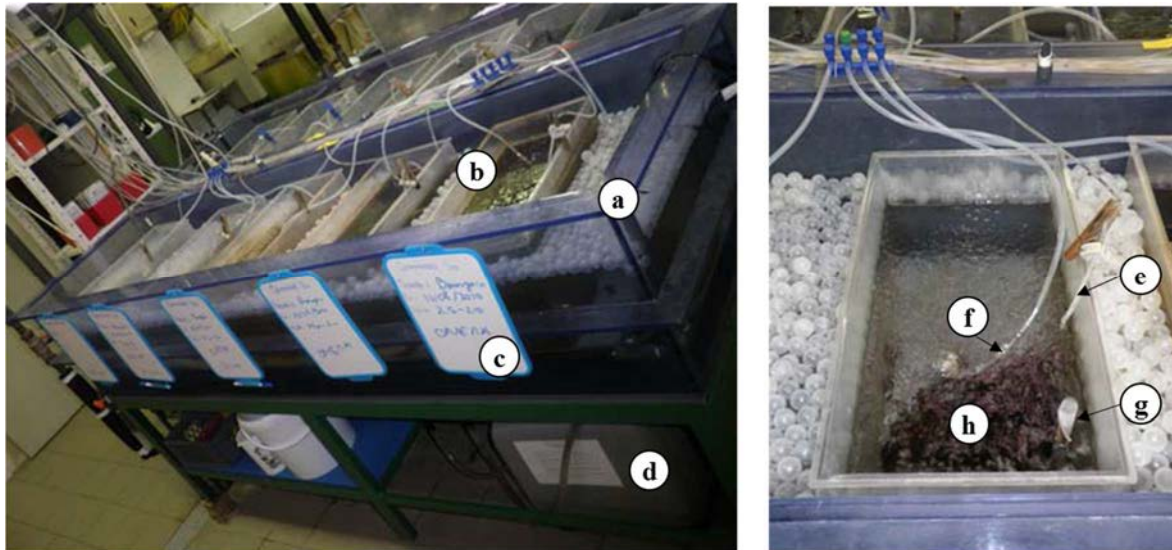


Figure II-3 : Dispositif de stabulation des organismes au laboratoire (Photographies Emilie Lacaze / IRSTEA Villeurbanne)

a) Bain-marie thermostaté, b) Aquarium, c) Provenance du prélèvement, d) Groupe froid, e) Arrivée d'eau, f) Bulleur, g) Trop plein, h) Feuilles d'aulne

Dans ce système de stabulation, les gammares sont nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulnes (*Alnus glutinosa*). Ces feuilles ont été récoltées dans une zone faiblement anthropisée, dans la localité des Ardillats (Rhône). Avant leur utilisation, les feuilles sont placées pendant 6 ± 1 jour, à température ambiante, dans les aquariums de stabulation (dont l'eau est quotidiennement renouvelée). Ce conditionnement des feuilles permet de les réhydrater et de favoriser le développement d'un biofilm à leur surface, ceci afin d'augmenter leur appétence. Enfin 500 mg de vers lyophilisés (*Tubifex sp.*) sont distribués deux fois par semaine pour limiter l'apparition de carences alimentaires.

2. Expérimentations

Dans le cadre de ce travail de thèse, différentes expérimentations en conditions contrôlées et *in situ* ont été entreprises. Les expériences en conditions contrôlées avaient pour objectif de localiser les réponses enzymatiques étudiées, et de caractériser les réponses biologiques d'intérêt (enzymes digestives et/ou réserves énergétiques) soumises (i) à l'influence de différents facteurs environnementaux (la température, la conductivité et la quantité de nourriture) et (ii) à l'état physiologique des organismes (sexe, stade de reproduction). Concernant les expériences *in situ*, elles ont été réalisées afin d'évaluer la sensibilité des réponses étudiées chez des organismes transplantés sur des sites soumis à différents types de contaminations chimiques.

2.1. Expérimentations en laboratoire

2.1.1 Localisation des activités digestives d'intérêt

Dans le cadre d'une expérience préliminaire, des gammares mâles ont été prélevés à l'issue de 15 jours de stabulation (voir conditions précédemment décrites), afin de comparer les activités digestives amylase, cellulase et trypsine présentes dans l'organisme entier, le système digestif et le reste du corps de l'animal.

L'objectif est double : (i) s'assurer de la localisation des activités enzymatiques mesurées aux cours des expérimentations suivantes ; (ii) s'affranchir de la dissection systématique des organismes en considérant l'activité enzymatique totale mesurée dans les individus entiers comme représentative de l'activité digestive des gammares.

Ainsi, au cours de l'échantillonnage un premier lot d'organismes a été prélevé et conservé entier, tandis qu'un deuxième lot d'individus a été disséqué afin de prélever séparément les tissus digestifs et le reste de l'individu. La dissection des organismes est réalisée à l'aide de deux paires de pinces et d'une paire de ciseau. Dans un premier temps, l'urosoma est coupé afin de détacher la partie postérieure de l'intestin du reste des tissus (**Figure II-4a**). Puis, avec une paire de pince placée au niveau du mésosoma, l'animal est fermement maintenu avec une autre paire de pince placée juste à l'arrière du prosoma. Il faut ensuite tirer afin de séparer la tête du corps de l'animal. Les quatre caeca ventraux sont alors retirés avec la tête (**Figure II-4b**). Les caeca sont ensuite séparés de la tête (**Figure II-4c**) et prélevés pour les analyses. Les différents échantillons ont été conservés dans la glace durant toute la dissection avant d'être stockés à -80°C .

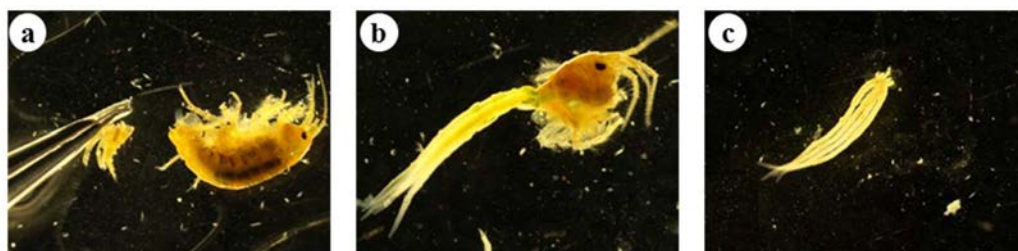


Figure II-4 : Dissection de *Gammarus fossarum* pour réaliser le prélèvement des caeca (photographies personnelles) a) Libération de l'intestin postérieur b) Les caeca reliés à la tête du gammare c) Les quatre caeca isolés avant prélèvement

2.1.2. Influence du genre et du stade de mue

Plusieurs travaux menés sur des populations de gammares ont déjà montré des différences inter-sex sur des réponses biologiques notamment énergétiques (Sornom et al., 2010, Sroda et Cossu-Leguille, 2011b, Gismondi et al., 2012a). Cependant aucune étude n'a pris en compte le cycle de mue qui est un évènement d'une importance considérable chez les crustacés. Parallèlement, chez les femelles amphipodes sexuellement actives, le cycle de mue est étroitement associé au cycle de reproduction (voir synthèse bibliographique). Ainsi il apparaît fort probable que ces deux phénomènes entraînent des variations physiologiques mesurables sur les marqueurs étudiés.

Nous avons ainsi caractérisé l'évolution des activités enzymatiques digestives et des réserves énergétiques en fonction du genre et du stade de mue. Des gammares mâles ainsi que des femelles à chaque stade du cycle de mue (AB, C1, C2, D1 et D2) ont été prélevés dans les bacs de stabulation après 15 jours d'acclimatation dans les conditions décrites au paragraphe 1.2 de ce chapitre. La détermination des stades de mue décrits par Geffard et al. (2010) est détaillée dans la partie 3 du chapitre I. A l'issue du prélèvement les organismes sont plongés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'aux analyses.

2.1.3. Influence de la température et de la conductivité

D'après la littérature (Pöckl, 1992, Sornom et al., 2010), il semble que la température et la conductivité soient deux paramètres abiotiques qui influencent de manière considérable les réponses biologiques des organismes. Ainsi, cette expérience a pour objectif d'appréhender la modulation des marqueurs du métabolisme énergétique chez des organismes mâles et femelles soumis à l'effet de ces deux facteurs.

Durant les expérimentations réalisées, la température, la quantité d'oxygène dissous, le pH et la conductivité de l'eau ont été mesurés quotidiennement. Parallèlement à ce relevé ponctuel, des sondes (Tinytag temperature logger Aquatic 2®) ont été placées dans les bains-marie pour obtenir un suivi plus précis et régulier de la température.

Pour aborder l'impact de la température et de la conductivité sur nos paramètres physiologiques d'intérêt, nous avons choisi de tester en laboratoire trois températures ($7 \pm 0,5$; $12 \pm 0,5$; $16 \pm 0,5$ °C) et trois conductivités (200 ± 50 ; 500 ± 50 ; 800 ± 50 µS/cm). L'objectif est d'approcher une gamme large représentative d'une majorité des conditions rencontrées lors des expérimentations de terrain réalisées en région tempérée.

Le système expérimental est présenté dans la **figure II-5**.



Figure II-5 : Dispositif expérimental utilisé dans le cadre des études *in vivo* (photographies Benoit Xuereb / IRSTEA Villeurbanne)

b. : béccher ; **b.m.** : bain-marie thermorégulé ; **g.f.** : groupe froid ; **d.a.** : disques d'aulne ; **id.** : identifiant de l'expérimentation ; **p.e.** : plan expérimental ; **t.b.** : toile à bluter ; **th.** : thermostat

Le dispositif se compose de bains-marie thermorégulés, où sont placés des bécchers en verre de 500mL dans lesquels les organismes sont distribués. Ainsi, pour chaque condition testée, 11 bécchers de 7 couples de gammares ont été placés dans le dispositif expérimental présenté dans la **figure II-5**. Les bécchers sont alimentés de manière continue par de l'eau à conductivité souhaitée. Le renouvellement de l'eau, assuré par des pompes péristaltiques, est homogène entre répliquats et constant dans le temps. Les bécchers sont équipés d'une surverse pour évacuer le trop plein d'eau, cette ouverture étant obstruée par un tissu de maille de 300 μm pour éviter la perte des organismes. A l'intérieur de chaque béccher une pièce de toile à bluter en polyamide (porosité : 500 μm ; longueur x largeur : 6 x 5 cm) est ajoutée. Ce tissu constitue une surface d'accroche pour les gammares permettant de minimiser les agressions entre organismes. Pour la régulation et la stabilisation précise de la température des bains-marie, l'eau a été refroidie par un cryostat puis réchauffée par un thermostat à la température désirée. Les individus ont été nourris *ad libitum* avec 20 disques de feuille d'aulne (*Alnus glutinosa*) de 2 cm de diamètre.

Les couples d'individus ont été constitués en sélectionnant des femelles en fin de cycle de reproduction (stade de mue D2) pour le lancement de l'expérimentation (la détermination du stade de mue est détaillée dans le paragraphe 3.3.3 du chapitre I). Ce choix a été fait par souci d'homogénéité de la sélection des femelles et pour s'assurer que les organismes sont exposés durant un cycle de reproduction complet. D'après la littérature et suite aux

précédents travaux menés à l'IRSTEA (Xuereb, 2009, Coulaud, 2012), la température du milieu influence fortement la durée du cycle de reproduction du gammar. A faible température, la durée du cycle est beaucoup plus longue. Par conséquent, les prélèvements des organismes ont été décalés dans le temps en fonction de la température à laquelle les organismes étaient exposés. Du début à la fin de leur cycle, le stade de mue des femelles a été suivi toutes les 72h à 7°C, toutes les 48h à 12°C et toutes les 36h à 16°C pour les différentes conductivités. Ce décalage des prélèvements a permis d'obtenir un nombre homogène d'individus pour chaque modalité testée.

2.1.4. Influence d'un stress alimentaire

L'expérience proposée pour appréhender l'impact d'une privation alimentaire sur l'acquisition de l'énergie et le cycle de reproduction de *Gammarus fossarum* a pour objectif de préciser les liens possibles entre une perturbation des capacités digestives et les conséquences éventuelles sur l'allocation de l'énergie et la fonction de reproduction.

L'expérimentation a été menée durant deux cycles de reproduction successifs avec deux mesures pour chaque cycle : une avant l'entrée en vitellogenèse (arrêt 1 à 11 jours et arrêt 3 à 43 jours) et une en fin de cycle de reproduction (arrêt 2 à 23 jours et arrêt 4 à 52 jours) (**Figure II-6**). La durée d'expérimentation a permis à la fois (i) d'exercer une privation alimentaire suffisamment importante dans le temps pour observer des effets sur les différents marqueurs ; (ii) de pouvoir mesurer, en ce qui concerne la reproduction, des effets à la fois sur la fertilité (nombre des ovocytes durant les deux cycles) et sur la fécondité (nombre d'embryons produits pendant la période de privation pour le cycle 2).

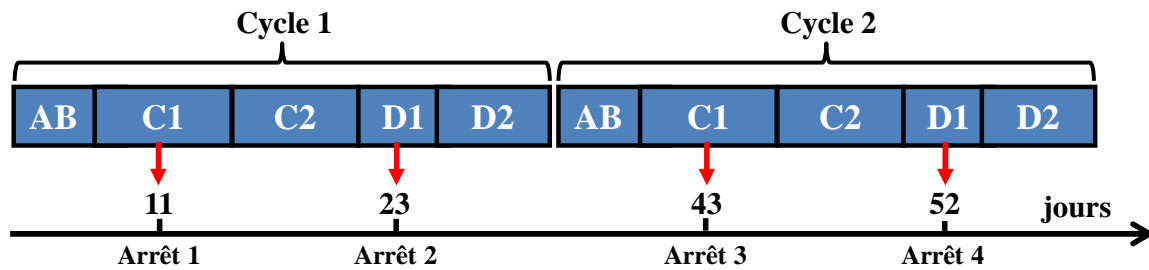


Figure II-6 : Représentation schématique de l'échantillonnage des organismes au cours du temps en fonction des cycles de mue de *Gammarus fossarum*

Une étude préliminaire des taux d'alimentation de gammarus mâle et femelle soumis à 5 conditions de privation alimentaire a permis de définir trois niveaux de privation pertinents pour observer d'éventuelles effets sur les réponses mesurées. La privation alimentaire a été appliquée en modulant le temps de disponibilité de la nourriture. Ainsi les gammarus ont été nourris *ad libitum* avec 14 disques de feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) de 2 cm de diamètre pendant des laps de temps plus ou moins importants selon l'intensité de la privation désirée. De cette façon, les organismes ont été nourris sept jours sur sept (7/7) ; deux jours sur sept (2/7) ou un jour sur sept (1/7).

Le dispositif expérimental employé est le même que celui présenté dans la **figure II-5** de ce chapitre. Les béciers en verre de 500 mL ont été placés dans un bain-marie thermorégulé à $14 \pm 0,3^\circ\text{C}$ et alimenté en continu par de l'eau présentant un pH compris en 7,4 et 7,8 et une conductivité de $600 \pm 50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Pendant les périodes de privation, les disques de feuilles ont été retirés et stockés en chambre froide pour ensuite être remis dans les béciers lors de la deuxième semaine d'exposition.

Des couples avec des femelles de taille homogène ($8,6 \pm 0,6$ mm) en fin de cycle de reproduction (stade de mue D2) ont été sélectionnés pour le lancement de l'expérimentation (pour les raisons évoquées dans le paragraphe 1.1.3 de ce chapitre). Les organismes ont été répartis dans les systèmes à raison de 7 couples par bécier et de cinq réplicats par condition testée. Les dates des arrêts ont été définies en tenant compte de la relation entre la température et les différents paramètres reproducteurs (Coulaud, 2012). A 14°C , à chaque cycle, des organismes ont été prélevés au stade C1 et D1, soit 11 et 23 jours après le début du cycle de mue respectivement.

2.2. Expérimentations *in situ*

2.2.1. Méthodologie d'encagement

Afin de valider l'intérêt de l'utilisation de nos marqueurs en lien avec le métabolisme énergétique dans un contexte de contamination environnementale, l'IRSTEA a réalisé des encagements *in situ* de gammars acclimatés issus de la population « La Tour du Pin ».

La méthodologie d'encagement est une adaptation de celle proposée par Maltby et al. (1990) pour l'étude du taux d'alimentation *in situ* chez *Gammarus pulex*. Au cours de ces expositions, les organismes ont été répartis dans des chambres cylindriques d'encagement en polypropylène de 5 cm de diamètre et 12 cm de hauteur. Ces systèmes sont clos par un couvercle percé au préalable, vissé sur un carré de toile à bluter avec une maille de 500µm (**Figure II-7**) sur les bords du tube de polypropylène. Le fond de la chambre d'encagement est un carré de toile à bluter soudé sur les bords du tube de polypropylène.

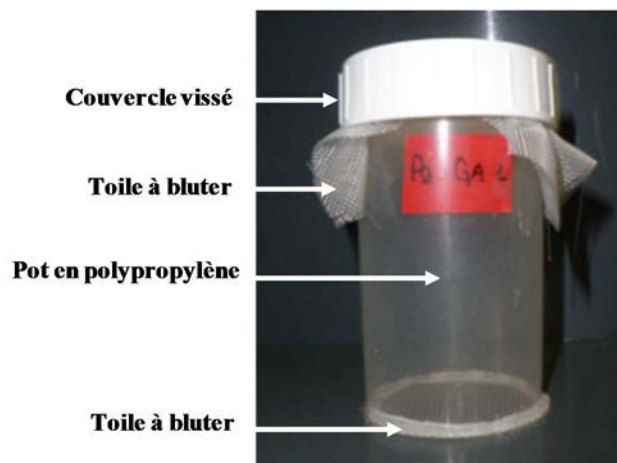


Figure II-7 : Dispositif d'encagement *in situ* pour les organismes (Photographie Emilie Lacaze / IRSTEA Villeurbanne)

Lors des transports sur les sites, les systèmes sont transportés dans des bidons en polypropylène contenant le même milieu que celui de stabulation. Ces bidons sont placés dans des glacières avec un système de bullage pour les transports.

Sur le site, les chambres d'encagement sont placées dans des caisses en PVC (longueur x largeur x hauteur : 60 x 40 x 20 cm) afin de les protéger des branches ou des pierres pouvant dériver dans l'eau (**Figure II-8**).



Figure II-8 : Caisse contenant les dispositifs d'encagement (Photographie Emilie Lacaze / IRSTEA Villeurbanne)

Les caisses sont ensuite fixées sur la berge par une corde et lestées par des pierres posées sur le couvercle. Selon l'expérimentation considérée, la période d'exposition a été d'une semaine concernant l'étude sur les sites de la rivière Lot (voir article 3) et de deux semaines pour l'étude des sites de la région Rhône-Alpes (voir article 4). Lors de l'arrêt d'une expérimentation de terrain, les gammars sont ramenés au laboratoire dans leur chambre d'encagement originelle placée dans un bidon contenant l'eau du site.

2.2.2. Mesures physico-chimiques

Lors de chaque encagement sur un site, des mesures physico-chimiques, de la température, de la conductivité et du pH ont été réalisées à l'aide d'une sonde multimètre WTW Multi350i. La teneur en oxygène est également mesurée avec un oxymètre WTW oxi 315i. Parallèlement, un prélèvement d'eau est réalisé et analysé dans les 48 heures suivant l'échantillonnage afin de déterminer, les concentrations en anions majeurs Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , NO_2^- , PO_4^{3-} , HCO_3^- , et en cations Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , et NH_4^+ . L'ensemble de ces dosages a été réalisé par un laboratoire de chimie accrédité (Laboratoire d'analyses physicochimiques des milieux aquatiques, IRSTEA Villeurbanne, UR Milieu Aquatiques, Ecologie et Pollutions). Ces mesures chimiques ponctuelles ont fourni quelques éléments indicatifs des conditions environnementales au moment de l'encagement des organismes.

3. Méthodologies utilisées pour la mesure des biomarqueurs

3.1. Mesure des marqueurs individuels

L'ensemble des mesures concernant le stade de mue, la fertilité (nombre d'ovocytes) et la fécondité (nombre d'embryons dans le marsupium) a été réalisé par l'IRSTEA (Villeurbanne).

3.1.1. Détermination des stades de mue des femelles

La méthodologie utilisée repose sur les critères développés par Blanchet-Tournier (1980) chez l'amphipode marin *Orchestia gammarelus* et adaptés chez *Gammarus fossarum* par Geffard et al. (2010). Cette technique se base sur l'observation microscopique des tissus de l'extrémité des péréiopodes. En effet, les amphipodes présentent une caractéristique particulière et assez rare chez les crustacés (Charniaux-Cotton, 1957) : dès l'achèvement de l'exosquelette, au début de la face d'intermue, l'épiderme se décolle au niveau de la griffe dactylienne des péréiopodes (**Figure I-13**). La matrice tégumentaire s'invagine progressivement puis se recouvre précocement (en comparaison au reste du corps) d'un étui cuticulaire. Ainsi, afin de déterminer le stade de mue des organismes, les extrémités des troisièmes et quatrième paires de péréiopodes sont sectionnées avec des ciseaux de Wecker et montées entre lame et lamelle. Cette observation microscopique (grossissement x 200) permet de discriminer six stades de mue (A, B, C1, C2, D1, D2) représentatifs du degré d'avancement de la femelle dans son cycle de mue.

3.1.2. Estimation de la fertilité

Le nombre d'ovocytes secondaires dans chaque ovaire est compté *in vivo* par transparence en observant les femelles sous une loupe binoculaire (grossissement x 30).

3.1.3. Estimation de la fécondité

Pour évaluer la fécondité, les embryons de la femelle sont retirés du marsupium, déposés dans une goutte d'eau sur une lame de verre et comptés sous une loupe binoculaire (grossissement x 80). Le stade de développement embryonnaire est déterminé sur la base des critères définis chez *Gammarus pulex* (McCahon et Pascoe, 1988) et adaptés chez *Gammarus fossarum* par Geffard et al. (2010). Ces critères permettent de différencier cinq stades de développement (stade 1 à 5) qui sont caractérisés par différentes étapes clés de l'organogénèse (**Figure I-14**).

3.2. Mesure des marqueurs sub-individuels

3.2.1. Dosage des activités enzymatiques digestives

Préparation des échantillons

Pour les mesures réalisées sur des gammars entiers, chaque échantillon est composé d'un pool de 3 gammars. Par contre, pour les mesures réalisées sur le système digestif et sur le reste du gammadre, chaque échantillon est constitué respectivement d'un pool de 7 appareils digestifs et de 5 restes d'individus. Chaque échantillon est pesé, plongé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C .

Lors du traitement des échantillons, ceux-ci sont conservés dans la glace, afin de ne pas altérer les activités enzymatiques recherchées. Le broyage des échantillons s'effectue dans un tampon Tris-HCl de 0,01M à pH 7. Le volume de tampon est ajusté en fonction de la masse de tissus frais, à raison de 50 mg de tissus par mL de tampon utilisé. Pour broyer l'échantillon, trois billes en inox de 3 mm de diamètre sont placées dans chaque échantillon, qui est ensuite positionné dans un broyeur (Retsch) pour 2 minutes de broyage à une fréquence de 30 Hz. Les billes sont retirées et l'homogénat est vortexé avant de prélever les 20 μL nécessaires au dosage des protéines totales (**Figure II-9**). L'homogénat est ensuite centrifugé à 10 000 g durant 10 minutes à 4°C puis le surnageant obtenu est divisé pour chaque type de dosage à effectuer (**Figure II-9**).

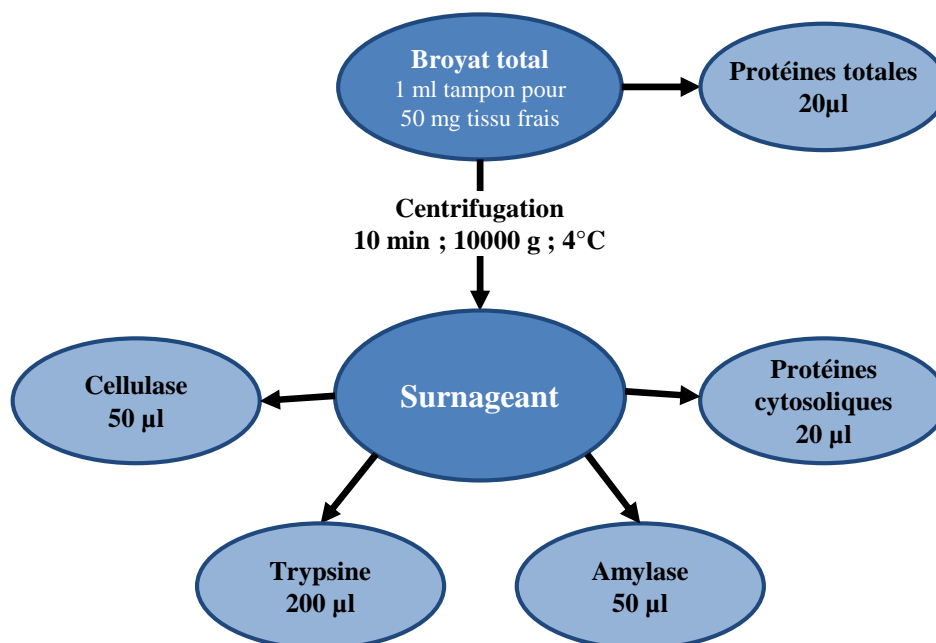


Figure II-9: Méthodologie de la préparation des échantillons pour l'étude des activités enzymatiques digestives

Dosage des protéines

Les concentrations en protéines sont déterminées selon la méthode de Bradford (1976). Une dilution de l'échantillon est effectuée respectivement au 1/5 et au 1/3 pour déterminer les concentrations en protéines totales et cytosoliques de chaque échantillon. Vingt microlitres de cette dilution sont placés dans un eppendorf et 1 ml de liquide de Bradford est ajouté. Le mélange est vortexé et placé à l'obscurité 30 minutes. La densité optique de l'échantillon est alors mesurée au spectrophotomètre (Cary 50, Varian) à une longueur d'onde de 595 nm. Une gamme étalon est réalisée parallèlement à partir de 4 concentrations de sérum d'albumine bovine (BSA) à 125, 250, 500 et 750 µg/ml afin de déterminer les concentrations de protéines présentes dans l'échantillon et exprimées en mg/ml. Des blancs sont également réalisés en remplaçant le volume d'échantillon par un volume de tampon de broyage Tris-HCl.

Dosage des carbohydrases (amylase et cellulase)

Les activités enzymatiques amylase et cellulase ont été déterminées selon la technique de Bernfeld (1955) modifiée par Palais et al. (2010) et adaptée pour le gammare, en utilisant comme réactif l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) permettant de quantifier les sucres réduits par l'action des enzymes sur leur substrat spécifique. Ainsi au cours de la réaction enzymatique (**Figure II-10**), l'acide 3,5-dinitrosalicylique de couleur jaune est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique de couleur orange-rouge en présence de sucre réduit à haute température.

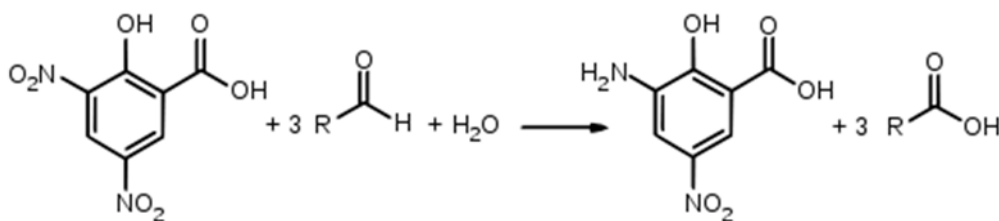


Figure II-10 : Equation de la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique en acide 3-amino-5-nitrosalicylique

L'ensemble des dosages enzymatiques a été réalisé sur des extraits enzymatiques dilués dans l'eau distillée au 1/20^{ème} pour l'amylase et au 1/10^{ème} pour la cellulase.

Pour le dosage de l'amylase, le substrat utilisé se présente sous la forme d'une solution d'amidon à 1% préparée dans un tampon phosphate (KH₂PO₄/ K₂HPO₄, 2 M; NaCl, 6 mM; pH 7). Pour le dosage de la cellulase, le substrat employé est une solution de

carboxyméthylcellulose à 2% préparée dans un tampon acétate ($\text{CH}_3\text{COOH} / \text{NaCH}_3\text{COO}$, 2M ; NaCl, 6mM ; pH 5,5).

Lors du dosage enzymatique, les mélanges réactionnels contenant 0,125 ml de substrat, 0,125 ml d'extrait enzymatique et une goutte de toluène sont incubés respectivement pendant 30 minutes à 42°C pour l'amylase et pendant 1 heure à 45°C pour la cellulase. La réaction enzymatique pour chacune des deux enzymes est réalisée dans les conditions optimales d'activités préalablement testées au laboratoire. Pour interrompre la réaction, 0,250 ml de DNS sont ajoutés puis le mélange est plongé durant 5 minutes dans l'eau bouillante. Enfin, l'échantillon est placé dans l'eau glacée pendant 10 minutes puis 2 ml d'eau distillée sont ajoutés. La quantité de sucre réduit produit durant la réaction est mesurée au spectrophotomètre à une absorbance de 540 nm. Des blancs sont également préparés en incubant du substrat seul et en ajoutant l'extrait enzymatique après le DNS. Le calcul de l'activité enzymatique de chaque enzyme est réalisé à partir d'une gamme étalon de maltose avec des concentrations comprises entre 0 et 9 mM. Les activités enzymatique obtenues sont ramenées à la quantité de protéines cytosoliques dans l'échantillon et exprimées en μg de maltose / mg de BSA / minute.

Dosage des protéases (trypsine)

L'activité enzymatique de la trypsine a été déterminée selon la méthode de Garcia-Carreño et Haard (1993) et adaptée à *G. fossarum*. Cette technique utilise comme substrat le Na-benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA). La trypsine, par hydrolyse de la liaison amide du substrat, libère deux composées, la Na benzoyl-L arginine et la p-nitroaniline (produit de couleur jaune) (**Figure II-11**). Ainsi, la formation de la p-nitroaniline peut être suivie en mesurant l'absorbance de ce produit à 410 nm.

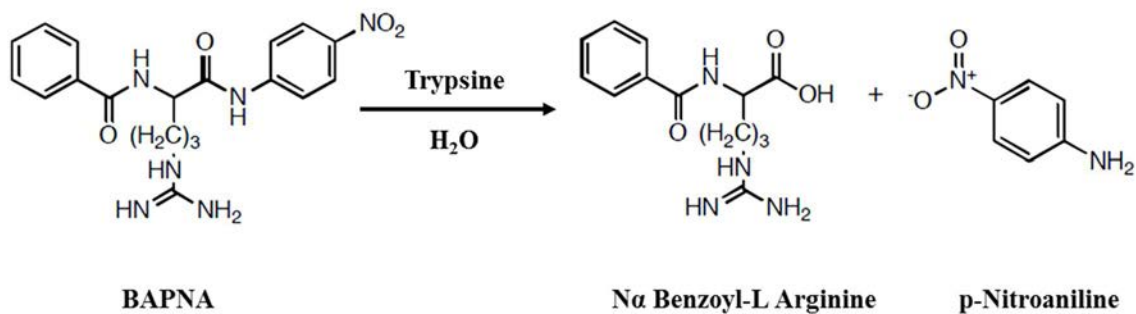


Figure II-11: Réaction du substrat (BAPNA) avec l'enzyme (trypsine)

Le dosage de la trypsine est réalisé avec une solution de BAPNA (3mM, pH 8) préparée avec un tampon Tris-Base (50mM), CaCl₂ (20mM) et DMSO (diméthylsulfoxyde). Au moment du dosage enzymatique, 0,5 ml de substrat sont ajoutés aux 0,2 ml d'extrait enzymatique. L'échantillon est incubé durant 10 minutes à 45°C. Pour interrompre la réaction, 0,5 ml d'acide acétique 30% sont ajoutés au mélange. La quantité de produit formé à l'issue de la réaction est mesurée au spectrophotomètre à une absorbance de 410 nm. Des blancs sont également préparés en incubant l'extrait enzymatique seul et en ajoutant le substrat après l'acide acétique. Le calcul de l'activité enzymatique de chaque enzyme est réalisé à partir d'une gamme étalon de p-nitroaniline avec des concentrations comprises entre 0 et 0,3 mM. Les activités enzymatique obtenues sont ramenées à la quantité de protéines cytosoliques dans l'échantillon et exprimées en µg de pNa / mg de BSA / minute.

3.2.2. Dosage des réserves énergétiques

Au cours de ces dosages, la quantité de lipides, de glycogène et de sucres libres est déterminée de manière individuelle pour chaque organisme et généralement 6 gammares

sont dosés par condition testée. Les protocoles suivants sont une adaptation des méthodes de Van Handel (1985a, b) et de Plaistow et al. (2003).

Comme pour les enzymes, le traitement des échantillons s'effectue dans la glace par souci d'homogénéité de température au cours des manipulations. Le broyage est réalisé en plaçant un gammare dans 800 µl de méthanol avec trois billes en inox de 3 mm de diamètre. Les échantillons sont ensuite positionnés dans un broyeur (Retsch) pour 2 minutes de broyage à une fréquence de 30 Hz. Chaque échantillon ainsi homogénéisé est divisé en deux volumes identiques (A et B) consacrés respectivement au dosage des lipides et à celui des sucres libres et du glycogène.

Dosage des lipides

Dans l'homogénat (A) de chaque échantillon est ajouté 200 µl de chloroforme afin de solubiliser les lipides totaux, puis les échantillons sont vortexés et placés durant 20 minutes à 4°C. Après cette période, les homogénats sont de nouveau vortexés puis 100 µl de ces solutions sont transférés dans des tubes en pyrex (16x100mm). Les tubes sont placés dans un bain-marie à 95°C durant 5 minutes jusqu'à complète évaporation du solvant. Puis 200 µl d'acide sulfurique (95%) sont ajoutés dans chaque échantillon avant d'être de nouveau placés dans le bain-marie à 95°C pendant 10 minutes. Finalement, les tubes sont sortis du bain puis stockés dans un bain glacé où 5 ml de réactif vanilline-acide phosphorique sont additionnés. Après 25 minutes d'attente, la densité optique du mélange est mesurée à 525 nm à l'aide du spectrophotomètre (Cary 50, Varian). La quantité de lipides dans les échantillons est déterminée en utilisant une courbe de calibration basée sur une solution standard d'huile d'olive (Sigma-Aldrich) (1 g/l) solubilisée dans du chloroforme.

Dosage des sucres

La totalité des sucres présents dans les échantillons (glycogène et sucres libres) sont déterminés en utilisant l'homogénat B. Afin de séparer les deux types de sucres, 200µl de sulfate de sodium (2%) sont ajoutés aux homogénats. Durant 20 minutes à 4°C le glycogène est adsorbé et précipite avec le sulfate de sodium. Puis les échantillons sont centrifugés à 4°C pendant 4 minutes à 2000g ceux-ci afin d'obtenir un culot de glycogène. Ainsi, le surnageant (solution 1) et le culot sont analysés séparément. Pour mesurer le glycogène facilement, le culot obtenu est remis en suspension dans 400 µl d'eau distillée (solution 2) à l'aide de trois billes en inox et d'une minute de broyage à 30 Hz (Mixer Mill

MM 400, Retsch, Haan, Germany). Après avoir vortexé chaque fraction d'échantillon, le surnageant contenant les sucres libres (solution 1) et le culot suspendu contenant le glycogène (solution 2), 300 µl de chaque solution sont transférés respectivement dans un tube en pyrex (16x100 mm). Puis 5 ml de réactif d'anthrone sont ajoutés à chaque échantillon avant d'être placé dans un bain-marie à 95°C pendant 17 minutes. Enfin les tubes sont sortis du bain et placés dans un bain d'eau glacé durant 10 minutes pour arrêter la réaction. La densité optique de chaque échantillon est lue à 630 nm avec le spectrophotomètre (Cary 50, Varian). La quantité de carbohydrate de chaque échantillon est déterminée à partir d'une courbe de calibration réalisée à partir d'une solution standard de glucose (1 g/l) solubilisée dans de l'eau distillée.

Le calcul de l'énergie disponible (E_a)

L'énergie disponible représente la somme des contributions énergétiques des trois constituants des réserves (protéines 24 000 mJ/mg, sucres 17 500 mJ/mg, lipides 39 500 mJ/mg). L'énergie disponible est exprimée en mJ/mg d'organisme. Cette valeur peut servir au calcul de l'AEC (Bagheri et al., 2010).

4. Traitement statistique des données

Les analyses statistiques réalisées sont présentées dans les articles proposés ou sont associées aux résultats exposés en français.

Chapitre III

Résultats et discussion des travaux

Partie 1

Caractérisation éco-physiologique des
réponses du métabolisme énergétique
et lien avec la reproduction

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION DES TRAVAUX

PARTIE 1 : CARACTERISATION ECO-PHYSIOLOGIQUE DES REPNSES DU METABOLISME ENERGETIQUE ET LIEN AVEC LA REPRODUCTION

Cette première partie de ce chapitre est consacrée à l'étude des réponses biologiques d'intérêt (enzymes digestives et réserves) en conditions contrôlées. Cet axe d'étude mené en laboratoire a été traité en quatre sous-parties, chacune ayant pour objet d'apporter des éléments permettant de répondre aux deux objectifs suivants :

1-Quelle est l'influence des facteurs biotiques et abiotiques sur les réponses biologiques abordées (enzymes digestives et réserves énergétiques) ?

2-Peut-on faire le lien entre une perturbation de ces réponses sub-individuelles et des effets sur la descendance ?

Dans une première sous-partie, des résultats relatifs à la localisation tissulaire des enzymes d'intérêt (amylase, cellulase et trypsine) ont été présentés afin de préciser leur origine. Dans une seconde sous partie, l'influence des facteurs abiotiques tels que la température et la conductivité sur l'activité enzymatique digestive et les réserves a été abordée. Dans une troisième sous-partie, l'influence du sexe, du stade reproducteur et l'impact d'une privation alimentaire sur les activités digestives et les réserves énergétiques du gammare sont présentés dans une publication intitulée « Influence of moulting and starvation on digestive enzyme activities and energy storage in *Gammarus fossarum* » (article n°1). La quatrième sous-partie s'intéresse au lien potentiel entre une perturbation des réponses enzymatiques digestives et son effet sur le succès reproducteur. Cette étude se présente sous la forme d'une publication intitulée « Consequences of impaired digestive enzyme activity on the energy reserves and the reproductive outcome in *Gammarus fossarum* » (article n°2).

1. Localisation des enzymes digestives (amylase, cellulase et trypsine) chez *Gammarus fossarum*

Les activités enzymatiques digestives des gammaridés ont été appréhendées de manière différente selon les objectifs recherchés. En effet, une partie des études concernant la physiologie et la biochimie de la digestion chez ces organismes a été réalisée sur des extraits de l'appareil digestif ou sur l'appareil entier (Monk, 1977, Bärlocher, 1982, Bärlocher et Porter, 1986, Zimmer et Bartholmé, 2003). D'autres études ont considéré les activités enzymatiques à partir des organismes entiers (Chamier et Willoughby, 1986, McGrath et Matthews, 2000, Dedourge-Geffard et al., 2009). Cependant, chez le gammare, il apparaît qu'aucune étude n'a comparé l'activité enzymatique présente dans les tissus digestifs par rapport à celle présente dans le reste de l'individu. Ainsi, afin de s'assurer de la localisation des enzymes étudiées au cours de ce travail de thèse, nous avons mesuré chez le gammare mâle les activités enzymatiques (amylase, cellulase et trypsine) dans l'organisme entier, les caeca et dans le reste de l'organisme (sans caeca). Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure III-1**.

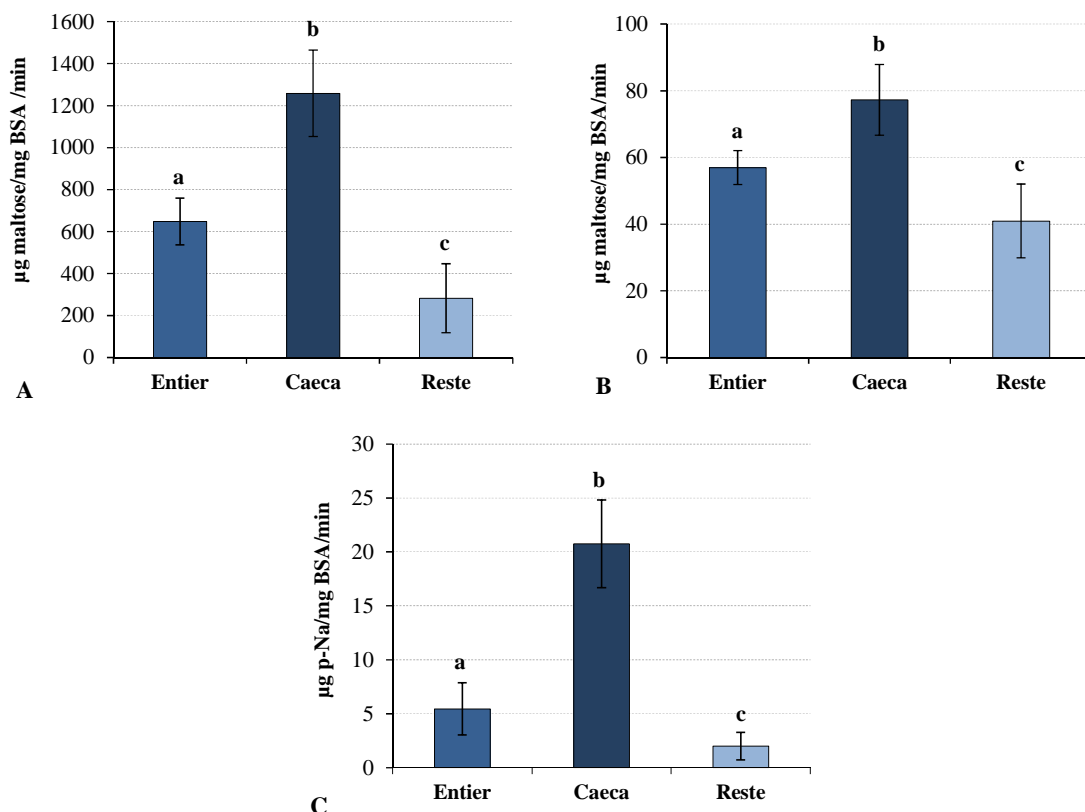


Figure III-1 : Activité enzymatique digestive de l'amylase (A), de la cellulase (B) et de la trypsine (C) mesurée chez *Gammarus fossarum* dans l'organisme entier, dans les caeca ou dans le reste de l'organisme (sans caeca) (moy ± ET, n=6). Les barres présentant la même lettre ne sont pas statistiquement différentes (Test de KruskalWallis, $p < 0,05$)

Les moyennes obtenues pour le dosage des organismes entiers (648 μg maltose/mg BSA/min pour l'amylase, 56 μg maltose/mg BSA/min pour la cellulase et 5,4 μg p-nitroaniline/mg BSA/min pour la trypsine) sont comparables à d'autres résultats obtenus chez des organismes mâles maintenus en laboratoire entre 12 et 14°C où les valeurs sont respectivement de l'ordre de 620 et 50 μg maltose/mg BSA/min et de 4,5 μg p-nitroaniline/mg BSA/min. Ces données révèlent que les activités amylase, cellulase et trypsine se trouvent principalement dans les caeca avec des ratio respectivement 4,5 fois, 2 fois et 10 fois supérieurs dans les caeca que dans le reste de l'organisme.

La présence majoritaire des activités dans l'appareil digestif nous permet de confirmer le rôle prépondérant de ces trois enzymes dans le processus de digestion. Ainsi l'étude de ces activités enzymatiques reflète bien le potentiel digestif des organismes, même lorsque ces activités sont mesurées chez les individus entiers.

Au regard de ces résultats et compte tenu du temps nécessaire à la dissection de chaque individu pour travailler uniquement sur des caeca digestifs, il a été choisi de mesurer les activités enzymatiques sur les organismes entiers.

2. Influence des facteurs environnementaux (conductivité et température de l'eau) sur l'activité digestive et les réserves énergétiques de *Gammarus fossarum*

Comme évoqué dans la deuxième partie du chapitre I, les facteurs abiotiques du milieu peuvent influencer considérablement les réponses du métabolisme énergétique en faisant varier leur niveau basal. Ce phénomène peut limiter considérablement l'interprétation des réponses étudiées en tant que marqueurs de toxicité dans le milieu naturel.

Parmi les facteurs abiotiques particulièrement variables dans le milieu naturel, la température et la conductivité sont des facteurs majeurs pouvant influencer l'acquisition de l'énergie. En effet, Maltby et al. (2002) ont souligné que la température et la conductivité de l'eau étaient les deux principaux facteurs environnementaux influençant le taux d'alimentation des gammaridae. Plus récemment Coulaud et al. (2011) ont mis en évidence que le taux d'alimentation de *Gammarus fossarum* est significativement supérieur chez les organismes placés à 16°C par rapport à ceux placés à 7°C. Ainsi, le comportement alimentaire et, par conséquent, l'énergie ingérée par l'organisme sont modulés par ces paramètres environnementaux.

Par ailleurs, nous pouvons évoquer l'intérêt biochimique d'étudier l'impact de deux facteurs influençant considérablement les propriétés lytiques des enzymes. En effet, la température du milieu de vie d'un organisme ectotherme comme le gammare pourrait influencer l'activité de son métabolisme interne et digestif. Quant à la teneur en ions dans le milieu, elle peut également influencer la composition minérale du bol alimentaire, comme cela a été démontré chez les crustacés au cours d'expériences *in vivo* (Vega-Villasante et al., 1993, De Coen et al., 2000) où la teneur en ions dans le milieu a inhibé ou activé l'activité des enzymes digestives.

Dans ce contexte, il apparaît judicieux de nous focaliser sur l'influence de ces deux facteurs pour caractériser nos réponses d'intérêts. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'effet de trois températures (7, 12 et 16°C) et trois conductivités (200, 500 et 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$) chez des gammars mâles et chez des femelles à différents stades de reproduction (B, C et D). Concernant l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude, la normalité et l'homogénéité des variances ont été évaluées respectivement en utilisant le test de Shapiro-Wilk et le test de Lévène. Puis une analyse de variance ANOVA a été réalisée afin de déterminer un éventuel effet de la température et de la conductivité sur les réponses étudiées. Enfin un test post-hoc de Tukey a été conduit pour identifier les différences entre les groupes exposés. Les différences sont considérées significatives à $p < 0,05$.

2.1. Réponses des activités enzymatiques digestives de *Gammarus fossarum*

Chez les mâles, les enzymes glycolytiques (amylase et cellulase) présentent chacune des réponses différentes vis-à-vis de la température et de la conductivité (**Figure III-2**).

L'activité amylase n'est pas influencée par la conductivité de l'eau ($p=0,48$) (non montré), en revanche elle augmente avec la température ($p=0,028$). Cet effet température est mieux visible en regroupant l'ensemble des valeurs obtenues pour toutes les conductivités testées (200, 500 et 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$) à une température donnée. Ainsi, on peut observer que les gammars maintenus à 7°C ont une activité amylase significativement plus faible d'en moyenne 20% que celle des gammars maintenus à 12 ou 16°C (**Figure III-2A**). Par contre, l'activité de la cellulase est influencée aussi bien par la température que par la conductivité (**Figure III-2B**). Comme pour l'amylase, les gammars exposés à 7 °C présentent une activité de la cellulase plus faible que ceux exposés à 12 et 16°C (excepté pour la condition 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ à 12°C). L'influence de la conductivité sur l'activité de la

cellulase n'est visible que chez les organismes maintenus à 7°C, l'activité cellulase augmente progressivement avec la conductivité (**Figure III-2B**).

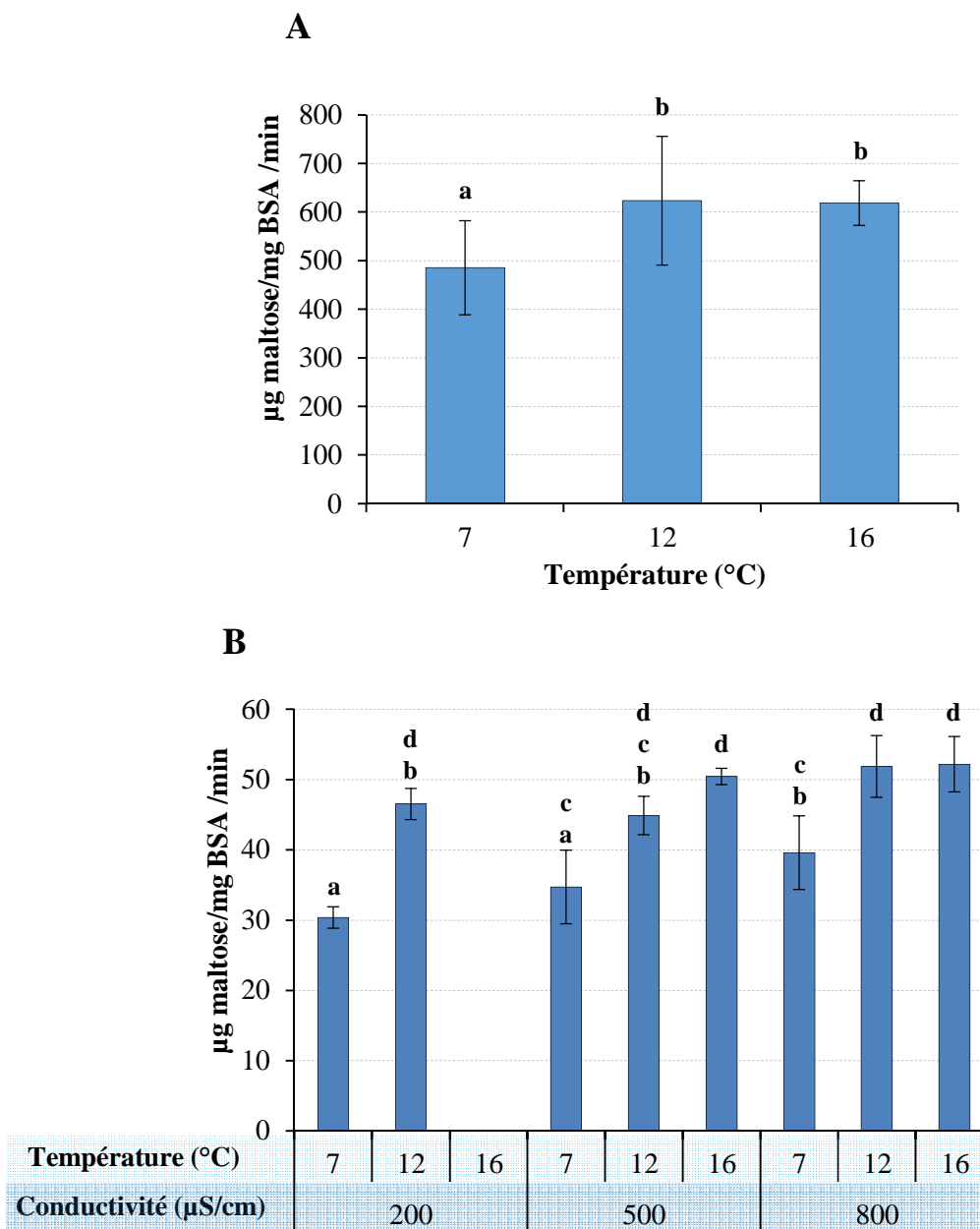


Figure III-2 : Activité de l'amylase (A) mesurée chez les gammarès mâles exposés à trois températures (7, 12 et 16°C), n=9. Activité de la cellulase (B) mesurée chez les gammarès mâles exposés à trois températures (7, 12 et 16°C) et trois conductivités (200, 500 et 800 µS/cm), n=3. Les barres présentant la même lettre ne sont pas statistiquement différentes (p<0,05)

Chez les **fémmelles**, les enzymes glycolytiques (amylase et cellulase) présentent des réponses similaires vis-à-vis de la température et de la conductivité (**Figure III-3**).

Quel que soit le stade considéré (B, C ou D), l'activité enzymatique n'est pas influencée par la conductivité ($p=0,85$) (non montré), en revanche un effet température peut être observé au stade C et D. Au stade C, les gammars exposés à 7 °C présentent des activités amylase et cellulase plus faibles que ceux exposés à 12 et 16 °C. Au stade D, les organismes maintenus à 16°C ont des activités amylase et cellulase supérieures à ceux maintenus à 7 et 12°C (**Figure III-3**).

Enfin chez les **mâles et les fémmelles**, l'activité de la trypsine n'est influencée par aucun des deux facteurs testés (données non présentées).

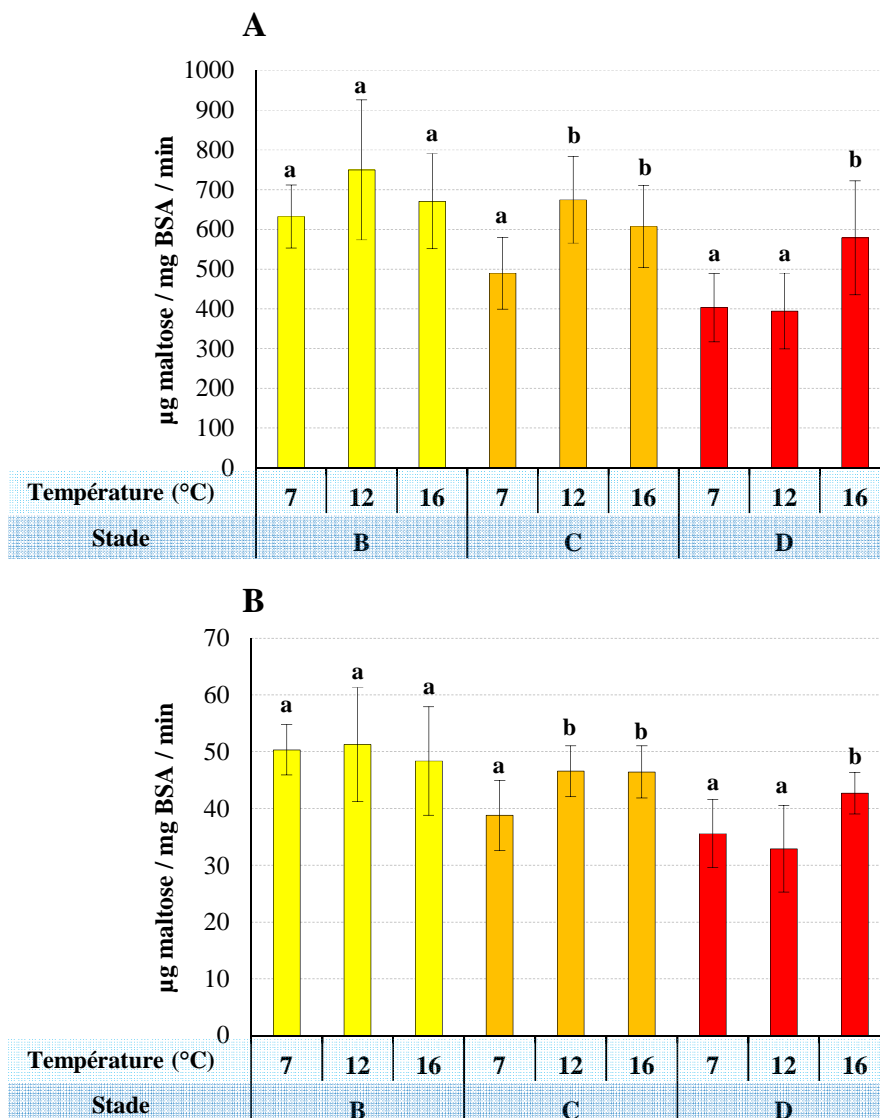


Figure III-3 : Activités amylase (A) et cellulase (B) mesurées chez les gammars fémmelles aux trois stades de reproduction (B, C et D) à trois températures (7, 12 et 16°C), n=9. Chacun des stades est analysé séparément, ainsi les barres d'un même stade présentant la même lettre ne sont statistiquement pas différentes ($p < 0,05$)

D'une manière globale, les résultats obtenus montrent que l'activité enzymatique digestive des gammares n'est pas (ou peu) influencée par la conductivité du milieu. Par ailleurs, les activités amylase et cellulase chez les mâles et les femelles sont modulées par la température avec des activités plus importantes aux températures les plus élevées. Ces résultats sont pris en considération chez le mâle dans la publication n°4. Cependant aucune relation linéaire ne peut être faite entre les activités enzymatiques mesurées et la température du milieu. Chez les femelles, les différences de réponses en fonction du stade soulignent que le cycle de reproduction et/ou de mue influence de manière importante les activités enzymatiques digestives et que cet effet prend le pas sur celui de la température. L'influence du cycle reproducteur de la femelle sur les réponses enzymatiques fait l'objet de discussion dans l'article n°1.

2.2. Réponses des réserves énergétiques de *Gammarus fossarum*

L'ensemble des résultats de cette partie présente les réserves énergétiques des gammares sous forme d'énergie disponible exprimée en mJ/mg de poids frais. L'énergie disponible est égale à la somme des équivalents énergétiques de chaque type de réserve mesurée (protéines, sucres et lipides) (**Figure III-4 et Figure III-5**).

Chez **les mâles**, les résultats montrent que l'énergie disponible n'est pas influencée par la température ($p=0,22$), par contre elle est conditionnée par la conductivité du milieu ($p=0,0004$). Ainsi, les données obtenues pour les trois températures testées (7, 12 et 16°C) ont été regroupées pour présenter l'effet de la conductivité. Nous pouvons alors observer que les gammares maintenus à 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ont une énergie disponible significativement plus élevée que ceux exposés à 200 et 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$. A 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ les réserves énergétiques sont en moyenne 15% plus élevées qu'à 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (**Figure III-4**).

Chez **les femelles**, l'énergie disponible n'est pas influencée par la température ($p=0,09$), ceci quel que soit le stade de reproduction étudié (B, C ou D). Par contre, un effet conductivité est constaté au stade B et C ($p=0,0002$). Les gammares exposés à 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ montrent un niveau d'énergie disponible de 5 à 15% inférieur aux organismes exposés à 500 et 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (**Figure III-5**).

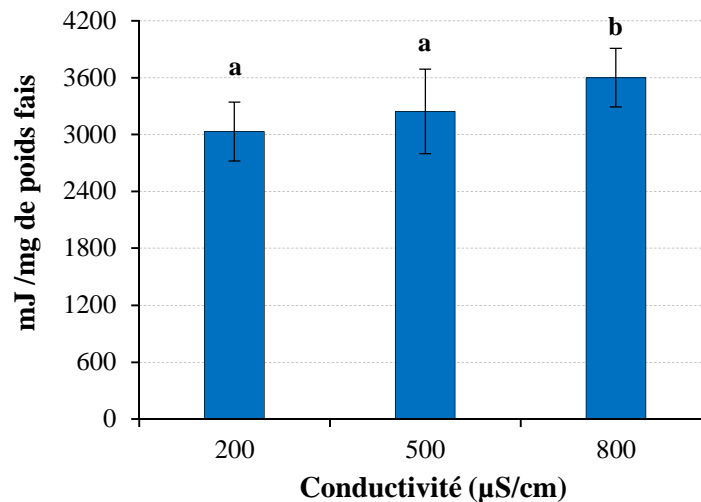


Figure III-4 : Energie disponible mesurée chez les gammarus mâles exposés à trois conductivités (200, 500 et 800 µS/cm), n=3. Les barres présentant la même lettre ne sont pas statistiquement différentes ($p < 0,05$)

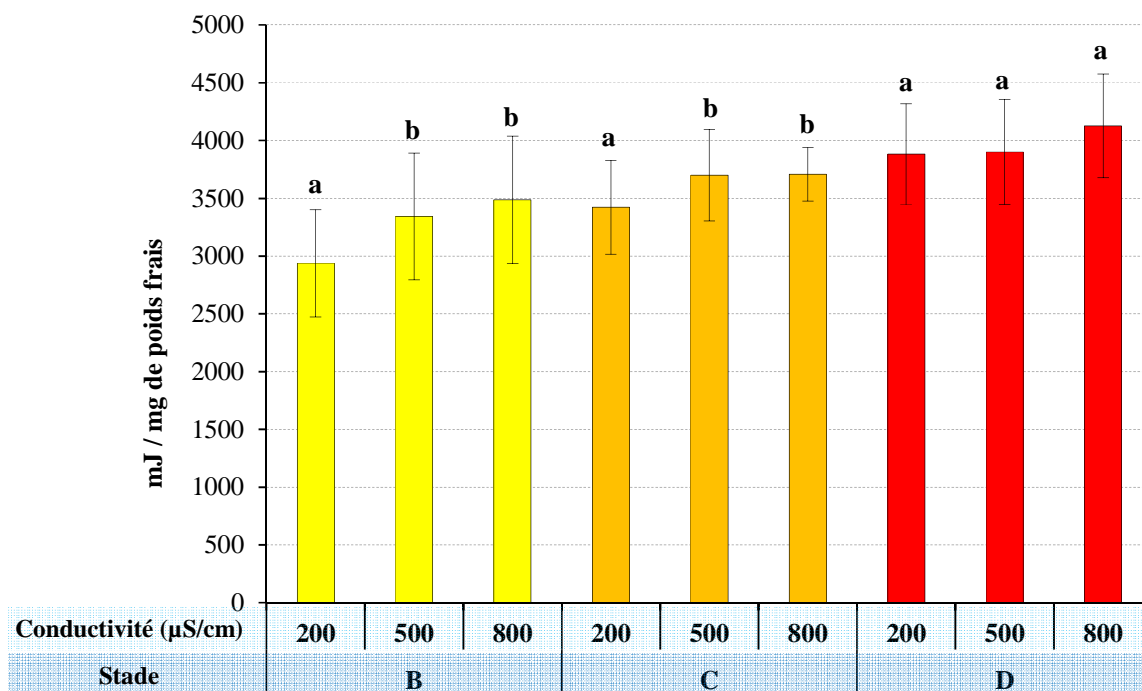


Figure III-5 : Energie disponible mesurée chez les gammarus femelles aux trois stades de reproduction (B, C et D) à trois conductivités (200, 500 et 800 µS/cm), n=9. Chacun des stades est analysé séparément, ainsi les barres pour un même stade présentant la même lettre ne sont pas statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Globalement, les réserves énergétiques des gammares ne sont pas influencées par la température du milieu. En outre, la conductivité de l'eau a tendance à moduler les niveaux d'énergie chez les mâles et les femelles. Les niveaux d'énergie des organismes exposés à 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ sont significativement plus élevés que ceux des gammares exposés à 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (excepté pour le stade D chez les femelles). Par ailleurs, aucune relation linéaire ne peut être faite entre les réserves énergétiques mesurées et la conductivité du milieu. Enfin, comme pour les activités enzymatiques digestives, chez les femelles, le stade de reproduction et/ou de mue influence de manière importante les réserves énergétiques et cet effet surpasse celui de la conductivité. L'influence du cycle reproducteur de la femelle sur les réponses énergétiques est traitée dans l'article n°1.

Il est difficile de confronter à d'autres données les résultats que nous avons obtenus concernant l'effet de la température sur les activités enzymatiques digestives chez *G. fossarum*; aucune étude comparable n'a été menée chez les amphipodes. Cependant, il apparaît pertinent de comparer la réponse digestive au comportement alimentaire de l'organisme étudié dans des conditions similaires. D'après les résultats de Coulaud et al. (2011) l'apport alimentaire de cette espèce est également influencé par la température. En effet, à 7°C le taux d'alimentation des gammares est réduit de 50% par rapport à celui des organismes placés à 16°C. La variation similaire des activités enzymatiques digestives et du taux d'alimentation par rapport à la température du milieu souligne le lien étroit existant entre l'activité d'une enzyme et la quantité présente de son substrat dans la nourriture disponible. On peut supposer ici que lorsque le gammare s'alimente davantage, son activité enzymatique digestive augmente. Ainsi une quantité d'énergie plus grande est acquise à 16°C par rapport à 7°C. Cependant, avec des organismes nourris *ad libitum* en conditions contrôlées, les résultats obtenus montrent que la quantité de réserve énergétique chez cet organisme n'est pas influencée par la température. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que la demande énergétique à 16°C est supérieure à la demande à 7°C. Ainsi, dans le contexte de notre étude (exposition relativement courte, avec une alimentation contrôlée) l'acquisition de l'énergie serait proportionnelle à la demande. Selon Giller et Malmqvist (1998), une augmentation de 10°C peut multiplier par deux ou par trois l'activité métabolique des organismes ectothermes comme le gammare. Une telle augmentation d'activité s'accompagne probablement d'une demande énergétique accrue. Ainsi, les travaux *in situ* considérant les réserves énergétiques de différentes espèces de gammare

(dont *G. fossarum*) au cours de l'année ont montré que l'énergie totale du mâle et de la femelle diminue de décembre à septembre avec l'augmentation de la température dans le milieu naturel (Sroda et Cossu-Leguille, 2011b, Gismondi et al., 2012a, Becker et al., 2013). Cette diminution de l'énergie au cours de l'année est vraisemblablement due à l'augmentation de l'activité des organismes en lien avec l'augmentation des températures du milieu. La dépendance du rythme biologique de *Gammarus fossarum* par rapport à la température a déjà été mise en évidence de manière précise. La femelle en conditions contrôlées présente un cycle de mue et de reproduction d'une durée de 65 jours à 7°C qui n'est plus que de 25 jours à 16°C (Coulaud, 2012). Ceci semble confirmer que lorsque la température du milieu est élevée, l'activité et les besoins énergétiques du gammare augmentent. Plusieurs études ont également souligné que chez le mâle, le comportement associé à la reproduction présente un coût énergétique élevé (Plaistow et al., 2003, Koop et al., 2011, Becker et al., 2013).

Il semble probable que les gammares adaptent leur rythme physiologique et comportemental à la température du milieu. Ainsi, une augmentation de la température provoque une accélération de la mue, de la reproduction (Pöckl, 1992), de la respiration (Sutcliffe, 1984) et de la locomotion (Issartel et al., 2005), s'accompagnant d'une augmentation des dépenses énergétiques. Dans le cadre de notre étude, il semble que les dépenses énergétiques (variables selon la température considérée) ont été compensées par la nourriture proposée. En revanche, il est très probable que le milieu naturel offre des conditions moins favorables notamment au niveau trophique, entraînant au cours du temps une diminution de l'énergie disponible. Ainsi à terme, la quantité d'énergie deviendrait insuffisante pour assurer la reproduction, dès lors les organismes entreraient en période de repos sexuel (Becker et al., 2013).

Selon les résultats obtenus par Coulaud (2012) chez *Gammarus fossarum*, la conductivité du milieu ne présente pas d'influence sur le taux d'alimentation, la croissance, le cycle de mue, la fertilité et la fécondité de cet organisme. Cependant, d'après nos résultats, les réserves énergétiques apparaissent influencées par la conductivité du milieu. Nous pouvons surtout souligner qu'il existe une quantité de réserves plus faible à 200 $\mu\text{S/cm}$ par rapport à 800 $\mu\text{S/cm}$. Dans le cadre de notre étude, les organismes étudiés proviennent tous du site « La Tour du Pin », présentant une conductivité de 600 $\mu\text{S/cm}$ (± 50) en moyenne. Pendant leur période de stabulation au laboratoire les gammares ont été maintenus à cette même conductivité. Au cours de notre étude, les organismes ont été placés à différentes

conductivités entraînant probablement des variations dans leur activité osmorégulatrice. Les animaux d'eau douce sont des organismes hyperosmotiques, leur milieu intérieur est plus concentré en ions (Na^+ , K^+ , H^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} ...) que l'eau dans laquelle ils vivent (Corsin, 1999). Ainsi, pour atteindre son équilibre ionique l'organisme doit absorber les ions présents dans son milieu par un processus de transport actif d'ion qui nécessite de l'énergie. Selon Sutcliffe (1984), une concentration en ions dissous supérieure ou inférieure aux seuils de tolérance d'un organisme provoque chez celui-ci un stress osmotique qui présente un coût énergétique pour l'organisme. Dans une eau pauvre en ions, l'organisme aurait plus de mal à maintenir son équilibre ionique puisqu'il doit augmenter son activité ventilatoire ou locomotrice pour favoriser l'absorption cutanée des ions qui sont peu présents dans le milieu (Komnick, 1977). L'énergie dépensée par *Gammarus fossarum* pour assurer sa régulation ionique n'est pas compensée par une augmentation de sa prise alimentaire (Coulaud et al., 2011), ce qui a pour conséquence une diminution de ces réserves énergétiques. Nous pouvons d'après les résultats cités précédemment (Coulaud, 2012) affirmer que ce coût énergétique est limité et n'a pas de conséquence sur la fitness de la population de *G. fossarum* étudiée.

Pour conclure, l'influence des facteurs abiotiques testés sur les activités enzymatiques digestives et les réserves énergétiques de *Gammarus fossarum* semble être assez limitée. Par ailleurs, l'influence de facteurs biotiques tels que le stade de reproduction de la femelle abordé dans l'article suivant aurait une influence considérable sur les deux types de réponses biologiques considérées.

3. Influence du sexe, du stade reproducteur et d'une privation alimentaire sur les activités digestives et les réserves énergétiques du gammare

Parmi les nombreuses réponses biologiques étudiées en écotoxicologie, les biomarqueurs énergétiques comme les activités enzymatiques digestives et les réserves énergétiques apparaissent être des outils prédictifs pour la détection des perturbations physiologiques chez les organismes. Cependant, l'utilisation de ces réponses biologiques comme biomarqueurs peut être limitée par l'effet de facteurs de confusion (d'origine biotique et abiotique) et par des processus physiologiques comme le cycle reproducteur de l'organisme. Ainsi, la compréhension des effets de ces facteurs sur le métabolisme énergétique de l'espèce sentinelle étudiée permettrait l'utilisation optimale de ces biomarqueurs. Dans cette étude, nous avons choisi de considérer l'effet du sexe, du cycle de reproduction chez la femelle et l'effet de la disponibilité de la nourriture sur l'activité enzymatique digestive et les réserves énergétiques de *Gammarus fossarum*.

Les résultats obtenus ont indiqué que durant le cycle reproducteur de la femelle, les activités enzymatiques digestives (amylase, cellulase et trypsine) diminuent significativement, tandis que le niveau des réserves énergétiques (protéines, lipides et sucres) augmente jusqu'au dernier stade de pré-mue (D1). D'autre part, la privation alimentaire a provoqué une diminution des activités amylase chez les deux sexes, tandis que les activités trypsine n'ont pas été influencées. Par ailleurs, cette restriction nutritionnelle a induit une chute des réserves énergétiques chez les femelles mais aucun effet n'a été observé sur les réserves énergétiques des mâles.

Globalement, les réponses biochimiques (activités enzymatiques digestives et réserves énergétiques) sont apparues plus stables chez les mâles que chez les femelles. Ainsi, ces résultats valident l'utilisation des organismes mâles nourris *ad libitum* pour limiter les effets des facteurs de confusion lors de l'utilisation des biomarqueurs énergétiques chez *Gammarus fossarum* dans le cadre des programmes de surveillance des milieux dulçaquicoles.

Article n°1**Influence of molting and starvation on digestive enzyme activities and energy storage in *Gammarus fossarum***

Laetitia Charron¹, Olivier Geffard², Arnaud Chaumot², Romain Coulaud², Ali Jaffal¹, Véronique Gaillet¹, Odile Dedourge-Geffard¹, Alain Geffard^{1*}

Plos One (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0096393

¹ Université Reims Champagne Ardenne, Unité Interactions Animal-Environnement (EA 4689), Reims, France

² Institut national de Recherche en sciences technologiques pour l'environnement et l'agriculture, Unité de Recherche Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions (MAEP), Villeurbanne, France

*Corresponding author: Alain Geffard

E-mail : alain.geffard@univ-reims.fr

Tel: + 33 3 26913342

Abstract

Among the many biological responses studied in ecotoxicology, energy-based biomarkers such as digestive enzyme activities and energy reserves appear to be useful predictive tools for detecting physiological disturbances in organisms. However, the use of these biological responses as biomarkers could be limited by the effects of confounding factors (biotic and abiotic) and physiological processes, such as the reproductive cycle. Thus, the optimal use of these biomarkers will be facilitated by understanding the effects of these factors on the energy metabolism of the sentinel species being studied. We considered abiotic factors (temperature and conductivity) in a previous study, whereas the present study investigated the effects of gender, the female reproductive stage, and food availability on the digestive enzyme activities and energy storage of *Gammarus fossarum*. The results indicated that, during the female reproductive cycle, the activities of digestive enzymes (amylase, cellulase, and trypsin) decreased significantly, whereas the levels of reserves (proteins, lipids, and sugar) increased until the last premolt stage. Restricted food diets only led to decreased amylase activities in both sexes. Food starvation also induced a decrease in the energy outcomes in females, whereas there were no effects in males. In general, the biochemical (digestive enzyme activities) and physiological (energy reserves) responses were more stable in males than in females. These results support the use of males fed *ad libitum* to limit the effects of confounding factors when using these energy biomarkers in *Gammarus fossarum* during biomonitoring programs.

Keywords: amylase, available energy, cellulase, glycogen, invertebrate, lipids, reproductive cycle, trypsin.

Introduction

A challenge in aquatic ecotoxicology is the development of relevant ecological tools for detecting the roles of chemical contaminations in environmental quality degradation. In general, population level biological impacts can be tracked by monitoring many responses at lower levels of biological organization (sub-individual or individual) because some of them are related more or less directly to fitness traits (survival, reproduction, and growth) [1]. Based on this framework, several ecotoxicological studies have investigated biological responses related to energy metabolism. Early disturbances in energy intake can affect growth, maintenance, reproduction, and energy reserves [2]. Thus, variation in energy metabolism appears to be a good predictive tool for detecting physiological disturbances in organisms that are linked to ecosystem quality [3]. For example, the cellular energy allocation approach is ecologically relevant because cellular effects are linked to higher levels of biological organization in crustaceans [4,5] and mollusks [6]. Similarly, a decrease in the scope for growth appears to be a sensitive indicator of stress in invertebrates [7,8]. Variations in energy reserves can also be considered biochemical responses to stress [2]. Previous studies of gammarids have shown that significant modulations in the feeding rates and the activities of digestive enzyme are correlated with chemical water quality [9,10]. However, the same studies highlighted the potentially strong effects of confounding factors and the importance of characterizing such biological responses accurately before using them as biomarkers.

Chemical stress is not the only source of disrupted responses in organisms and many potential variable factors can lead to misinterpretations [11]. Thus, biomarkers can be influenced by different environmental factors. For many years, studies have focused on the effects of environmental factors as external sources of variability in biological responses [9,12]. Studies of these external sources of variability have considered many abiotic effects, such as temperature [9,13,14], salinity [14], pH [15], and conductivity [9,13]. The effects of external biotic parameters have also been investigated in biotic relationships such as parasitism [16,17] and symbiosis [18,19]. In studies of energy acquisition, the amount of food available must be considered as a major source of variability that affects digestive enzyme activities [20] and energy reserves [21,22]. In addition, it may be necessary to consider intrinsic biotic characteristics that define the organism being studied. In general, biotic parameters such as gender [23], stage of development [24], sexual maturity, and the reproduction cycle [25] must be considered as factors that are likely to affect biomarkers.

Thus, the optimal use of biomarkers will be facilitated by understanding the effects of confounding factors on the biochemistry, physiology, and behavior of the sentinel species being studied.

Among the freshwater species that are used intensively in ecotoxicology, *Gammarus fossarum* is a representative test species. In addition to its sensitivity to contaminants [26], this organism is widespread and has a high population density in the West Palaearctic. Moreover, gammarids play major roles in the European freshwater ecosystem. First, they represent a major source of food for macro-invertebrates, fishes, amphibians, and bird species [27]. Second, gammarids have a key role in the food web as common shredders and they are important for leaf litter breakdown processes [28]. Thus, physiological disturbances in *Gammarus* spp. may have effects at higher levels of biological organization [29].

The present study focused on understanding the physiological processes related to energy metabolism during: (i) the reproductive cycle of females organisms and (ii) starvation. Our previous study analyzed the effects of abiotic factors (temperature and conductivity) [13], whereas the present complementary study investigated the effect of different factors (gender, female reproductive cycle, and food availability) on the activities of digestive enzymes and energy storage in *G. fossarum*. These two approaches may help to elucidate the effects on biomarker responses of parameters that are considered to be confounding factors, thereby facilitating their use in biomonitoring studies.

Materials and methods

Ethics statement

Gammarids were sampled by members of the Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA), which is the French national institute of science and technology for environment and agriculture. All of the necessary authorizations for sampling were obtained for the designated site at La Tour du Pin.

In France, amphipod research does not require permission, *G. fossarum* is not a protected species and its use in scientific research does not require any specific authorization. All efforts were made to minimize suffering during laboratory experiments.

Collection and maintenance of gammarids

Gammarids were collected by kick sampling at La Tour du Pin, upstream of the Bourbre River (France). This station has good water quality according to the data records of the RNB (French Watershed Biomonitoring Network) and a high density of gammarids. Adult *G. fossarum* were collected using a hand-held net and recovered using 2–2.5 mm mesh sieves. Immediately after sampling, the organisms were kept in a plastic bucket and transferred promptly to the laboratory. The organisms were maintained during a 15-day acclimatization period in 30-L tanks with constant aeration at $14 \pm 0.5^\circ\text{C}$ using a 10/14 h light/dark photoperiod. The tanks were supplied continuously with drilled groundwater mixed with softwater (obtained by reverse osmosis) to adjust the sampling site conductivity to $600 \mu\text{S cm}^{-1}$. The organisms were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*), which had been conditioned for at least 6 ± 1 days in groundwater. Freeze-dried *Tubifex* sp. worms were added as a dietary supplement twice each week.

Experimental design

Effects of gender and the female reproductive cycle on energy metabolism parameters

G. fossarum is an example of a crustacean where the molting and reproductive cycles can occur concurrently in sexually active females. According to a previous study [30], several features characterize the molt and reproductive stages in females. For *G. fossarum*, Geffard et al. [30] described six molt stages, which are determined by the hardening of the cuticle, the retraction of the epidermis from the cuticle, and the secretion of the new cuticle. The six different stages are referred to as postmolt (A and B), intermolt (C1 and C2), and premolt (D1 and D2). Molting stage A is very short and the two postmolt stages (A and B) are grouped into a single AB stage. The reproductive behavior and oocyte maturity change during the molt cycle. The beginning of the molt cycle (stage AB) is characterized by spawning and fertilization. The first vitellogenesis occurs between stages AB and C1, where the apparent mean follicle surface measures $24800\text{--}45100 \mu\text{m}^2$ [30]. The second vitellogenesis occurs between stages C2 and D2, where the follicle surface grows significantly to $106000\text{--}164000 \mu\text{m}^2$. Between stages C2 and D2, a male will grasp a female and place her in a position of precopulatory amplexus until the time of fertilization [31].

According to Geffard et al. [30], the female reproductive (and molt) stages can be determined by studying the cuticle shape. Thus, the ends of the third and fourth periopod pairs (dactilopodite and protopodite) in each female were cut using Wecker's scissors. The periopod pieces were then prepared on a microscope slide with a coverslip and their integumental morphogenesis was observed ($\times 200$) to discriminate the five molt stages (AB, C1, C2, D1, and D2). For each moulting stages, six individual specimens were kept to measure their energy reserves and six pools of three specimens were used to measure the activities of digestive enzyme. In all cases, embryos were collected manually from the marsupium and eliminated. All of the samples were weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until they were analyzed.

In males, reproductive cycle (spermatogenesis) is little known and documented. Spermatogenesis duration is very short, six days after mating, the maximum stock of sperm in the testes is again obtained. Contrary to females, spermatogenesis is not related to moulting cycle, consequently morphological parameters are not available to accurately sample organism at different spermatogenesis stages. Finally, all males organisms sampled were in amplexus, (associated with females), consequently we are sure that they were in similar spermatogenesis stages (mature). As for females, six males were kept to measure their energy reserves and six pools of three males were used to measure the activities of digestive enzyme

Effects of food availability on energy metabolism parameters

After the acclimatization period, 210 females in the same molt stages (AB) and 210 males were selected for the study. Seven males and seven females were placed in each glass beaker ($n = 30$) with continuously renewed water (the acclimatization conditions are described above). According to previous experiments (Geffard et al., 2010), we applied feed conditions to induce gradually starvation diet of 0% (control) 50% or 75%. In these controlled conditions ($n = 10$ glass beakers), the organisms were fed *ad libitum* with discs of alder leaves that measured 2 cm in diameter 7 days each week (these conditions are referred to as 7/7). In two other conditions ($n = 10$ beakers per condition), the organisms were fed by supplying them with discs of alder leaves only 2 days each week (2/7, corresponding to 50% starvation diet) or only 1 day each week (1/7, corresponding to 75% starvation diet). After each feeding period in the 2/7 and 1/7 conditions, the remaining food was removed from the beakers and kept in a cold room for use in the next meal.

Females associated with males were sampled after 11 and 23 days at stages C1 and D1, respectively, in controlled conditions at $14 \pm 0.5^\circ\text{C}$. For each sampling period (11 and 23 days), each level of food tested (7/7, 2/7, and 1/7), and each gender, six individual organisms were kept to test their energy reserves and six pools of three organisms were collected to measure the activities of their digestive enzyme. All of the samples were weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until they were analyzed.

During this experiment, survival rates fluctuated between 93 to 89% and were not significantly different between exposure conditions.

Measurement of the digestive enzyme activities

Each pool of gammarids from both experiments was homogenized in Tris-HCl buffer (0.01 M, pH 7) for 2 min using a mixer mill (Retsch) at a frequency of 30 Hz. The homogenate was centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4°C . The supernatant was collected and stored at -80°C until the analysis.

The carbohydrase activities (cellulase and amylase) were measured using the 3,5-dinitrosalicylic reagent method [32], based on a published protocol [33]. The amylase activity was measured after 30 min of incubation at pH 7 and 42°C with a starch substrate (1%). The cellulase activity was measured after 60 min of incubation at pH 5.5 and 45°C with a carboxymethylcellulose substrate (2%). A calibration curve was established using maltose as the reference sugar. According to the protocol described by Garcia-Carreño and Haard [34], the trypsin activity was measured after 10 min of incubation at pH 8 and 45°C with the substrate of N-benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (3 mM). A calibration curve was established using p-nitroaniline (p-Na). Each enzyme activity was expressed as micrograms of the final product released per minute and per milligram of protein. The total and cytosolic protein contents in the supernatant were determined according to a published method [35] using bovine serum albumin (BSA) as the protein standard.

Measurement of energy reserves

To measure the amounts of total lipids, free sugar, and glycogen in individuals, each organism ($n = 6$ per condition) was placed in a tube containing 800 μL of methanol and three stainless steel balls. The samples were ground by shaking the tube for 2 min at 30 Hz (Mixer Mill MM 400, Retsch, Haan, Germany). Each homogenized sample was divided

into two identical volumes (A and B), where A was used to measure the total lipids and B was used to determine the free sugars and glycogen. The energy reserves were measured according to a method adapted from Plaistow et al. [36].

Chloroform (1:2 v/v) was added to each A homogenate to solubilize the total lipids. All of the samples were vortexed and kept for 20 min at 4°C. After vortexing, 100 µL of the homogenate was transferred to 16 × 100 mm culture tubes. The tubes were heated to 95°C in a water bath for 5 min, ensuring that the solvent had evaporated completely. Next, 200 µL of sulfuric acid (95%) was added to each tube before replacing them in the water bath for 10 min at 95°C. The tubes were then removed from the hot water, placed in an ice water bath, and 5 mL of vanillin-phosphoric acid reagent was added. The optical density was measured at 525 nm after 25 min. The quantity of lipids in the samples was determined using a calibration curve based on a standard olive oil (Sigma-Aldrich) solution (1 g/L), which was solubilized in chloroform.

All carbohydrates, including glycogen and free sugars, were determined using homogenate B. To separate the carbohydrates, 200 µL of sodium sulfate solution (2%) was added to the homogenate. After 20 min at 4°C, glycogen was adsorbed onto the sodium sulfate precipitate. The samples were centrifuged for 4 min at 2000 × *g* and 4°C to remove the glycogen residues. Next, the supernatant (solution 1) and the pellet were analyzed separately. To measure the glycogen content, the pellet was resuspended in 400 µL of distilled water (solution 2) and three stainless steel balls were added, followed by shaking for 1 min at 30 Hz (Mixer Mill MM 400, Retsch, Haan, Germany). After vortexing, 300 µL of the supernatant (solution 1) containing soluble free sugars and 300 µL (solution 2) of the glycogen homogenate were transferred into separate 16 × 100 mm culture tubes. Five milliliters of anthrone reagent was added to the tubes, which were then placed in a water bath at 95°C for 17 min. The tubes were removed from the water bath and kept in a cold bath for 10 min to stop the reaction. The optical density of each sample was measured at 630 nm to determine the soluble carbohydrate and glycogen levels. The carbohydrate level was determined by reference to a calibration curve prepared using a standard solution of glucose (1 g/L) in distilled water.

The available energy (E_a) was determined based on the total protein, carbohydrate, and lipid contents at each stage. Each type of energy reserve was transformed into its energetic

equivalent using the combustion enthalpy (24000 mJ/mg for protein, 17500 mJ/mg for carbohydrates, and 39500 mJ/mg for lipids) [2].

Statistical analysis

The statistical procedures were performed using XLSTAT [37]. The normality and homogeneity of the data were tested first using Shapiro-Wilk and Levene tests. These criteria were not satisfied, so nonparametric tests were used to analyze the data. The Kruskal-Wallis test was used to study the effects of the molt stage or gender on the physiological responses. For the starvation study, the diet effect and time exposure were assessed independently using the Mann-Whitney test.

Results and discussion

Effects of gender and female reproductive cycle on energetic metabolism biomarkers

Females

The activities of amylase, cellulase, and trypsin (Figure 1) in female gammarids declined significantly ($p < 0.05$) during the reproductive cycle. A similar pattern was observed in all cases, where the highest digestive enzyme activities were detected during stages AB and C1 compared with the other stages (D1 to D2). The second intermolt stage (C2) was an intermediate stage. The size of the reduction differed among the enzymes, i.e., the amylase, cellulase, and trypsin activities decreased to 51%, 31%, and 61% of the higher levels (AB or C1), respectively.

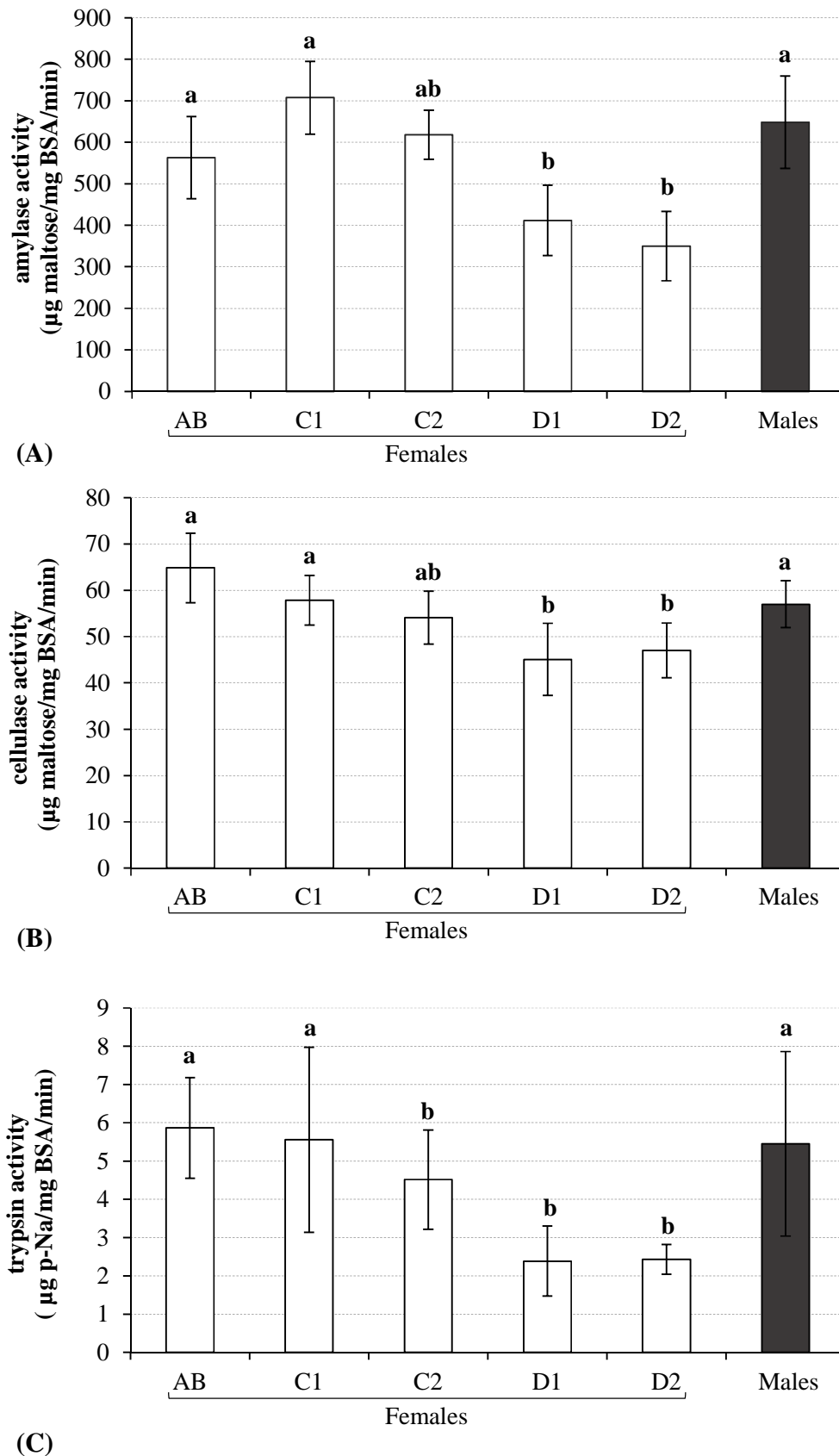


Figure 1. Digestive enzyme activities during each stage of the reproductive cycle in females and males (mean \pm SD, $n = 6$). A: Amylase (mg maltose/mg BSA/min), B: Cellulase (mg maltose/mg BSA/min), C: Trypsin (μg p-Na/mg BSA/min). Histograms with the same letters are not statistically different (Kruskal-Wallis test: $p < 0.05$)

The energy reserves of females were highly dependent on the molt stage and they followed a similar trend (Figure 2), except for the total free sugars (not shown), which did not differ among the reproductive stages. The reserves and Ea increased throughout the first four reproductive stages (postmolt AB, intermolt C1 and C2, and premolt D1), although the lipids increased from postmolt stage AB to intermolt C2. The average energy gains over the reproductive cycles of females were 32%, 40%, 29%, and 30% for glycogen, lipids, proteins, and Ea, respectively. In the second stage, a significant depletion of the Ea was detected in the final premolt stage (D2). The average energy losses at the end of the reproductive cycle were 32%, 26%, 18%, and 19% for glycogen, lipids, proteins, and Ea, respectively.

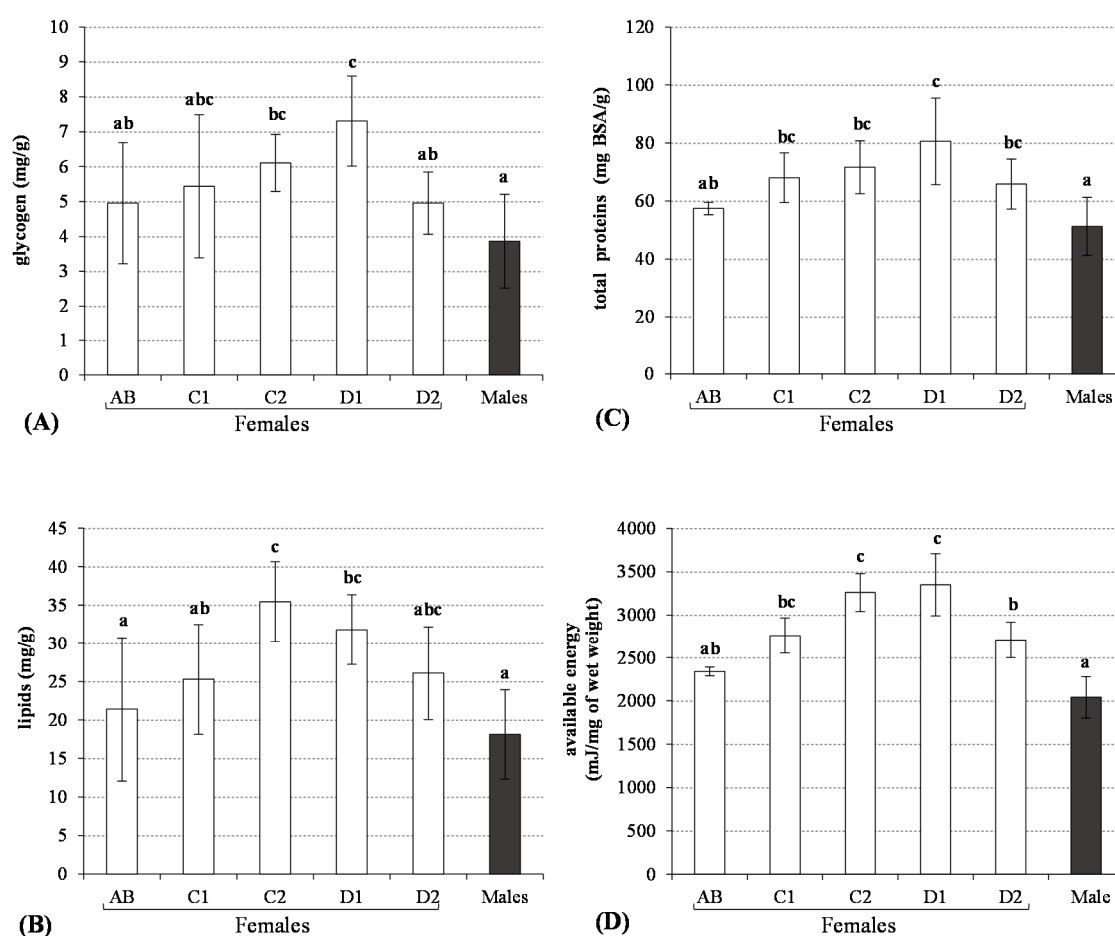


Figure 2. Energy reserve levels during each stage of the reproductive cycle in females and males (mean \pm SD, n = 6). A: Glycogen (mg/g wet weight), B: Lipids (mg/g wet weight), C: Total proteins (mg BSA/g wet weight), D: Available energy (mg/mg wet weight). Histograms with the same letters are not statistically different (Kruskal-Wallis test: $p < 0.05$)

Molting and reproduction are considered to be fundamental events in the lives of crustaceans. Thus, the morphological and structural changes that occur during the molting cycle are reflected by physiological and biochemical variations [38]. In the present study,

during the molt and reproductive cycle, the reserves (glycogen, lipids, and proteins) increased in female gammarids until the late intermolt stage (C2) (Figure 2), which correlated with the high digestive enzyme activities (Figure 1). During this first part of the reproductive cycle in female gammarids, the accumulation of energy may be necessary to respond to the growth of oocytes and to prepare for ecdysis, which are extremely costly events in terms of energy. In *Callinectes arcuatus*, Vega-Villasante et al. [39] also suggested that differences in the activities of the digestive enzymes were related to specific requirements for nutrients and energy during the stages of the molting cycle. Thus, the activities of digestive enzyme appear to be physiological responses that are adapted to energy needs.

Our findings are consistent with those of many other studies of crustaceans, which have highlighted the biochemical variations linked to molting. According to Martin [40], lipids, glycogen, and proteins are required to form the new cuticle. Therefore, lipids are stored continuously during the intermolt and early premolt periods in decapods and gammarids [40,41]. In addition, the glycogen level increases in crustaceans between the late intermolt stage and the molt before decreasing thereafter, which shows that glycogen is a chitin formation precursor [42]. Our results also agree with other studies of the changes that occur during the crustacean reproductive cycle. Several studies suggest that breeding females accumulate and store lipids during the maturation of oocytes and vitellogenesis [31]. In some species, lipids account for 18–41% of the total ovarian dry mass at the end of ovarian maturation [21].

However, we observed that digestive enzyme activities declined from the end of the intermolt stage to ecdysis, despite the growing need for energy. The overall decrease in the activities of all digestive enzyme may be linked to the physiological (soft exoskeleton) and/or behavioral (amplexus) changes associated with poor access to food [43,44]. In this context, it may be preferable for gammarids not to allocate energy to their digestive enzymes. Our results agree with other studies of the activities of digestive enzyme, particularly amylase and trypsin during the molting cycle in decapods, where decreases in the digestive enzyme activities occur during the late premolt stage [45-48]. In addition, Zilli et al. [49] detected changes in the cell type composition in the hepatopancreas of *Marsupenaeus japonicas*. During the molting cycle, F cells were implicated in enzyme synthesis and zymogen secretion declines in the premolt stages (D0 to D3). In addition to the molt cycle effect in female gammarids, the reproductive behavior during the premolt

can disrupt the feeding activities of the female. Indeed, females must be accompanied by a male during amplexus, which begins toward the end of the female intermolt period and continues until ecdysis [50]. This precopulatory mate guarding behavior may impair the mobility and foraging capacity of the female. Thus, the females probably did not feed until the end of the cycle in the present study and all of their digestive activities declined. Amplexus and its effects on energy acquisition may explain the decline in biochemical compounds and Ea in the late premolt stage (D2). Indeed, a few days after the initiation of fasting, an organism has to draw on its energy reserves to ensure the completion of oogenesis, ventilation during egg incubation, and the formation of a new exoskeleton. Thus, the completion of the reproductive cycle depends greatly on food access during the cycle. In this context, Read and Caulton [51] also detected declines in lipids and proteins in *Panaeus indicus* during the last premolt stage, which may be attributable to the catabolic energy required for the forthcoming molt.

Males

Males were sampled during amplexus. The levels of digestive enzyme (Figure 1) were similar to those in females in stages AB and C1, i.e., the amylase, cellulase, and trypsin activities were 648 (\pm 111.3) μ g maltose/mg BSA/min, 56.9 (\pm 5.06) μ g maltose/mg BSA/min, and 5.4 (\pm 2.41) μ g p-Na/mg BSA/min, respectively. The levels of the reserves in males were also similar to those in females in the postmolt stage (AB). However, we found that the levels of all the parameters monitored in males (glycogen, lipids, proteins, and available energy) were always lower than those in females, except for the total free sugars (results not shown), which were the same as those in females.

It is interesting that the digestive enzyme activities in the males were equivalent to those in females during the intermolt stage. These digestive activities in males suggest indirectly that the males have the ability to feed during the precopulatory stage. This male feeding capacity during amplexus is also supported by Becker et al. [52]. Despite the presence of this feeding behavior followed by digestion (based on the enzyme activities), the individual males were physiologically exhausted. The energetic costs of precopulatory mate guarding may explain the low levels of glycogen, lipids, and proteins in males. Many previous studies suggest that high energy expenditure occurs in males during amplexus. Indeed, several behaviors are expected to be energetically costly, such as male-male competition [53], sexual conflict over the mate-guarding duration [54], and the cost of carrying a partner [55,56].

Effects of food starvation on energy metabolism parameters

Digestive enzyme activities

The amylase activity decreased significantly ($p < 0.05$) comparing to the control fed condition, except after 23 days in females (Figure 3A). By contrast, the trypsin activity levels (Figure 3B), were not affected by starvation in either gender.

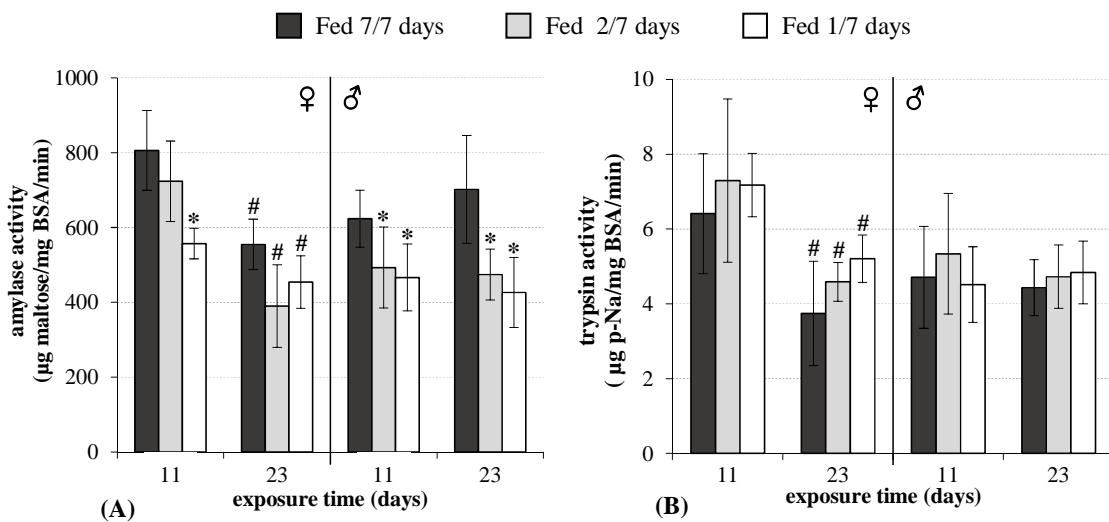


Figure 3. Digestive enzymes activities in *Gammarus fossarum* females (♀) and males (♂) exposed to three levels of diet stress (control, fed 7 days per week; fed 2 days per week; and fed 1 day per week) after 11 and 23 days (mean \pm SD, $n = 6$). A: Amylase (mg maltose/mg BSA/min), B: Trypsin ($\mu\text{g p-Na/mg BSA/min}$). Stars indicate significant differences between the starved organisms and the fed control organisms (Mann-Whitney test: $p < 0.05$). The hash (#) symbol indicates a significant difference between the two sampling time points for each diet condition tested (Mann-Whitney test: $p < 0.05$)

The correlation between the decline in amylase activity and food starvation may reflect the implementation of an energy optimization strategy in a context of low dietary intake. Previous observations of the effects of starvation on carbohydrase enzymes in decapods agree with our results. Furthermore, a positive correlation between the amylase activity and ingested or assimilated food was demonstrated in different zooplankton species [57]. Kerambrun and Guérin [58] showed that the amylase activity of *Leptomysis lingvura* decreased after 8 days of starvation and remained at this level during subsequent weeks. Thus, the food quantity can have marked effects on the activities of digestive enzymes. The protease activity levels in crustacean decapods also appear to depend on food availability. For example, in the shrimp *Penaeus vannamei*, the hepatopancreas trypsin and chymotrypsin activities were 40–60% lower after 120 h of starvation [59]. Cuzon et al. [60] also showed that the trypsin activity declined in shrimps during starvation. By contrast, we detected no effects of food quantity on trypsin activity. This may be because

Tubifex worms were not provided as a dietary supplement during this study of the effects of food starvation, which contrasted with their use as a dietary supplement during the acclimatization period. The gammarids were fed only with plant materials, with no animal protein.

Boucher et al. [61] studied the amylase and trypsin activities in *Temora stylifera* fed with a relatively low quantity of natural food, comparatively to organisms fed with abundant diet of monospecific phytoplankton. With a monospecific vegetable diet, the amylase activities were twofold higher whereas the trypsin activities were fivefold lower. These results demonstrate that the amylase and trypsin activities are modulated by food availability, and also by the protein and starch content of food. Similar observations were made by Van Wormhoudt et al. [62] in the shrimp, *Penaeus kerathurus*. Thus, the activities of digestive enzymes appear to be adjusted to the nature and the availability of food, thereby optimizing the efficiency of the digestive process. In addition, Garcia-Carreno and Hernandez [63] suggested the concept of enzymatic adaptation, where the activities of digestive enzyme vary according to food stresses, such as inadequate food or food containing anti-nutritional factors.

For both enzymes (Figures 3A and 3B), significant reductions ($p < 0.05$) in their activities were observed only in females at the two sampling times under all feeding conditions (7/7, 2/7, and 1/7). These results are consistent with the conclusions of the previous part of this study regarding the effects of the reproductive cycle on energy metabolism responses.

At the start of this study, the females were at stage AB, but after 11 and 23 days they were at stages C1 and D1, respectively. The decrease between day 11 and day 23 was consistent with the decline observed during the female reproductive cycle between stages C1 and D1 (see below). In addition, the absence of a gradient in the digestive enzyme activities after 23 days of food stress could be explained by behaviors (precopulatory mate-guarding) related to the reproduction process. In stage D1, the females did not feed in any of the experimental conditions (fed, 7/7, 2/7, or 1/7; see below). The stable digestive enzyme activities of males between day 11 and day 23 suggest a lower effect of the reproductive cycle in males compared with that in females.

Energy reserves

A significant effect of food deprivation ($p < 0.05$) was detected in the female energy reserves after 11 and 23 days (Figure 4). After 11 days, the females fed 1/7 and 2/7 had Ea

reductions of 28.6% and 34%, respectively, compared with the control. These Ea reductions were less than those of the control after 23 days for females fed 1/7 and 2/7, with decreases of 11.6% and 15.5%, respectively. In diet stress conditions, the Ea in females was lower than that in the control state. By contrast, no effect of starvation on Ea was observed in the males.

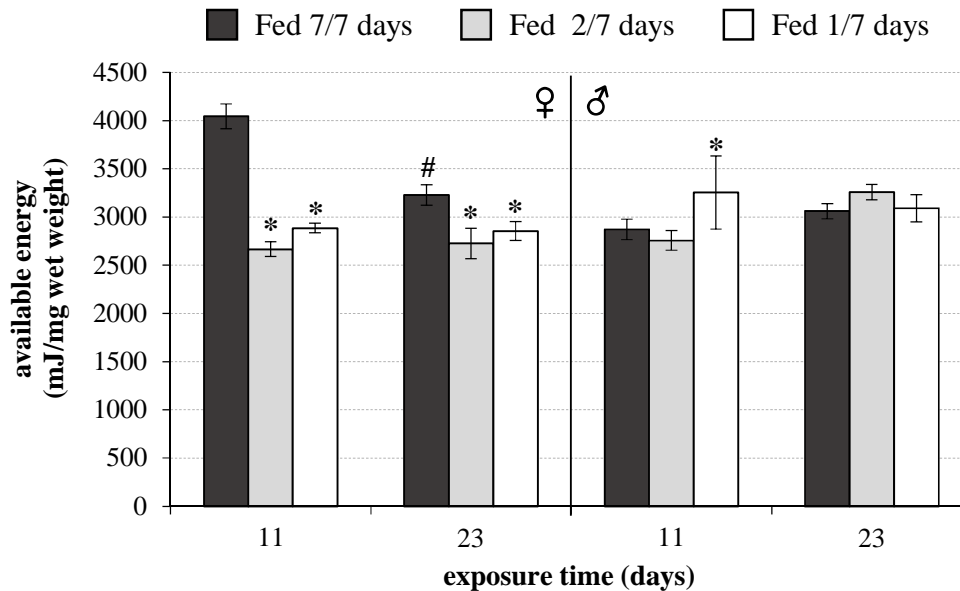


Figure 4. Available energy (mJ/mg wet weight) in *Gammarus fossarum* females and males exposed to three levels of diet stress (control, fed 7 days per week; fed 2 days per week; and fed 1 day per week) after 11 and 23 days (mean \pm SD, n = 6). Stars indicate significant differences between the starved organisms and the fed control organisms (Mann-Whitney test: $p < 0.05$). The hash (#) symbol indicates a significant difference between the two sampling time points for each diet condition tested (Mann-Whitney test: $p < 0.05$).

Based on these results in males, we hypothesize that: (i) low quantities of food (fed 1/7) were sufficient to meet the basal energy needs of males, or (ii) all of the diets tested were not adapted to the nutritional requirements and all of the organisms were depleted. However, the Ea in males supports the first hypothesis. After feeding with leaves and worms in the acclimatization conditions (Figure 2), the males had average Ea values of 2000 mJ/mg (wet weight). In the diet stress conditions, the males had Ea values between 2700 and 3200 mJ/mg (wet weight), which did not suggest an energy metabolism impairment.

In females, however, we observed significant Ea declines in starved organisms (fed 1/7 or 2/7) compared with those fed 7/7. These results highlight the different metabolic needs of males and females. Females appear to need more energy to complete their reproductive cycles. Thus, diet stress might have affected the Ea level at each sampling time point and

throughout the reproductive cycle. Disturbances of the energy balance in females could affect their reproductive success. Therefore, it would be useful to compare the oocyte number and their embryonic development in each diet condition to assess the effects of food starvation at the individual level.

Conclusion

The present study assessed the effects of physiological parameters (gender and female reproductive cycle) and food availability on two energy metabolic responses (digestive enzyme activities and Ea) in *G. fossarum*. This ecophysiological study of *Gammarus fossarum* provides novel biological information, which will facilitate a better understanding of the physiological and biochemical responses of gammarids. These data could also help to understand energy metabolism in gammarids. We determined the effects of the reproductive cycle on the activities of digestive enzyme and Ea in females, and highlighted the more stable responses found in males. In female gammarids, two hypotheses may explain the fluctuations in their digestive activities and energy storage levels: (i) physiological events (molt, oogenesis, and spawning) and (ii) reproductive behavior (amplexus). We also demonstrated the effects of food on the digestive activities and energy outcomes in both genders. First, the effect of the food quantity was illustrated by higher amylase activity levels when more food was available. Second, the effect of food quality was highlighted by the stable trypsin activity level in organisms fed a monospecific vegetable diet with no protein supplements. Given the responses of these biomarkers, we suggest that the experimental designs used in field studies should aim to reduce the effects of these parameters, which are possible confounding factors in active biomonitoring. To limit the effects of physiological processes (such as molt and reproduction) on the biological responses being studied, we advocate the use of calibrated males. In the field, the possible differences in the trophic levels among study sites could be limited by using caging approaches, where the organisms are fed *ad libitum*. In conclusion, our results confirm that males fed *ad libitum* can be used in different active biomonitoring studies [9,10], where their metabolic responses can serve as biomarkers.

Acknowledgments

The authors sincerely thank Bioedit® LTD for the English revision.

References

1. Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Rainbow PS (2013) Ecological Biomarkers : Indicators of Ecotoxicological Effects; Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Rainbow PS, editors. New York: CRC Press. 450 p.
2. De Coen WM, Janssen CR (1997) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J Aquat Ecosyst Stress Recov* 6: 43-55.
3. Hyne RV, Maher WA (2003) Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol Environ Saf* 54: 366-374.
4. De Coen WM, Janssen CR (2003) The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environ Toxicol Chem* 22: 1632-1641.
5. Verslycke T, Ghekiere A, Janssen CR (2004) Seasonal and spatial patterns in cellular energy allocation in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) of the Scheldt estuary (The Netherlands). *J Exp Mar Biol Ecol* 306: 245-267.
6. Moolman L, Van Vuren JHJ, Wepener V (2007) Comparative studies on the uptake and effects of cadmium and zinc on the cellular energy allocation of two freshwater gastropods. *Ecotoxicol Environ Saf* 68: 443-450.
7. Maltby L, Naylor C, Calow P (1990) Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate. *Ecotoxicol Environ Saf* 19: 292-300.
8. Widdows J, Donkin P, Staff FJ, Matthiessen P, Law RJ, et al. (2002) Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea. *Mar Environ Res* 53: 327-356.
9. Coulaud R, Geffard O, Xuereb B, Lacaze E, Quéau H, et al. (2011) In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Res* 45: 6417-6429.
10. Dedourge-Geffard O, Palais F, Biagianti-Risbourg S, Geffard O, Geffard A (2009) Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An in situ experiment. *Chemosphere* 77: 1569-1576.
11. Handy RD, Galloway TS, Depledge MH (2003) A Proposal for the Use of Biomarkers for the Assessment of Chronic Pollution and in Regulatory Toxicology. *Ecotoxicology* 12: 331-343.
12. Palais F, Dedourge-Geffard O, Beaudon A, Pain-Devin S, Trapp J, et al. (2012) One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Ecotoxicology* 21: 888-905.
13. Charron L, Geffard O, Chaumot A, Coulaud R, Queau H, et al. (2013) Effect of water quality and confounding factors on digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum*. *Environ Sci Pollut Res*: 1-13.
14. Sornom P, Felten V, Médoc V, Sroda S, Rousselle P, et al. (2010) Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environ Pollut* 158: 1288-1295.
15. Felten V, Charmantier G, Charmantier-Daures M, Aujoulat F, Garric J, et al. (2008) Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* exposed to acid stress. *Comp Biochem Physiol, Part C: Toxicol Pharmacol* 147: 189-197.
16. Gismondi E, Rigaud T, Beisel J-N, Cossu-Leguille C (2012) Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a gammarid. *Environ Pollut* 160: 17-23.

17. Minguez L, Buronfosse T, Beisel J-N, Giambérini L (2012) Parasitism can be a confounding factor in assessing the response of zebra mussels to water contamination. *Environ Pollut* 162: 234-240.
18. McGrath CC, Matthews RA (2000) Cellulase Activity in the Freshwater Amphipod *Gammarus lacustris*. *J North Am Benthol Soc* 19: 298-307.
19. Zimmer M, Bartholmé S (2003) Bacterial endosymbionts in *Asellus aquaticus* (Isopoda) and *Gammarus pulex* (Amphipoda) and their contribution to digestion (Amphipoda) and their contribution to digestion. *Limnol Oceanogr* 48: 2208-2213.
20. Hassett RP, Landry MR (1983) Effects of food-level acclimation on digestive enzyme activities and feeding behavior of *Calanus pacificus*. *Mar Biol* 75: 47-55.
21. Sánchez-Paz A, García-Carreño F, Muhlia-Almazan A, Peregrino-Uriarte AB, Hernandez-Lopez J, et al. (2006) Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: Status and future directions. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 241-249.
22. Sánchez-Paz A, García-Carreño F, Hernández-López J, Muhlia-Almazán A, Yepiz-Plascencia G (2007) Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Exp Mar Biol Ecol* 340: 184-193.
23. Gismondi E, Beisel J-N, Cossu-Leguille C (2012) Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. *Environ Res* 118: 47-52.
24. Correia AD, Costa MH, Luis OJ, Livingstone DR (2003) Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J Exp Mar Biol Ecol* 289: 83-101.
25. Xuereb B, Chaumot A, Mons R, Garric J, Geffard O (2009) Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquat Toxicol* 93: 225-233.
26. Marsden ID, Rainbow PS (2004) Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology - The amphipod example? *J Exp Mar Biol Ecol* 300: 373-408.
27. Macneil C, Dick JTA, Elwood RW (1999) The dynamics of predation on *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda). *Biol Rev* 74: 375-395.
28. Forrow DM, Maltby L (2000) Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environ Toxicol Chem* 19: 2100-2106.
29. Maltby L (1994) Stress, shredders and streams: using *Gammarus* energetics to assess water quality. In: Sutcliffe DW, editor. *Water quality & stress indicators in marine and freshwater systems: linking levels of organisation*: Freshwater Biological Association. pp. 98-110.
30. Geffard O, Xuereb B, Chaumot A, Geffard A, Biagianti S, et al. (2010) Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environ Toxicol Chem* 29: 2249-2259.
31. Sutcliffe DW. *Reproduction in Gammarus (Crustacea, Amphipoda): basic processes*; 2010.
32. Bernfeld P (1955) Amylases, α and β . In: Colowick SP KN, editor. *Methods Enzymol*. New York: Academic Press. pp. 149-158.
33. Palais F, Jubeaux G, Dedourge-Geffard O, Giambérini L, Biagianti-Risbourg S, et al. (2010) Amylolytic and cellulolytic activities in the crystalline style and the digestive diverticulae of the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771). *Molluscan Res* 30: 29-36.

34. Garcia-Carreño FL, Haard NF (1993) Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus Planipes*) extracts. *J Food Biochem* 17: 97-113.
35. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
36. Plaistow SJ, Bollache L, Cézilly F (2003) Energetically costly precopulatory mate guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences. *Anim Behav* 65: 683-691.
37. Addinsoft (2012) Microsoft Excel XLSTAT-pro. version 6 ed. Brooklyn, NY, USA.
38. Carrillo-Farnés O, Forrellat-Barrios A, Guerrero-Galván S, Vega-Villasante F (2007) A review of digestive enzyme activity in penaeid shrimps. *Crustaceana* 80: 257-275.
39. Vega-Villasante F, Fernández I, Preciado RM, Oliva M, Tovar D, et al. (1999) The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Ordway, 1863 (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Bull Mar Sci* 65: 1-9.
40. Martin A (1965) The histochemistry of the moulting cycle in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda). *Proc Zool Soc Lond* 147: 185-200.
41. Schultz TW (1976) The ultrastructure of the hepatopancreatic caeca of *Gammarus minus* (Crustacea, amphipoda). *J Morphol* 149: 383-399.
42. Travis DF (1955) The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille. II. Preecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. *Biol Bull* 108: 88-112.
43. Fernández Gimenez AV, García-Carreño FL, Navarrete del Toro MA, Fenucci JL (2001) Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. *Comp Biochem Physiol, Part B: Biochem Mol Biol* 130: 331-338.
44. Muhlia-Almazan A, García-Carreño FL (2003) Digestion physiology and proteolytic enzymes of crustacean species of the Mexican Pacific Ocean. *Contributions to the study of east Pacific crustaceans* 2: 77-91.
45. Casillas-Hernández R, Magallón F, Portillo G, Carrillo O, Nolasco H, et al. (2002) La actividad de proteasa, amilasa y lipasa durante los estadios de muda del camarón azul *Litopenaeus stylirostris*. *Rev Invest Mar* 23: 35-40.
46. Fernández Gimenez AV, García-Carreño FL, Navarrete del Toro MA, Fenucci JL (2002) Digestive proteinases of *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae) and relationship with molting. *Comp Biochem Physiol, Part B: Biochem Mol Biol* 132: 593-598.
47. Fernández I, Oliva M, Carrillo O, Wormhoudt AV (1997) Digestive enzyme activities of *Penaeus notialis* during reproduction and molting cycle. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol* 118: 1267-1271.
48. Perera E, Moyano FJ, Diaz M, Perdomo-Morales R, Montero-Alejo V, et al. (2008) Changes in digestive enzymes through developmental and molt stages in the spiny lobster, *Panulirus argus*. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 151: 250-256.
49. Zilli L, Schiavone R, Scordella G, Zonno V, Verri T, et al. (2003) Changes in cell type composition and enzymatic activities in the hepatopancreas of *Marsupenaeus japonicus* during the molting cycle. *J Comp Physiol B* 173: 355-363.
50. Hyne RV (2011) Review of the reproductive biology of amphipods and their endocrine regulation: Identification of mechanistic pathways for reproductive toxicants. *Environ Toxicol Chem* 30: 2647-2657.

51. Read G, Caulton M (1980) Changes in mass and chemical composition during the moult cycle and ovarian development in immature and mature *Penaeus indicus* milne edwards. Comp Biochem Physiol Part A Physiol 66: 431-437.
52. Becker J, Ortmann C, Wetzel MA, Winkelmann C, Koop JHE (2013) Mate guarding in relation to seasonal changes in the energy reserves of two freshwater amphipods (*Gammarus fossarum* and *G. pulex*). Freshw Biol 58: 372-381.
53. Elwood R, Gibson J, Neil S (1987) The amorous *Gammarus* : size assortative mating in *G. pulex*. Anim Behav 35: 1-6.
54. Jormalainen V, Honkanen T, Heikkilä N (2001) Feeding preferences and performance of a marine isopod on seaweed hosts: cost of habitat specialization. Mar Ecol Prog Ser 220: 219-230.
55. Watson PJ, Stallmann RR, Arnqvist G (1998) Sexual conflict and the energetic costs of mating and mate choice in water striders. Am Nat 151: 46-58.
56. Koop JH, Winkelmann C, Becker J, Hellmann C, Ortmann C (2011) Physiological indicators of fitness in benthic invertebrates: a useful measure for ecological health assessment and experimental ecology. Aquat Ecol 45: 547-559.
57. Mayzaud O, Mayzaud P, de la Bigne C, Grohan P, Conover RJ (1984) Diel changes in the particulate environment, feeding activity and digestive enzyme concentration in neritic zooplankton. J Exp Mar Biol Ecol 84: 15-35.
58. Kerambrun P, Guérin J-P (1993) Changes in amylase activity of *Leptomysis lingvura* in relation to experimental feeding conditions. Comp Biochem Physiol Part A Physiol 105: 303-310.
59. Muhlia-Almazan A, García-Carreño FL (2002) Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol 133: 383-394.
60. Cuzon G, Cahu C, Aldrin J, Messenger J, Stephan G, et al. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*; 1980. Wiley Online Library. pp. 410-423.
61. Boucher J, Laurec A, Samain J-F, Smith S. Etude de la nutrition, du régime et du rythme alimentaire du zooplancton dans les conditions naturelles, par la mesure des activités enzymatiques digestives; 1975. pp. 85-110.
62. Van Wormhoudt A, Legal Y, Ceccaldi H (1974) Etudes des enzymes de l'hépatopancreas de *Penaeus kerathurus* et *Palemon serratus*, crustacés décapodes, dans les conditions physiologiques normales et en élevage: Ph. D. Thesis. Université d'Aix Marseille II. France.
63. Garcia-Carreño F, Hernandez P (1996) Enzimas del sistema digestivo del camaron I. Estado del arte y tendencias de investigación en digestión de proteínas. Taller de Trabajo: La investigación científica en Peneidos de Iberoamerica Ecuador: 1-88.

4. Etude d'un lien entre le métabolisme énergétique et le succès reproducteur chez *Gammarus fossarum*

Les activités enzymatiques digestives sont souvent utilisées pour leur sensibilité face à une pollution environnementale. Cependant, très peu d'informations sont disponibles concernant les conséquences de perturbations des capacités digestives des organismes sur les réserves énergétiques et la reproduction qui conditionnent le maintien de la population. Afin de souligner le lien existant entre les réponses biochimiques (activités enzymatiques digestives et réserves énergétiques) et les réponses individuelles (fertilité et fécondité) chez les organismes, nous avons soumis notre espèce modèle *G. fossarum* à un stress nutritionnel durant deux cycles reproducteurs.

Les résultats acquis ont montré que chez les mâles et les femelles, les activités amylase sont inhibées par le stress alimentaire, tandis que les activités trypsine ne le sont pas. Chez les femelles, les niveaux d'activités des deux enzymes sont significativement plus faibles au cours du second cycle reproducteur. Cette diminution pourrait traduire un épuisement des organismes lié à un régime alimentaire peu varié. D'autre part, les réserves énergétiques diminuent conjointement à la privation alimentaire chez les femelles tandis qu'elles restent stables chez les mâles. De plus, les effets du stress nutritionnel se traduisent également par une réduction du nombre d'ovocytes et d'embryons chez les femelles privées de nourriture. Ces résultats suggèrent un investissement énergétique alloué à la reproduction plus élevé chez les femelles que chez les mâles.

Dans cette étude, les activités enzymatiques digestives réduites chez les mâles et les femelles apparaissent comme des réponses précoces permettant d'anticiper des conséquences néfastes sur le succès reproducteur (fertilité et fécondité) des femelles. Ceci souligne la pertinence écologique des enzymes digestives vis-à-vis de leur utilisation en évaluation du risque environnemental.

Article n°2**Consequences of impaired digestive enzyme activity on the energy reserves and the reproductive outcome in *Gammarus fossarum***

L. Charron¹, O. Geffard², A. Chaumot², R. Coulaud², A. Jaffal¹, V. Gaillet¹, O. Dedourge-Geffard¹, A. Geffard^{1*}

¹ Université Reims Champagne Ardenne, UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO Unité Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France.

² Irstea, UR MAEP, F-69626 Villeurbanne, France.

Freshwater biology (En preparation)

*Corresponding author: Alain Geffard

E-mail : alain.geffard@univ-reims.fr

Tel: + 33 3 26913342.

Summary :

1. Digestive enzyme activity is often used as a sensitive response to environmental pollution. However, only little is known about the negative effects of water quality on digestive capacities and their consequences on energy reserves and reproduction although these parameters important for the maintenance of populations.

2. To highlight the link between biochemical responses (digestive enzymes and reserves) and responses at an individual level (fertility and fecundity). *G.fossarum* were submitted to nutritional stress throughout two female reproductive cycles.

3. For both males and females, amylase activity was inhibited by the diet stress whereas trypsin activity was not influenced. The activity levels of the two enzymes were significantly lower in the second reproductive cycle of females. Energy reserves decreased with food starvation in females and remained stable in males.

4. Lower digestive activity in males and females appears as an early response aimed at anticipating against its consequences on the reproductive process (fertility or fecundity) in females.

Keywords:

Amylase, available energy, reproduction, invertebrate, food starvation.

1. Introduction

The environmental risk of aquatic ecosystems is continuously monitored thanks to chemical and biological tools to determine their quality. In this way, many biological responses to stress have been investigated as diagnosis tools. These measurements are well-known biomarkers used to assess the effects of toxic exposure on the biota. According to Depledge and Fossi (1994), biomarkers are defined as “ a biochemical, cellular, physiological or behavioral variation that can be measured in tissue or body fluid samples or at the level of whole organisms that provides evidence of exposure to and/or effects of, one or more chemical pollutants (and/or radiations).” Moreover, the main asset of these biomarkers is their early warning response to changes. The interest of these biological tools to link contaminant exposure with animal health impairment has been clearly demonstrated (Handy & Depledge, 1999). However, the significance of such sub-organismal responses in relation to impacts at higher levels of biological organization (population and/or ecosystem) is uncertain and often poorly understood (Duquesne, 2006). In fact, there is a knowledge gap about the ecological relevance of most of the currently implemented biomarkers (Forbes, Palmqvist & Bach, 2006). Therefore, validation studies demonstrating quantitative relationships between sub-organismal and supra-organismal effects need to be developed (De Coen, Janssen & Giesy, 2000).

Among all the biological responses studied in ecotoxicology, energy-based biomarkers seem to be one relevant tool for investigating the relationships between the disturbances occurring at the sub-organismal level and those emerging at higher levels of biological organization (De Coen & Janssen, 1998; Amiard-Triquet, Amiard & Rainbow, 2013). According to the hypothesis proposed by De Coen & Janssen (1998; 2003), sublethal stress induces changes in the energy budget. To cope with stress, the energy expenditure for basal metabolism increases; in parallel, the energy available for growth and reproduction is reduced. So energy analysis can (i) reveal physiological disturbances in organisms and (ii) make the link with key biological variables for population dynamics such as survival, growth and reproduction. Many different energy parameters have been already used as biomarkers of contamination effects, such as the adenylate energy charge (AEC) (Olsen *et al.*, 2008), energy reserves (glycogen, lipids, proteins) (Dutra *et al.*, 2009), cellular energy allocation (CEA) (De Coen & Janssen, 1997) and the scope for growth (SfG) (Naylor, Pindar & Calow, 1990). However, few studies have investigated the ecological relevance of measured responses, as only cellular energy allocation and scope

for growth biomarkers are linked to effects on the reproductive success (De Coen, Janssen & Giesy, 2000; Maltby & Naylor, 1990).

Furthermore, to assess the global energy metabolism, previous processes concerning energy acquisition should be considered. The energy intake that depends on the feeding and digestion processes could affect the energy metabolism and lead to its impairment. In aquatic invertebrates, feeding rates and digestive enzyme activity are usually studied as sensitive responses to environmental pollution (Kalman *et al.*, 2009; Bourgeault *et al.*, 2010; Boldina-Cosqueric *et al.*, 2010; Fossi Tankoua *et al.*, 2012; Coulaud *et al.*, 2011; Dedourge-Geffard *et al.*, 2013). Many studies have shown the negative effect of chemical contamination of waters on ingestion and assimilation processes in aquatic organisms. Nevertheless, very few works have considered the indirect effect of feeding and digestive inhibition on the energy metabolism and its consequences on the reproductive success at an individual level.

In European freshwater ecosystems, amphipods are usually considered as keystone species due to their high density and their position in the aquatic food web. In fact, the genus *Gammarus* is identified as a shredder and a detritus feeder that plays a major role in the processing of organic matter (Kelly, Dick & Montgomery, 2002) and is a prey for many other organisms (Macneil, Dick & Elwood, 1999). Therefore, the structure and functioning of freshwater ecosystems are strongly influenced by gammarid populations, underlining their high ecological relevance (Maltby, 1994). Moreover *Gammarus sp* are currently used in aquatic ecotoxicological studies as sentinel species owing to their sensitivity to several toxicants. In freshwater gammarids, some studies have showed that the inhibition of the feeding behavior and/or a lower digestive activity can be caused by a wide range of pollutants (metals, pesticides, organic pollutants...) (Coulaud *et al.*, 2011; Charron *et al.*, 2013). Finally, these amphipods are also relevant test species defined by a relatively short, temperature-dependent, reproductive cycle (Pöckl, 1992), with several broods *per year* (Sutcliffe, 2010). Thus, the whole ecological and physiological features of gammarids enable investigations on early changes during energy acquisition as well as long-term effects on the reproductive success (Maltby, 1994; Maltby *et al.*, 2002).

In order to investigate the ecological relevance of digestive enzyme responses as a biomarker, we submitted male and female *Gammarus fossarum* to a stress throughout two successive female reproductive cycles. We measured digestive enzyme (amylase and

trypsin) activity levels, energy reserves, fertility (number of oocytes) and fecundity (number of embryos) at different times. We used nutritional stress as a means to assess the direct relationship between the disturbances of the energy intake and the reproductive outcome, regardless of the impacts of chemical stress.

2. Materials and methods

2.1- Sampling and maintenance of gammarids

Male and female *Gammarus fossarum* were collected with a hand-held net (2-2.5mm) at La Tour du Pin, upstream of the Bourbre River (France) (Coulaud *et al.*, 2011; Besse *et al.*, 2013). The station has good water quality according the data records of the RNB (French Watershed Biomonitoring Network). After sampling, the gammarids were quickly brought to the laboratory, where they were kept in 30-L tanks under constant aeration at $14\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ using a 10/14-hr light/dark photoperiod. The tanks were continuously supplied with drilled groundwater mixed with softwater (obtained by reverse osmosis) to adjust to the sampling site conductivity of $600\ \mu\text{S}/\text{cm}$. Throughout the 15 days of the acclimatization period, gammarids were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*) collected from a pristine site and previously conditioned for at least 6 (± 1) days in groundwater. Freeze-dried *Tubifex sp.* worms were added as a dietary supplement twice a week.

2.2-Experimental design: food starvation experiment

The aim of our study was to define the potential consequences of energy metabolism impairment, as related to food starvation, on the reproductive capacities of female *G. fossarum*. According to Geffard *et al.* (2010), the length of a female reproductive cycle is 30 days in these maintenance conditions (14°C , fed *ad libitum*). *G. fossarum* is an example of a crustacean where the molting and reproductive cycles can occur concurrently in sexually active females. Geffard *et al.* (2010) described six molt stages determined by the hardening of the cuticle, the retraction of the epidermis from the cuticle and the secretion of a new cuticle. The six different stages are referred to as postmolt (A and B), intermolt (C1 and C2), and premolt (D1 and D2) (Figure 1). Molting stage A is very short and the two postmolt stages (A and B) are grouped into a single AB stage. Reproductive behavior and oocyte maturity change during the molt cycle. The beginning of the molt cycle (stage AB) is characterized by spawning and fertilization. The first vitellogenesis occurs between

stages AB and C1 (Geffard *et al.*, 2010). The second vitellogenesis occurs between stages C2 and D2. Between stages C2 and D2, a male will grasp a female and place her in a position of precopulatory amplexus until fertilization (Sutcliffe, 2010).

In males, the reproductive cycle (spermatogenesis) is little known and documented. Spermatogenesis duration is very short, and, the maximum stock of sperm in the testes is obtained again as early as six days after mating. There is no link between spermatogenesis and the molting cycle.

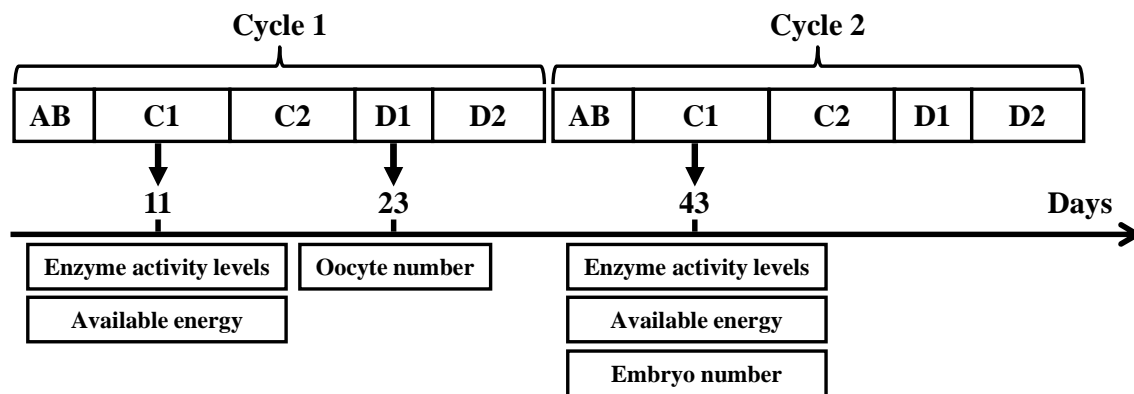


Figure 1: Female reproductive cycle stages (AB, C1, C2, D1 and D2, according to Geffard *et al.*, 2010) and sampling periods for biological response measurements in males and females during the food starvation experiment

The influence of diet starvation was studied throughout two successive reproductive cycles by exposing 315 females at the same molt stages (AB) and 315 males to three levels of diet stress. Pursuing the experiment over the second cycle allowed us to assess the influence of food starvation on fecundity, as marsupium embryos issued from the fecundation of oocytes during the first cycle were submitted to different levels of food starvation. Seven males and 7 females *per* glass beaker were used (n=45 beakers), with continuously renewed water (same conditions as acclimatization, see section 2.1 below). According to previous experiments (Geffard *et al.*, 2010), we applied feed conditions to induce gradual starvation conditions of 0% (control) 50% or 75%. In the control condition (n=15 beakers), gammarids were fed *ad libitum* every day of the week with 2-cm diameter alder leaf discs (*Alnus glutinosa*)(control condition, noted 7/7). In the two other conditions (n= 15 beakers *per* condition), gammarids were fed by supplying alder leaf discs only during 2 days a week (50% food starvation, noted 2/7) or only 1 day a week (75% food starvation, noted 1/7). After each feeding period for the 2/7 and 1/7 condition, the remaining food was removed from the beakers and kept in a cold room for the next meal.

Females with males associated were sampled after 11 and 23 days during the first reproductive cycle, to define energy and fertility (number of oocytes) parameters, respectively, and after 43 days, during the second cycle, to define energy and fecundity parameters (Figure 1). In accordance with the reproductive cycle in the control conditions at $14\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (Geffard *et al.*, 2010), females were expected to be in the C1 (11 and 43 days) and D1 (23 days) stages of their reproductive cycle.

For each exposure condition, (11 and 43 days; food starvation levels: 0, 50 and 75%), 6 gammarids (males and females separately) were kept for the energy reserves and 6 pools of 3 gammarids (males and females separately) were collected for digestive enzyme activity assays. In all cases, embryos were collected manually from the marsupium and eliminated before biochemical analysis. Oocytes and embryos were counted after 23 and 43 days, respectively, on the females used for digestive enzyme activity assays and energy reserve measurements. All samples were weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

2.3- Measurement of digestive enzyme activity levels and energy reserves in *G. fossarum*

Digestive enzyme activity

Amylase and trypsin activity levels were measured according to modified methods from Palais *et al.* (2010) and Garcia-Carreño and Haard (1993), respectively, with starch (1%) and BAPNA (3mM) as substrates. Each enzyme activity was expressed as micrograms of the final product released *per* minute and *per* milligram of proteins. The protein content in the supernatant was determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as the protein standard.

Each enzyme activity level was expressed as micrograms of the final product released *per* minute and *per* milligram of protein. The total and cytosolic protein contents in the supernatant were determined according to Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA) as the protein standard.

Energy reserves

To measure lipid, free sugar and glycogen contents in single individuals, we used a method adapted from Van Handel, (1985a; b) and Plaistow, Bollache & Cézilly (2003). Each gammarid was crushed with 3 stainless steel balls in 800 μL of methanol for 2 min at 30Hz

(Mixer Mill MM 400, Retsch, Haan, Germany). The homogenate was divided into two identical volumes (A and B) to measure lipids and sugars (free sugars and glycogen).

To measure total lipids in homogenate (A), 200 μ L of chloroform were added and mixed. After 20 min at 4°C, 100 μ L of homogenate were transferred into culture tubes and placed in a water bath at 95°C to evaporate the solvent. Then, 200 μ L of sulfuric acid (95%) were added to the mixture and left at 95°C for 10 min. Finally, the tubes were placed in an ice water bath and 5 ml of vanillin-phosphoric acid reagent were added. After 25 min, the optical density was read at 525 nm. Olive oil (Sigma Aldrich) solubilized in chloroform (1g/L) was used as a standard.

To measure sugars in homogenate (B), 200 μ L of sodium sulphate (2%) were added and mixed. After 20 min at 4°C, the samples were centrifuged (2,000xg, 4 min, 4°C). The resulting supernatant (solution 1) and the pellet were respectively used to measure free sugar and glycogen contents. Three hundred μ L of supernatant (solution 1) were transferred into culture tubes, while each pellet was resuspended in 400 μ L of distilled water (solution 2) with three stainless steel balls, and shaken for 1 min at 30Hz. Subsequently, 300 μ L (solution 2) of glycogen homogenate were placed in culture tubes. Finally, 5 mL of anthrone reagent were mixed into every sample (solutions 1 and 2), and the tubes were heated at 95°C in a water bath for 17 min. The samples were cooled for 10 min, and their optical density was measured at 630 nm. Glucose solution (1g/L) was used as a standard.

Available energy (Ea) was deduced from the total protein, carbohydrate and lipid contents at each sampling time. Each type of energy reserve was transformed into energetic equivalents using enthalpy combustion (24,000 mJ/mg protein, 17,500 mJ/mg carbohydrates and 39,500 mJ/mg lipids) (De Coen & Janssen, 1997).

2.4- Reproductive cycle, fertility and fecundity of *G. fossarum* females

In the course of the molt cycle, simultaneous oocyte maturation and embryo development take place in the marsupium of female gammarids. A cycle starts with spawning and fertilization during the short stages A and B. The first vitellogenesis occurs between the AB and C1 stages, followed by the second vitellogenesis during the C2 and D2 stages. At the end of the cycle (D stage), males grasp females and place them in precopulatory amplexus until fertilization (Sutcliffe, 2010). The first response concerns the reproductive cycle in females. We based our measurements on the molting stage. To accurately assess

the female molt stages, the third and fourth periopod pairs (dactilopodite and protopodite) of females were cut off, mounted on a microscope slide and covered with with a coverslip, and their integumental morphogenesis was observed (x 200) to discriminate the five molt stages (AB, C1, C2, D1 and D2).

To determine the reproductive success of these gammarids, we carried out two kinds of observations under the binocular microscope: we first determined the number of oocytes *per* female by *in vivo* observation of the two ovaries at the end of the first cycle (23 days). We only took into account females in the last intermolt stage C2 and those in premolt stages D1 and D2. Then we determined the number of embryos *per* female (issued from the first cycle) by collecting and counting embryos from the marsupium during the second cycle (43 days) (Geffard *et al.*, 2010).

2.5- Statistical analysis

Statistical procedures were carried out with XLSTAT (Addinsoft, 2012). Normality and homogeneity of data were first tested with Shapiro-Wilk and Levene tests. As these criteria did not meet, a non parametric test was applied to analyze the data. Diet effect and time exposure were assessed independently using the Mann-Witney test. Spearman's correlations were used to test the relation between food starvation, individual biological responses (digestive enzyme activity levels, available energy after 11 days) and the reproductive outcomes (number of oocytes after 23 days and number of embryos after 43 days) in female gammarids.

3. Results

3.1- Effect of food starvation on digestive enzyme activity levels and energy reserves

Amylase activity

For both males and females, food starvation inhibited amylase activity (Figure 2A). In females, we measured significant differences between the most severely starved organisms (fed 1/7) and the controls (fed 7/7). Amylase activity was respectively reduced by 31% and 36%, compared to the controls, after 11 and 43 days of starvation (Figure 2A). Between the two sampling times, amylase activity significantly decreased by 24, 23 and 29% for each of the 7/7, 2/7 and 1/7 feeding conditions in females. In males, amylase activity in the two starved conditions (fed 1/7 and 2/7) was significantly lower than in the controls (Figure 2A). The highest starvation level (1/7) reduced amylase activity by 25 and 36% after 11 and 43 days, respectively, compared to the control, but no difference was noticed according to the length of food starvation (11 and 43 days) in males.

Trypsin activity

Whether in males or females, food starvation had no influence on trypsin activity levels (Figure 2B). Inversely, trypsin activity significantly decreased in females (Figure 2B) between the first (11 days) and the second (43 days) reproductive cycles, whatever their feed status. In the control gammarids (7/7), trypsin activity levels were 6.4 (± 1.6) $\mu\text{g p-Na/mg BSA/min}$ and 4 (± 0.5) $\mu\text{g p-Na/mg BSA/min}$ after 11 and 43 days, respectively. In the most severely starved females (1/7), trypsin activity levels ranged between 7.1 (± 0.8) $\mu\text{g p-Na/mg BSA/min}$ after 11 days and 4.9 (± 0.8) $\mu\text{g p-Na/mg BSA/min}$ after 43 days. In males, values ranged between 4 (± 1.6) and 5.3 (± 0.7) $\mu\text{g p-Na/mg BSA/min}$, whatever the starvation level or the exposure time.

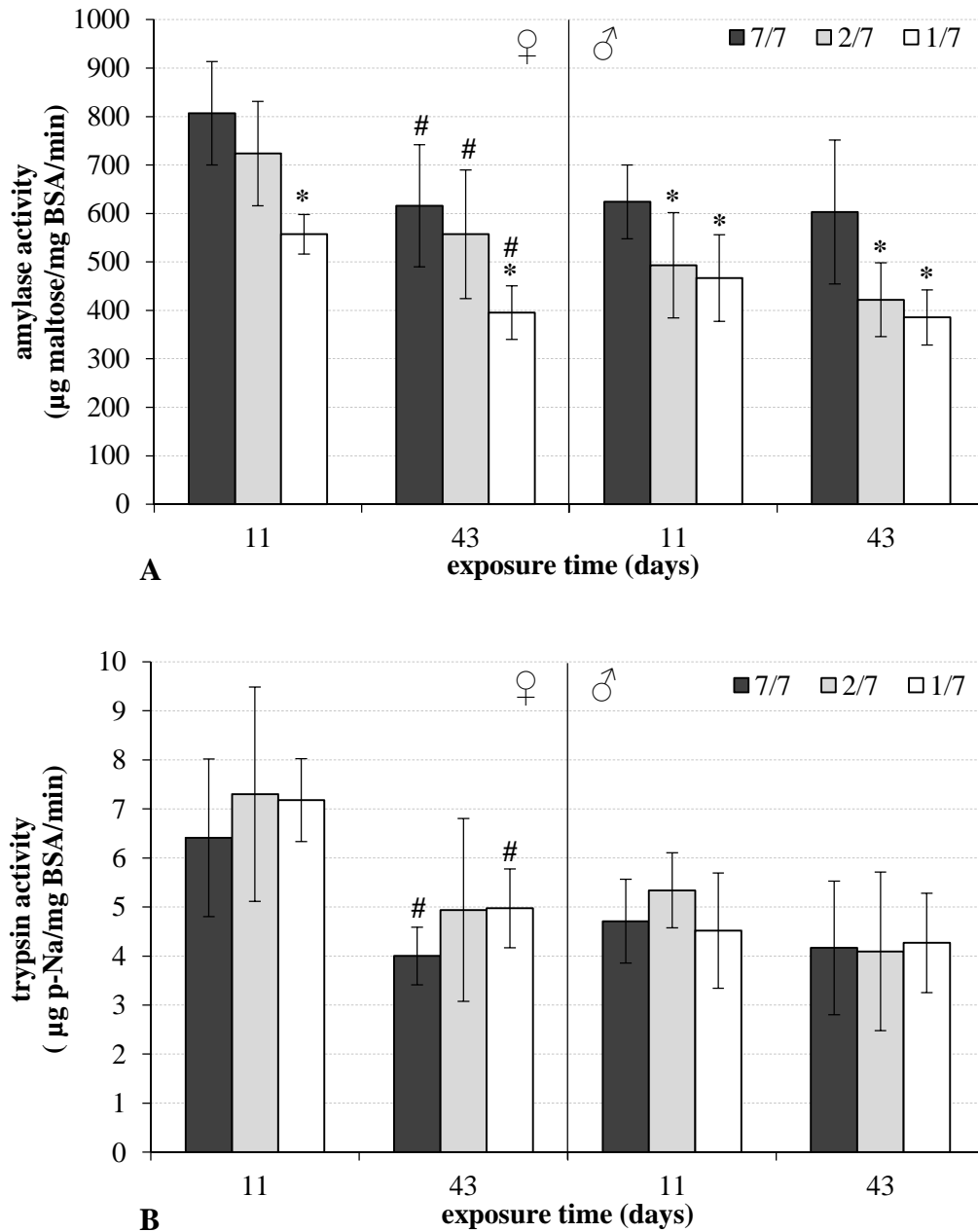


Figure 2: Amylase (A) and trypsin (B) activity levels in *Gammarus fossarum* exposed to 3 levels of food starvation (control: fed 7 days a week; 2/7: fed 2 days a week; 1/7: fed 1 day a week) after 11 and 43 days (means \pm SD, n=6). Stars indicate significant differences between starved and control gammarids (Mann Whitney test: $p < 0.05$). The hash (#) symbol points to significant changes between the two sampling times for each diet condition (Mann Whitney test: $p < 0.05$)

Energy reserves

In females, food starvation significantly reduced the available energy (Figure 3). From the first reproductive cycle (after 11 days), the available energy values in 2/7 and 1/7 females were 2,885 (± 49) mJ/mg of wet weight and 2,666 (± 76) mJ/mg of wet weight, respectively, while the controls exhibited about one third more with 4,043 (± 128) mJ/mg of wet weight. Over the second reproductive cycle (after 43 days), 1/7 and 2/7 females exhibited average energy values of 2,318 (± 58) and 2,103 (± 135) mJ/mg of wet weight, respectively, *i.e.* 20% and 28% lower than the available energy in control females (average value: 2,906 (± 81) mJ/mg of wet weight).

In males, food starvation did not affect the available energy. In addition, after 11 days, the most severely starved males (fed one day a week) exhibited the highest level of available energy with 3,254 mJ/mg of wet weight.

In contrast, in both males and females and for all diets, the available energy significantly decreased between the two sampling times (11 and 43 days). In females, the decrease ranged between 563 mJ/mg of wet weight (2/7) and 1,137 mJ/mg of wet weight (controls). In males, the energy drop was less important: it ranged between 171 mJ/mg of wet weight (controls) and 538 mJ/mg of wet weight (1/7).

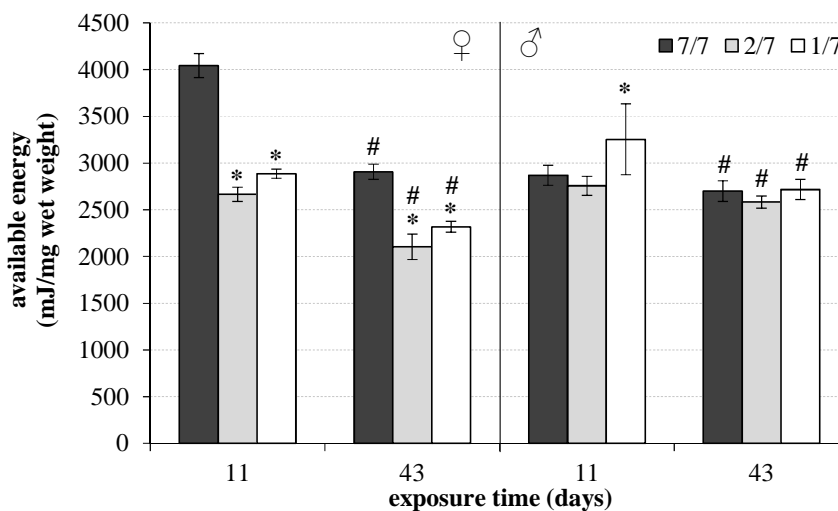


Figure 3: Available energy (mJ/mg wet weight) in *Gammarus fossarum* exposed to 3 levels of food starvation (controls: fed 7 days a week; 2/7: fed 2 days a week; 1/7: fed 1 day a week) after 11 and 43 days (means \pm SD, n=6). Stars indicate significant differences between starved and control organisms (Mann Whitney test: $p < 0.05$). The hash (#) symbol indicates significant changes between the two sampling times in each diet condition (Mann Whitney test: $p < 0.05$)

3.2- Effect of food starvation on survival, molting cycle, fertility and fecundity

Male and female survival rates are presented in Table 1. They decreased concurrently with starvation length, with average values of 98% and 86.5% after 11 days and 43 days of starvation, respectively. The molting stages of females exposed to starvation are summarized in Table 1. After 11 days of exposure, all females were at molt stage AB or C1 whatever the starving condition. In contrast, after 23 days starved females exhibited a delay in the molting process related to the diet stress. In fact, 63% of the control females had reached premolt stages (D1 or D2), whereas 50 and 90% of the females fed 2 days or 1 day a week were still in intermolt stage (C1 or C2). Finally, after 43 days, all females fed *ad libitum* had started their second molting cycle, while 4 and 14 % of the females fed 2 days and 1 day a week were just finishing their first molting cycle.

Table 1: Occurrence (%) of different molt stages (AB, C1, C2, D1 and D2) in *Gammarus fossarum* females and survival rates (%) in males and females exposed to 3 levels of food starvation (control: fed 7 days a week; 2/7: fed 2 days a week; 1/7: fed 1 day a week) after 11, 23 and 43 days.

Time of exposure (days)	Food availability (day/day)	♀ Molt stages (%)					Survival rates (%)	
		AB	C1	C2	D1	D2	males	females
11	7/7	40	60	0	0	0	100	97
	2/7	67	33	0	0	0	97	97
	1/7	53	47	0	0	0	97	100
23	7/7	0	0	37	43	20	91	94
	2/7	0	7	50	37	6	97	97
	1/7	0	23	67	10	0	89	97
43	7/7	43	57	0	0	0	93	79
	2/7	81	15	0	0	4	89	80
	1/7	73	13	0	0	14	89	89

We counted the number of oocytes *per* female (*i.e.* fertility) at the end of the first reproductive cycle, after 23 days of food starvation (Figure 4A). Food starvation induced a significant decrease in fertility. Females fed *ad libitum* 7/7 had 17.4 (± 5.8) oocytes while starved ones had 12.4 (± 5.4) and 11.9 (± 3.6) oocytes *per* 2/7 and 1/7 female, respectively. So when food was available 2 days and 1 day a week, female fertility declined by 28 and 32 %, respectively.

We also counted the number of embryos *per* female (*i.e.* fecundity) after 43 days of food stress (Figure 4B). The mean number of embryos in 2/7 and 1/7 starved females was 11.2 (± 4.8) and 8.4 (± 4.4) *per* female, respectively, *versus* 13.9 (± 5.1) in the control females. Starvation resulted, in an embryo loss of 19% in 2/7 females and 39% in 1/7 females, compared to the controls fed 7/7 days.

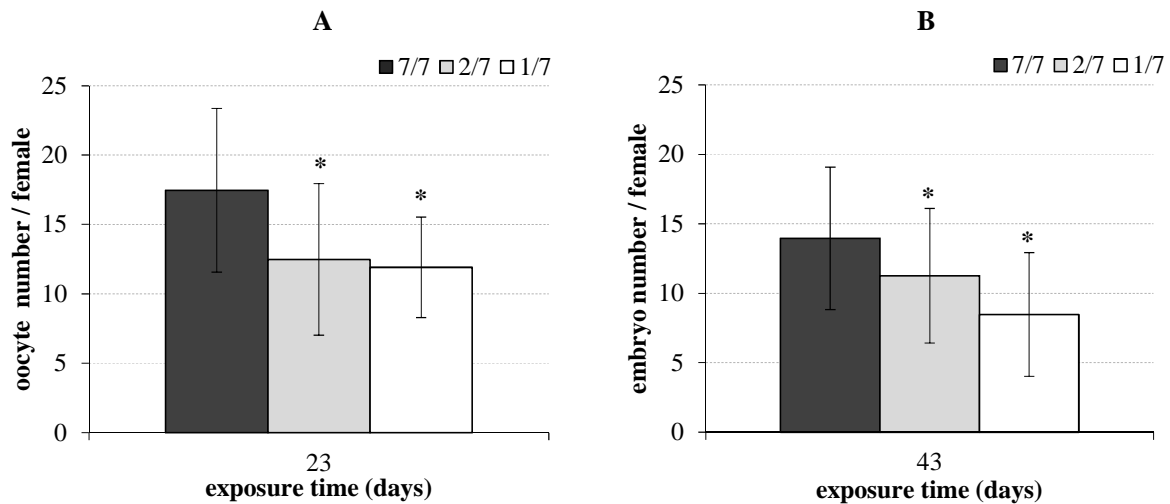


Figure 4: Mean oocyte (A) and embryo (B) numbers in *Gammarus fossarum* females exposed to 3 levels of diet starvation (control: fed 7 days a week; 2/7: fed 2 days a week; 1/7: fed 1 day a week) after 23 and 43 days, respectively (means \pm SD, n=23). Stars indicate significant differences between starved and control organisms (Mann Whitney test: $p < 0.05$).

3.3- Relationship between changes in energetic parameters and the subsequent reproductive success

The effects of the starvation diet on enzyme activity (amylase, trypsin) and energy after only 11 days of exposure could be related to the subsequent fertility (after 23 days) and fecundity (after 43 days) of gammarids (Table 2). Our results show that amylase activity, available energy and oocyte and embryo numbers were significantly positively correlated with food availability ($p < 0.05$) and with each other (except E_a and oocyte). Moreover, the available energy in females was positively correlated with the mean number of oocytes. Furthermore, trypsin activity was not correlated with any of the parameters we tested.

Table 2: Spearman correlation coefficient (r) between food starvation, digestive enzyme activity (amylase and trypsin) and available energy (Ea) after 11 days, and with oocyte and embryo numbers after 23 and 43 days in female *G. fossarum*. (n=6). Values in bold indicate significant correlations at $P < 0.05$.

	Starvation	Amylase	Trypsin	Ea	Oocytes	Embryos
Starvation	1 0					
Amylase	0.787 0.0001	1 0				
Trypsin	-0.36 0.344	0.191 0.444	1 0			
Ea	0.472 0.049	0.216 0.386	-0.282 0.256	1 0		
Oocytes	0.676 0.003	0.534 0.024	-0.188 0.453	0.567 0.015	1 0	
Embryos	0.86 < 0.0001	0.74 0.001	-0.243 0.333	0.4 0.1	0.584 0.012	1 0

4. Discussion

4.1-Impact of food starvation on energy metabolism parameters over two successive reproductive cycles

This study focuses on energy metabolism impairments related to food starvation through the assessment of its biological effects at the individual level, including the reproductive outcomes. In order to assess the effect of exposure time, we sampled gammarids after 11 and 43 days, when most females were at the beginning of their reproductive cycle for all our diet conditions. In this way, in each gender and for each parameter, we observed similar patterns after 11 and 43 days. As regards digestive activity, amylase activity appeared to be downregulated when food was less available, whereas trypsin activity remained unaltered. This difference between amylase and trypsin responses could be linked to the nature of the food, which was solely composed of plant material and contained no animal protein. This effect of food quantity and quality on digestive enzymes in *Gammarus fossarum* is more extensively discussed in a previous study carried out in the same stress conditions (Charron *et al.*, 2014). Consequently, lower food availability (1/7 or 2/7 days feed) decreased the digestive capacity and possibly contributed to a lower energy access for starved gammarids. Otherwise, we can hypothesize that the reduction of digestive processes was a means to decrease energy expenditure during starvation. Food acquisition and assimilation are expensive processes, and decrease of digestive enzyme is manifested as a reduction in the basal metabolic rate. This reduction in gut energy

expenditure constitutes a part of the overall bodily reduction in energy expenditure during starvation (Wang, Hung & Randall, 2006). *G. fossarum* can also decrease their energy expenditure after one week of starvation by reducing their oxygen consumption and their ventilatory and locomotor activity (Hervant *et al.*, 1997). Moreover, the significant decrease in the digestive activity of *G. fossarum* during starvation is in agreement with the findings of Mezek *et al.* (2010), who reported that starvation resulted in a significant decrease in all enzymatic activities, such as electron transport system (ETS) activity (Mezek *et al.*, 2010; García-Esquivel, Bricelj & Felbeck, 2002).

Besides, available energy was significantly lower in starved females than in control females fed *ad libitum*. In contrast, no effect of food starvation appeared in the available energy of males whatever the diet. These energy responses highlight differences in metabolic needs between males and females. The total amount of energy in females has to be allocated for maintaining the basal metabolism and to ensure the reproductive cycle. Therefore, food starvation affected the available energy of females throughout the period of deprivation. Many studies have shown higher lipid contents in female gammarids than in males (Meier, Meyer & Meyns, 2000; Plaistow, Bollache & Cézilly, 2003; Sroda & Cossu-Leguille, 2011; Gismondi, Beisel & Cossu-Leguille, 2012). This influence of sex on reserve composition is usually attributed to the oogenesis process related to the synthesis of lipoproteins that takes place in females over the reproductive cycle. Gammarids reproduce continuously and in parallel to the energy uptake, their reproduction can be constantly fuelled from stored substrates if enough food is available (Koop *et al.*, 2008). Moreover, our food exclusively composed of plant material may have penalized females more than males, as *Echinogammarus marinus* females consume significantly more animal material at the expense of algae (Dick *et al.*, 2005). These authors also suggest that females may invest that energy in egg production.

However, we recorded similar effects of food starvation between the two reproductive cycles in both males and females. We highlighted a significant decrease in digestive activity in starved and control females and a drop in available energy in both genders. These observations support that a diet only composed of alder leaves, though fed at *ad libitum*, may not thoroughly supply the nutrient demand to keep the level of available energy in gammarids stable. In fact, many studies have mentioned that freshwater gammarids may have high diet diversity composed of algae, fungi and animals (Bärlocher & Kendrick, 1973; Willoughby & Sutcliffe, 1976; Macneil, Dick & Elwood, 1997;

Felten *et al.*, 2008). This varied diet seems to be necessary to meet their nutritional requirements. In this way, in *Dikerogammarus villosus*, variation in growth rate and lipid quantity might be related to variation in the food regime (Maazouzi *et al.*, 2009). Our results could be compared with those obtained by Foucreau *et al.* (2013), with *Gammarus pulex* fed with leaves for 12 days. They evidenced lower triglyceride contents in males and females, regardless of the leaf species and the population origin.

4.2- Digestive enzyme activity, energy reserves and reproductive outcome as related to energy allocation

We investigated the possible link between energy-based sub-organismal outcomes and higher levels of biological organization, especially for Cellular Energy Allocation and Scope for Growth. Several studies on daphnids submitted to various chemical stresses have already underlined the link between CEA and reproduction criteria (intrinsic rate of natural increase, mean number on young *per* female, mean brood size and net reproductive rate) (Muyssen, Janssen & Bossuyt, 2002; De Coen & Janssen, 1997; 2003). In the same way, the SfG values measured in daphnids submitted to Cd or food stress was positively correlated with reproduction (Baillieul, Selens & Blust, 1996; Baillieul, Smolders & Blust, 2005). Moreover, in contaminated conditions the reduction in gammarid SfG is generally caused by a decreased feeding rate (Naylor, Maltby & Calow, 1989; Maltby, Naylor & Calow, 1990). Finally, a positive correlation was established between SfG and the reproductive output in *Gammarus pulex* under zinc contamination (Maltby & Naylor, 1990). In the same way, our results confirm the relevance of the energy metabolism to link different levels of biological organization. The reproductive success parameters (fertility and fecundity) were significantly correlated with amylase digestive enzyme activity in female gammarids. This correlation could show that the reduction in the number of oocytes and embryos *per* female was directly linked to a reduction in digestive capacity and energy reserves during oogenesis, both related to food availability and indirectly to the energy uptake.

4.3- Environmental risk assessment of aquatic ecosystems using digestive enzyme activity in gammarids.

Our most severely starved gammarids (fed once a week) exhibited amylase activity levels reduced by 25 and 31% compared to control males and females, respectively. This decrease in digestive capacity induced a drop in the energy reserves and embryo number

(28%) in females. These results underline (i) a similar sensitivity of males and females concerning their digestive capacity and (ii) the consequences of starvation on reproduction in females, a key biological variable for population dynamics. As previously mentioned, many studies have highlighted that chemical contaminants can also influence food assimilation through the impairment of digestive enzyme activity (Amiard-Triquet, Amiard & Rainbow, 2013). In the same way, we can assume that all types of stresses (including chemical stress) that inhibit digestive activity in gammarids could represent a risk for female reproduction and possibly to the whole population. In biomonitoring programs, male gammarids have been proposed in an active approach to avoid the influence of biotic, particularly reproduction, parameters (Charron *et al.*, 2014), known as confounding factors. In view of our results, inhibition of digestive enzyme activity in males during an active biomonitoring program could be a sign of a potential effect on female reproduction. Indeed, in a previous *in situ* experiment, amylase activity in male gammarids exposed to different contaminated sites for 15 days dropped by up to 54% compared to gammarids in reference sites (Charron *et al.*, 2013), corresponding to the inhibition level that induced a negative effect on reproduction in the present study.

However, the potential impact of chemical stressors on gammarids assessed in a caging approach might not reflect the biological responses of native populations submitted to chronic chemical stress. Indigenous populations quite probably develop mechanisms of resistance and adaptation to cope with the effects of toxic stress.

Acknowledgments

This research program was financially supported by the ANR CESA program GAMMA 021 02 “Variability-adaptation-diversity and Ecotoxicology in gammarids” (2012-2015), and the PIREN-Seine Program. The authors sincerely thank Annie Buchwalter for editing English language.

References

- Addinsoft. (2012) Microsoft Excel XLSTAT-pro. Brooklyn, NY, USA.
- Amiard-Triquet C., Amiard J.-C. & Rainbow P.S. (2013) *Ecological Biomarkers : Indicators of Ecotoxicological Effects*, CRC Press, New York.
- Baillieul M., Selens M. & Blust R. (1996) Scope for growth and fitness of *Daphnia magna* in salinity-stressed conditions. *Functional Ecology*, 10, 227-233.
- Baillieul M., Smolders R. & Blust R. (2005) The effect of environmental stress on absolute and mass-specific scope for growth in *Daphnia magna* Strauss. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 140, 364-373.
- Bärlocher F. & Kendrick B. (1973) Fungi in the diet of *Gammarus pseudolimnaeus* (Amphipoda). *Oikos*, 295-300.
- Besse J.P., Coquery M., Lopes C., Chaumot A., Budzinski H., Labadie P. & Geffard O. (2013) Caged *Gammarus fossarum* (crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters. Toward the determination of threshold values. *Water Research*, 47, 650-660.
- Boldina-Cosqueric I., Amiard J.-C., Amiard-Triquet C., Dedourge-Geffard O., Métails I., Mouneyrac C., Moutel B. & Berthet B. (2010) Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 1733-1741.
- Bourgeault A., Gourlay-Francé C., Vincent-Hubert F., Palais F., Geffard A., Biagianti-Risbourg S., Pain-Devin S. & Tusseau-Vuillemin M.H. (2010) Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: an integrated ecotoxicological assessment. *Environmental Toxicology*, 25, 468-478.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Charron L., Geffard O., Chaumot A., Coulaud R., Jaffal A., Gaillet V., Dedourge-Geffard O., Geffard A. (2014) Influence of moulting and starvation on digestive enzyme activities and energy storage of *Gammarus fossarum*. *PLOS ONE*, DOI: 10.1371/journal.pone.0096393
- Charron L., Geffard O., Chaumot A., Coulaud R., Queau H., Geffard A. & Dedourge-Geffard O. (2013) Effect of water quality and confounding factors on digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-13.
- Coulaud R., Geffard O., Xuereb B., Lacaze E., Quéaau H., Garric J., Charles S. & Chaumot A. (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.
- De Coen W., Janssen C. & Giesy J. (2000) Biomarker applications in ecotoxicology: bridging the gap between toxicology and ecology. In: *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*. pp. 13-25. Springer.
- De Coen W.M. & Janssen C.R. (1997) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health)*, 6, 43-55.
- De Coen W.M. & Janssen C.R. (1998) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. I. The digestive physiology of daphnids exposed to toxic stress. *Hydrobiologia*, 367, 199-209.
- De Coen W.M. & Janssen C.R. (2003) The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 1632-1641.

- Dedourge-Geffard O., Charron L., Hofbauer C., Gaillet V., Palais F., Lacaze E., Geffard A. & Geffard O. (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.
- Depledge M. & Fossi M. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, 3, 161-172.
- Dick J.T., Johnson M.P., Mccambridge S., Johnson J., Carson V.E., Kelly D.W. & Macneil C. (2005) Predatory nature of the littoral amphipod *Echinogammarus marinus*: gut content analysis and effects of alternative food and substrate heterogeneity. *Marine ecology. Progress series*, 291, 151-158.
- Duquesne S. (2006) Effects of an organophosphate on *Daphnia magna* at suborganismal and organismal levels: Implications for population dynamics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 145-150.
- Dutra B., Fernandes F., Lauffer A. & Oliveira G. (2009) Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149, 640-646.
- Felten V., Tixier G., Guérol F., De Crespin D.B. & Dangles O. (2008) Quantification of diet variability in a stream amphipod: implications for ecosystem functioning. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie*, 170, 303-313.
- Forbes V.E., Palmqvist A. & Bach L. (2006) The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 272-280.
- Fossi Tankoua O., Buffet P., Amiard J., Amiard-Triquet C., Méléder V., Gillet P., Mouneyrac C. & Berthet B. (2012) Intersite variations of a battery of biomarkers at different levels of biological organisation in the estuarine endobenthic worm *Nereis diversicolor* (Polychaeta, Nereididae). *Aquatic Toxicology*, 114, 96-103.
- Foucreau N., Piscart C., Puijalon S. & Hervant F. (2013) Effect of Climate-Related Change in Vegetation on Leaf Litter Consumption and Energy Storage by *Gammarus pulex* from Continental or Mediterranean Populations. *PLoS ONE*, 8, e77242.
- García-Carreño F.L. & Haard N.F. (1993) Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus Planipes*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 17, 97-113.
- García-Esquivel Z., Bricelj V.M. & Felbeck H. (2002) Metabolic depression and whole-body response to enforced starvation by *Crassostrea gigas* postlarvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133, 63-77.
- Geffard O., Xuereb B., Chaumot A., Geffard A., Biagianti S., Noël C., Abbaci K., Garric J., Charmantier G. & Charmantier-Daures M. (2010) Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, 2249-2259.
- Gismondi E., Beisel J.-N. & Cossu-Leguille C. (2012) Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. *Environmental Research*, doi: 10.1016/j.envres.2012.06.004.
- Handy R. & Depledge M. (1999) Physiological responses: their measurement and use as environmental biomarkers in ecotoxicology. *Ecotoxicology*, 8, 329-349.
- Hervant F., Mathieu J., Barré H., Simon K. & Pinon C. (1997) Comparative study on the behavioral, ventilatory, and respiratory responses of hypogean and epigean crustaceans to long-term starvation and subsequent feeding. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118, 1277-1283.

- Kalman J., Palais F., Amiard J., Mouneyrac C., Muntz A., Blasco J., Riba I. & Amiard-Triquet C. (2009) Assessment of the health status of populations of the ragworm *Nereis diversicolor* using biomarkers at different levels of biological organisation. *Marine Ecology Progress Series*, 393, 55-67.
- Kelly D.W., Dick J.T. & Montgomery W.I. (2002) The functional role of Gammarus (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? *Hydrobiologia*, 485, 199-203.
- Koop J.H., Schäffer M., Ortmann C. & Winkelmann C. (2008) Towards environmental assessment of river ecosystems by analyzing energy reserves of aquatic invertebrates. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters*, 38, 378-387.
- Maazouzi C., Piscart C., Pihan J.-C. & Masson G. (2009) Effect of habitat-related resources on fatty acid composition and body weight of the invasive *Dikerogammarus villosus* in an artificial reservoir. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie*, 175, 327-338.
- Macneil C., Dick J.T.A. & Elwood R.W. (1997) The Trophic ecology of freshwater gammarus spp. (crustacea: amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews*, 72, 349-364.
- Macneil C., Dick J.T.A. & Elwood R.W. (1999) The dynamics of predation on Gammarus spp. (Crustacea: Amphipoda). *Biological Reviews*, 74, 375-395.
- Maltby L. (1994) Stress, shredders and streams: using Gammarus energetics to assess water quality. In: *Water quality & stress indicators in marine and freshwater systems: linking levels of organisation*. (Eds D.W. Sutcliffe), pp. 98-110. Freshwater Biological Association.
- Maltby L., Clayton S.A., Wood R.M. & McLoughlin N. (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. & Naylor C. (1990) Preliminary observations on the ecological relevance of the Gammarus scope for growth assay: effect of zinc on reproduction. *Functional Ecology*, 393-397.
- Maltby L., Naylor C. & Calow P. (1990) Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19, 292-300.
- Meier G., Meyer E. & Meyns S. (2000) Lipid content of stream macroinvertebrates. *Archiv für Hydrobiologie*, 147, 447-463.
- Mezek T., Simčič T., Arts M.T. & Brancelj A. (2010) Effect of fasting on hypogean (*Niphargus stygius*) and epigeal (*Gammarus fossarum*) amphipods: a laboratory study. *Aquatic Ecology*, 44, 397-408.
- Muyssen B.T., Janssen C.R. & Bossuyt B.T. (2002) Tolerance and acclimation to zinc of field-collected *Daphnia magna* populations. *Aquatic Toxicology*, 56, 69-79.
- Naylor C., Maltby L. & Calow P. (1989) Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore. *Hydrobiologia*, 188-189, 517-523.
- Naylor C., Pindar L. & Calow P. (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.
- Olsen G.H., Carroll J., Sva E. & Camus L. (2008) Cellular energy allocation in the Arctic sea ice amphipod *Gammarus wilkitzkii* exposed to the water soluble fractions of oil. *Marine Environmental Research*, 66, 213-214.
- Palais F., Jubeaux G., Dedourge-Geffard O., Giambérini L., Biagianti-Risbourg S. & Geffard A. (2010) Amylolytic and cellulolytic activities in the crystalline style and the digestive diverticulae of the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771). *Molluscan Research*, 30, 29-36.

- Plaistow S.J., Bollache L. & Cézilly F. (2003) Energetically costly precopulatory mate guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences. *Animal Behaviour*, 65, 683-691.
- Pöckl M. (1992) Effects of temperature, age and body size on moulting and growth in the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. *Freshwater Biology*, 27, 211-225.
- Sroda S. & Cossu-Leguille C. (2011) Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere*, 83, 538-544.
- Sutcliffe D.W. Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): basic processes. In: *Freshwater Forum*. (Eds 2010).
- Van Handel E. (1985a) Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1, 299-301.
- Van Handel E. (1985b) Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1, 302-304.
- Wang T., Hung C.C. & Randall D.J. (2006) The comparative physiology of food deprivation: from feast to famine. *Annual Review of Physiology*, 68, 223-251.
- Willoughby L. & Sutcliffe D. (1976) Experiments on feeding and growth of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) related to its distribution in the River Duddon. *Freshwater Biology*, 6, 577-586.

Partie 2

Réponse des biomarqueurs en milieu naturel

PARTIE 2 : REPONSE DES BIOMARQUEURS EN MILIEU NATUREL

Cette partie est dédiée à l'étude des réponses biologiques d'intérêt (enzymes digestives et réserves) en condition *in situ*. Une approche « active » se basant sur l'encagement *in situ* d'organismes standardisés a été réalisée (Dedourge-Geffard et al., 2009, Coulaud et al., 2011, Lacaze et al., 2011). Cet axe d'étude a été traité en deux sous parties, chacune étant présentée sous la forme d'un article permettant de répondre au troisième et dernier objectif proposé dans cette thèse à savoir :

3- Quelles sont les réponses de ces marqueurs dans le cadre d'applications *in situ* menées par des approches actives ?

La première sous partie concerne la publication intitulée «Temporal patterns of digestive enzyme activities and feeding rate in gammarids (*Gammarus fossarum*) exposed to inland polluted waters» (article n°3). Cette étude s'intéresse aux activités enzymatiques digestives mesurées chez des gammares exposés durant une semaine, à différentes périodes de l'année sur cinq sites d'un bassin versant soumis à une contamination polymétallique.

A l'issue de cette première expérimentation *in situ* une nouvelle campagne de terrain a été conduite. Ainsi, la dernière sous partie de ce chapitre s'intéresse aux activités enzymatiques digestives et aux réserves énergétiques de *Gammarus fossarum* exposés pendant 15 jours, sur 23 sites situés sur une aire géographique relativement large (d'une centaine de km²). Les données concernant les activités enzymatiques digestives sont présentées dans l'article intitulé «Effect of water quality and confounding factors on digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum*. » (article n°4). Les données relatives aux réserves énergétiques sont analysées à part dans une dernière partie.

1. Variations spatio-temporelles des activités enzymatiques digestives de *Gammarus fossarum* transplantés sur un bassin contaminé

Le but de cette étude est d'utiliser les activités enzymatiques digestives chez *Gammarus fossarum* comme biomarqueur dans le cadre d'un suivi actif. Des gammares standardisés ont été transplantés pendant sept jours sur cinq sites du bassin hydrologique du Riou Mort contaminé par une pollution polymétallique. Cette expérimentation a été conduite à sept dates différentes de février 2009 à juin 2010. Au cours de cette période, les taux d'alimentation ainsi que les activités enzymatiques digestives amylase, cellulase et trypsine ont été mesurés chez les gammares encagés.

Nous avons ainsi pu montrer une réduction des taux d'alimentation et des capacités digestives des gammares exposés sur le site le plus contaminé nommé « Joany » par rapport aux réponses des organismes transplantés sur le site référence nommé « Up Lot ». De plus, l'activité de la trypsine semble plus sensible que l'activité des deux carbohydrases étudiées (amylase et cellulase). D'autre part, la variation saisonnière des réponses mesurées sur les quatre sites les moins contaminés a pu être appréciée sans qu'aucune modulation récurrente ne puisse être établie.

Cette étude souligne (i) l'intérêt de l'utilisation des taux d'alimentation et des enzymes digestives chez *Gammarus fossarum* pour détecter la présence de perturbations environnementales (ii) la fiabilité de l'approche active employée dans le cadre de ces travaux. En effet, l'encagement d'organismes nourris *ad libitum* permet de réduire la variabilité inter-individuelle et de s'affranchir des fluctuations de la nourriture du milieu. Cependant, d'autres facteurs de confusion semblent influencer les réponses étudiées. Par exemple, la durée d'exposition relativement courte dans cette étude a pu être un facteur limitant l'interprétation des réponses enzymatiques digestives.

Article n°3**Temporal patterns of digestive enzyme activities and feeding rate in gammarids
(*Gammarus fossarum*) exposed to inland polluted waters**

Ecotoxicology and Environmental Safety (2013) 97: 139-146

Odile Dedourge-Geffard^{a*}, Laetitia Charron^a, Cyrielle Hofbauer^a, Véronique Gaillet^a,
Frédéric Palais^a, Emilie Lacaze^b, Alain Geffard^a, Olivier Geffard^b

^a Université de Reims Champagne Ardenne, Interactions Animal-Environnement EA 4689,
UFR SEN, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

^b IRSTEA Lyon, Laboratoire d'écotoxicologie, Unité de Recherche Milieux Aquatiques,
Ecologie et Pollutions (MAEP), 5 rue de la Doua, CS70077, 69626 Villeurbanne Cedex,
France

*Corresponding author : Odile Dedourge-Geffard

E-mail: odile.dedourge@univ-reims.fr

Tel.: +33 326913328. Fax: + 33 326913342

Abstract

The aim of this study was to use digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum* as biomarkers during active biomonitoring. Standardised gammarids were transplanted for 7 days to five sites in the Riou Mort watershed contaminated by polymetallic pollution. This experiment was conducted on seven different dates from February 2009 to June 2010. Feeding rates were tracked, along with amylase, cellulase and trypsin activities. We found that feeding rate and digestive capacity were reduced in the most polluted site, “Joany,” in comparison with the reference site “Up.Lot”. The results suggested that trypsin was more sensitive than the other two carbohydrases. In the four other sites, seasonal differences were observed during the two years but no clear pattern can be established. This study highlights the ability of *G. fossarum* to demonstrate environmental disturbances and suggests the use of a caging process in certain seasons. Caging organisms and feeding *ad libitum* is advantageous, as it reduces inter-individual variability and removes dependence on the native food fluctuations. However, confounding factors other than temperature were present, and the interpretation of digestive enzyme activities is complex.

Highlights

- ▶ Feeding rates and digestive enzyme activities decreased in the most impacted site.
- ▶ No clear seasonal or annual pattern was observed for digestive enzyme activities and feeding rates.
- ▶ Environmental parameters other than temperature may influence the digestive enzymes of gammarids.

Keywords

Energy metabolism, Caging, Temporal variations, Invertebrate, Metal contamination

1. Introduction

Organisms exposed to pollutants may have to increase their energy requirements to maintain their basal metabolism, to the detriment of growth and reproduction. This metabolic cost hypothesis has been described by several authors (Koehn and Bayne, 1989; Calow and Sibly, 1990; De Coen and Janssen, 1998).

Numerous methods are available to determine the metabolic state of an organism, which reflects the health of the organism (De Coen et al., 2000). In particular, feeding rate is an indicator of energy intake and is relevant to the assessment of water quality, as demonstrated by numerous studies (Matthiessen et al., 1995; Blockwell et al., 1998; Forrow and Maltby, 2000; Bloor and Banks, 2006; Zubrod et al., 2010). Digestive enzymes convert the crude food into nutrients, which are easily assimilated and which will provide essential energy for organisms. Many ecotoxicological studies have shown that digestive enzymes are also affected by the presence of pollutants (Chen et al., 2002; De Coen and Janssen, 1997; Dedourge-Geffard et al., 2009; Boldina-Cosqueric et al., 2010; Lebrun et al., 2012).

Relative to other organisms used in aquatic ecotoxicological studies, invertebrates have a short life cycle and small body size, which have practical advantages (De Coen et al., 2000). With their high ecological relevance, their abundance in fresh water and their major role in the food web, amphipods of the genus *Gammarus* are frequently used in ecotoxicological studies (Maltby et al., 1990; Garmendia Tolosa and Axelsson., 1993; Gerhardt et al., 2007; Adam et al., 2010; Kunz et al., 2010; Bundschuh et al., 2011). Traditionally classified as shredders and detritus feeders, gammarids are involved in the detritus cycle and microbial turnover (Willoughby and Sutcliffe, 1976; Cummins and Klug, 1979). They are characterised by a high reproductive capacity, with females having several broods per year. The high number of offspring (12 embryos per female per cycle) is combined with a lifespan of 1-2 years (Geffard et al., 2010; Gerhardt, 2011). The reproductive cycle of *Gammarus fossarum* has been well described (Geffard et al., 2010). Whereas feeding in *Gammarus* sp. is well documented (Feckler et al., 2012; Bloor, 2011; Nelson, 2011; Mayer et al., 2009; Franken et al., 2006), there is little information about digestive enzyme activities, notably in the case of *in situ* studies.

Feeding rates and digestive enzyme activities are also sensitive to various biotic and abiotic factors. These confounding factors can modulate the biological responses and

interact with the potential contamination effects (Handy et al., 2003). The life stage of the organism, the availability of food and the physicochemistry of the aquatic medium are just some of the many potentially confounding natural factors affecting digestive enzymes (Dedourge-Geffard et al., 2012). To limit the effects of biotic factors (sex, weight and food availability), controlling organisms with caging can be useful (Liber et al., 2007).

In Dedourge-Geffard et al. (2009), we investigated the effects of heavy metals (originating mainly from an acid mine drainage) on the feeding rate and digestive enzymes of *G. fossarum* in an *in situ* experiment in the Amous River watershed. However, temporal variations were not taken into account, as the experiments were only conducted once, in April 2008. In a context of caging and active biomonitoring, here the authors have raised the question of seasonal influences on the parameters studied. Is the discrimination between studied sites the same when caging is done at different seasons and from one year to another?

The objectives of the present study in a caging context were both (i) to discriminate the impacted sites from the non-impacted site, at the confluence of the Lot River and the Riou Mort watershed, known for its polymetallic contamination gradient, and (ii) to describe if the potential discrimination could be determined at different seasons in order to use the caging methodology whatever the moment.

2. Materials and methods

2.1. Collection and maintenance of transplanted organisms

G. fossarum specimens were collected using a hand-held net (by kick sampling) from La Tour du Pin, upstream of the Bourbre River (mid-eastern France). This site has good water quality according to RNB data records (French Watershed Biomonitoring Network; <http://sierm.eaurmc.fr/eauxsuperficielles/index.php>), and abundant gammarid populations are found there. This monitoring is based on the measurement of chemical parameters (physicochemical indicators and some pollutants in water) and ecological parameters (biological indicators using invertebrates and diatoms), as required by the Water Framework Directive (European Commission, Directive 2000/60/EC, 2000). For several years, the Tour du pin site has shown good chemical and ecological quality. Adult organisms (male and female) were recovered through 2- and 2.5-mm sieves, stored in plastic bottles containing ambient freshwater, then quickly transferred to the laboratory, where they were kept for 15 days at $12 \pm 0.5^\circ\text{C}$, at calcium levels close to those of studied

sites. A 16/8-h light/dark cycle was used, and they were continuously supplied with aerated uncontaminated groundwater before being used in experiments (Lacaze et al., 2011). Organisms were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*) collected in a pristine site and previously conditioned for at least 6 ± 1 days in water. Freeze-dried Tubifex worms were added as a dietary supplement twice a week.

2.2. *In situ* deployments

2.2.1. Study sites

A field experiment was conducted along a polymetallic contamination gradient surrounding the confluence of the Lot River and the Riou Mort watershed (Figure 1). The Riou Mort is severely affected by pollution coming from the industrial basin of Decazeville, where a zinc ore factory has produced ores for over a century (Baudrimont et al., 1999). The industrial area contributes significant amounts of metals/metalloids (Cd, Pb, Zn, Cu, As, Sb, U) and has been studied for 15 years. The pollution leads particularly to very high Cd and Zn concentrations in the water, and the suspended particulate matter reaches 30 mg Cd/L and 1500 mg Zn/L at the most contaminated site (Marie et al., 2006; Saari et al., 2007; Coynel et al., 2007; Morin et al., 2008).

Five sites were selected based on their metallic contamination levels. The “Upstream station” (“Up.Lot”) is located on the Lot River above the confluence with the Riou Mort River and is considered a reference site because of its low metal contamination. The “Downstream station” (“Dn.Lot”) is located on the Lot River, downstream from the confluence of the Riou Mort River and the Lot River, where waters from the two rivers are considered to be totally mixed. The site called “Decazeville” is located on the Riou Mort River upstream from the industrial site, but in an industrial and urban area. The “Riou Viou” site is located upstream from the factory, but near a smelting waste discharge; consequently, it is characterised by metallic contamination. Finally, the “Joany” site is on the Riou Mort River, downstream from the industrial site and directly receiving the smelting waste leachates and ore treatment site wastes (Lacaze et al., 2011). Recently, Besse et al. (2013) proposed threshold values for 5 metals, including Cd and Zn, which when exceeded by bioaccumulation in *G. fossarum* would indicate anthropogenic contamination. Based on these threshold values (Table 1), “Up.Lot” and “Decazeville” sites did not show average of Cd and Zn bioavailable contamination with values lower than the threshold ones, respectively of 0.3 and 84.7 $\mu\text{g/g}$. On the contrary, Cd contents

observed in gammarids exposed to “Dn.Lot”, “Riou Viou” and “Joany” sites have significantly higher threshold values, with average concentrations ranging from 5.081, 6.413 and 6.843 $\mu\text{g/g}$ respectively. For Zn, only organisms exposed to “Joany” site (average 196 $\mu\text{g/g}$) and to a lesser extent “Dn.Lot” (average 89 $\mu\text{g/g}$) sites showed an average concentration higher to the threshold value of 84.7 $\mu\text{g/g}$.

2.2.2. Physicochemical characteristics of the sites

A summary of the aquatic physicochemical parameters of the study sites is presented in Table 2 from Lacaze et al. (2011). The “Decazeville” and “Joany” sites showed conductivity values that were 2 to 13.6 times greater than those of the three other sites, with high variability. Both sites also displayed higher NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , Mg^{2+} and SO_4^{2-} values. The latter two are characteristic of industrial wastes. For example, Mg^{2+} and SO_4^{2-} in June 2010 were 30 and 134 times higher in “Decazeville” than in “Up.Lot”, respectively. In order to compare with our results (Table 2 and detailed values in Lacaze et al., 2011), we indicated the standards set by the European Water Framework Directive: 30 mg/L to 50 mg/L for Mg^{2+} and 250 mg/L for SO_4^{2-} .

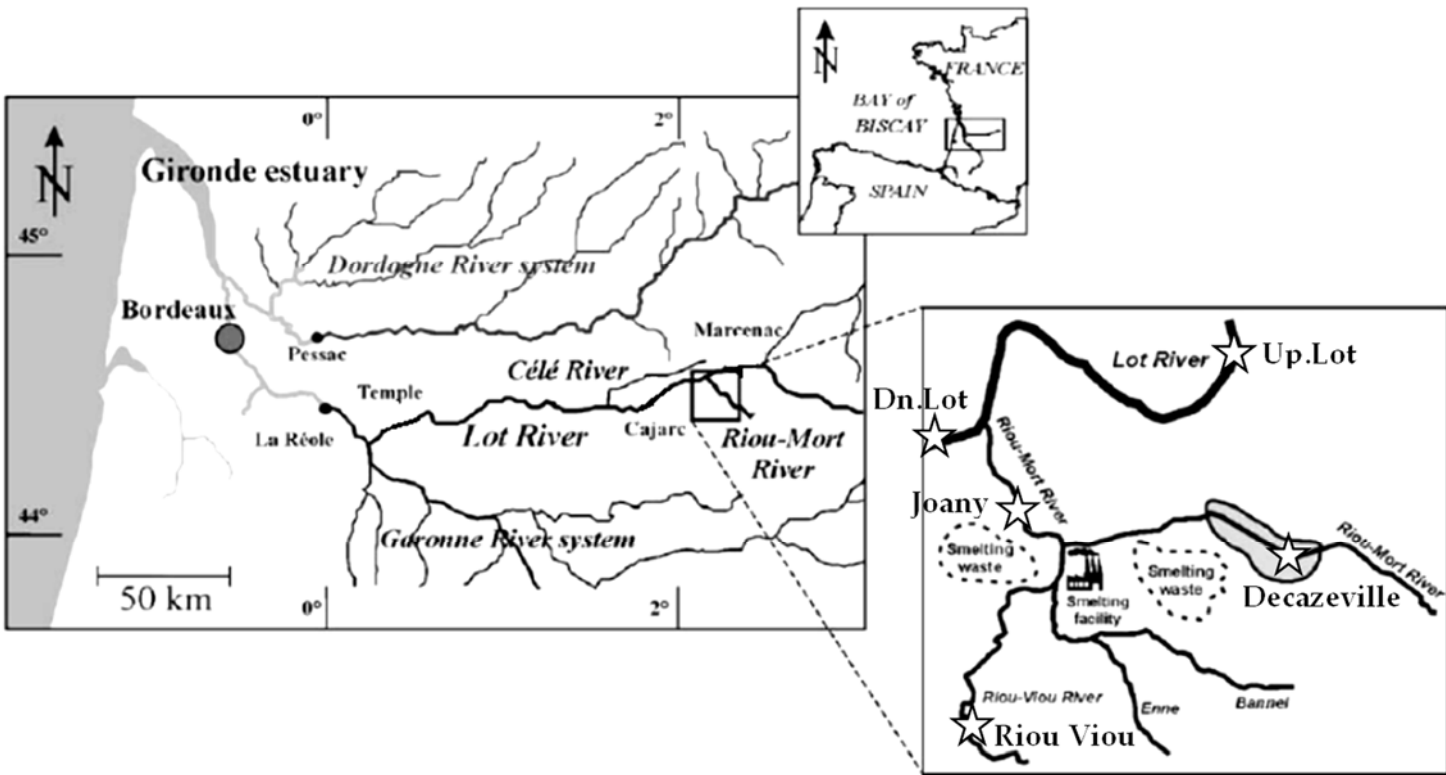


Figure 1: Localization of study area and sampling stations (modified from Audry et al., 2004)

Table 1 : Summary of Cd and Zn bioaccumulation in gammarids at the five studied sites from Lacaze et al. (2011).

Minimum, average and maximum values from February 2009 to June 2010 for Up.Lot, Dn.Lot, Riou Viou and Decazeville. Minimum, average and maximum values from February 2009 to April 2009 for Joany

		Besse et al. (2013)	Up.Lot	Dn.Lot	Riou Viou	Decazeville	Joany
Cd (µg/g dry weight)	Max		0.379	12.690	14.350	0.509	7.518
	Average		0.255	5.081	6.413	0.286	6.843
	Min		0.100	1.414	1.185	0.042	6.167
	Threshold values*	0.3					
Zn (µg/g dry weight)	Max		79	103	97	69	207
	Average		65	89	84	68	196
	Min		41	64	70	47	184
	Threshold values*	84.7					

* Threshold values of bioaccumulation in *G. fossarum* above which the concentration reveals a bioaccumulation of compounds significantly higher than the natural background contamination in this species, tracing thus an anthropogenic source of pollution (determined by Besse et al., 2013)

Table 2: Summary of physicochemical characteristics at the five studied sites (minimum and maximum values) from Lacaze et al. (2011)

	T°C	C (µS/cm)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	NO ₂ ⁻ (mg/L)	NH ₄ ⁺ (mg/L)	PO ₄ ³⁻ (mg/L)	Mg ²⁺ (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)
	Min/max	Min/max	Min/max	Min/max	Min/max	Min/max	Min/max	Min/max
Up. Lot	4.6/14.9	112/178	3.6/5.8	<0.02/0.045	<0.02/0.05	<0.03/0.08	3.9/5.4	4.5/6.5
Dn. Lot	4.8/15.2	130/220	2.4/6.1	0.02/0.08	0.02/0.1	<0.03/0.08	5.6/6.9	8.5/23
Riou Viou	3.7/15.6	193/270	5.7/11.5	<0.02/0.29	<0.02/0.46	0.045/0.135	8.6/53.15	16.5/273.5
Decazeville	5.2/17.4	717/1530	5.2/25.5	0.075/1.24	0.205/1.565	0.065/0.435	33.1/134.6	149/672.5
Joany	5.6/16.6	522/1552	8.6/19.5	0.295/1.43	0.43/1.42	0.155/0.65	26.4/78.5	145.5/1876.4

2.2.3. *Caging procedure*

Seven campaigns were conducted from February 2009 to June 2010. Experiments were performed in four seasons in 2009 and in three seasons in 2010. The caging procedure for gammarids was already described in detail by Lacaze et al. (2011) and Coulaud et al. (2011), and it was adapted from Maltby et al. (1990). Adult male gammarids with homogenous body size (9 ± 1 mm) were identified in the laboratory. Selecting for these characteristics limits the inter-individual variability, preventing (i) digestive variations during larval development and (ii) variation in energy allocation and digestion during the female reproductive cycle. Four replicate sets of 20 adult male gammarids with homogenous body size were deployed in polypropylene cylinders (length, 10 cm; diameter, 5.5 cm) capped at the ends with pieces of net (mesh, 1 mm) to guarantee the free circulation of water, from February 2009 to June 2010 in each of the 5 study sites. The cylinders were protected by a rigid plastic container. Rocks were placed on the top of protective containers in order to weigh them down in the river bed. Twenty alder leaf discs (20 mm in diameter, without major veins), previously prepared as described by Felten et al. (2008), were supplied in each cylinder in order to measure feeding rate (section 2.5.). Two cylinders with only leaf material were deployed at each site as a control, in order to determine the leaf consumption that results from bacterial, fungal or physical processes.

After 7 days of exposure, organisms were brought to the laboratory in water collected at each station. For each replicate, the survival and feeding rate were determined. Then, all organisms were put together, and they were distributed into six replicate groups of six organisms each for digestive enzyme activity measurements. They were weighed, frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C until digestive enzyme activity analysis. Consequently, we used only 36 organisms out of all the surviving gammarids collected at each station. The rest of the gammarids were used for other studies (see, for example, Lacaze et al., 2011).

2.3. *Survival rate of gammarids*

The survival rates of caged adult male gammarids at the five study sites were shown in Lacaze et al. (2011). The mean survival was $90.5 \pm 9.0\%$, except at “Joany,” where the high mortality rate (frequently $> 50\%$) prevented some measurements. For this reason, the feeding rate was not assessed in June (2009 and 2010) and November 2009, and the digestive enzyme activities were only measured in February 2009 and April 2009 at this

site. The high survival rates underscored the low probability of predation at four of the sites. The supplied leaves served not only as a highly preferred food resource for the gammarids (Friberg and Jacobsen, 1994), they also may have provided refuges from predation.

2.4. Metal bioaccumulation in gammarids

Metal bioaccumulation in *G. fossarum* was used to classify sites according to their levels of metal contamination (Lacaze et al., 2011). Organisms exposed at the “Joany” station exhibited a significantly higher Zn concentration compared with the four other sites (Table 1). Cadmium levels in the gammarids exhibited the following gradient: “Upstream Lot” ≈ “Decazeville” << “Downstream Lot” < “Riou Viou” < “Joany”. However, the physicochemical parameters of the waters (section 2.2.2.) demonstrated that the “Decazeville” site was also impacted by industrial wastes. To summarise, it was clear that only the “Up.Lot” site could be used as a control in this study.

2.5. Feeding rate assessment

Feeding rate calculations were based on scanning leaf discs and expressed as the consumed surface per day per living gammarid (mm²/d/organism). Feeding rate was calculated as follows (Coulaud et al., 2011):

$$FR_i = \frac{(S_{\text{control}} - S_i)}{((l_{i,0} + l_{i,t})/2) * t}$$

where FR_i is the feeding rate of replicate i ; S_{control} is the total surface area of leaf discs at the end of the experiment in the control without gammarids; S_i is the total surface area of leaf discs at the end of the experiment in replicate i ; t is the duration time in days (here $t = 7$ days) and $l_{i,0}$ and $l_{i,t}$ are the numbers of living gammarids at the start and end of the experiment, respectively (here, $l_{i,0}=20$).

2.6. Measurement of digestive enzymes in *G. fossarum*

To measure enzymatic activities, six replicates groups of six gammarids each were homogenised in Tris-HCl buffer (0.01 M, pH 7) with a hand-held glass grinder, with a ratio of 50 mg ml⁻¹ (w/v). After centrifugation (10,000 g, 4 °C, 10 min), the supernatant was collected and used for enzymatic activity analysis. Amylase and carboxymethylcellulase (CMCase) activities were measured according to a method by Palais et al. (2010) that was adapted for *G. fossarum*. The artificial substrates starch (1%, pH 7) and carboxymethyl-

cellulose (2%, pH 5.5) were used for amylase and CMCase, respectively, and the optimal incubation temperatures were 42 °C and 45 °C, respectively. Trypsin activity was analysed according to the modified method of García-Carreño and Haard (1993), adapted for *G. fossarum*. Briefly, the enzyme extract was added to the appropriate substrate (BAPNA, 3 mM, pH 8) and incubated for 10 min at 45 °C. Acetic acid (30%) was then added, and the optical density was measured at 410 nm. A calibration curve was established with p-nitroaniline.

Each enzyme activity was expressed in terms of micrograms of final product released per minute per milligram of protein. The protein content in the supernatant was determined according to the Bradford method (Bradford, 1976).

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the statistica 8.0 software (StatSoftInc). Normality and homogeneity of data were first tested with the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. The data were found to be non-normal and non-homogeneous, so a non-parametric test was used for analysis. The Mann-Whitney test was used to test for spatial differences between different sites and the “Up.Lot” site, and the Kruskal-Wallis test was used to test for temporal differences (annual and seasonal), with Bonferroni correction. Statistical significance was determined by $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Feeding activity

With regard to spatial variation, no differences were observed between sites in June 2009 and 2010 and in November 2009 (Figure 2). Much lower values at “Joany” were measured in February 2009 (6 mm²/d/gammarid) and April 2009 (5.7 mm²/d/gammarid), when compared with the feeding rate at the reference site “Up.Lot” (22.3 and 22.2 mm²/d/gammarid in February and April 2009, respectively). This inhibition remained significantly lower in “Joany” the next year, in February and April 2010, comparatively with “Up.Lot” ($p < 0.001$). Significant feeding rate inhibition was also observed at “Decazeville” in February 2010 ($p = 0.00125$) and April 2010 ($p < 0.001$) in comparison with the reference site (“Up.Lot”), but there was no difference recorded in 2009. In April 2009 and 2010, gammarids at “Dn.Lot” had a significantly reduced feeding compared to those in “Up.Lot” (about 1.5 times lower).

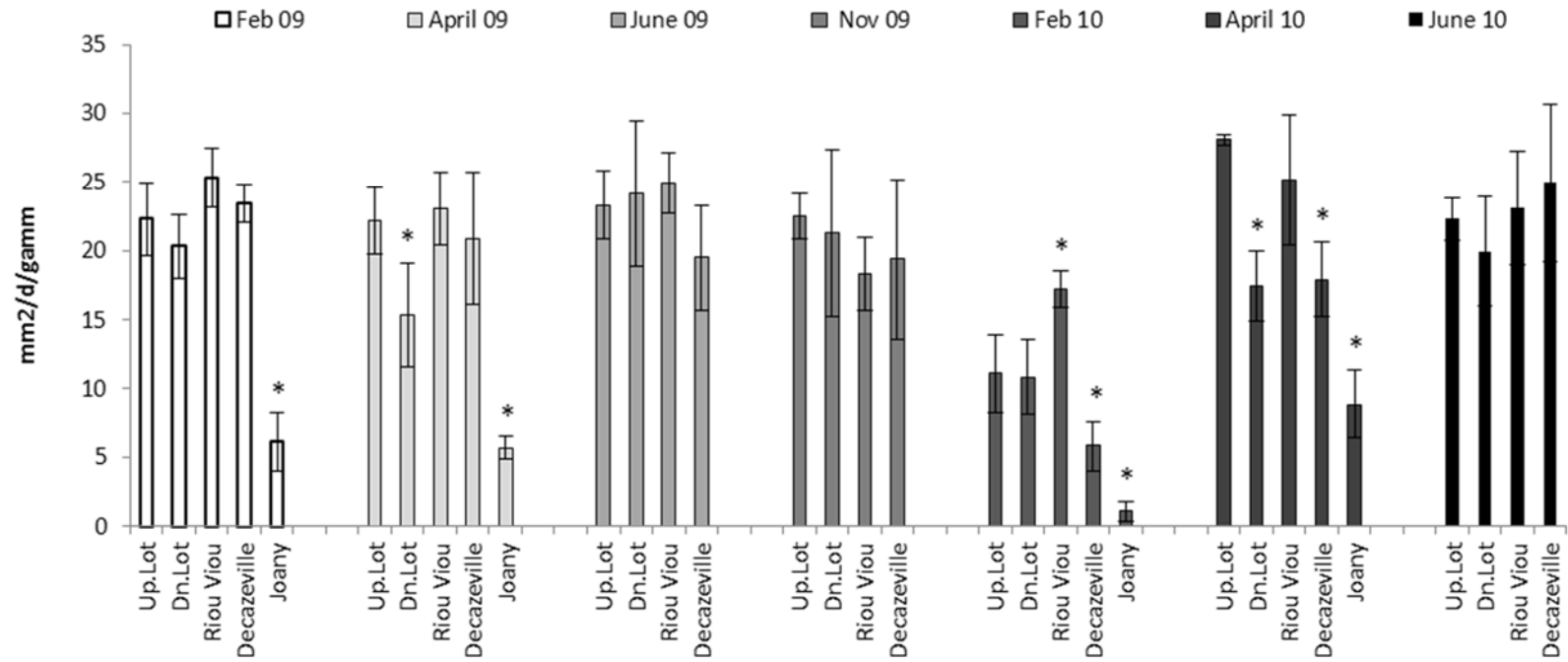


Figure 2: Spatio-temporal variations of feeding rate of *Gammarus fossarum* caged 7 days. Mean values and standard error from four replicates, * significantly different from upstream site value ($p < 0.05$)

No particular seasonal variations were observed in 2009. In contrast, in 2010 the feeding rate was always significantly lower in February than in other months, for all five study sites. For example, at the reference site (“Up.Lot”), the feeding rate was 11 mm²/d/gammarid in February 2010, whereas values of 28 and 22 mm²/d/gammarid were found in the same year for April and June, respectively ($p < 0.001$).

Regarding yearly variations for particular months, significant differences between 2009 and 2010 were principally caused by lower values observed in February 2010 compared to February 2009 for all sites. At the reference site (“Up.Lot”), the feeding rate in February 2009 was twice that of February 2010.

3.3. Digestive enzyme activities

Amylase activity (Figure 3A). With regard to spatial variation, the values at “Joany” were found to be much lower in February 2009 and April 2009 (93% decrease when compared to “Up.Lot”, $p < 0.001$). To a lesser extent, gammarids in “Dn.Lot” showed reduced amylase activity compared to “Up.Lot” during the two previous months ($p = 0.008$ and $p = 0.016$, respectively), whereas this activity only decreased in February 2009 concerning organisms caged at “Riou Viou”. In November 2009, a significantly lower activity ($p = 0.01$) was recorded at “Decazeville” than at “Up.Lot”. The reference site “Up.Lot” stood out in February 2010 and April 2010, with lower amylase activity values compared to other sites. Considering the seasonal variation in 2009, gammarids from “Up.Lot” and “Dn.Lot” showed a significant decrease ($p < 0.001$ for “Up.Lot” and $p < 0.05$ for “Dn.Lot”) in amylase activity between February 2009 (928 µg maltose/mg BSA/min for “Up.Lot”) and June 2009 (607 µg maltose/mg BSA/min for “Up.Lot”), followed by a significantly higher activity in November (1102 µg maltose/mg BSA/min for “Up.Lot”). A similar trend was noted at “Riou Viou”, whereas the activities were stable at “Decazeville” and “Joany”. During 2010, a different pattern was observed for “Up.Lot” and “Dn.Lot”, with a significant increase of amylase activity between February and June ($p = 0.027$ and $p < 0.001$, respectively).

Regarding annual variations at the “Up.Lot” and “Dn.Lot” sites, amylase activity was significantly lower in February 2010 (598 and 586 for “Up.Lot” and “Dn.Lot”, respectively) than in 2009 (927 and 788 for “Up.Lot” and “Dn.Lot”, respectively), whereas the opposite was observed in June 2010 when compared with 2009.

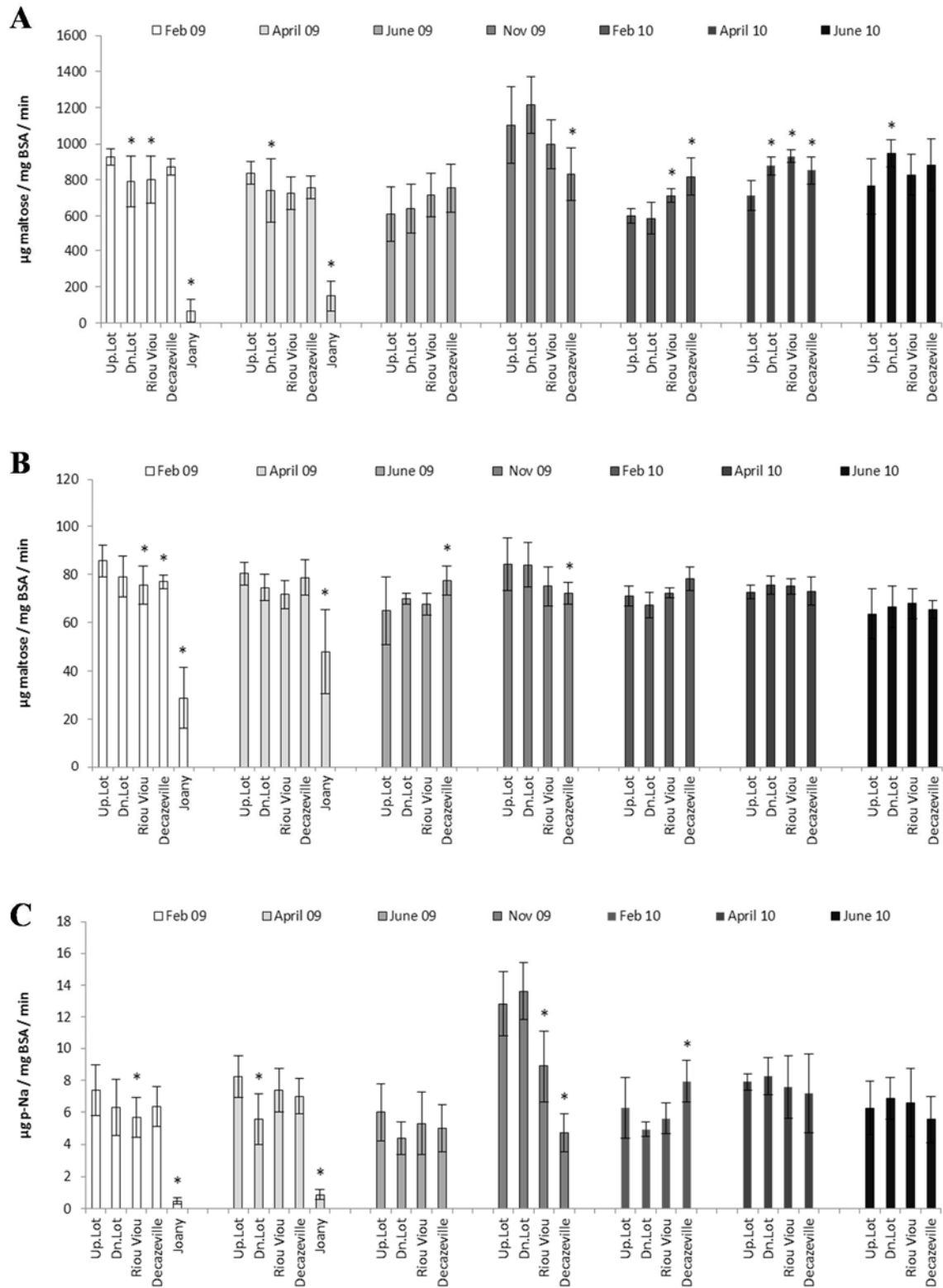


Figure 3: Spatio-temporal variations of digestive enzyme activities (amylase (A), cellulase (B) and trypsin (C)) of *Gammarus fossarum* caged 7 days. Mean values and standard error from six pools of six gammarids, * significantly different from upstream site value (p < 0.05)

Cellulase activity (Figure 3B). With regard to spatial variation, much lower values at “Joany” were measured in February and April 2009 (decreases of 66% and 40%, respectively, when compared with “Up.Lot”; $p < 0.001$). In November 2009, a significantly lower activity ($p = 0.023$) was recorded at “Decazeville” (72 μg maltose/mg BSA/min) than at “Up.Lot” (84 μg maltose/mg BSA/min). This site was also pointed out in February 2009, together with “Riou Viou” site, as cellulase activity was significantly lower as compared with the activity measured at “Up.Lot”. The activities measured in 2009 did not show a strong trend, excepted for the lower values at “Up.Lot” ($p < 0.001$), “Dn. Lot” ($p = 0.0208$) and “Riou Viou” ($p = 0.0248$) in June 2009 in comparison with the February 2009 values. In 2010, no seasonal variations were observed.

Regarding annual variation, a comparison of cellulase activities conducted in 2009 and 2010 showed little difference. However, lower activity was recorded in February 2010 at “Up.Lot” (71 μg maltose/mg BSA/min) and “Dn.Lot” (67 μg maltose/mg BSA/min) compared with values in February 2009 (86 and 79 μg maltose/mg BSA/min, in “Up.Lot” and “Dn.Lot,” respectively).

Trypsin activity (Figure 3C). The spatial variations demonstrated the much lower values at “Joany” in February and April 2009 (decreases of 94% and 89% respectively), when compared with “Up.Lot”). In November 2009, a significantly lower activity was recorded at “Decazeville” (4.7 μg p-Na/mg BSA/min, $p < 0.001$) and “Riou Viou” (8.9 μg p-Na/mg BSA/min, $p = 0.0016$) when compared with “Up.Lot” (12.8 μg p-Na /mg BSA/min). Gammarids caged at “Riou Viou” also showed also significantly lower values in February 2009.

Considering the seasonal variations in 2009, the trypsin activities were marked by a significantly higher value in November 2009 at “Up.Lot” ($p < 0.001$), “Dn.Lot” ($p < 0.001$) and “Riou Viou” ($p = 0.0032$), when compared with February 2009. In 2010, few variations in trypsin activity were recorded during the different months, with no particular trend observed.

Regarding annual variations, a comparison of 2009 and 2010 showed no specific characteristics, except for the higher values at “Dn.Lot” in April 2010 (8.23 μg p-Na/mg BSA/min, $p = 0.0016$) and June 2010 (6.87 μg p-Na/mg BSA/min, $p=0.003$) compared to those in 2009 (5.54 and 4.36 μg p-Na/mg BSA/min, respectively).

4. Discussion

4.1. Spatial variations and contamination

In accordance with the high metal contamination found at “Joany”, lower values for feeding rate and digestive enzyme activities were observed in comparison to “Up.Lot”. The negative impact of water quality on these biological parameters was clearly highlighted. According to Bundschuh et al. (2011), high proportions of wastewater may affect the feeding rates and thus affect the availability of energy for the aquatic food web, and wastewater may also affect the energy budget of *G. fossarum*. Numerous studies have shown a decrease of feeding rates (Wilding and Maltby, 2006; Bloor and Banks, 2006; Barata et al., 2007) and digestive enzyme activities (Hyne and Maher, 2003; Kalman et al. 2009; Seebaugh et al., 2011, Lebrun et al., 2012) in aquatic invertebrates due to contamination exposure. In Dedourge-Geffard et al. (2009), a similar order of values of feeding rate was recorded at the reference site (23 mm²/d /organism) and at the impacted site (9 mm²/d/organism) after 7 days of transplantation (April 2008). However, amylase and cellulase activities were about 2 times lower in the “Joany” site in April 2009, than in the impacted “Amous” site, whereas similar order of values was found in the reference sites for amylase and cellulase activities, compared with activities in “Up.Lot” (about 700 ± 100 µg maltose/mg BSA/min for amylase activity and 110 ± 30 µg maltose/mg BSA/min for cellulase activity).

These biological measures are relevant parameters for demonstrating an environmental disturbance. In this study, gammarids were fed *ad libitum* so that the inhibition of digestive enzymes recorded at “Joany” did not result from relative starvation. In contrast to the other four sites with high survival rates, gammarids at “Joany” had a mortality rate greater than 50%. However, we did not observe an increase in trypsin activity that might have signified a dietary change such as cannibalism. The supplied leaves also prevented predation. Douhri and Sayah (2009) showed that amylase activity in *Nereis diversicolor* and *Patella vulgate* was negatively affected by altered conditions. Their hypothesis is that the cells responsible for the synthesis suffer from the cytotoxic effects of pollution. Moreover, it is possible that polluted waters decrease the quality of added food and inhibit food intake, ingestion and nutrient assimilation (Allen et al., 1995; Meyer et al., 2005; De Schamphelaere et al., 2007).

Whereas no spatial difference in feeding rate was observed in June (2009 and 2010) and November 2009 (no measure for “Joany”), lower values were observed at “Decazeville” in February and April 2010 compared to the reference site (“Up.Lot”). Lacaze et al. (2011) did not find metal accumulation (Cd and Zn) in gammarids at “Decazeville,” but a high conductivity and high concentrations of Mg^{2+} and SO_4^{2-} were recorded, reflecting industrial impact. Curiously, these differences in feeding rate at the “Decazeville” station were not observed in other months, even though the physicochemical characteristics did not change. Other factors, biotic (parasite load etc.) or abiotic (pH, light etc.), may have influenced gammarids, but they were not identified.

Aside from feeding rate, the only other spatial variations we noted (except at “Joany”) were the significantly lower values of the three digestive enzymes studied at the “Decazeville” site in November 2009 compared to “Up.Lot”. In accordance with our results, Lacaze et al. (2011) demonstrated genotoxic adverse effects at the “Joany” and “Decazeville” sites, with the maximum value of DNA damage being measured in November 2009 at “Decazeville”. However, the feeding rate was not significantly affected in this month. According to the literature, the feeding rate and digestive enzyme activities are not always related, as shown in *Penaeus monodon* by Ong and Johnston (2006), who suggest that digestive enzyme production is not strongly influenced by feeding. A third station, “Riou Viou”, was distinguishable by the genotoxic response observed in exposed gammarids. This site differed also in its lower activity as compared to the reference one in February 2009 for the three digestive enzymes activities and in November 2009 for trypsin activity, even if this inhibition was not repeated in 2010. However, these significant inhibitions found at “Decazeville” and “Riou Viou” in autumn and winter, constitute an interesting point in regards to the seasons of interest in view of caging to discriminate the sites suggested as impacted and with no mortality.

Finally, the enzymatic activity ratio between the most impacted site (“Joany”) and the reference site (“Up.Lot”) was greatest for trypsin (ratio 9.4), followed by amylase (ratio 5.6) and cellulase activity (ratio 1.6) in spring 2009. These results suggest trypsin activity is more sensitive than the activities of the other two carbohydrases when the most impacted site is compared to the reference site. The protease trypsin is considered the most important crustacean digestive enzyme, as it accounts for 50–60% of digestive proteolysis (Galgani et al., 1984). The two main functions of trypsin are the hydrolysis of food protein and the activation of trypsin zymogens and other digestive proteases (Muhlia-Almazán et al.,

2008). The marked inhibition of this protease may disturb some functions of the organism that relate to the first steps of energy acquisition (breakdown of nutritive material). Protein digestion was highly disturbed in gammarids encaged at the “Joany” site.

4.2. Seasonal and annual variations

Seasonal variations and contaminant factors can interact with biological responses, particularly in the case of digestive enzyme activities (Golovanova et al., 1999; Kuz'mina and Ushakova, 2007). Thus, to focus on temporal changes for a caging application, we decided to analyse only the biological responses observed at the “Up.Lot” site, which was used as the reference site. Few seasonal changes were observed for the digestive enzymes cellulase and trypsin (except in November 2009).

An increase of amylase and trypsin activities was observed at the “Up.Lot” site in November 2009 (no data for 2010). This could be due to the physiological status of the organism at this time. We hypothesized that the digestive enzyme activity may be higher before winter, in order to maximize energy reserves. The study of Becker et al. (2013) supports this hypothesis as they showed that stored energy reached a peak in late winter, notably in males.

The feeding rates and amylase activities were also reduced in February 2010 compared to other months of the same year. This may be attributable to the lower temperatures in February. Generally, the rate of digestion and the quantity of enzyme produced depends to a great extent on temperature. Coulaud et al. (2011) described a significant linear influence of water temperature on feeding rate, with a 50% reduction of the feeding rate at 7 °C compared to 16 °C. Seasonal variations in digestive enzymatic activities have also been observed in various bivalve and crustacean species (Stuart et al., 1985; Guarna and Borowsky, 1995; Palais et al., 2012). In Ibarrola et al. (1998), total digestive enzyme activities in the cockle (*Cerastoderma edule*) were lower in February and higher in May, when environmental temperatures are at their minimum and maximum, respectively. However, we did not find this pattern in 2009; feeding rate and amylase activity were particularly high in February. This difference, as compared with previous studies, could be due to the methodology applied. In fact, the influence of environmental parameters on biological responses could be lower during caging experiments, with a short time exposure of organisms, compared to organisms from autochthonous population. Thus, in the present study, for one week exposure, water temperature is not the only environmental factor that

explains the observed variations in digestive enzyme activities and feeding rate. Like other biomarkers, feeding rate and digestive enzyme activities could be subject to the influence of numerous factors. Under field conditions, organisms are exposed to numerous chemical, physical and biological pressures. Caging the organisms and feeding *ad libitum* is advantageous because it reduces inter-individual variability and frees the organisms from the effects of natural food fluctuations. However, other confounding factors occur that are not always easy to distinguish from the true biomarker response. For example, the presence of parasites can be a confounding factor: it has been shown that infection by *Dollfusioella martini* adversely affects the digestive gland function of green crabs (*Carcinus maenas*) by reducing trypsin and lipase activities (Gurney et al., 2006). Similarly, Guerlet et al. (2007) followed cellular responses in *Dreissena polymorpha* monthly over 2 years in order to differentiate pollution effects from environmental factors. The authors found no systematic seasonal patterns in mussels from one year to another. In order to determine the reliability of a biomarker, it would be better to increase the sampling frequency and to understand the causes of seasonal variations in biomarker response (Hagger et al., 2006; Kalman et al., 2009; Nahrgang et al., 2013).

As pointed out by Guerlet et al. (2007), it is difficult to untangle the complex influences and interactions that occur in the field. This underlines the need for laboratory experiments in order to gain insight about the importance of different parameters, particularly for parameters that may affect digestive enzyme activities in *G. fossarum*. Because a one-week exposure was perhaps not sufficient to clearly distinguish the “Dn.Lot”, “Riou Viou” and “Decazeville” sites from “Up.Lot”, we suggest a longer period for the next *in situ* experiment. We have no information about the appropriate period for *G. fossarum*, but for mussels, we know that at least 2 weeks may be required to observe significant changes in digestive enzyme levels (Samain in Bayne, 1993).

5. Conclusion

Energy metabolism is crucial for all biochemical and physiological processes in all organisms. Whereas feeding rate is well known in *Gammarus* sp., this study provides original information on digestive enzyme activities in *G. fossarum* by way of an *in situ* study. Feeding rate and digestive enzyme activity were severely reduced at the more polluted site. However, concerning digestive enzyme, their activities were also inhibited in some seasons for those organisms exposed to less impacted sites with no mortality in

contrast to the most contaminated site Joany. This suggests that these biological responses could serve as biomarkers to study water quality. More specifically, our results suggest that digestive enzymes may be able to be used as biomarkers to monitor water quality with caging experiments preferentially during autumn and winter seasons. Feeding rate and digestive enzyme activities are not always linked, so they represent complementary tools. In a multi-biomarker approach, they could be used together.

Temporal fluctuations differed depending on the biomarker measured (feeding rate or one of the three enzyme activities), and there was no clear seasonal or annual pattern. Temperature is not the only abiotic parameter that could explain the fluctuations of digestive enzyme activities. The caging procedure employed here limited some of the potentially confounding factors, but the interpretation of the biological responses over the course of several seasons remained difficult. It seems necessary to perform experiments under controlled conditions to test different environmental factors (temperature, water hardness, organic matter). Biomonitoring programs need biomarkers that are well characterised in order to clearly distinguish the effects of particular contaminants.

Acknowledgements

This study was supported by the National Research Project ANR 08-CES-014 RESYST and ANR 2011 CESA 021 02. The authors sincerely thank Elsevier for the English revision.

References

- Adam, O., Degiorgi, F., Crini, G., Badot, P.-M., 2010. High sensitivity of *Gammarus* sp. juveniles to deltamethrin: Outcomes for risk assessment. *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 1402–1407.
- Allen, Y., Calow, P., Baird, D.J., 1995. A mechanistic model of contaminant induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1625–1630.
- Barata, C., Damasio, J., López, M.A., Kuster, M., De Alda, M.L., Barceló, D., Riva, M.C., Raldúa, D., 2007. Combined use of biomarkers and *in situ* bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 370–379.
- Baudrimont, M., Andrès, S., Metivaud, J., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (River Lot, France): II Metallthionein response to metal. exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2472–2477.
- Bayne, B.L., 1993. Feeding physiology of bivalves: time dependence and compensation for changes in food availability. *NATO ASI Series G : Ecol Sciences.* 33, 1–24.
- Becker, J., Ortmann, C., Wetzel, M.A., Winkelmann, C., Koop, J.H.E., 2013. Mate guarding in relation to seasonal changes in the energy reserves of two freshwater amphipods (*Gammarus fossarum* and *G. pulex*). *Freshwater Biol.* 58, 372–381.
- Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., 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 Res.* 47, 650–660.
- Blockwell, S.J., Taylor, E.J., Jones, I., Pascoe, D., 1998. The influence of fresh water pollutants and interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the feeding activity of *Gammarus pulex* (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 41–47.
- Bloor, M.C., Banks, C.J., 2006. An evaluation of mixed species in-situ and ex-situ feeding assays: The altered response of *Asellus aquaticus* and *Gammarus pulex*. *Environ. Int.* 32, 22–27.
- Bloor, M.C., 2011. Dietary preference of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus* during a laboratory breeding programme for ecotoxicological studies. *Int. J. of Zool*
- Boldina-Cosqueric, I., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Dedourge-Geffard, O., Métais, I., Mouneyrac, C., Moutel, B., Berthet, B., 2010. Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality. *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 1733–1741.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bundschuh, M., Zubrod, J.P., Schulz, R., 2011. The functional and physiological status of *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda) exposed to secondary treated wastewater. *Environ. Pollut.* 159, 244–249.
- Calow, P., Sibly, R., 1990. A physiological basis of population process: ecotoxicological implications? *Funct. Ecol.* 4, 283–288.
- Chen, Z., Mayer, L.M., Weston, D.P., Bock, M.J., Jumars, P.A., 2002. Inhibition of digestive enzyme activities by copper in the guts of various marine benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1243–1248.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S., Chaumot, A., 2011. *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Res.* 45, 6417–6429.

- Coyne, A., Schäfer, J., Dabrin, A., Girardot, N., Blanc, G., 2007. Groundwater contributions to metal transport in a small river affected by mining and smelting waste. *Water Res.* 41, 3420-3428.
- Cummins, K.W., Klug, M.J., 1979. Feeding ecology of stream invertebrates. *Annu. Rev. Ecol. Systemat.*, vol. 10, 147-172.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing, II. Digestive enzyme activity in *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of cadmium, chromium and mercury. *Chemosphere* 35, 1053-1067.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1998. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing, I. The digestive physiology of daphnids exposed to toxic stress. *Hydrobiologia* 367, 199-209.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., Giesy, J.P., 2000. Biomarker applications in ecotoxicology: Bridging the gap between toxicology and ecology. In Persoone G, Janssen C, De Coen WM, (Eds.), *New Microbiotest for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, O., Geffard, A., 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An *in situ* experiment. *Chemosphere* 77, 1569-1576.
- Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Geffard, A., Amiard-Triquet, C., 2012. Origin of Energy Metabolism Impairments. In: Amiard-Triquet C., Amiard J.C., Rainbow P.S. (Eds.), *Ecological Biomarkers – Indicators of Ecotoxicological Effects*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 279-306.
- De Schamphelaere, K.A.C., Forrez, I., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Janssen, C.R., 2007. Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 81, 409-4180.
- Douhri, H., Sayah, F., 2009. The use of enzymatic biomarkers in two marine invertebrates *Nereis diversicolor* and *Patella vulgata* for the biomonitoring of Tangier's bay (Morocco). *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 394-399.
- European Commission, Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, Off. J. Eur. Comm. L327/1, 2000.
- Feckler, A., Thielsch, A., Schwenk, K., Schulz, R., Bundschuh, M., 2012. Differences in the sensitivity among cryptic lineages of the *Gammarus fossarum* complex. *Sci. Total Environ.* 439, 158-164.
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.* 86, 413-425.
- Forrow, D.M., Maltby, L., 2000. Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2100-2106.
- Franken, R.J.M., Batten, S., Beijer, J.A.J., Gardeniers, J.J.P., Scheffer, M., Peeters, E.T.H.M., 2006. Effects of interstitial refugia and current velocity on growth of the amphipod *Gammarus pulex* Linnaeus. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 25, 656-663.
- Friberg, N., Jacobsen, D. 1994. Feeding plasticity of two detritivore-shredders. *Freshwater Biol.* 32, 133-142.
- Galgani, F.G., Benyamin, Y., Ceccaldi, H.J., 1984. Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forskål): A comparison with *Penaeus japonicus* Bate. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 78, 355-361.

- García-Carreño, F.L., and Haard, N., 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food. Biochem.* 17, 97–113.
- Garmendia Tolosa, A.J., Axelsson, B., 1993. *Gammarus*, their biology, sensitivity and significance as test organisms, Tech. Rep. B 1095. Swedish Environmental Research Institute, Stockholm, Sweden, p.88.
- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2249-2259.
- Gerhardt, A., Kienle, C., Allan, I.J., Greenwood, R., Guigues, N., Fouillac, A.-M., Mills, G.A., Gonzalez, C., 2007. Biomonitoring with *Gammarus pulex* at the Meuse (NL), Aller (GER) and Rhine (F) rivers with the online Multispecies Freshwater Biomonitor. *J. Environ. Monitor.* 9, 979–985.
- Gerhardt, A., 2011. GamTox: a low-cost multimetric ecotoxicity test with *Gammarus* spp. for in and ex situ application. *Int. J. Zoo.* 2011, 7, <http://dx.doi.org/10.1155/2011/574536>, (Article ID 574536).
- Golovanova, I.L., Kuz'mina, V.V., Gobzheliani, T.E., Pavlov, D.F., Chuiko, G.M., 1999. *In vitro* effects of cadmium and DDVP (dichlorvos) on intestinal carbohydrase and protease activities in freshwater teleosts. *Comp. Biochem. Phys. C.* 122, 21–25.
- Guarna, M.M., Borowsky, R.L., 1995. Biochemical properties of amylase isozymes from *Gammarus palustris*. A comparative study. *Comp. Biochem. Phys. B. Biochem. Mol. Biol.* 112, 619–628.
- Guerlet, E., Ledy, K., Meyer, A., Giambérini, L., 2007. Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussels: A 2-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations. *Aquat. Toxicol.* 81, 377-388.
- Gurney, R.H., Johnston, D.J., Nowak, B.F., 2006. The effect of parasitism by trypanorhynch plerocercoids (Cestoda, Trypanorhyncha) on the digestive enzyme activity of *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758) (Decapoda, Portunidae). *Crustaceana* 79, 663–675.
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: Are there more questions than answers? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2, 312–329.
- Handy, R.D., Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* 12, 331–343.
- Hyne, R.V., Maher, W.A., 2003. Review Invertebrate biomarkers: link to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 54, 366–374.
- Ibarrola, I., Larretxea, X., Iglesias, J.I.P., Urrutia, M.B., Navarro, E., 1998. Seasonal variation of digestive enzyme activities in the digestive gland and the crystalline style of the common cockle *Cerastoderma edule*. *Comp. Biochem. Phys. A. Mol. Integr. Physiol.* 121, 25–34.
- Kalman, J., Palais, F., Amiard, J.C., Mouneyrac, C., Muntz, A., Blasco, J., Riba, I., Amiard-Triquet, C., 2009. Assessment of the health status of populations of the ragworm *Nereis diversicolor* using biomarkers at different levels of biological organization. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 393, 55–67.
- Koehn, R.K., Bayne, B.L., 1989. Towards a physiological and genetical understanding of the energetic of the stress response. *Biol. J. Linn. Soc.* 37, 157–171.
- Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A., 2010. *Gammarus* spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: Toward integrated multilevel tests. *Rev. Environ. Contam. T.* 205, 1-76.

- Kuz'mina, V.V., Ushakova, N.V., 2007. Activities of proteinases in invertebrate animals-Potential objects of fish nutrition. Effects of temperature, pH, and heavy metals. *J. Evol. Biochem. Phys.* 43, 483-489.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., Geffard, O., 2011. DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution* 159 (6): 1682-1691.
- Lebrun, J.D., Perret, M., Geffard, A., Gourlay-Francé, C., 2012. Modelling copper bioaccumulation in *Gammarus pulex* and alterations of digestive metabolism. *Ecotoxicology* 7, 2022-2030.
- Liber, K., Goodfellow, W., den Besten, P., Clements, W., Galloway, T., Gerhardt, A., Green, A., Simpson, S., 2007. *In situ*-based effects measures: considerations for improving methods and approaches. *Integrated Environ. Assess. Manag.* 3, 246-258.
- Maltby, L., Naylo, C., Calow, P., 1990. Field deployment of a scope for growth assay involving *gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 19, 292-300.
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere.* 65, 609-617.
- Matthiessen, P., Sheahan, D., Harrison, R., Kirby, M., Rycroft, R., Turnbull, A., Volkner, C., Williams, R., 1995. Use of a *Gammarus pulex* bioassay to measure the effects of transient carbofuran runoff from farmland. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 30, 111-119.
- Mayer, G., Maier, G., Maas, A., Waloszek, D., 2009. Mouthpart morphology of *Gammarus roeseui* compared to a successful invader, *Dikerogammarus villosus* (Amphipoda). *J. Crustacean Biol.* 29, 161-174.
- Meyer, J.S., Adams, W.J., Brix, K.V., Luoma, S.N., Mount, D.R., Stubblefield, W.A., Wood, C.M., 2005. Toxicity of Dietborne Metals to Aquatic Organisms. SETAC, Pensacola, FL, USA.
- Morin, S., Duong, T.T., Dabrin, A., Coynel, A., Herlory, O., Baudrimont, M., Delmas, F., Coste, M., 2008. Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France. *Environ. Pollut.* 151, 532-542.
- Muhlia-Almazán, A., Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F.L., 2008. Invertebrate trypsins: A review. *J. Comp. Physiol. B.* 178, 655-672
- Nahrgang, J., Brooks, S.J., Evenset, A., Camus, L., Jonsson, M., Smith, T.J., Lukina, J., Renaud, P.E., 2013. Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*)-Implications for environmental monitoring in the Barents Sea. *Aquat. Toxicol.* 127, 21-35.
- Nelson, D., 2011. Gammarus-microbial interactions: A review. *Int. J. Zool.* 2011, 6p, <http://dx.doi.org/10.1155/2011/295026>. (Article ID 295026).
- Ong, B.L., Johnston, D., 2006. Influence of feeding on hepatopancreas structure and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *J. Shellfish Res.* 25, 113-121.
- Palais, F., Jubeaux, G., Dedourge-Geffard, O., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2010. Amylolytic and cellulolytic activities in the crystalline style and the digestive diverticulae of the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771). *Molluscan Res.* 30, 29-36.
- Palais, F., Dedourge-Geffard, O., Beaudon, A., Pain-Devin, S., Trapp, J., Geffard, O., Noury, P., Geffard, A., 2012. One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Ecotoxicology* 21, 888-905.
- Saari, H.-K., Schmidt, S., Coynel, A., Hugué, S., Schäfer, J., Blanc, G., 2007. Potential impact of former Zn ore extraction activities on dissolved uranium distribution in the Riou-Mort watershed (France). *Sci. Total Environ.* 382, 304-310.

- Seebaugh, D.R., L'Amoreaux, W.J., Wallace, W.G., 2011. Digestive toxicity in grass shrimp collected along an impact gradient. *Aquat. Toxicol.* 105, 609–617.
- Stuart, V., Head, E.J.H., Mann, K.H., 1985. Seasonal changes in the digestive enzyme levels of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas) in relation to diet. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 88, 243–256.
- Wilding, J., Maltby, L., 2006. Relative toxicological importance of aqueous and dietary metal exposure to a freshwater crustacean: implications for risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1795–1801.
- Willoughby, L.G., Sutcliffe, D.W., 1976. Experiments on feeding and growth of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) related to its distribution in the River Duddon. *Freshwat. Biol.* 6: 577–586.
- Zubrod, J.P., Bundschuh, M., Schulz, R., 2010. Effects of subchronic fungicide exposure on the energy processing of *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda). *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 1674-1680.

2. Réponses des activités enzymatiques digestives chez *Gammarus fossarum* à la qualité du milieu

La prise alimentaire et l'assimilation des produits de la digestion permettent aux organismes d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance, leur maintenance et leur reproduction. Parmi les réponses biologiques liées à l'acquisition de l'énergie, nous avons étudié les enzymes digestives (amylase, cellulase et trypsine) de *Gammarus fossarum* afin d'évaluer l'impact des contaminants chimiques sur l'accès à l'énergie chez ces organismes. Cependant, pour évaluer les effets toxiques provoqués par la dégradation de la qualité de l'eau sur la capacité digestive des organismes, il est nécessaire d'établir des valeurs de référence prenant en considération les variations naturelles liées aux facteurs biotiques et abiotiques. Afin de limiter l'influence de facteurs de confusion, nous avons choisi d'opter pour une approche par encagement d'organismes mâles calibrés issus d'une même population de référence. Cette étude *in situ* concernant 23 sites situés sur le bassin du Rhône est complétée par une expérimentation menée en laboratoire pour évaluer l'influence de deux facteurs abiotiques (température et conductivité) sur les enzymes étudiées. Les résultats de l'expérimentation menée en laboratoire ont déjà été présentés dans le chapitre III- partie 1.2.1.

Les conditions expérimentales nous ont permis de définir une valeur environnementale de référence des activités enzymatiques digestives, et ainsi de discriminer les sites où la qualité de l'eau a impacté la capacité digestive des organismes. Parallèlement, l'inhibition des activités enzymatiques digestives a été comparée à l'inhibition des taux d'alimentation mesurés chez les gammarus exposés. Les résultats obtenus ont souligné la complémentarité des réponses suivies. En conclusion, cette étude a validé l'utilisation des activités enzymatiques digestives de *G. fossarum* en tant qu'outils d'alerte précoce traduisant des perturbations de l'acquisition de l'énergie chez les organismes et reflétant la qualité chimique des écosystèmes aquatiques. Ainsi, nous suggérons l'utilisation des enzymes digestives comme biomarqueurs chez *G. fossarum*.

Article n°4**Effect of water quality and confounding factors on digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum***

Environmental Science and Pollution Research (2013) 20(12): 9044-9056

L. Charron^{1*}, O. Geffard², A. Chaumot², R. Coulaud², H. Queau², A. Geffard¹, O. Dedourge-Geffard¹

¹ Université Reims Champagne Ardenne, EA 4689, Unité Interactions Animal-Environnement (EA 4689), UFR Sciences Exactes et Naturelles, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France.

² Irstea, Lyon, Laboratoire d'écotoxicologie, Unité de Recherche Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions (MAEP), 5 rue de la Doua, CS70077, 69626 Villeurbanne Cedex, France

*Corresponding author: Laetitia Charron

E-mail : laetitia.charron@univ-reims.fr

Tel: + 33 3 26913285.

Abbreviations: IDEA: Inhibition rate of digestive enzyme activity.

Abstract

The feeding activity and subsequent assimilation of the products resulting from food digestion allow organisms to obtain energy for growth, maintenance and reproduction. Among these biological parameters, we studied digestive enzymes (amylase, cellulase and trypsin) in *Gammarus fossarum* to assess the impact of contaminants on their access to energy resources. However, to enable objective assessment of a toxic effect of decreased water quality on an organisms' digestive capacity it is necessary to establish reference values based on its natural variability as a function of changing biotic and abiotic factors. To limit the confounding influence of biotic factors, a caging approach with calibrated male organisms from the same population was used. This study applied an *in situ* deployment at 23 sites of the Rhone basin rivers, complemented by a laboratory experiment assessing the influence of two abiotic factors (temperature and conductivity). The results showed a small effect of conductivity on cellulase activity and a significant effect of temperature on digestive enzyme activity but only at the lowest temperature (7°C). The experimental conditions allowed us to define an environmental reference value for digestive enzyme activities to select sites where the quality of the water impacted the digestive capacity of the organisms. In addition to the feeding rate, this study showed the relevance of digestive enzymes as biomarkers to be used as an early warning tool to reflect organisms' health and the chemical quality of aquatic ecosystems.

Highlights:

Digestive enzyme activities (amylase and trypsin) in *Gammarus fossarum* are sensitive biomonitoring tools that reflect the quality of aquatic ecosystems.

Abiotic factors (temperature and conductivity) have a small influence on the digestive enzyme activities of gammarids.

The caging procedure avoids the potential influence of biotic factors.

Keywords:

Biomarkers, invertebrate, caging, amylase, cellulase, trypsin, temperature, conductivity

1. Introduction

A great diversity of chemical compounds has been introduced into aquatic ecosystems. These contaminants can have toxic effects on the biological components of ecosystems (Chapman 2007; Chapman et al. 2003). One of the challenges of aquatic ecotoxicology is to develop tools and indicators to assess the chemical pollution of aquatic systems as well as to determine or predict the effects or suspected effects on living organisms (Hagger et al. 2006). In this context, multi-level studies are needed to link toxic effects obtained at biochemical and cellular levels with impacts observed on populations and communities. Many biological parameters called biomarkers have been developed to monitor the quality of aquatic systems. However, the responses of these biomarkers can be influenced by a number of confounding factors, and, consequently, their variation may not directly reflect an impact caused by contamination. This requires that the natural variability of these biomarkers to be known and quantified in relation to biotic and abiotic factors so that their levels are reliably interpreted in terms of contamination or toxicity level of aquatic systems (Geffard et al. 2007; Xuereb et al. 2009).

Among freshwater species, crustacean amphipods are often used as sentinel species in aquatic ecotoxicological studies (Coulaud et al. 2011; Dedourge-Geffard et al. 2009; Lacaze et al. 2011) because their sensitivity towards many contaminants is relatively well known (Bundschuh et al. 2011). The genus *Gammarus* has a key role in the food web as common shredders, which play a major role in leaf litter breakdown, and reductions in its feeding activity were directly correlated with reductions in the processing of leaf litter (Forrow and Maltby 2000). Furthermore, in *Gammarus* sp., the ingestion of leaves leads to the assimilation of energy and the production of faecal pellets. Gammarids and their faeces represent a food resource for many aquatic species. In Central and Eastern Europe, *Gammarus fossarum* is widespread and common, and this species has been defined as a very good candidate to study the impact of chemical stressors on processes used to obtain energy and on overall metabolism.

The acquisition of energy for growth, maintenance and reproduction depends on food availability, ingestion and assimilation (De Coen and Janssen 1998). The study of biological responses, including the feeding rate, digestive enzyme activities and energy storage, constitutes a relevant approach for identifying stressed organisms, especially those exposed to contaminants (Coulaud et al. 2011; Dedourge-Geffard et al. 2009; Gismondi et

al. 2012; Sroda and Cossu-Leguille 2011). In the same way, energy metabolism impairments appear to be good predictive markers of disturbances observed at higher biological levels, including reproduction and growth (Hyne and Maher 2003). Consequently, under chemical stress, organisms' energy metabolism could be modified by (i) initiating defence mechanisms and/or (ii) toxic effects on the feeding rate and food digestion. Digestive enzyme activities are therefore an early warning tool that can help assessing changes in energy metabolism. Various studies have shown direct effects of contaminants on digestive enzyme activities (Chen and Mayer 1998; Chen et al. 2002). However, some investigators suggested that polluted waters had decreased the quality of added food, inhibiting food intake, ingestion and assimilation of nutrients (Allen et al. 1995; De Schamphelaere et al. 2007; Meyer et al. 2005). In contrast, Douhry and Sayah (2009) demonstrated that the cells responsible for the synthesis of digestive enzymes suffered a cytotoxic effect from pollution. In addition to a toxic insult, various biotic and abiotic factors can also influence the level of these enzymatic responses (Dedourge-Geffard et al., 2012). Therefore, it is essential to characterise the natural variability of the biological responses studied to enable distinguishing the impact of contaminants from that of environmental factors. Concerning the influence of biotic factors on digestive capacity, some studies have highlighted differences in activities according to the species, gender and life stage (Ibarrola et al. 1998; Kuz'mina 1996; Palais et al. 2012). In crustaceans, Johnston et al. (2005) and Johnston and Freeman (2005) showed differences of digestive enzyme activities (cellulase, laminarinase, β -glucosidase, proteases, α -glucosidase, α -amylase) in six species of crabs and also in three species of amphipods (laminarinase, cellobiase, carboxymethyl-cellulase, xylanase, α and β -glucosidase and lipase). Similarly, Perera et al. (2008) found that ontogenic parameters can influence digestive enzyme activities. Thus, it appears important to understand and take into account how the physiological state (age, sex, reproductive stage) of organisms influences the activity levels of these biomarkers. The influence of biotic factors can be limited by using organisms that are as homogenous as possible (Coulaud et al. 2011; Dedourge-Geffard et al. 2009; Lacaze et al. 2011). Among environmental abiotic factors, previous studies emphasised temperature and conductivity as major confounding parameters (Pöckl 1992; Pöckl et al. 2003; Sornom et al. 2010). Maltby et al. (2002; 1990) and Coulaud et al. (2011) observed that temperature strongly influences the feeding rate in *G. fossarum*, with higher activity in summer than in winter. Consequently, it could be suggested that this parameter modulates digestive enzyme activities as well (Trellu and Ceccaldi 1980b).

The aim of our study was to assess the feasibility and the relevance of various molecular responses related to digestive capacity as potential biomarkers to monitor the quality of aquatic system. The present study focused on three digestive enzymes: (i) amylase, which is responsible for starch hydrolysis, an essential step for shredder feeding; (ii) endocellulase, which breaks the crystallin structure of cellulose into polysaccharide fragments; and (iii) trypsin, a protease found in the digestive system of many vertebrate and invertebrate organisms in which it cleaves peptide chains primarily at the carboxyl side of certain amino acids. We therefore studied the variability of digestive enzyme activities in *G. fossarum* transplanted to several sites with different contamination histories. Active biomonitoring based on the use of selected organisms collected from a control population allowed us to limit the impact of biotic factors (age, gender, size and reproductive state). The potential impact of temperature and conductivity as confounding abiotic factors on the above-described enzyme activities was investigated during laboratory experiments.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and maintenance of transplanted *G. fossarum*

Gammarids were collected by kick sampling at La Tour du Pin, upstream of the Bourbre River (France). This station displayed good water quality according to the data records of the RNB (French Watershed Biomonitoring Network), and a high density of gammarids was found. Sexually mature *G. fossarum* were collected using a handheld net and were sieved (2–2.5 mm). The organisms were kept during a 15-day acclimatisation period in 30-L tanks under constant aeration at $12\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ using a 10/14 h light/dark photoperiod (Besse et al. 2013). They were continuously supplied with drilled groundwater mixed with soft water (obtained by reverse osmosis) at constant conductivity, 200 or 600 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, depending on the conductivity level of the subsequent experimental environment. The organisms were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*) previously conditioned for at least 6 ± 1 days in drilled groundwater. Twice a week, freeze-dried *Tubifex* sp. worms were added as a dietary supplement (Coulaud et al. 2011).

2.2 *In situ* exposure

2.2.1 Description of sites

For this study, 23 stations were selected on rivers in the Rhône-Alpes region, seeking to cover a wide range of physicochemical characteristics and geographical locations (Figure 1). All deployments were implemented during one campaign in June 2010.

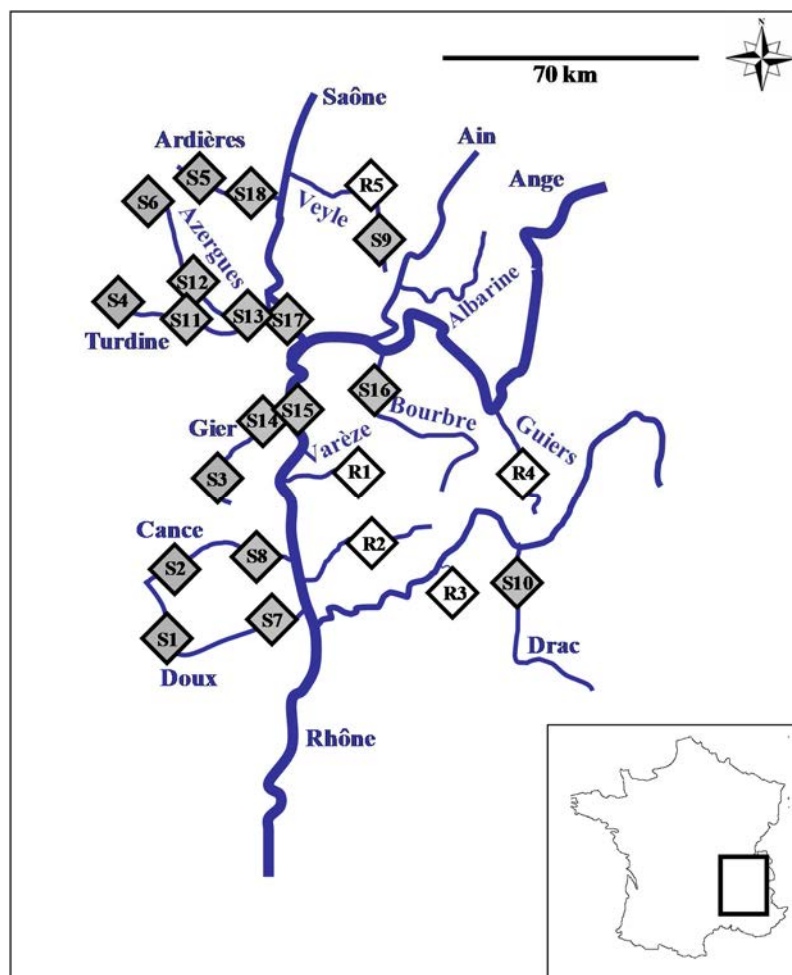


Figure 1: Location of study sites in the Rhône-Alpes region (France). Non-impacted sites are indicated with white squares while impacted sites are indicated in grey. (modified from Coulaud et al. 2011)

The physicochemical parameters of the water (pH, temperature, and conductivity) were analysed by a French accredited chemical analysis laboratory (Laboratoire d'analyses physico-chimiques des milieux aquatiques, IRSTEA, UR Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions). Measured water temperature ranged mainly between 12 and 18°C (with one exception of 20.8°C on site S17), and conductivity fluctuated between 55 and 650 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Table 1). Temperature was continuously measured using the Tinytag temperature logger Aquatic 2 from Gemini Data Loggers (Chichester, UK).

During a previous study that included the same 23 sites that were investigated in the present study, Besse et al. (2013) proposed threshold values of bioaccumulation for five metallic compounds and 30 organic compounds including seven pesticides + DDTs in *G. fossarum* above which the concentration reveals a bioaccumulation of compounds significantly higher than the natural background contamination in this species, tracing thus an anthropogenic source of pollution. Based on the results obtained by Besse et al. (2013), the sites investigated in the present study were organised into two groups according to the number of compounds measured in the caged gammarids with concentrations higher than the threshold values (Table 1). Five sites (R1–R5) were considered as references with concentrations of compounds in caged gammarids less than the threshold values or only slightly higher for only one compound (Pb for R2 and R4; perylene for R5). For the other sites (18 stations, S1–S18), caged gammarid bioaccumulation (Besse et al., 2013) was higher than the threshold values for at least two compounds and maximal for 28 compounds (Table 1). These sites (S1–S18) were considered as impacted by contamination.

Table 1: Detailed information on the 23 stations studied in the Rhône-Alpes region during June 2010 and mortality measured after 15 days of deployment. Typology of contamination was established according to Besse et al. (2013) based on the numbers of molecules accumulated in caged gammarids during this previous study showing a concentration higher than the threshold values (Table 4 in Besse et al. (2013)) (nd= not determined)

Station	GPS coordinates	National grid reference	Deployment number	Water temperature (°C)	pH	Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Number of molecules with concentrations higher to threshold values			Survival percentage of gammarids
							Metals (5)	Pesticides, DDTs (7)	PAHs, PCBs and PBDEs (23)	
River, location										
Vareze, Cour et Buis	04°58' 52.0" E; 45°26' 15.3" N	6820073	R1	14.5	7.8	325	0	0	0	88.1
Galavayson, Saint Clair sur Galaure	05°07' 50.3" E; 45°15' 26.5" N	6104900	R2	14.5	7.8	130	1	0	0	90
Drevenne, Rovon	05°27' 55.5" E; 45°12' 11.6" E	6147220	R3	nd	8.1	315	0	0	0	nd
Guiers Mort, Saint Laurent du Pont	05°45' 17.4" E; 45°21' 42.2" N	6078200	R4	nd	8.3	290	1	0	0	93.7
Veyle, Lent	05°11' 48.4" E; 46°06' 58.7" N	6048570	R5	15.8	7.8	345	0	0	1	86.2
Doux, Labatie d'Andaure	04° 29' 41.5" E; 45° 01' 23.6" N	6105568	S1	13.8	6.4	55	1	0	1	69.3
Cance, Saint Julien Vocance	04°30' 11.9" E; 45°10' 39.5" N	6101905	S2	11.8	6.5	65	2	0	1	74.3
Gier, La Valla en Gier	04°30' 36.4" E; 45°26' 36.3" N	6820138	S3	11.6	6.5	70	2	0	2	60
Boussuivre, Saint Marcel l'Eclairé	04°23' 39.3" E; 45°51' 52.7" E	6580673	S4	13.3	8.2	245	nd	nd	nd	89.3
Ardières, Les Ardillats	04°31' 15.9" E; 46°11' 11.8" N	6051375	S5	13.6	8	105	2	0	1	86.8
Ergues, Poule les Echarmeaux	04°26' 45.5" E; 46°08' 21.2" N	6053830	S6	14.3	7.9	110	1	1	17	90
Doux, Saint Jean de Muzols	04°49' 39.5" E; 45°04' 40.2" N	6106030	S7	18.5	8.2	80	1	0	2	71.2
Cance, Sarras	04°47' 47.6" E; 45°11' 30.9" N	6103500	S8	17.3	7.8	160	3	0	7	74.3
Veyle, Servas	05°10' 31.34" E; 46°07' 37.9" N	6049550	S9	17.7	7.8	330	0	0	5	83.1
Drac, Fontaine	05°42' 04.3" E; 45°11' 36.6" N	6146500	S10	11.9	7.5	240	3	7	11	94.1
Turdine, Arbresle	04°36' 09.1" E; 45°50' 15.5" N	6057200	S11	17.2	7.5	465	1	0	10	85.8
Arzergues, Legny	04°34' 21.4" E; 45°54' 24.6" N	6800009	S12	15.3	7.6	265	1	0	3	87.5
Azergues, Lucenay	04°43' 33.1" E; 45°54' 41.5" N	6057700	S13	18.1	7.6	430	2	1	14	68.7
Gier, Givors	04°45' 42.3" E; 45°35' 15.4" N	6097000	S14	17.5	7.8	240	2	3	23	87.5
Rhône, Givors	04°47' 03.4" E; 45°35' 36.4" E	Na	S15	17.8	8	390	1	1	21	81.8
Bourbre, Pont de Cheruy	05°10' 29.9" E; 45°04' 00.3" N	Na	S16	16.7	7.9	650	1	0	14	91.2
Saône, Ile Barbe	04°49' 57.3" E; 45°47' 49.4" N	6059500	S17	20.8	7.9	490	0	2	2	70.6
Ardières, Saint Jean	04°44' 00.9" E; 46°07' 18.4" N	6051550	S18	16.8	8.1	160	2	3	13	78.7

2.2.2 Caging procedure

The *in situ* assay was performed according to the protocol described previously (Lacaze et al. 2011). Briefly, 24 h before initiating the experiment, four replicates of 20 adult male gammarids were caged in polypropylene cylinders (length, 10 cm; diameter, 5.5 cm) capped at the ends with pieces of net (mesh, 1 mm) to guarantee the free circulation of water. The cylinders were protected by a rigid plastic container. Rocks were placed on the top of protective containers in order to weigh them in the river bed. Adult gammarids with an average body length of 10–11 mm were selected so that mature animals of the same age would be exposed. During the tests, gammarids were fed with the same alder leaves as in the laboratory (*A. glutinosa*). After 15 days of exposure, gammarids and alder leaf discs were collected and carried to the laboratory. Gammarids from the same site were pooled, counted (for survival rate assessment), dried, organised into six pools of three organisms, weighed, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until the digestive enzyme activity was analysed. The remaining pool of gammarids was used in different studies.

2.3 Laboratory exposure

The influence of water temperature and conductivity on digestive enzyme activities was studied by exposing adult male gammarids (10.6 ± 0.7 mm) to three temperatures (7, 12 and 16°C) and three conductivity levels (200, 500 and $800 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). These levels corresponded to the range of physicochemical characteristics usually encountered in streams in the Rhône-Alpes region. Twenty-four hours before initiating the experiment, the gammarids were placed in each water temperature and conductivity treatment (Coulaud et al. 2011). Three replicates of three organisms each were analysed for each of the nine conditions.

During this experiment, conductivity, temperature, pH and dissolved oxygen were monitored daily. We used a flow-through system which consisted of 0.5-L glass beakers filled with continuously renewed water (four renewals per day), a continuous pumping system, and a 10/14 h light/dark photoperiod. In each beaker, gammarids were fed with 20 alder leaves. After 20 days of exposure, gammarids were counted (for survival rate assessment), dried on paper, weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until biochemical analyses.

2.4. Analysis of digestive enzyme activities

Samples were homogenised in Tris-HCl buffer (0.01 M, pH 7) for 2 min using a mixer mill (Retsch) with a frequency of 30 Hz. The homogenate was centrifuged at 10,000xg for 10 min at 4°C. The supernatant was stored at -80°C until enzyme activity analysis.

The cellulase and amylase activities were measured according to the protocol adapted from Palais et al. (2010) with the artificial substrates carboxymethyl-cellulose (2%) and starch (1%), respectively. Trypsin activity was determined according to the protocol described by Garcia-Carreño and Haard (1993), using N-benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA, 3 mM) as the substrate. Enzyme activities were expressed in micrograms of the final product released per minute and per milligram of protein. The protein content in the supernatant was determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as the protein standard.

2.5. Statistics

Statistical analyses were performed with R software (R Development Core Team 2008). For *in situ* experiments, the normality and homogeneity of data variance for digestive activities in the reference stations were first checked using the Shapiro-Wilk test and the Levene test, respectively. Then, following the methodology reported in Coulaud et al. (2011), a reference distribution of *in situ* activity levels based on the measurements in selected reference stations was built with the Mass R-package to compute *p*-values associated with the mean activities measured at the different stations of the study and test their conformity to this reference distribution. Homoscedasticity of measurements between sites occurred for the three enzymes even both under reference and contaminated conditions. Thus, conformity to the reference distribution was checked by comparing the mean value of the measurements obtained at a site against the confidence threshold defined for a mean of the same number of replicates.

For laboratory experiments, the normality and homogeneity of data variance for digestive activities were evaluated using the Shapiro-Wilk test and the Levene test, respectively. To determine the temperature and conductivity effects on digestive enzyme activities, an analysis of variance (ANOVA) was chosen. Then, Tukey's HSD post hoc test was used to identify differences between groups of exposed *G. fossarum*. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Large-scale *in situ* caging study

During the 2 weeks of caging, water temperature and conductivity ranged between 11.6°C and 20.8°C and between 55 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ and 650 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectively (Table 1).

The survival percentages of caged gammarids (Table 1) ranged between 86.2% and 93.7% for the reference sites (R1–R5) and between 60% and 94.1% for suspected contaminated stations (S1–S18).

For the three enzymes, ANOVA tests showed that no significant differences existed in the levels of enzymatic activities among the five reference stations (Figure 2). Therefore, all replicate measurements were pooled to fit a normal distribution, defining by this means the variability of values expected under reference conditions and allowing for testing of deviations from this range in the measurements obtained for a given station.

The mean amylase activity (Figure 2A) in gammarids in the reference group (R1–R5 sites) was 827 (\pm 138) μg maltose/mg BSA/min. With a p -value set at 0.01, only stations with a mean value below 696 μg maltose/mg BSA/min were considered to have significantly lower activity levels than the reference group. The threshold of $p < 0.01$ was selected because the variability within reference measurements, combined with the number of replicates, led to a p -value lower than 0.05 for the reference station R5. We therefore decided to be more conservative with the risk of decreasing our ability to detect significant inhibitions in contaminated stations. Nevertheless we calculate that for six replicates, an inhibition beyond only 16% will be detected as significant. With this constraint, at seven sites (S1, S2, S3, S4, S5, S6 and S9), the gammarids had an average amylase activity that was not significantly different from gammarids exposed to the reference sites. On the contrary, gammarids exposed to the 11 other sites (S7, S8, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17 and S18) presented a significant inhibition of amylase activity when compared with the reference group.

Cellulase activity (Figure 2B) of gammarids at the reference stations showed a mean value of 58.6 (\pm 4.72) μg maltose/mg BSA/min. With a p -value set at 0.01, cellulase activity was considered as inhibited for values below 54.1 μg maltose/mg BSA/min. Under this condition, only station S7 showed a significant inhibition (8%).

Finally, for trypsin activity (Figure 2C), the reference mean value was $7 (\pm 1.88)$ $\mu\text{g p-Na/mg BSA/min}$ (p-Na corresponding to p-nitroaniline, the product of the reaction). With a *p*-value set at 0.01, trypsin activity could be considered significantly inhibited for values below $5.23 \mu\text{g p-Na/mg BSA/min}$ (corresponding to $\geq 25\%$ inhibition). Under these conditions, gammarids exposed at nine sites (S4, S7, S10, S11, S12, S14, S15, S16 and S18) showed a significant decrease in the activity of this enzyme. An inhibition of trypsin activity of 25% or more compared to the reference group was significant; this high value, compared to those of the other enzyme activities, was related to the high variability of this enzyme activity in control gammarids.

The amylase/trypsin (A/T) ratio reflects a potential change in the relative proportion of protein or carbohydrate in the animal's diet. Under the conditions tested here, except for S8, the A/T ratio was constant for all sites considered (not shown). This is in accord with the standardisation of food given to the gammarids during the different experiments.

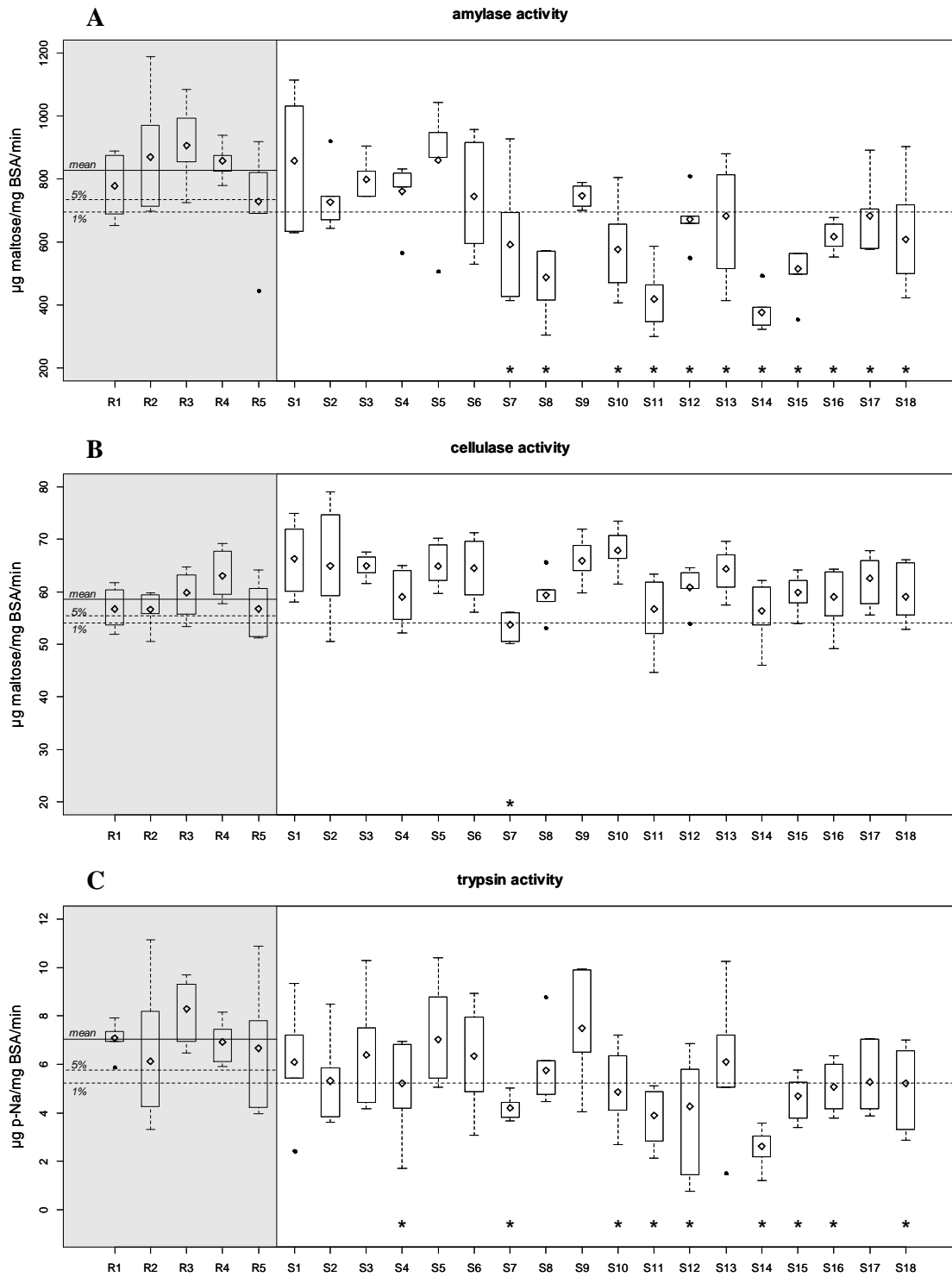


Figure 2: Digestive enzyme activities of amylase (A), cellulase (B) and trypsin (C) for all sites studied (in grey areas: reference stations; in white areas: compared stations). Each boxplot represents a deployment (diamond: site mean, squares: interquartile, black dot: outlier, segments: range). The solid and dotted lines represent the mean and the first species risk at 1% evaluated within reference stations. Deployments with a significant deviation of enzyme activity values from the reference distribution are marked with stars

For an easier comparison of the data (digestive enzyme inhibition) with the results of feeding rate inhibition (FI) obtained by Coulaud et al. (2011) during the same campaign (June 2010), an inhibition rate of digestive enzyme activities (IDEA) was calculated for each deployment and for each digestive enzyme using the following equation (Table 2):

$$IDEA = \frac{(DEA_{ref} - DEA_{site})}{DEA_{ref}} \times 100$$

Table 2 : Values of the inhibition rate of digestive enzyme activities (IDEA, see calculation in the text) in organisms exposed to the 18 impacted sites (S1–S18). Bold values correspond to sites showing a digestive enzyme activity or a feeding rate significantly different (99% level) from the reference value calculated with the reference sites (R1–R5) (see Figure 2). For the feeding rate inhibition (FI), refer to Coulaud et al. (2011)

Site	IDEA (<i>Inhibition of Digestive Enzyme Activity</i>)			FI (<i>Feeding Inhibition corrected</i>)
	Amylase	Cellulase	Trypsin	
S1	-3.64	-13.17	13.00	33.53
S2	12.17	-10.79	24.00	73.27
S3	3.46	-10.85	8.69	76.09
S4	7.98	-0.70	25.41	-3.37
S5	-3.93	-10.71	-0.26	24.20
S6	9.99	-10.05	9.34	25.99
S7	28.52	8.39	39.98	36.95
S8	41.04	-1.31	17.77	48.00
S9	9.74	-12.51	-7.16	24.75
S10	30.32	-15.87	30.35	79.34
S11	49.42	3.20	44.46	54.70
S12	18.70	-3.81	38.98	17.30
S13	17.49	-9.74	12.62	-6.62
S14	54.41	3.85	62.46	95.44
S15	37.73	-2.27	32.98	3.48
S16	25.43	-0.76	27.44	14.20
S17	17.37	-6.81	24.71	-36.37
S18	26.49	-0.82	25.47	39.25

where DE_{Aref} is the mean digestive enzyme activity in gammarids exposed to reference sites (R1 to R5) and DE_{A_{site}} is the mean digestive enzyme activity in gammarids exposed to each suspected contaminated stations (S1 to S18). Inhibition of digestive enzyme activities was observed for amylase and trypsin but not for cellulase (except for site S7; Figure 2). Concerning amylase and trypsin, in organisms exposed to the suspected contaminated stations (S1 to S18), the lowest enzyme activity inhibition was approximately 20%. However, these activity inhibitions reached 54%.and 62% for amylase and trypsin, respectively, at site S14. Of the 12 sites presenting an inhibition of activity for at least one enzyme, eight sites were similar for amylase and trypsin.

3.2. Laboratory experiment: influence of water conductivity and temperature on enzyme activities

Amylase activity was not significantly influenced by water conductivity ($p > 0.05$, data not shown). So to define the effect of temperature on enzyme activities, gammarid samples from all water conductivity conditions tested (200, 500 and 800 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) were pooled. No effect of conductivity was observed on enzymes activities, consequently, in order to test the effect of temperature on enzymes activities, for each temperature, we used the mean of values obtained for all conductivity conditions. Significantly lower amylase activity was recorded in gammarids maintained at 7°C compared to those maintained at 12°C or 16°C, ($p=0.013$ for 12°C and $p=0.029$ for 16°C) (Figure 3). However, no significant variation of amylase activity was detected between gammarids exposed at 12°C or 16°C. At 7°C, the level of enzyme activities was reduced by 21% compared to the level observed for 12°C and 16°C.

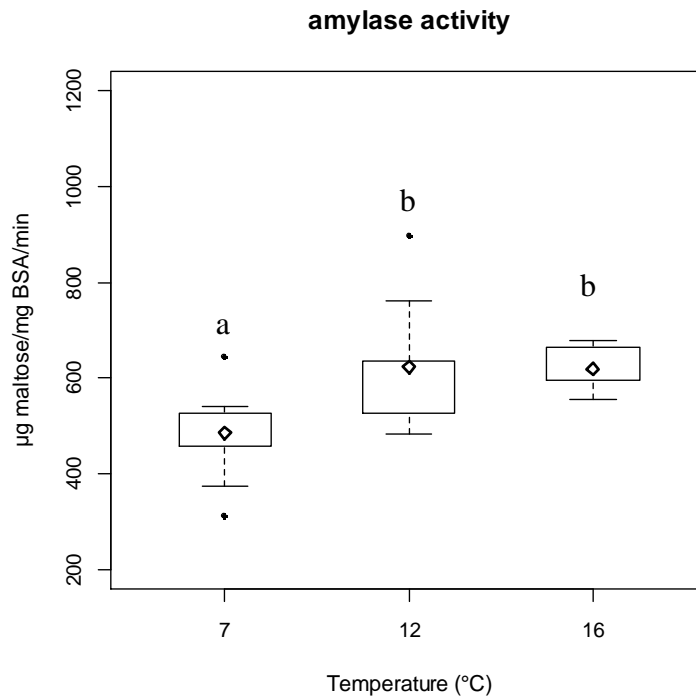


Figure 3: Amylase activity measured in male gammarids exposed to three temperatures (7, 12 and 16°C). Diamond: mean for each condition, $n=9$; squares: interquartile, black dot: outlier, segments: range. Boxplots with the same letter are not statistically different at 95% level

For cellulase activity, ANOVA analysis indicated a strong temperature effect ($p<0.001$) and a weak conductivity effect ($p<0.05$) with no significant interactions (Figure 4). For each conductivity tested, significantly lower cellulase activities were observed at 7°C than at 12 and 16°C (Tukey post hoc test; $p<0.0001$) except in the case of 500 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ at 12°C. In addition, cellulase activity significantly increased ($p<0.05$) with conductivity but only for gammarids exposed at 7°C (Figure 4).

For trypsin activity, no significant differences were observed regardless of the temperature or conductivity tested (data not shown).

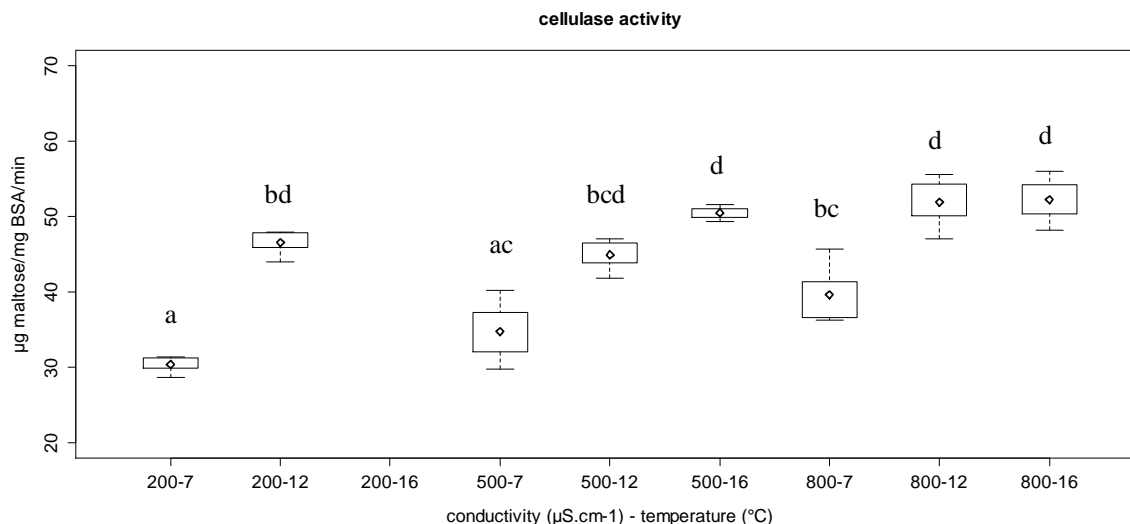


Figure 4: Cellulase activity measured in male gammarids exposed to three temperatures (7, 12 and 16°C) and conductivity (200, 500 and 800 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Diamond: mean for each condition, $n=3$; squares: interquartile, segments: range. Boxplots with same letter are not statistically different at 95% level (samples for 200-16 were lost)

4. Discussion

4.1. Digestive enzymes in gammarids

According to MacNeil et al. (1997), *Gammarus* spp. may be mainly shredders in one habitat in one season, collector-gatherers in the same habitat in a different season, mainly predators in a third ecosystem and generalist-detritivores in other habitats. Consequently, gammarids could have a large digestive enzymatic package composed of carbohydrases and proteases to digest these different food sources. However, to our knowledge, few studies have focused on the digestive enzyme activities in *Gammarus* sp. Amylase activity has been found in *Gammarus palustris* (Borowsky and Guarna 1989; Guarna and Borowsky 1995). Similarly, endoglucanases and β -glucosidases have been detected in *Gammarus lacustris* (McGrath and Matthews 2000) and in *Gammarus pulex* (Chamier and Willoughby 1986). Bärlocher and Porter (1986) have also demonstrated the presence of other cellulase activities such as β -galactosidase and β -glucosidase in *Gammarus tigrinus*. Dedourge-Geffard et al. (2009) have shown the presence of five digestive enzyme activities, namely amylase, endoglucanase, β -glucosidase, esterase and β -galactosidase in *G. fossarum*. In accordance with previous studies (Borowsky and Guarna 1989; Dedourge-Geffard et al. 2009), the highest activities observed were for amylase. At the reference stations, amylase activity was 14 and 118 times higher than those measured for cellulase and trypsin, respectively. The activities of digestive enzymes observed during the present

study were similar to those obtained in previous *in situ* studies with *G. fossarum* (Dedourge-Geffard et al. 2009). Amylase and cellulase activities in reference gammarids were 685 (± 153) and 64 (± 12) μg maltose/mg BSA/min, respectively, and 6 (± 1) μg p-Na/mg BSA/min for trypsin.

Many studies have supported the assumption that enzyme activities are indicative of the most common substrates in the diet. According to Johnston and Freeman (2005), digestive enzyme activities are effective tools for identifying particular components of an animal's diet. Thus, a high proteolytic activity reflects a diet rich in protein, and a high carbohydrase activity reflects a diet rich in starch or cellulose. Our results are in accord with a shredder behaviour of gammarids but are also explained mainly by the feeding conditions applied in these experiments, in which only alder leaves were supplied to the organisms as food.

4.2. Digestive enzyme activities in *G. fossarum* as field biomarkers

4.2.1 Influence of abiotic factors on digestive enzyme activities and definition of *in situ* reference values

A toxic effect on digestive enzyme activities could suggest a decrease in the animal's energy access. As a result, digestive enzymes could be interesting biomarkers in animal organisms (De Coen and Janssen 1997a; b). However, to use digestive enzyme activities for assessing water quality it is necessary to distinguish the impact of environmental factors other than chemical stressors on these responses or to avoid these factors, depending on the methodology applied. In fact, several biotic (reproduction status, phase of life cycle, food quantity) and abiotic factors are known to modulate digestive enzyme activities (Albentosa and Moyano 2008; Ibarrola et al. 2000; Palais et al. 2012; Sanchez-Paz et al. 2006).

The variability of digestive enzyme activities observed for the reference sites was low. These results could be related to our experimental design (transplantation of standard organisms and food). They also showed a low impact of abiotic factors, in particular conductivity, on these digestive enzyme activities. So the mean digestive enzyme activities measured in organisms exposed to these five control sites could be proposed as reference values for our field study (827 \pm 138 μg maltose/mg BSA/min for amylase, 58.6 \pm 4.72 μg maltose/mg BSA/min for cellulase and 7 \pm 1.9 μg p-Na/mg BSA/min for trypsin; see Figure 2). In our experimental conditions, threshold values below which the digestive capacity of

an organism is significantly impacted could be proposed (696 μg maltose/mg BSA/min for amylase, 54.1 μg maltose/mg BSA/min for cellulase and 5.23 μg p-Na/mg.BSA/min for trypsin; see Figure 2).

4.2.2 Responses of digestive enzyme activities to water quality

Among the organisms exposed to the 18 suspected contaminated sites, several gammarid groups showed significant changes in amylase and trypsin activities, particularly at sites S7–S18. These changes corresponded to a decrease in enzyme activities that could represent, in comparison to the reference values defined above, a 10–60% inhibition of activity (IDEA) (Table 2). These inhibitions could potentially have severe consequences for the digestive capacity and energy access of organisms, particularly in the case of amylase for shredder behaviour organisms such as gammarids. Similar patterns were observed for amylase and trypsin activities for all sites studied, whereas no effect on cellulase activity was shown. Many studies have reported an effect on digestive enzyme activities in vertebrate and invertebrate species related to a contamination source (Barfield et al. 2001; Chen et al. 2002; De Coen and Janssen 1997b; Essedaoui et al. 1998; Le Bihan et al. 2004; Li et al. 2008; Mukherjee and Bhattacharya 1977; Reddy and Fingerman 1994; Yan et al. 1996). Under lab condition experiments, in crustaceans, digestive enzyme activities were usually downregulated under contaminated conditions (De Coen and Janssen 1998; De Coen et al. 1998; Lebrun et al. 2012). Under *in situ* studies, similar results were observed in gammarids. Dedourge-Geffard et al. (2009) have observed inhibitions of digestive enzyme activities linked with very high levels of heavy metal contamination related to mine activities and severe toxic effect (mortality) after 2 weeks of exposure. In the present study, the range of contaminants was greater, including pesticides and organic contaminants. In fact, bioaccumulation of organic compounds, (i.e., S7 for pesticides +DDs and S14, S15 for HAPs+PCBs; Besse et al. (2013) and Table 1), was observed at several sites. Complementary to the previous *in situ* studies investigating the effects of metals, the present study suggested that two types of enzymes (carbohydrases and proteases) were promise tools for identifying contaminated sites. However, further calibration studies are needed in support of using digestive enzymes in biomonitoring programs.

4.3. Variability of digestive enzyme activities in *G. fossarum* under laboratory conditions

During field experiments, differences in abiotic parameter ranges were observed between the reference (temperature, 14.5–15.8°C; conductivity, 130–345 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) and impacted sites (temperature, 11.6–20.8°C; conductivity, 55–650 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). We therefore conducted a laboratory experiment to test a wider range of temperature and conductivity on the digestive enzyme activities under controlled conditions in support of field observations and the discussion of potentially impacted sites. The results showed a small effect of conductivity on digestive enzyme activities (only on cellulase at a low temperature) and a significant effect of temperature (only at the lowest temperature; 7°C) for both enzymes. These results indicate that conductivity is not a key parameter influencing digestive enzyme activities recorded during the short-term bioassays with *G. fossarum* described here. In our experiments, the temperatures measured were all above 11.5°C. Nevertheless, for further experiments in other seasons (autumn or winter), temperature should be taken into account for a reliable interpretation of field data, especially for cold systems with temperatures lower than 12°C. For these two abiotic parameters, similar patterns were observed for the feeding rate in *G. fossarum* (Coulaud et al. 2011). These results confirmed the low variability of enzyme activities in organisms from the five reference sites, which had similar temperatures (14.5–15.8°C). In the same way, given that there was no temperature effect on the enzyme activities at the highest temperatures tested in the laboratory experiment (12 and 16°C), these additional results supported the hypothesis that the IDEA observed on several impacted sites was principally related to the water quality.

Differences in digestive enzyme activities were observed between organisms from reference sites during the *in situ* experiments and organisms maintained in the laboratory with a similar temperature (reference sites, 14.5–15.8°C; laboratory, 12–16°C). In fact, amylase, trypsin and cellulase activities, respectively, averaged 25%, 34% and 15.5% lower in laboratory experiments than in the *in situ* study. Several hypotheses could explain these results. The symbiotic microorganisms present in the digestive apparatus of gammarids could differ between the *in situ* and laboratory conditions. In fact, many studies have considered these interactions in the gammarids' digestive process (Chamier and Willoughby 1986; Monk 1977). Among natural factors, seasonal variability could influence energy metabolism. Many studies have already shown a seasonal impact on biomarkers including digestive enzymes (Geffard et al. 2007; Palais et al. 2012; Sroda and

Cossu-Leguille 2011). In this case, the field study was conducted in June, whereas the laboratory assay was carried out in July, in the same season of the year. Concerning seasonal effects, important parameters were generally linked to temperature or reproductive process (Palais et al., 2012; Geffard et al., 2007). In our conditions, temperatures between experiments were similar (reference sites 14.5-15.8°C; lab 12-16°C). Besides, all organisms were male, avoiding effect of reproduction, important in female. In fact, in the field experiments, the gammarids were caged in polypropylene cylinders away from sunlight, whereas organisms exposed in the laboratory experiments were exposed to a day/night cycle (10 h light and 14 h dark). Thus in our case, the variations observed between laboratory and field measurements were most likely dependent on light intensity. In this way, some studies have focused on variations of digestive enzyme activity in crustacean species (Van Wormhoudt 1977), and some have mentioned the influence of a circadian rhythm (Galgani et al. 1983; Trelu and Ceccaldi 1980a; Van Wormhoudt and Malcoste 1976). Van Wormouth (1977) noted a peak of amylase activity at approximately 21 h (during the dark exposure) for organisms exposed to a day/night cycle. So we can hypothesize that, in our *in situ* condition, an activation of digestive enzyme activities occurs such as it could happened during the night in organisms exposed to light/dark cycle.

The results of the laboratory experiment suggested that further studies are needed to detail the potential effect of several environmental factors such as light on the digestive capacity of *G. fossarum*. These results also showed the need to have reference values for the biological responses under environmental conditions (the *in situ* experiment), to allow comparisons with organisms transplanted to different sites and to assess whether the exposure to a contamination environment induced a toxic effect. In view of using digestive enzyme activities as biomarkers on a very large geographical scale or for several seasons, it seems necessary to assess the range of reference values for these digestive enzymes at more reference sites covering a wider range of temperatures.

4.4. Digestive enzyme activities versus individual parameters: feeding rate and mortality

The acquisition of energy is dependent on food availability and two intrinsic organism parameters: feeding rate and digestive capacity. The sensitivity of the feeding rate to chemical stress is well established in gammarids (Coulaud et al. 2011; Maltby et al. 2002). For digestive capacities, fewer data are available, but the present study underlines the

influence of contaminant bioaccumulation on this parameter in *G. fossarum*, in an *in situ* experiment, and indicates the relevance of these responses. During this *in situ* experiment, Coulaud et al. (2011) measured the feeding rate of the same organisms so we could legitimately consider the comparison between these two biomarkers and relate the feeding behaviour to the digestive process expressed as IDEA (Table 2). At the nine studied sites where the feeding rate was inhibited, seven also showed an inhibition of at least one digestive enzyme (amylase and/or trypsin). The inhibition of the feeding rate was more pronounced than the inhibition of the digestive enzyme activities, with the percentage inhibition being greater than 50% for five of the nine sites impacted. In some cases, the feeding rate was the only impacted response (i.e., S2, S3), which could suggest an effect of water quality on the palatability of leaves but not on the organism's physiology. These results underlined the importance of a multi-marker approach including feeding rate and digestive enzyme activity.

In previous studies on digestive enzymes in gammarids (Dedourge-Geffard et al. 2009), we investigated four sites in a river basin known to be highly contaminated by heavy metals originating primarily from acid mine drainage. A strong inhibition of digestive enzyme activities was observed at the most impacted sites in association with high mortality after 7 or 14 days of caging (Dedourge-Geffard et al. 2009). In the present study, based on a larger geographical scale and considering several contamination sources, the highest sensitivity of digestive enzyme responses compared with mortality confirmed the relevance of these measurements to assessing the effect of water quality on the digestive capacity of *G. fossarum*.

5. Conclusions

The transplantation of gammarids for 15 days on 23 multi-contaminated stations with a wide range of contamination sources showed the usefulness of the inhibition of digestive enzyme activities (amylase and trypsin) as a sensitive tool to suggest an organism exposure to contaminant. The accuracy and suitability of enzyme activities is related to the active biomonitoring approach. The caging process avoids the potential influence of biotic factors (population, size, sex, etc.) and helps to distinguish the variability in biological responses related to the water quality. However, abiotic environmental factors might influence the data and bias the interpretations. The laboratory bioassay highlighted the small effect of abiotic confounding factors (temperature and conductivity) on digestive enzyme activities.

However, some environmental parameters such as rainfall, water flow, suspended matter and light conditions need to be investigated to specify their effects on digestive enzyme activities. The investigation of the inhibition of digestive enzyme activities was complementary to the study of feeding rate responses for monitoring the impact of xenobiotics on energy acquisition in organisms. These results suggest a possible disturbance of the energy purchase for gammarids. It will be advantageous to define whether this disturbance impacts energy reserves and/or different fitness parameters, including growth and reproduction.

Acknowledgements

This research program was financially supported by the ANR CESA program GAMMA 021 02 “Variability-adaptation-diversity and ecotoxicology in gammarids” (2012-2015), and the PIREN-Seine Program. The authors sincerely thank the Elsevier site for the English revision.

References

- Albentosa M, Moyano FJ (2008) Influence of nutritional stress on digestive enzyme activities in juveniles of two marine clam species, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*. *J. Sea Res.* 59:249-258
- Allen Y, Calow P, Baird DJ (1995) A mechanistic model of contaminant induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14:1625-1630
- Barfield ML, Farris JL, Black MC (2001) Biomarker and bioaccumulation responses of asian clams exposed to aqueous cadmium. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 63:495-510
- Bärlocher F, Porter CW (1986) Digestive Enzymes and Feeding Strategies of Three Stream Invertebrates. *J. North. Am. Benthol. Soc.* 5:58-66
- Besse JP, Coquery M, Lopes C, Chaumot A, Budzinski H, Labadie P, Geffard O (2013) Caged *Gammarus fossarum* (crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters. Toward the determination of threshold values. *Water Res.* 47:650-660
- Borowsky R, Guarna MM (1989) Excess amylase in *Gammarus palustris* (Crustacea: Amphipoda); its release into and possible roles in the environment. *Mar. Biol. (Berl.)* 101:529-534
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Bundschuh M, Zubrod JP, Schulz R (2011) The functional and physiological status of *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda) exposed to secondary treated wastewater. *Environ. Pollut.* 159:244-249
- Chamier A-C, Willoughby LG (1986) The role of fungi in the diet of the amphipod *Gammarus pulex* (L.): an enzymatic study. *Freshw. Biol.* 16:197-208
- Chapman PM (2007) Determining when contamination is pollution - Weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environ. Int.* 33:492-501
- Chapman PM, Wang F, Janssen CR, Goulet RR, Kamunde CN (2003) Conducting Ecological Risk Assessments of Inorganic Metals and Metalloids: Current Status. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 9:641-697
- Chen Z, Mayer LM (1998) Digestive proteases of the lugworm (*Arenicola marina*) inhibited by Cu from contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 17:433-438
- Chen Z, Mayer LM, Weston DP, Bock MJ, Jumars PA (2002) Inhibition of digestive enzyme activities by copper in the guts of various marine benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:1243-1248
- Coulaud R, Geffard O, Xuereb B, Lacaze E, Quéau H, Garric J, Charles S, Chaumot A (2011) *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Res.* 45:6417-6429
- De Coen WM, Janssen CR (1997a) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. II. Digestive enzyme activity in *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of cadmium, chromium and mercury. *Chemosphere* 35:1053-1067
- De Coen WM, Janssen CR (1997b) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.* 6:43-55
- De Coen WM, Janssen CR (1998) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. I. The digestive physiology of daphnids exposed to toxic stress. *Hydrobiologia* 367:199-209

- De Coen WM, Vangheluwe ML, Janssen CR (1998) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. III. Rapid toxicity testing of pure chemicals and sediment pore waters using ingestion and digestive enzyme activity. *Chemosphere* 37:2677-2694
- De Schamphelaere KAC, Forrez I, Dierckens K, Sorgeloos P, Janssen CR (2007) Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 81:409-418
- Dedourge-Geffard O, Palais F, Biagianti-Risbourg S, Geffard O, Geffard A (2009) Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An *in situ* experiment. *Chemosphere* 77:1569-1576
- Dedourge-Geffard O, Palais F, Geffard A, Amiard-Triquet C (2012) Origin of Energy Metabolism Impairments. In : Ecological Biomarkers – Indicators of Ecotoxicological Effects. Amiard-Triquet C, Amiard JC, & Rainbow P, eds, CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, pp 279-306
- Douhri H, Sayah F (2009) The use of enzymatic biomarkers in two marine invertebrates *Nereis diversicolor* and *Patella vulgata* for the biomonitoring of Tangier's bay (Morocco). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72:394-399
- Essedaoui A, Sif J, Kerambrun P (1998) Effet du cadmium sur l'activité de l' α -amylase chez *Mytilus galloprovincialis* : Effect of cadmium on α -amylase activity in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine life* 8:51-61
- Forrow DM, Maltby L (2000) Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environ. Toxicol. Chem.* 19:2100-2106
- Galgani F, Benyamin Y, Van Worhmoedt A, Cecaldi J (1983) Variations des activités digestives en fonction des facteurs du milieu chez les crustacés. *Bases biologiques de l'aquaculture* 1:277-292
- Garcia-Carreño FL, Haard NF (1993) Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus Planipes*) extracts. *J. Food Biochem.* 17:97-113
- Geffard A, Quéau H, Dedourge O, Biagianti-Risbourg S, Geffard O (2007) Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 145:632-640
- Gismondi E, Beisel J-N, Cossu-Leguille C (2012) Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. *Environ. Res.* 118:47-52
- Guarna MM, Borowsky RL (1995) Biochemical properties of amylase isozymes from *Gammarus palustris*. A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 112:619-628
- Hagger JA, Jones MB, Leonard DRP, Owen R, Galloway TS (2006) Biomarkers and integrated environmental risk assessment: Are there more questions than answers? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2:312-329
- Hyne RV, Maher WA (2003) Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54:366-374
- Ibarrola I, Etxeberria M, Iglesias JIP, Urrutia MB, Angulo E (2000) Acute and acclimated digestive responses of the cockle *Cerastoderma edule* (L.) to changes in the food quality and quantity: II. Enzymatic, cellular and tissular responses of the digestive gland. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 252:199-219

- Ibarrola I, Larretxea X, Iglesias JIP, Urrutia MB, Navarro E (1998) Seasonal variation of digestive enzyme activities in the digestive gland and the crystalline style of the common cockle *Cerastoderma edule*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 121:25-34
- Johnston D, Freeman J (2005) Dietary Preference and Digestive Enzyme Activities as Indicators of Trophic Resource Utilization by Six Species of Crab. *Biol. Bull.* 208:36-46
- Johnston M, Johnston D, Richardson A (2005) Digestive capabilities reflect the major food sources in three species of talitrid amphipods. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 140:251-257
- Kuz'mina VV (1996) Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture* 148:25-37
- Lacaze E, Devaux A, Mons R, Bony S, Garric J, Geffard A, Geffard O (2011) DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environ. Pollut.* 159:1682-1691
- Le Bihan E, Perrin A, Koueta N (2004) Development of a bioassay from isolated digestive gland cells of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda): effect of Cu, Zn and Ag on enzyme activities and cell viability. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 309:47-66
- Lebrun J, Perret M, Geffard A, Gourlay-Francé C (2012) Modelling copper bioaccumulation in *Gammarus pulex* and alterations of digestive metabolism. *Ecotoxicology* 21:2022-2030
- Li N, Zhao Y, Yang J (2008) Effects of Water-Borne Copper on Digestive and Metabolic Enzymes of the Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55:86-93
- Macneil C, Dick JTA, Elwood RW (1997) The Trophic ecology of freshwater gammarus spp. (crustacea: amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biol. Rev.* 72:349-364
- Maltby L, Naylor C, Calow P (1990) Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 19:292-300
- Maltby L, Clayton SA, Wood RM, McLoughlin N (2002) Evaluation of the *Gammarus pulex in situ* feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:361-368
- McGrath CC, Matthews RA (2000) Cellulase Activity in the Freshwater Amphipod *Gammarus lacustris*. *J. North. Am. Benthol. Soc.* 19:298-307
- Meyer JS, Adams WJ, Brix KV, Luoma SN, Mount DR, Stubblefield WA, Wood CM (2005) Toxicity of Dietborne Metals to Aquatic Organisms, SETAC, Pensacola,FI, USA
- Monk DC (1977) The digestion of cellulose and other dietary components, and pH of the gut in the amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Freshw. Biol.* 7:431-440
- Mukherjee S, Bhattacharya S (1977) Variations in the hepatopancreatic α -amylase activity in fishes exposed to some industrial pollutants. *Water Res.* 11:71-74
- Palais F, Dedourge-Geffard O, Beaudon A, Pain-Devin S, Trapp J, Geffard O, Noury P, Gourlay-Francé C, Uher E, Mouneyrac C, Biagianti-Risbourg S, Geffard A (2012) One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Ecotoxicology* 21:888-905
- Palais F, Jubeaux G, Dedourge-Geffard O, Giambérini L, Biagianti-Risbourg S, Geffard A (2010) Amylolytic and cellulolytic activities in the crystalline style and the digestive diverticulae of the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas,1771). *Molluscan Res.* 30:29-36

- Perera E, Moyano FJ, Diaz M, Perdomo-Morales R, Montero-Alejo V, Rodriguez-Viera L, Alonso E, Carrillo O, Galich GS (2008) Changes in digestive enzymes through developmental and molt stages in the spiny lobster, *Panulirus argus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 151:250-256
- Pöckl M (1992) Effects of temperature, age and body size on moulting and growth in the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. *Freshw. Biol.* 27:211-225
- Pöckl M, Webb BW, Sutcliffe DW (2003) Life history and reproductive capacity of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda) under naturally fluctuating water temperatures: a simulation study. *Freshw. Biol.* 48:53-66
- R Development Core Team (2008) R: a Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing
- Reddy PS, Fingerman M (1994) Effect of cadmium chloride on amylase activity in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 109:309-314
- Sanchez-Paz A, García-Carreño F, Muhlia-Almazan A, Peregrino-Uriarte AB, Hernandez-Lopez J, Yepiz-Plascencia G (2006) Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: Status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36:241-249
- Sornom P, Felten V, Médoc V, Sroda S, Rousselle P, Beisel J-N (2010) Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environ. Pollut.* 158:1288-1295
- Sroda S, Cossu-Leguille C (2011) Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere* 83:538-544
- Trellu J, Ceccaldi HJ (1980a) Influence de l'intensité lumineuse sur quelques activités enzymatiques chez *Palaemon serratus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 8:181-191
- Trellu J, Ceccaldi HJ (1980b) Influence de la température sur quelques activités enzymatiques chez *Palaemon serratus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 8:171-179
- Van Wormhoudt A (1977) Activités enzymatiques digestives chez *Palaemon serratus*: Variations annuelles de l'acrophase des rythmes circadiens. *Biochem. Syst. Ecol.* 5:301-307
- Van Wormhoudt A, Malcoste R (1976) Influence d'éclairements brefs, à différentes longueurs d'onde, sur les variations circadiennes des activités enzymatiques digestives chez *Palaemon serratus* (Crustacea, Natantia). *J. Interdisciplinary Cycle Res.* 7:101-111
- Xuereb B, Chaumot A, Mons R, Garric J, Geffard O (2009) Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquat. Toxicol.* 93:225-233
- Yan T, Teo LH, Sin YM (1996) Effects of Metals on α -Amylase Activity in the Digestive Gland of the Green Mussel, *Perna viridis* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56:677-682

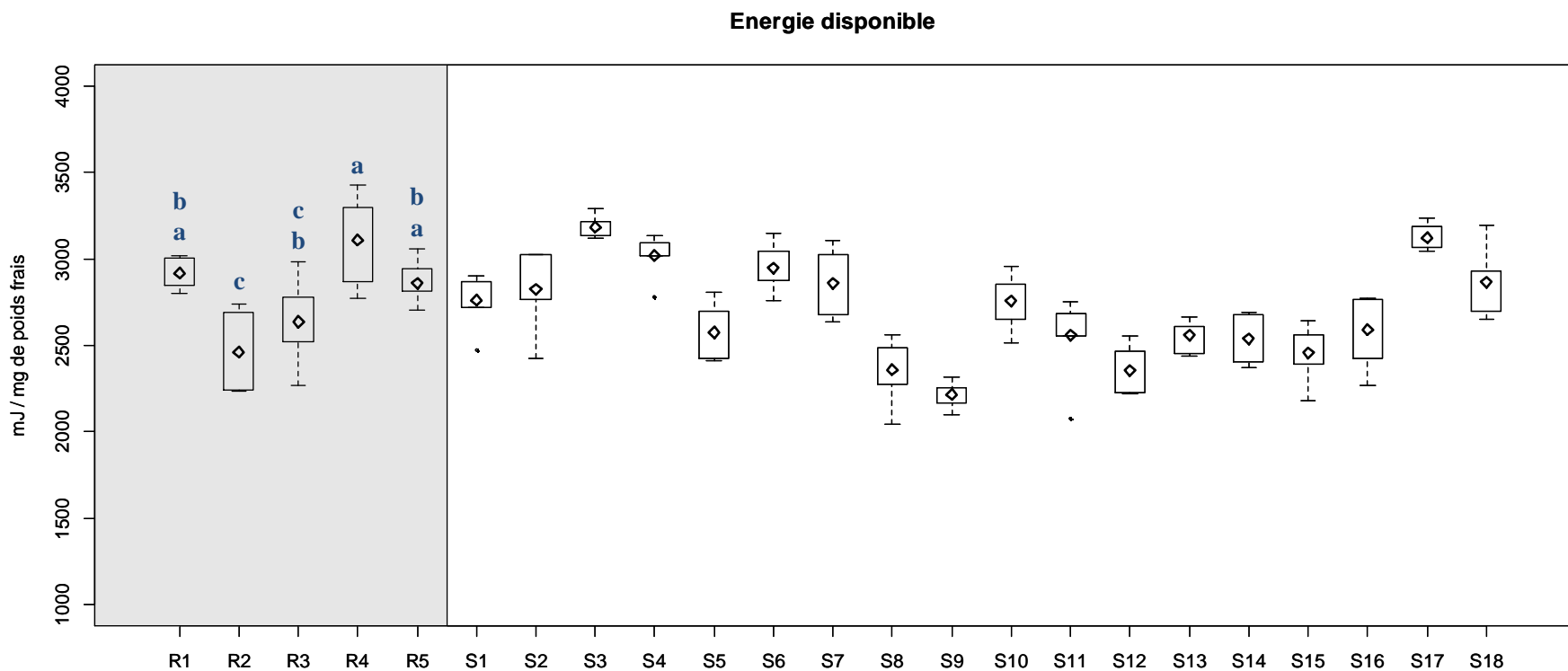
3. Réponses de l'énergie disponible chez *Gammarus fossarum* à la qualité du milieu

Dans le cadre de cette étude *in situ*, parallèlement à l'étude des activités enzymatiques digestives présentées précédemment, des données sur les réserves énergétiques des organismes ont été acquises. La mesure de ces réserves énergétiques a été réalisée suivant le protocole présenté dans l'article n°1. Chaque type de réserve énergétique a été dosé séparément, converti en équivalent énergétique puis additionné. Ainsi la somme de l'énergie représentée par les réserves énergétiques, appelée énergie disponible, est exprimée en mJ/mg de poids frais (**Figure III-6**).

L'énergie disponible des organismes exposés (**Figure III-6**) a été représentée de la même manière que les activités enzymatiques analysées dans la figure 2 de l'article n°4. Le test ANOVA mené sur les mesures de l'énergie montre qu'il existe des différences significatives entre les cinq stations de référence (R). Les différences entre groupe ont été identifiées en réalisant un test post hoc de Tukey où les différences sont considérées significatives à $p < 0,05$. Ainsi, contrairement aux résultats obtenus avec les activités enzymatiques, les sites potentiellement contaminés (S) n'ont pas pu être comparés à une distribution homogène de valeurs issues de sites définis comme références (R). L'ensemble des valeurs obtenues sur les 23 stations présente une variabilité appréciable, les niveaux d'énergie sont compris entre 2460 et 3108 mJ/mg de poids frais pour les sites références (R) et entre 2215 et 3043 mJ/mg de poids frais pour les sites à risque (S). Nous pouvons souligner qu'il existe une forte variabilité de la conductivité entre les sites. Selon les données acquises en condition contrôlée (chapitre III, partie 1, paragraphe 2.2.), les niveaux énergétiques des organismes mâles exposés à 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ sont 15% supérieurs aux niveaux énergétiques des organismes exposés à 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Cependant, les travaux menés en laboratoire se sont focalisés sur une gamme de conductivités comprise entre 200 et 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$, alors que dans le cas présent, 8 sites (R2, S1, S2, S3, S5, S6, S7, S8 et S18) affichent des conductivités inférieures à 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$. De plus, l'ensemble des sites présente des conductivités inférieures à 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, excepté le site S16 à 650 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Dans ce contexte et d'après les résultats obtenus en conditions contrôlées, il est difficile de parler ici d'une influence de la conductivité du milieu sur les réserves énergétiques des gammarus.

Figure III-6 : Energie disponible (exprimée en mJ/mg de poids frais) mesurée chez les gammares exposés sur chaque site étudié

La zone grise correspond aux stations de référence (R1 à R5), la zone blanche présente les stations potentiellement contaminées (S1 à S18). Chaque boîte à moustache représente un site (le losange: la moyenne du site; le rectangle: l'écart interquartile; le point noir: une valeur marginale; les moustaches: l'étendue des valeurs). La différence entre lettres indique une différence significative entre les sites références à $p < 0,05$



De la même manière que Coulaud et al. (2011) ont corrigé l'influence de la température sur la mesure du taux d'alimentation des gammares exposés sur le terrain, nous avons tenté de soustraire l'influence de la conductivité sur l'énergie disponible des gammares exposés *in situ* (données non présentées). Malgré cette correction, la variabilité des mesures reste difficilement interprétable. De même, en se basant sur les valeurs non corrigées, on peut observer sur le terrain que les 3 sites ayant les conductivités les plus basses (S1, S2 et S3) ont accueilli des organismes présentant des niveaux d'énergie relativement élevés (entre 2825 et 3183 mJ/mg de poids frais) par rapport à l'ensemble des organismes exposés. Ainsi, cette constatation vient confirmer que dans cette étude, la variation de la conductivité ne permet pas d'expliquer la différence énergétique entre les organismes exposés. La variabilité des réponses obtenues pourrait être liée à de nombreux facteurs environnementaux non mesurés et différents entre les sites (débit de l'eau, quantité de matières en suspension...). D'après les réponses obtenues dans cette étude, les variations des réserves énergétiques chez les gammares mâles ne seraient pas des indicateurs précoces de l'état de santé de la population et de la qualité du milieu.

Chapitre IV

Conclusions générales et perspectives

CHAPITRE IV : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Pour comprendre les effets du milieu sur la santé des organismes vivants, les biomarqueurs apparaissent comme des outils particulièrement pertinents et complémentaires aux approches chimiques et biocénologiques classiquement utilisées pour la surveillance de l'environnement. Malgré leur importance, les biomarqueurs sont peu utilisés dans le cadre des programmes de surveillance des milieux. Les principales limites de leur utilisation sont d'une part, la variabilité naturelle des réponses biologiques étudiées, non liée aux stress chimiques, et d'autre part, la faible pertinence écologique des réponses suivies. En effet, pour être pertinent d'un point de vue écologique, un biomarqueur doit être capable de prédire des perturbations aux niveaux d'organisation supérieurs. Ainsi, parmi les biomarqueurs utilisés, les réponses en lien avec l'énergie semblent particulièrement pertinentes pour y rechercher le/les biomarqueurs permettant d'établir le lien entre les différents niveaux d'organisation.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail doctoral a été de proposer un biomarqueur de l'assimilation de l'énergie chez une espèce sentinelle, l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. Ainsi le métabolisme du gammare a été appréhendé au travers de deux types de réponses biochimiques, celle des activités enzymatiques digestives et celle des réserves énergétiques, respectivement en tant que marqueurs de l'assimilation et de l'état énergétique des organismes.

Dans cette dernière partie, nous proposons de résumer et de discuter l'ensemble des résultats présentés précédemment, en abordant trois axes de réflexion :

1. La variabilité naturelle des réponses énergétiques étudiées, la validation du protocole d'encagement et l'établissement de niveau de base des réponses.
2. Les enzymes digestives par rapport aux autres marqueurs étudiés.
3. La signification écologique des activités enzymatiques digestives : lien entre inhibition des activités et effet sur la reproduction.

1. Réponses énergétiques étudiées : variabilité naturelle et validation du protocole d'encagement

1.1. Mieux connaître la variabilité naturelle des réponses suivies

Dans un premier temps, une étude à caractère éco-physiologique s'est intéressée à la variabilité des réponses digestives et énergétiques chez le gammare en lien avec des facteurs intrinsèques (sexe, reproduction / mue) et environnementaux (température, conductivité et quantité de nourriture). Un résumé des résultats obtenus est proposé dans le **tableau IV-1**. Ces travaux réalisés en conditions contrôlées ont permis de mettre en lumière l'impact plus ou moins important de chaque facteur testé.

Tableau IV-1 : Récapitulatif des réponses des marqueurs étudiés chez *G. fossarum* soumis à l'influence de divers facteurs de confusion. ↑ : augmentation ; ↓ : diminution, 0 : pas d'effet ; ND : non déterminé

	Activité Amylase		Activité Cellulase		Activité Trypsine		Energie disponible	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Température	↑	↑	↑	↑	0	0	0	0
Conductivité	0	0	↑	0	0	0	↑	↑
Stade de mue / Reproduction	ND	↓	ND	↓	ND	↓	ND	↑↓
Privation alimentaire	↓	↓	ND	ND	0	0	0	↓

Influence importante du genre et du statut reproducteur de l'organisme

Les résultats de ces travaux ont montré que chez les femelles toutes les réponses suivies sont modulées au cours de son cycle de reproduction, alors que chez les mâles elles sont relativement stables. En effet, chez les femelles au cours du cycle, les activités enzymatiques digestives diminuent de 51% pour l'amylase, de 31% pour la cellulase et de 61% pour la trypsine. Tandis que, les réserves énergétiques présentent une évolution différente, avec une augmentation de 30% de la post-mue (stade AB) à la pré-mue (stade D1) suivie d'une chute de 19% au dernier stade avant la mue (stade D2). Chez les mâles, le cycle reproducteur (spermatogénèse) est mal connu et peu documenté. La spermatogénèse est courte et n'est pas liée à la mue, ainsi aucun paramètre morphologique ne permet de

déterminer le stade de spermatogénèse des individus échantillonnés. De ce fait, l'influence du cycle n'a pas été mise en évidence.

De nombreuses études ont déjà révélé l'influence du sexe sur les réponses étudiées, notamment sur les réserves énergétiques chez le gammare (Sroda et Cossu-Leguille, 2011b, Gismondi et al., 2012a). D'après ces travaux, les niveaux des réserves énergétiques chez *G. roeseli* (concentrations en lipides et en glycogène) sont systématiquement plus élevés chez les femelles que chez les mâles quelle que soit la saison. D'après les données présentées dans notre étude au cours d'un cycle de reproduction les niveaux des réserves énergétiques de *Gammarus fossarum* sont également supérieurs chez les gammarus femelles.

Importance majeure de la quantité et de la qualité de la nourriture présente

L'étude de l'impact de la privation alimentaire sur les activités digestives du gammare a souligné la rapidité des réponses des enzymes digestives à l'égard de la variation de la quantité et de la qualité de la nourriture. En effet, lorsque les substrats glucidiques sont diminués, l'activité amylase est significativement réduite chez le gammare nourri un jour par semaine (25% pour le mâle et 31% pour la femelle), tandis que l'activité de la trypsine reste stable lorsque les gammarus sont soumis à un régime alimentaire sans protéines animales.

L'étude de la sensibilité des activités enzymatiques digestives vis-à-vis de la nature de l'alimentation mériterait d'être approfondie par un suivi des enzymes chez des organismes soumis à des régimes alimentaires de composition variable. D'après les résultats obtenus, il semblerait intéressant d'étudier l'influence d'un régime alimentaire plus ou moins riche en protéines sur l'activité digestive de la trypsine chez les gammaridés. D'autre part, la privation alimentaire a entraîné une diminution des réserves uniquement chez les femelles. Cette chute montre que les besoins énergétiques de la femelle sont supérieurs à ceux des mâles. Cette différence métabolique inter-sexe pourrait être attribuée à la dépense énergétique engagée dans la reproduction. En effet, chez les mâles, la gamétogénèse n'est pas associée à un cycle de mue, elle a lieu après la copulation sur une période de 6 jours. Chez les femelles, l'énergie disponible doit être allouée à la mue et à l'ovogénèse qui dure 30 jours à 12°C. Ainsi, nous pouvons supposer que le coût énergétique engagé pour la reproduction chez les femelles (vitellogénèse et soin aux embryons) est plus important que celui investi chez les mâles.

Influence secondaire de la température et de la conductivité du milieu

L'activité enzymatique de la trypsine chez *Gammarus fossarum* n'est pas influencée par la température ni par la conductivité, quelque soit le sexe ou le stade de reproduction de l'organisme considéré. Par ailleurs, l'amylase et la cellulase présentent des niveaux d'activités plus faibles pour la température la plus faible qui a été testée (7°C) quelque soit le sexe. Les réserves énergétiques ne sont pas influencées par la température du milieu.

La conductivité du milieu n'influence pas les activités enzymatiques digestives des femelles. Cependant, l'activité de la cellulase chez les gammares mâles a tendance à augmenter avec la conductivité du milieu. Les réserves énergétiques des deux sexes augmentent également avec la conductivité de l'eau. Ces éléments de réponse concernant l'influence de la température et de la conductivité sur les réponses appréhendées, permettront une meilleure interprétation des résultats obtenus en milieu naturel.

Ce travail de caractérisation des réponses digestives et énergétiques a apporté des informations précises concernant la physiologie de l'espèce considérée et un pré-requis indispensable à l'utilisation des réponses étudiées en tant que biomarqueurs.

1.2. Limiter la variabilité naturelle induite par des facteurs biotiques durant l'encagement

L'évaluation des effets de la qualité chimique du milieu naturel sur les gammares peut être réalisée à l'aide d'approche active. L'encagement d'organismes sur site permet d'étudier des sites où les gammaridés sont absents, de contrôler les traits d'histoire de vie des individus exposés, et d'appliquer une méthodologie d'exposition reproductible (Besse et al., 2012).

L'amplitude des réponses digestives et énergétiques appréhendées en conditions contrôlées nous permet de valider un protocole d'encagement apte à minimiser l'impact des facteurs de confusion sur nos marqueurs. En effet, l'encagement d'organismes mâles « standardisés » (issus d'une même population de référence et ayant une taille similaire), nourris *ad libitum* limite considérablement la variation naturelle des réponses biologiques vis-à-vis des facteurs biotiques (taille, sexe, statut reproducteur et alimentation). Ainsi **dans le cadre de l'évaluation de la qualité des écosystèmes aquatiques, il apparaît pertinent d'exposer des gammares mâles nourris *ad libitum* pour interpréter sans ambiguïté les réponses suivies.**

1.3. Proposer un niveau de référence et un niveau seuil au delà duquel la variation peut être attribuée à un stress de nature chimique

Comparaison des réponses obtenues en laboratoire et sur le terrain

Au cours des différents travaux réalisés, nous avons pu mettre en évidence des réponses digestives plus élevées chez les organismes exposés *in situ* par rapport aux organismes maintenus en laboratoire (**Tableau IV-2**).

Tableau IV-2 : Réponses enzymatiques digestives mesurées chez les gammarès mâles nourris *ad libitum* avec uniquement des feuilles d'aulnes (*Alnus glutinosa*) au laboratoire et sur le terrain, à l'issue de 15 jours d'exposition. Les valeurs sont présentées sous forme des moyennes (\pm écartype)

	Laboratoire condition témoin	Terrain encagement sur les sites références
Durée d'exposition	15 jours	15 jours
Site (date)		Rhône (juin-2010)
Activité amylase µg maltose/mg BSA/min	604,7 (\pm 114,5)	827 (\pm 138)
Activité cellulase µg maltose/mg BSA/min	51,6 (\pm 6,4)	58,6 (\pm 4,7)
Activité trypsine µg pNa/mg BSA/min	5,3 (\pm 2,)	7 (\pm 1,8)

Les niveaux des activités enzymatiques digestives mesurés en laboratoire sont sensiblement inférieurs à ceux mesurés en conditions naturelles. Ce phénomène souligne l'influence que peut avoir le milieu de vie sur les niveaux de base des réponses biologiques des organismes et il mérite d'être discuté et élucidé à l'occasion de prochains travaux. En effet, ce décalage entre les réponses acquises en laboratoire et sur le terrain peut limiter la mise en place de valeurs de référence et de valeurs seuil indispensables pour une utilisation standardisée à une large échelle. Plusieurs pistes pourraient être empruntées pour comprendre l'origine de ce décalage entre les mesures réalisées sur des gammarès ayant séjournés au laboratoire et ceux ayant été exposés sur le terrain.

D'une part, il pourrait être judicieux d'approfondir le travail de caractérisation des réponses en étudiant l'influence d'autres facteurs de confusion. Par exemple, **les conditions de luminosité** sont différentes entre le terrain (avec un encagement réalisé dans l'obscurité) et le laboratoire (avec un éclairage soumis à un rythme circadien). Certains travaux réalisés chez les crustacés ont montré que les activités enzymatiques digestives

étaient influencées par l'intensité et la durée de l'éclairement (Van Wormhoudt et Malcoste, 1976, Van Wormhoudt, 1977, Galgani et al., 1983). D'autres paramètres physiques mériteraient d'être considérés comme **le débit du cours d'eau et la turbidité**, qui peuvent influencer le développement de microorganismes dans l'eau. Ces microorganismes pourraient d'une part être (i) une source potentielle de nourriture pour les gammares ou bien (ii) des partenaires améliorant de manière non négligeable l'appétence de la nourriture proposée au cours du caging (Foucreau et al., 2013). Enfin, **la teneur en chlorophylle** dans l'eau pourrait indiquer une présence plus ou moins importante de microorganismes photosynthétiques, qui seraient une source potentielle d'éléments nutritifs non contrôlée disponible pour l'alimentation du gammare.

Afin de pouvoir répondre à ces hypothèses, il serait intéressant de mesurer les activités enzymatiques digestives chez des gammares exposés dans des rivières artificielles et de réaliser un suivi annuel des réponses. Cette proposition permettrait i) d'apprécier les réponses considérées dans des conditions intermédiaires entre le laboratoire et le milieu naturel, ii) de corrélérer plus facilement un certain nombre de paramètres environnementaux (quantité de chlorophylle, composition zoo- et phyto-planctonique du milieu) avec les réponses étudiées.

D'autre part, une étude comparative de la flore intestinale des gammares exposés en laboratoire et sur le terrain pourrait également donner des éléments de réponse concernant une activité digestive et une assimilation différente liée au milieu de vie.

Application sur le terrain : synthèse des résultats et comparaison des deux études

Les applications *in situ* réalisées au cours de deux campagnes de terrain ont permis i) de valider l'approche active proposée, ii) de souligner la sensibilité des activités enzymatiques digestives face aux stress chimiques et iii) d'approfondir nos connaissances à leur égard dans le cadre d'approche active afin d'optimiser leur utilisation dans la biosurveillance des milieux aquatiques.

En effet, nous avons observé que l'activité des enzymes digestives des gammares est inhibée par différents types de contaminants (métalliques, polychlorobiphényles, hydrocarbures aromatiques polycycliques...). Ces résultats suggèrent la non spécificité des réponses enzymatiques face à un type de stress ou à une famille de contaminants.

Cependant, cette suggestion mériterait d'être précisée par des approches en conditions contrôlées, en mesurant les activités digestives de gammarex exposés à différentes familles de contaminants chimiques. D'autre part, l'étude mécanistique de l'interaction entre le contaminant et l'activité enzymatique digestive reste encore à préciser. Ainsi, il serait intéressant de déterminer si le contaminant agit (i) de manière directe dans la lumière de l'appareil digestif par interaction chimique avec les enzymes produites ou en affectant la fonction sécrétrice des cellules F (assurant la synthèse enzymatique) ou (ii) de manière indirecte par des perturbations comportementales et/ou hormonales qui affecteraient l'activité digestive. Afin de répondre à ces questions plusieurs études pourraient être envisagées :

- Des études *in vitro* comparant l'activité d'un extrait enzymatique soumis ou non à un contaminant. Cette approche biochimique permettrait de mettre en évidence une interaction directe enzyme/polluant.
- Des études histologiques réalisées en microscopie électronique portant sur les cellules F des caeca pour apprécier les différences ultrastructurales des cellules exposées par rapport aux cellules témoins, afin de souligner l'éventuelle action des polluants ciblée au niveau intra-cellulaire.

Par ailleurs, les réponses digestives obtenues vis-à-vis de la contamination étaient sensiblement différentes entre les deux campagnes réalisées. Plusieurs éléments pourraient expliquer cette différence. En effet, la première étude *in situ* (article n°3) menée sur le bassin du Lot concerne une zone contaminée par une pollution polymétallique importante. Un nombre réduit de sites (5) a été considéré et la durée d'exposition des organismes était de 7 jours. Les réponses acquises ont reflété uniquement la présence d'une perturbation chimique sur le site le plus contaminé, traduisant une sensibilité relativement faible du taux d'alimentation et des activités enzymatiques digestives vis-à-vis des contaminants. La seconde étude *in situ* (article n°4) a été conduite sur une zone géographique plus large située sur le bassin du Rhône. Les gammarex ont été encagés durant 15 jours sur un nombre important de sites (23) de qualité chimique variable. Dans ce contexte, la sensibilité des réponses étudiées concernant les taux d'alimentation (Coulaud et al., 2011) et les enzymes digestives a permis de discriminer les sites selon leur qualité chimique.

Ainsi l'expérience acquise au cours des deux campagnes terrains, nous a révélé que pour mettre en évidence une dégradation de la qualité chimique du milieu de manière sensible, **le suivi des activités digestives doit être réalisé chez des gammars exposés durant au moins deux semaines.**

Parallèlement à l'étude de l'impact chimique sur les réponses digestives, nous avons tenté de déterminer la variabilité des niveaux d'activités digestives en fonction de la saison (article n°3). Ainsi, le suivi de la variation temporelle des activités digestives au cours des campagnes réalisées en 2009 et 2010 sur le site référence (Lot Amont) n'a pas révélé de fluctuations saisonnières récurrentes, ceci quelle que soit l'enzyme considérée dans nos conditions expérimentales. En effet si durant une semaine, la température (en lien avec la saison) n'influence pas les réponses, cela peut être différent au bout de deux semaines d'exposition.

Proposition de valeurs de référence et de valeurs seuil

Au cours de l'étude réalisée sur le bassin du Rhône (article n°4), nous avons pu proposer une valeur de référence et une valeur seuil pour chaque activité enzymatique mesurée. La valeur de référence est établie à partir de la moyenne des activités enzymatiques mesurées sur les sites références (R1 à R5). La valeur seuil correspond à l'intervalle de confiance à 99%, au-delà duquel les modulations des enzymes digestives traduisent une perturbation liée à un stress. La valeur de référence établie pour les activités amylase, cellulase sont respectivement de 827 et 58,6 μg maltose/mg BSA/min et 7 μg p-Na/mg BSA/min pour la trypsine. L'intervalle de confiance à 99% pour l'amylase est compris entre 696 et 958 μg maltose/mg BSA/min ; pour la cellulase il est compris entre 54,1 et 63,1 μg maltose/mg BSA/min et pour la trypsine l'intervalle est entre 5,23 et 8,77 μg p-Na/mg BSA/min (**Figure IV-1**).

Afin d'évaluer la pertinence de ces valeurs référence et seuil, nous les avons comparées aux valeurs des activités enzymatiques digestives obtenues en juin 2009 et 2010, sur le site amont du bassin du Lot considéré comme site référence (**Figure IV-1**). Il semblerait que toutes les activités enzymatiques digestives soient comprises dans l'intervalle de confiance à 99%, excepté l'activité amylase mesurée en 2009 sur le site du Lot qui présente une valeur de 606 μg maltose/mg BSA/min.

Les moyennes mesurées sur le site référence du Lot semblent plutôt cohérentes avec les valeurs références et seuils proposées, ce qui semble appuyer la fiabilité de ces valeurs, puisqu'il est possible de les extrapoler à des bassins hydrologiques différents. Cependant, il faut souligner que cette comparaison est établie sur un petit nombre de valeurs dans la deuxième étude. Ainsi, pour s'assurer de la robustesse de nos valeurs, il serait intéressant de mener une étude à large échelle comparable à celle réalisée sur le Rhône sur un autre bassin versant présentant des sites de qualité chimique variable pour comparer les valeurs de référence et seuil déterminées pour chaque enzyme.

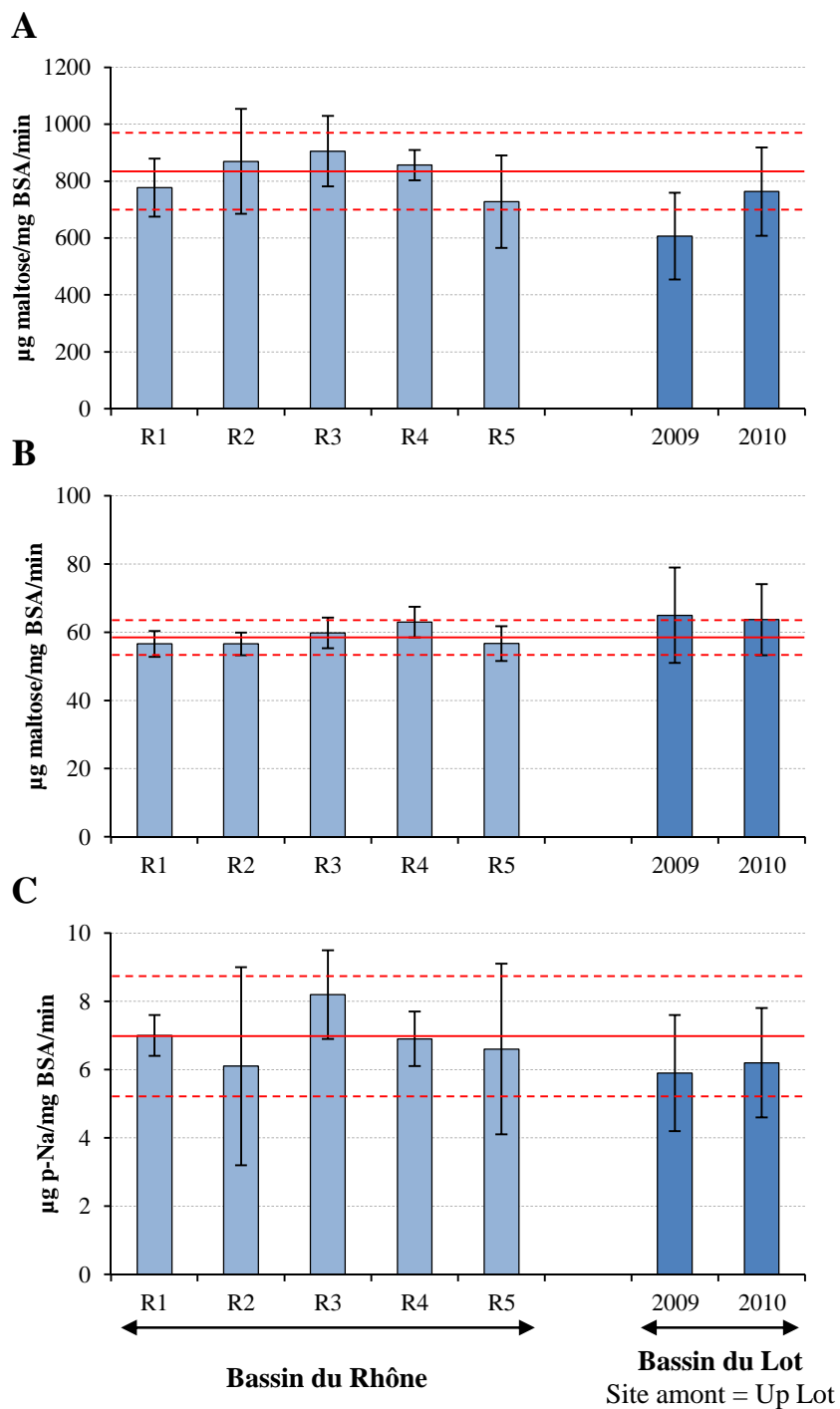


Figure IV-1 : Activité enzymatique digestive amylase (A), cellulase (B) et trypsine (C) des gammars encagés sur des sites références du bassin du Rhône (R1 à R5) et du bassin du Lot (Up Lot 2009 et 2010). La ligne rouge représente la valeur de référence déterminée sur le bassin du Rhône, les lignes en pointillé correspondent à l'intervalle de confiance à 99% également déterminé sur les sites du Rhône.

2. Les enzymes digestives par rapport aux réserves et aux taux d'alimentation

2.1. Réserves énergétiques versus activités digestives

Contrairement aux enzymes digestives, les réponses des réserves énergétiques mesurées chez des gammares encagés, n'ont pas permis de mettre en évidence la sensibilité de ces marqueurs à la présence de contaminants. Dans le cadre de l'étude du bassin du Rhône (article n°4) une grande variabilité des réserves énergétiques a pu être observée chez les organismes exposés sur des sites de qualité chimique variable. Ainsi, la prise en considération de la sensibilité des réserves à la conductivité du milieu n'a pas suffi à établir un lien entre les niveaux d'énergie disponible chez les organismes exposés et la qualité de l'eau. Par ailleurs, lorsque les gammares mâles sont soumis à un stress alimentaire important sur une période de 11 ou de 23 jours les réserves énergétiques ne sont pas affectées et restent stables (voir article n°1 Figure 4). Les mécanismes à l'origine des variations de l'énergie disponible chez le gammare restent mal connus.

Globalement, d'après les résultats présentés dans ce manuscrit, nous pouvons tirer certaines conclusions concernant l'utilisation des réserves et des enzymes digestives en tant que biomarqueurs chez les gammaridés.

Les études de privation alimentaire (article n°1) ont mis en évidence un effet précoce (dès 11 jours) du stress alimentaire sur la capacité digestive du gammare mâle (inhibition de l'activité amylase) qui ne s'est pas traduit sur les niveaux des réserves énergétiques. Ainsi, les enzymes digestives sont apparues comme des réponses plus sensibles et précoces au stress alimentaire par rapport aux réserves énergétiques. D'autre part, l'exposition des gammares mâles durant 15 jours sur le bassin du Rhône (article n°4) a souligné la sensibilité des réponses enzymatiques digestives face à la qualité de l'eau, contrairement aux réponses des réserves qui se sont montrées difficilement interprétables et non corrélées avec la contamination des sites. Ces résultats montrent que les mesures ponctuelles des activités digestives peuvent refléter la qualité du milieu, contrairement à celles des réserves. Par contre, la variation des réserves au cours du temps, comme cela a pu être appréhendé dans d'autres travaux avec le calcul de l'allocation énergétique cellulaire (AEC), semble plus informative qu'une mesure ponctuelle (De Coen et Janssen, 1997b). Malgré tout, la mesure ponctuelle des activités digestives semble plus facile à mettre en œuvre que le suivi temporel des réserves énergétiques chez les organismes.

Par conséquent, il apparaît plus intéressant de proposer les enzymes digestives comme biomarqueurs dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental.

2.2. Taux d'alimentation versus activités digestives

Les applications *in situ* ont également été l'occasion de mettre en évidence le caractère complémentaire du suivi du taux d'alimentation (Coulaud et al., 2011) et des activités enzymatiques digestives. Ces réponses individuelles et sub-individuelles fournissent des informations différentes concernant la perturbation possible de l'acquisition de l'énergie chez *Gammarus fossarum*. En effet, comme cela a été montré dans l'étude du bassin du Rhône (article n°4), les variations du taux d'alimentation et des activités digestives ne sont pas nécessairement corrélées. Ainsi, une chute des activités enzymatiques digestives peut ne pas être liée à une diminution de la prise alimentaire, et traduire une altération physiologique directe de la fonction digestive. Par ailleurs, la chute du taux d'alimentation traduit une perturbation comportementale pouvant diminuer indirectement l'activité enzymatique digestive qui est influencée par la quantité de nourriture consommée.

Suite à ce travail d'analyse des réponses du comportement alimentaire et des activités digestives, **il apparaît très pertinent de continuer de coupler l'étude de ces deux biomarqueurs pour l'évaluation de la qualité des milieux et pour approfondir l'étude des processus d'acquisition de l'énergie.**

3. Pertinence écologique des activités enzymatiques digestives : lien entre inhibition des activités et effet sur la reproduction

Parallèlement à ces travaux, l'étude de la femelle a été approfondie en s'intéressant au suivi de la descendance afin de préciser le lien entre une perturbation de réponse sub-individuelle et ses conséquences au niveau individuel, notamment sur la fonction de reproduction qui est une variable biologique clef pouvant impacter la dynamique des populations.

L'effet d'une inhibition des activités digestives sur le métabolisme énergétique et ses conséquences sur le succès reproducteur a été évalué en soumettant des gammares femelles à trois niveaux trophiques différents pendant deux cycles de reproduction successifs. Nous avons pu montrer que la privation alimentaire provoque une inhibition des activités digestives, une chute des réserves énergétiques ainsi qu'une diminution du nombre d'ovocytes et d'embryons chez les gammares femelles. Ainsi, une privation alimentaire sévère cause une inhibition de l'activité amylase de l'ordre de 31% et entraîne une diminution de 28% du nombre d'embryons par femelle. La réduction de l'activité digestive apparaît donc corrélée à celle du succès reproducteur des organismes. Au delà de ces résultats, il est fort probable que chez les femelles d'autres types de stress (comme l'impact de la qualité chimique du milieu) puissent provoquer une inhibition des activités enzymatiques digestives, ce qui pourrait engendrer, à une échelle plus large, des conséquences négatives sur la dynamique de la population. Par ailleurs, la privation alimentaire a affecté de manière similaire les activités enzymatiques chez le mâle et la femelle, provoquant des inhibitions équivalentes. De ce fait, et au regard des études basées sur l'encagement de gammares mâles en milieu naturel, nous pouvons supposer que les inhibitions d'activités digestives obtenues chez le mâle en milieu naturel soient comparables à celles que l'on pourrait mesurer chez la femelle. Selon cette hypothèse, l'impact de la qualité du milieu sur le succès reproducteur et les conséquences possibles sur la population pourraient être évalués. D'autre part, il serait particulièrement intéressant d'exposer des femelles dans le cadre d'une approche active afin (i) de confirmer une inhibition de l'activité enzymatique digestive en milieu contaminé (ii) et d'évaluer si la qualité du milieu affecte la reproduction dans des proportions attendues au regard des inhibitions digestives.

En perspective de ce travail il semblerait également pertinent de se servir directement des mesures effectuées chez le mâle exposé *in situ* pour prédire les effets possibles chez la femelle et les conséquences éventuelles sur son succès reproducteur (**Figure IV-2**).

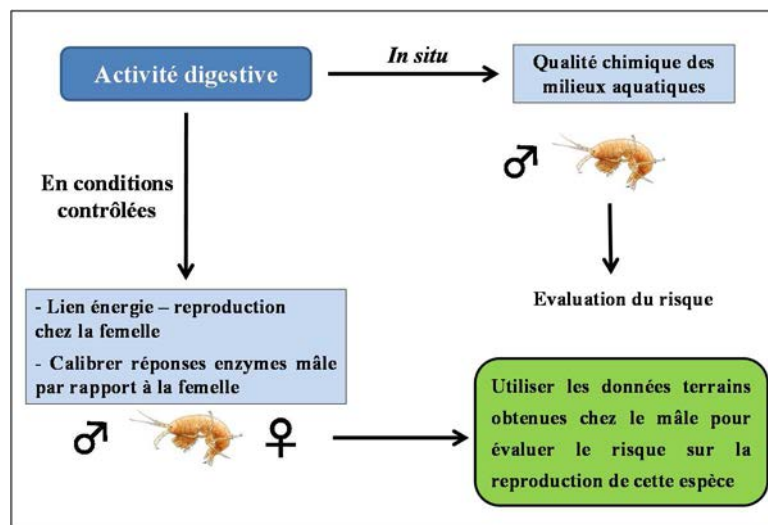


Figure IV-2 : Utilisation des enzymes digestives dans l'évaluation du risque environnemental

Globalement, nos résultats obtenus en conditions contrôlées et semi-contrôlées suggèrent l'utilisation des activités enzymatiques digestives chez les gammarés mâles en tant que biomarqueur dans le cadre de l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques d'eau douce.

Afin d'utiliser ces marqueurs à une large échelle, il serait intéressant de pouvoir apprécier les activités enzymatiques digestives de différentes espèces de gammaridés (*G.pulex*, *G. roseli*, *G. duebenii*...). Ceci afin de savoir si les différentes espèces potentiellement présentes dans un milieu donné peuvent fournir des réponses digestives comparables et/ou si leur sensibilité aux polluants est différente. Enfin, il pourrait être envisagé d'étudier la variabilité intra-spécifique de populations issues de milieux variés ayant des histoires de vie différentes afin d'estimer la variabilité des réponses mesurées et d'étudier les différences d'adaptations populationnelles face aux contaminants. Ces démarches sont en cours de développement dans le cadre du projet de recherche GAMMA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Adam, O. (2008). Impact des produits de traitement du bois sur les amphipodes *Gammarus pulex* (L) et *Gammarus fossarum* (K): approche chimique, hydro-écologique et écotoxicologique U.F.R de Sciences et Techniques, Université de Franche-Comté. **Doctorat**: 238.
- Adam, O. (2011). Bioindication de la qualité de l'eau par les gammarus: concepts et applications, Presses universitaires de Franche-Comté.
- Adam, O., Badot, P.-M., Degiorgi, F. et Crini, G. (2009) Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(2): 441-449.
- Agrawal, V. (1965) Feeding appendages and the digestive system of *Gammarus pulex*. Acta Zoologica **46**(1-2): 67-81.
- Ahearn, G., Mandal, P. et Mandal, A. (2004) Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. Journal of Comparative Physiology B **174**(6): 439-452.
- Al-Mohanna, S. et Nott, J. (1989) Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. Marine Biology **101**(4): 535-544.
- Alayse-Danet, A. M., Charlou, J. L., Jézéquel, M. et Samain, J. F. (1979) Modèle de détection rapide des effets sublétaux des polluants: Modification des taux d'amylase et de trypsine *Artemia salina* contaminées par le cuivre ou le zinc. Marine Biology **51**(1): 41-46.
- Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., Labarta, U. et Fernández-Reiriz, M. J. (1996) Evaluation of live microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. Aquaculture **148**(1): 11-23.
- Alonso, Á., De Lange, H. J. et Peeters, E. T. (2010) Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *G. fossarum*. Ecotoxicology **19**(1): 133-140.
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C. et Rainbow, P. S. (2013). Ecological Biomarkers : Indicators of Ecotoxicological Effects New York, CRC Press.
- Aragón-Axomulco, H., Chiappa-Carrara, X., Soto, L., Cuzon, G., Arena, L., Maldonado, C., Cárdenas, R. et Gaxiola, G. (2012) Seasonal variability in trypsin and α -amylase activities caused by the molting cycle and feeding habits of juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939). Journal of Crustacean Biology **32**(1): 89-99.
- Ashauer, R., Boxall, A. B. et Brown, C. D. (2007) Simulating toxicity of carbaryl to *Gammarus pulex* after sequential pulsed exposure. Environmental Science & Technology **41**(15): 5528-5534.
- Ashauer, R., Hintermeister, A., Potthoff, E. et Escher, B. I. (2011) Acute toxicity of organic chemicals to *Gammarus pulex* correlates with sensitivity of *Daphnia magna* across most modes of action. Aquatic Toxicology **103**(1): 38-45.
- Atkinson, D. E. (1968) Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochemistry **7**(11): 4030-4034.
- Atkinson, D. E. (1977). Cellular energy metabolism and its regulation, Academic Press.
- Auffret, M. (1988) Histopathological changes related to chemical. Marine Ecology Progress Series **46**: 101-107.

B

- Bagheri, F., Talebi, K. et Hosseiniaveh, V. (2010) Cellular energy allocation of pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kol. (Hemiptera.: Pentatomidae) in relation to juvenoid pyriproxyfen. African Journal of Biotechnology **9**(35): 5746-5753.
- Bakke, T. et Skjoldal, H. R. (1979) Effects of toluene on the survival, respiration, and adenylate system of a marine isopod. Marine Pollution Bulletin **10**(4): 111-115.
- Barclay, M., Dall, W. et Smith, D. (1983) Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **68**(3): 229-244.
- Bärlocher, F. (1982) The contribution of fungal enzymes to the digestion of leaves by *Gammarus fossarum* Koch (Amphipoda). Oecologia **52**(1): 1-4.
- Bärlocher, F. et Porter, C. W. (1986) Digestive Enzymes and Feeding Strategies of Three Stream Invertebrates. Journal of the North American Benthological Society **5**(1): 58-66.
- Barnard, J. L. et Barnard, C. M. (1983). Freshwater Amphipoda of the world, Hayfield Associates (Mt. Vernon, Va.)
- Barthel, D. (1984) Adenylate energy charge in three marine bivalve species during anoxia. Ophelia **23**(2): 155-164.
- Becker, J., Ortmann, C., Wetzel, M. A., Winkelmann, C. et Koop, J. H. E. (2013) Mate guarding in relation to seasonal changes in the energy reserves of two freshwater amphipods (*Gammarus fossarum* and *G. pulex*). Freshwater Biology **58**(2): 372-381.
- Beketov, M. A. et Liess, M. (2008a) Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. Environmental Toxicology and Chemistry **27**(2): 461-470.
- Beketov, M. A. et Liess, M. (2008b) Potential of 11 pesticides to initiate downstream drift of stream macroinvertebrates. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **55**(2): 247-253.
- Berner, D. L. et Hammond, E. G. (1970) Phylogeny of lipase specificity. Lipids **5**(6): 558-562.
- Bernfeld, P. (1955) Amylases, α and β . Methods in Enzymology. K. N. Colowick SP. New York, Academic Press. **Volume 1**: 149-158.
- Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P. et Geffard, O. (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**(2): 650-660.
- Besse, J.-P., Geffard, O. et Coquery, M. (2012) Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. TrAC Trends in Analytical Chemistry **36**(0): 113-127.
- Blanchet-Tournier, M. (1980) Mue et vitellogénèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas): contrôles endocrines et interactions. Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Paris.

- Bloor, M. et Banks, C. (2006) Acute and sub-lethal toxicity of landfill leachate towards two aquatic macro-invertebrates: demonstrating the remediation potential of aerobic digestion. Hydrobiologia **556**(1): 387-397.
- Boldina-Cosqueric, I., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Dedourge-Geffard, O., Métais, I., Mouneyrac, C., Moutel, B. et Berthet, B. (2010) Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality. Ecotoxicology and Environmental Safety **73**(7): 1733-1741.
- Bollache, L. (2003) Trois espèces d'Amphipodes épigés nouvelles pour la Saône bourguignonne. Bulletin Scientifique de Bourgogne **51**: 1-9.
- Bollache, L. et Cézilly, F. (2004) Sexual selection on male body size and assortative pairing in *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda): field surveys and laboratory experiments. Journal of Zoology **264**(2): 135-141.
- Borowsky, R. et Guarna, M. M. (1989) Excess amylase in *Gammarus palustris* (Crustacea: Amphipoda); its release into and possible roles in the environment. Marine Biology (Berlin) **101**(4): 529-534.
- Bossuyt, B. T. et Janssen, C. R. (2004) Influence of multigeneration acclimation to copper on tolerance, energy reserves, and homeostasis of *Daphnia magna* Straus. Environmental Toxicology and Chemistry **23**(8): 2029-2037.
- Bossuyt, B. T. A. et Janssen, C. R. (2003) Acclimation of *Daphnia magna* to environmentally realistic copper concentrations. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **136**(3): 253-264.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- Brêthes, J.-C., Parent, B. et Pellerin, J. (1994) Enzymatic activity as an index of trophic resource utilization by the snow crab *chionoecetes opilio* (O. fabricius). Journal of Crustacean Biology: 220-225.
- Brix, K. V., Volosin, J. S., Adams, W. J., Reash, R. J., Carlton, R. G. et McIntyre, D. O. (2001) Effects of sulfate on the acute toxicity of selenate to freshwater organisms. Environmental Toxicology and Chemistry **20**(5): 1037-1045.
- Brock, V., Kennedy, V. S. et Brock, A. (1986) Temperature dependency of carbohydrase activity in the hepatopancreas of thirteen estuarine and coastal bivalve species from the North American east coast. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **103**(1): 87-101.
- Brun, G. et Wojtowicz, M. (1976) A comparative study of the digestive enzymes in the hepatopancreas of Jonah crab (*Cancer borealis*) and rock crab (*Cancer irroratus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **53**(3): 387-391.
- Bundschuh, M. et Schulz, R. (2011) Ozonation of secondary treated wastewater reduces ecotoxicity to *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda): Are loads of (micro) pollutants responsible? Water Research **45**(13): 3999-4007.
- Buu, B. et Le Gal, Y. (1989) Cadmium intoxication of the common cockle *Cardium edule*. Oceanis. 1989.
- Byrne, K. A., Lehnert, S. A., Johnson, S. E. et Moore, S. S. (1999) Isolation of a cDNA encoding a putative cellulase in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Gene **239**(2): 317-324.

C

- Cajaraville, M. P., Diez, G., Marigómez, J. et Angulo, E. (1990) Responses of basophilic cells of the digestive gland of mussels to petroleum hydrocarbon exposure. Diseases of Aquatic Organisms **9**: 221-228.
- Calow, P. (1991) Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology **100**(1): 3-6.
- Calow, P. et Sibly, R. (1990) A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. Functional Ecology **4**(3): 283-288.
- Canli, M. (2005) Dietary and water-borne Zn exposures affect energy reserves and subsequent Zn tolerance of *Daphnia magna*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **141**(1): 110-116.
- Canli, M. (2006) Effects of copper pre-exposure routes on the energy reserves and subsequent copper toxicity in *Daphnia magna*. Environmental Toxicology **21**(5): 521-527.
- Carr, R. S. et Neff, J. M. (1982) Biochemical indices of stress in the sandworm *Neanthes virens* (SARS). II. Sublethal responses to cadmium. Aquatic Toxicology **2**(5-6): 319-333.
- Carr, R. S. et Neff, J. M. (1984) Field assessment of biochemical stress indices for the sandworm *Neanthes virens* (Sars). Marine Environmental Research **14**(1): 267-279.
- Castro, P. F., Freitas Jr, A. C., Santana, W. M., Costa, H. M., Carvalho Jr, L. B. et Bezerra, R. S. (2012) Comparative Study of Amylases from the Midgut Gland of Three Species of Penaeid Shrimp. Journal of Crustacean Biology **32**(4): 607-613.
- Ceccaldi, H. J. (1998) A synopsis of the morphology and physiology of the digestive system of some crustacean species studied in France. Reviews in Fisheries Science **6**(1-2): 13-39.
- Cengiz, E. et Unlu, E. (1999) The effects of the different concentrations of thiodan on the mortality rates of *Gambusia affinis* and *Gammarus pulex*. Biochemical archives **15**(3): 251-254.
- Chaisemartin, C. et Real, G. (1985) Réponses de *Potamopyrgus jenkinsi* (Gastropoda-Hydrobiidae) face à un herbicide le 2, 4, 5-T: survie, reproduction et énergie métabolique disponible chez les individus différenciées par un marqueur: le fer. Vie et Milieu **35**(2): 127-133.
- Chamier, A.-C. et Willoughby, L. G. (1986) The role of fungi in the diet of the amphipod *Gammarus pulex* (L.): an enzymatic study. Freshwater Biology **16**(2): 197-208.
- Chapman, R. F. (1998). The insects: structure and function, Cambridge university press.
- Charniaux-Cotton, H. (1957). Croissance, régénération et déterminisme endocrinien des caractères sexuels secondaires d'*Orchestia gammarella* (Pallas) crustacé amphipode, Masson.
- Chaumot, A., Gos, P., Garric, J. et Geffard, O. (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**(4): 294-299.
- Chen, Z., Mayer, L. M., Weston, D. P., Bock, M. J. et Jumars, P. A. (2002) Inhibition of digestive enzyme activities by copper in the guts of various marine benthic invertebrates. Environmental Toxicology and Chemistry **21**(6): 1243-1248.
- Chevreaux, É. et Fage, L. (1970). Amphipodes Paris.

- Chinnery, F. E. et Williams, J. A. (2003) Photoperiod and temperature regulation of diapause egg production in *Acartia bifilosa* from Southampton Water. Marine Ecology Progress Series **263**: 149-157.
- Clarke, A., Skadsheim, A. et Holmes, L. (1985) Lipid biochemistry and reproductive biology in two species of Gammaridae (Crustacea: Amphipoda). Marine Biology **88**(3): 247-263.
- Cold, A. et Forbes, V. E. (2004) Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. Aquatic Toxicology **67**(3): 287-299.
- Correia, A. D., Pereira, A. L., Costa, M. H. et Carrapiço, F. (2002) Functional anatomy of the midgut gland of *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **82**(02): 201-204.
- Corsin, J. (1999). Biologie animale: structures et fonctions, Ellipses Marketing.
- 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), Université Claude Bernard Lyon I. **PhD**: 331.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S. et Chaumot, A. (2011) *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. Water Research **45**(19): 6417-6429.
- Cruz-Rivera, E. et Hay, M. E. (2000) The effects of diet mixing on consumer fitness: macroalgae, epiphytes, and animal matter as food for marine amphipods. Oecologia **123**(2): 252-264.

D

- Dai, Y., Wang, T. T., Wang, Y. F., Gong, X. J. et Yue, C. F. (2009) Activities of digestive enzymes during embryonic development in the crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda). Aquaculture Research **40**(12): 1394-1399.
- Dall, W., Hill, B., Rothlisberg, P. et Sharples, D. (1990) The biology of the Penaeidae. Advances in Marine Biology **27**.
- Dangles, O. (2000) Approche du fonctionnement de ruisseaux forestiers soumis à des processus d'acidification: décomposition des litières, rôle des macroinvertébrés benthiques et application vers une gestion conservatoire. UFR Sci. FA-Ecotoxicologie, Biodiversité et Santé Environnementale. Metz, Université de Metz.
- Das, T. et Stickle, W. B. (1993) Sensitivity of crabs *Callinectes sapidus* and *C. similis* and the gastropod *Stramonita haemastoma* to hypoxia and anoxia. Marine Ecology-Progress Series **98**: 263-263.
- Daveikis, V. F. et Alikhan, M. (1996) Comparative body measurements, fecundity, oxygen uptake, and ammonia excretion in *Cambarus robustus* (Astacidae, Crustacea) from an acidic and a neutral site in northeastern Ontario, Canada. Canadian Journal of Zoology **74**(7): 1196-1203.
- De Coen, W., Janssen, C. et Giesy, J. (2000) Biomarker applications in ecotoxicology: bridging the gap between toxicology and ecology. New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring, Springer: 13-25.
- De Coen, W., Robbens, J. et Janssen, C. (2006) Ecological impact assessment of metallurgic effluents using in situ biomarker assays. Environmental Pollution **141**(2): 283-294.

- De Coen, W. M. et Janssen, C. R. (1997a) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. II. Digestive enzyme activity in *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of cadmium, chromium and mercury. Chemosphere **35**(5): 1053-1067.
- De Coen, W. M. et Janssen, C. R. (1997b) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health) **6**(1): 43-55.
- De Coen, W. M. et Janssen, C. R. (1998) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. I. The digestive physiology of daphnids exposed to toxic stress. Hydrobiologia **367**(1): 199-209.
- De Coen, W. M. et Janssen, C. R. (2003a) The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. Environmental Toxicology and Chemistry **22**(7): 1632-1641.
- De Coen, W. M. et Janssen, C. R. (2003b) A multivariate biomarker-based model predicting population-level responses of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry **22**(9): 2195-2201.
- De La Ruelle, M., Hajjou, M., Van Herp, F. et Le Gal, Y. (1992) Aminopeptidase activity from the hepatopancreas of *Procambarus clarkii*. Biochemical Systematics and Ecology **20**(4): 331-337.
- De Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P. et Chan, H. (2000) Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). Aquatic Toxicology **50**(1): 51-71.
- de Nicola, M., Cardellicchio, N., Gambardella, C., Guarino, S. M. et Marra, C. (1993) Effects of Cadmium on Survival, Bioaccumulation, Histopathology, and PGM. Ecotoxicology of metals in invertebrates: 103.
- Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, O. et Geffard, A. (2009) Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An in situ experiment. Chemosphere **77**(11): 1569-1576.
- Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Geffard, A. et Amiard-Triquet, C. (2013) Origin of energy metabolism impairments. Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects: 279.
- Dedourge, O., Geffard, A. et Amiard-Triquet, C. (2008) Origine des perturbations du métabolisme énergétique. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Paris: Lavoisier, Tec&Doc: 241-271.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S. et Samain, J.-F. (2006) Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. Aquaculture **254**(1): 571-582.
- Delong, M. D., Summers, R. B. et Thorp, J. H. (1993) Influence of food type on the growth of a riverine amphipod, *Gammarus fasciatus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **50**(9): 1891-1896.
- Depledge, M. et Fossi, M. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. Ecotoxicology **3**(3): 161-172.
- Depledge, M. H. et Galloway, T. S. (2005) Healthy animals, healthy ecosystems. Frontiers in Ecology and the Environment **3**(5): 251-258.

- Dick, J. T. (1995) The cannibalistic behaviour of two *Gammarus* species (Crustacea: Amphipoda). Journal of Zoology **236**(4): 697-706.
- Dick, J. T., Platvoet, D. et Kelly, D. W. (2002) Predatory impact of the freshwater invader *Dikerogammarus villosus* (Crustacea: Amphipoda). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **59**(6): 1078-1084.
- Dickson, G. W. et Giesy, J. P. (1981) Variation of phosphoadenylates and adenylate energy charge in crayfish (Decapoda: Astacidae) tail muscle due to habitat differences. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **70**(3): 421-425.
- Dickson, G. W. et Giesy, J. P. (1982) Seasonal variation of phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge in dorsal tail muscle of the crayfish, *procambarus acutus acutus* (Decapoda: Astacidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **72**(2): 295-299.
- Donkin, P. et Widdows, J. (1986) Scope for growth as a measurement of environmental pollution and its interpretation using structure-activity relationships. Chemistry and Industry: 732-737.
- Douhri, H. et Sayah, F. (2010) Validation of *Orchestia gammarellus* enzymatic activities in several sites of Tangier's bay (Morocco). African Journal of Environmental Science and Technology **4**(5).
- Duquesne, S., Liess, M. et Bird, D. J. (2004) Sub-lethal effects of metal exposure: physiological and behavioural responses of the estuarine bivalve *Macoma balthica*. Marine Environmental Research **58**(2): 245-250.
- Durou, C., Mouneyrac, C. et Amiard-Triquet, C. (2005) Tolerance to metals and assessment of energy reserves in the polychaete *Nereis diversicolor* in clean and contaminated estuaries. Environmental Toxicology **20**(1): 23-31.
- Durou, C., Mouneyrac, C., Pellerin, J. et Péry, A. (2008) Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier, Paris: 273-289.
- Dutra, B., Castiglioni, D., Santos, R., Bond-Buckup, G. et Oliveira, G. (2007) Seasonal variations of the energy metabolism of two sympatric species of *Hyalella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in the southern Brazilian highlands. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology **148**(1): 239-247.
- Dutra, B., Fernandes, F., Lauffer, A. et Oliveira, G. (2009) Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **149**(4): 640-646.
- Dutra, B., Santos, R., Bueno, A. et Oliveira, G. (2008) Seasonal variations in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyalella curvispina* (Crustacea, Amphipoda). Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology **151**(3): 322-328.

E

- EEA (2011). Hazardous substances in Europe's fresh and marine waters. An overview Technical report, European Environment Agency: 61.
- Ellington, W. R. (1981) Effect of anoxia on the adenylates and the energy charge in the sea anemone, *Bunodosoma cavernata* (Bosc). Physiological Zoology: 415-422.

- Encomio, V. et Chu, F.-L. E. (2000) The effect of PCBs on glycogen reserves in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Marine Environmental Research **50**(1): 45-49.
- Erk, M., Ivanković, D. et Strižak, Ž. (2011) Cellular energy allocation in mussels *Mytilus galloprovincialis* from the stratified estuary as a physiological biomarker. Marine Pollution Bulletin **62**(5): 1124-1129.
- Erk, M., Muysen, B. T., Ghekiere, A. et Janssen, C. R. (2008) Metallothionein and cellular energy allocation in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* exposed to cadmium at different salinities. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **357**(2): 172-180.

F

- Felten, V. (2003). Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophysiole de *Gammarus fossarum* Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda) : approche intégrée à différents niveaux d'organisation., Université de Metz: 339.
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J. et Geffard, O. (2008a) Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. Aquatic Toxicology **86**(3): 413-425.
- Felten, V. et Guerold, F. (2001) Hyperventilation and loss of hemolymph Na⁺ and Cl⁻ in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* exposed to acid stress: a preliminary study. Diseases of Aquatic Organisms **45**: 77-80.
- Felten, V., Tixier, G., Guérol, F., De Crespín, D. B. et Dangles, O. (2008b) Quantification of diet variability in a stream amphipod: implications for ecosystem functioning. Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie **170**(4): 303-313.
- Fernández Gimenez, A. V., García-Carreño, F. L., Navarrete del Toro, M. A. et Fenucci, J. L. (2001) Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **130**(3): 331-338.
- Fernández Gimenez, A. V., García-Carreño, F. L., Navarrete del Toro, M. A. et Fenucci, J. L. (2002) Digestive proteinases of *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae) and relationship with molting. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **132**(3): 593-598.
- Fernández, I., Oliva, M., Carrillo, O. et Wormhoudt, A. V. (1997) Digestive enzyme activities of *Penaeus notialis* during reproduction and moulting cycle. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **118**(4): 1267-1271.
- Forbes, V. E., Palmqvist, A. et Bach, L. (2006) The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. Environmental Toxicology and Chemistry **25**(1): 272-280.
- Fossi Tankoua, O., Amiard, J., Amiard-Triquet, C., Berthet, B., Mouneyrac, C. et Rainbow, P. (2010) Towards a comprehensive methodology for assessing the health status of coastal and estuarine ecosystems. ICES CM Documents 2010.
- Foucreau, N., Piscart, C., Puijalón, S. et Hervant, F. (2013) Effect of Climate-Related Change in Vegetation on Leaf Litter Consumption and Energy Storage by *Gammarus pulex* from Continental or Mediterranean Populations. PLoS ONE **8**(10): e77242.

G

- Galgani, F. (1985) Régulation de l'activité des protéases digestives de *Penaeus japonicus* Bate en relation avec la température. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **94**(1): 11-18.
- Galgani, F., Benyamin, Y. et Ceccaldi, H. (1984) Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forskål): A comparison with *Penaeus japonicus* Bate. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **78**(2): 355-361.
- Galgani, F., Benyamin, Y., Van Wormhoudt, A. et Cecaldi, J. (1983). Variations des activités digestives en fonction des facteurs du milieu chez les crustacés. Bases biologiques de l'aquaculture. Montpellier,, IFREMER. **1**: 277-292.
- Gamboa-delgado, J., Molina-poveda, C. et Cahu, C. (2003) Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. Aquaculture Research **34**(15): 1403-1411.
- Gao, F., Yang, H., Xu, Q., Wang, F. et Liu, G. (2009) Effect of water temperature on digestive enzyme activity and gut mass in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), with special reference to aestivation. Chinese Journal of Oceanology and Limnology **27**: 714-722.
- Garcia-Carreño, F. L. et Haard, N. F. (1993) Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus Planipes*) extracts. Journal of Food Biochemistry **17**(2): 97-113.
- Gates, B. et Travis, J. (1973) Purification and characterization of carboxypeptidases A and B from the white shrimp (*Penaeus setiferus*). Biochemistry **12**(10): 1867-1874.
- Gaudy, R. et Boucher, J. (1983) Relation between respiration, excretion (ammonia and inorganic phosphorus) and activity of amylase and trypsin in different species of pelagic copepods from an Indian Ocean equatorial area. Marine Biology **75**(1): 37-45.
- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G. et Charmantier-Daures, M. (2010) Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. Environmental Toxicology and Chemistry **29**(10): 2249-2259.
- Gerhardt, A. (1996) Behavioural early warning responses to polluted water. Environmental Science and Pollution Research **3**(2): 63-70.
- Gerhardt, A., Carlsson, A., Ressemann, C. et Stich, K. P. (1998) New online biomonitoring system for *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea): in situ test below a copper effluent in south Sweden. Environmental Science & Technology **32**(1): 150-156.
- Giesy, J., Denzer, S., Duke, C. et Dickson, G. (1981) Phosphoadenylate concentrations and energy charge in two freshwater crustaceans: Responses to physical and chemical stressors. Verh Internat Verein Limnol **21**: 205-220.
- Giesy, J., Duke, R., Bingham, R. et Denzer, S. (1978) Energy charges in several molluscs and crustaceans: natural values and responses to cadmium stress. Bull. ecol. Soc. Am **59**: 66.
- Giesy, J. P. et Dickson, G. W. (1981) The effect of season and location on phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge in two species of freshwater clams. Oecologia **49**(1): 1-7.

- Gildberg, A. (1988) Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **91**(3): 425-435.
- Giller, P. S. et Malmqvist, B. (1998). The biology of streams and rivers, Oxford University Press.
- Gilles, R., Anctil, M., Plumier, J.-C., Baguet, F., Charmantier, G., Gilles, R. J., Péqueux, A. et Sébert, P. (2006). Physiologie animale, De Boeck.
- Gismondi, E., Beisel, J.-N. et Cossu-Leguille, C. (2012a) Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. Environmental Research **118**: 47-52.
- Gismondi, E., Rigaud, T., Beisel, J.-N. et Cossu-Leguille, C. (2012b) Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a gammarid. Environmental Pollution **160**(0): 17-23.
- Gnaiger, E. (1983) Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. Polarographic oxygen sensors, Springer: 337-345.
- Gonzalez-Pena, M. d. C., Anderson, A. J., Smith, D. M. et Moreira, G. S. (2002) Effect of dietary cellulose on digestion in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture **211**(1): 291-303.
- González, M., López, D., Pérez, M. et Castro, J. (2002) Effect of temperature on the scope for growth in juvenile scallops *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquaculture International **10**(4): 339-348.
- Graf, F. (1964) Etude de la variation du calcium total au cours du cycle d'intermue chez les Crustacés Amphipodes *Gammarus pulex pulex* L. et *Orchestia gammarella* Pallas. Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences Serie III-Sciences de la Vie **259**: 2703-2705.
- Graf, F. et Michaut, P. (1980) Fine structure of the midgut posterior caeca in the crustacean *Orchestia* in intermolt: recognition of two distinct segments. Journal of Morphology **165**(3): 261-284.
- Graney, R. L. et Giesy Jr, J. P. (1986) Effects of long-term exposure to pentachlorophenol on the free amino acid pool and energy reserves of the freshwater amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* bousfield (crustacea, amphipoda). Ecotoxicology and Environmental Safety **12**(3): 233-251.
- Grassé, P. (1994a). Traité de Zoologie: Anatomie, Systématique, Biologie. Tome VII. Crustacés; fascicule I: Morphologie, Physiologie Paris Masson.
- Grassé, P. (1994b) Traité de Zoologie: Anatomie, Systématique, Biologie. Tome VII. Crustacés; fascicule I: Morphologie, Physiologie. Reproduction, Systématique. Paris, Masson, 917p.[Links].
- Gross, M. Y., Maycock, D. S., Thorndyke, M. C., Morrill, D. et Crane, M. (2001) Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. Environmental Toxicology and Chemistry **20**(8): 1792-1797.
- Guarna, M. M. et Borowsky, R. L. (1995) Biochemical properties of amylase isozymes from *Gammarus palustris*. A comparative study. Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology **112**(4): 619-628.
- Guerin, J. et Stickle, W. (1992) Effects of salinity gradients on the tolerance and bioenergetics of juvenile blue crabs (*Callinectes sapidus*) from waters of different environmental salinities. Marine Biology **114**(3): 391-396.

Guérin, J. P. et Kerambrun, P. (1982) Effets à court et moyen terme de chocs thermiques et influence de la cinétique de décroissance de la température consécutive au choc sur l'activité de la leucine aminopeptidase chez *Scolecopsis (Malacoceros) fuliginosa* Claparède (Annelida: Polychaeta). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **64**(3): 271-286.

Gutow, L., Strahl, J., Wiencke, C., Franke, H.-D. et Saborowski, R. (2006) Behavioural and metabolic adaptations of marine isopods to the rafting life style. Marine Biology **149**(4): 821-828.

H

Haeckel, J., Meijering, M. et Rusetzki, H. (1973) *Gammarus fossarum* Koch as a fallen leaf decomposer in forest streams: Schlitz production biological studies (5). (in German). Freshwater Biology **3**(3): 241-249.

Hagger, J. A., Jones, M. B., Lowe, D., Leonard, D., Owen, R. et Galloway, T. S. (2008) Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study. Marine Pollution Bulletin **56**(6): 1111-1118.

Han, X., Wang, R. et Wang, J. (2002) Digestive gut structure and activity of protease, amylase, and alkaline phosphatase in *Calanus sinicus* during summer in the Yellow Sea and the East China Sea. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **270**(2): 131-146.

Hassett, R. P. et Landry, M. R. (1983) Effects of food-level acclimation on digestive enzyme activities and feeding behavior of *Calanus pacificus*. Marine Biology **75**(1): 47-55.

Haya, K., Johnston, C. et Waiwood, B. (1980) Adenylate energy charge and ATPase activity in American lobster (*Homarus americanus*) from Belledune Harbour. Cadmium pollution of Belledune harbour, News Brunswick, Canada. Can Tech Rep Fish Aquat Sci **963**: 85-91.

Haya, K., Waiwood, B. et Johnston, D. (1983) Adenylate energy charge and ATPase activity of lobster (*Homarus americanus*) during sublethal exposure to zinc. Aquatic Toxicology **3**(2): 115-126.

Haya, K. et Waiwood, B. A. (1983) Adenylate energy charge and ATPase activity: potential biochemical indicators of sublethal effects caused by pollutants in aquatic animals. Advances in Environmental Science and Technology **13**: 307-333

Helson, J. G. et Gardner, J. P. (2007) Variation in scope for growth: a test of food limitation among intertidal mussels. Hydrobiologia **586**(1): 373-392.

Hohreiter, D. W., Reinert, R. E. et Bush, P. B. (1991) Effects of the insecticides carbofuran and fenvalerate on adenylate parameters in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology **21**(3): 325-331.

Holwerda, D. et Vonk, H. (1973) Emulsifiers in the intestinal juice of crustacea. Isolation and nature of surface-active substances from *Astacus leptodactylus* Esch. and *Homarus vulgaris* L. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **45**(1): 51-58.

Hsieh, M. S., Yin, L. J. et Jiang, S. T. (2008) Purification and characterization of the amylase from a small abalone *Haliotis sieboldii*. Fisheries Science **74**(2): 425-432.

Hynes, H. (1955) The reproductive cycle of some British freshwater Gammaridae. The Journal of Animal Ecology: 352-387.

I

- Ibarrola, I., Larretxea, X., Iglesias, J. I. P., Urrutia, M. B. et Navarro, E. (1998) Seasonal variation of digestive enzyme activities in the digestive gland and the crystalline style of the common cockle *Cerastoderma edule*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology **121**(1): 25-34.
- Icely, J. et Nott, J. (1980) Accumulation of copper within the "hepatopancreatic" caeca of *Corophium volutator* (Crustacea: Amphipoda). Marine Biology **57**(3): 193-199.
- Icely, J. et Nott, J. (1984) On the morphology and fine structure of the alimentary canal of *Corophium volutator* (Pallas)(Crustacea: Amphipoda). Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences: 49-78.
- Icely, J. et Nott, J. (1985) Feeding and digestion in *Corophium volutator* (Crustacea: Amphipoda). Marine Biology **89**(2): 183-195.
- Issartel, J., Hervant, F., Voituron, Y., Renault, D. et Vernon, P. (2005) Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigeal and hypogean crustaceans to different temperatures. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **141**(1): 1-7.
- Ivanina, A. V., Dickinson, G. H., Matoo, O. B., Bagwe, R., Dickinson, A., Beniash, E. et Sokolova, I. M. (2013) Interactive effects of elevated temperature and CO₂ levels on energy metabolism and biomineralization of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology.
- Ivanovici, A. M. (1980a) The adenylate energy charge in the estuarine mollusc, *Pyrazus ebeninus*. Laboratory studies of responses to salinity and temperature. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **66**(1): 43-55.
- Ivanovici, A. M. (1980b) Application of adenylate energy charge to problems of environmental impact assessment in aquatic organisms. Helgoländer Meeresuntersuchungen **33**(1-4): 556-565.

J

- Jeuniaux, C. (1963). Chitine et chitinolyse: un chapitre de la biologie moléculaire, Masson.
- Johnston, D. (2003) Ontogenetic changes in digestive enzyme activity of the spiny lobster, *Jasus edwardsii* (Decapoda; Palinuridae). Marine Biology **143**(6): 1071-1082.
- Johnston, D. et Freeman, J. (2005) Dietary Preference and Digestive Enzyme Activities as Indicators of Trophic Resource Utilization by Six Species of Crab. The Biological Bulletin **208**(1): 36-46.
- Johnston, D. J., Ritar, A. J. et Thomas, C. W. (2004) Digestive enzyme profiles reveal digestive capacity and potential energy sources in fed and starved spiny lobster (*Jasus edwardsii*) phyllosoma larvae. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **138**(2): 137-144.
- Johnston, M., Johnston, D. et Richardson, A. (2005) Digestive capabilities reflect the major food sources in three species of talitrid amphipods. Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology **140**(2): 251-257.
- Jones, D., Kumlu, M., Le Vay, L. et Fletcher, D. (1997) The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. Aquaculture **155**(1): 285-295.

K

- Kamarudin, M. S., Jones, D. A., le Vay, L. et Abidin, A. Z. (1994) Ontogenetic change in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture **123**(3): 323-333.
- Karaman, G. S. et Pinkster, S. (1977). Freshwater Gammarus species from Europe, north Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda), Commissie voor de artis bibliotheek.
- Kelly, D. W., Dick, J. T. et Montgomery, W. I. (2002) The functional role of Gammarus (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? Hydrobiologia **485**(1-3): 199-203.
- Knigge, T. et Köhler, H.-R. (2000) Lead impact on nutrition, energy reserves, respiration and stress protein (hsp 70) level in *Porcellio scaber* (Isopoda) populations differently preconditioned in their habitats. Environmental Pollution **108**(2): 209-217.
- Komnick, H. (1977) Chloride Cells and Chloride Epithelia of Aquatic Insects. International Review of Cytology **49**: 285-329.
- Koop, J. H., Winkelmann, C., Becker, J., Hellmann, C. et Ortmann, C. (2011) Physiological indicators of fitness in benthic invertebrates: a useful measure for ecological health assessment and experimental ecology. Aquatic Ecology **45**(4): 547-559.
- Kumlu, M. et Jones, D. (1997) Digestive protease activity in planktonic crustaceans feeding at different trophic levels. JMBA-Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **77**(1): 159-166.
- Kutlu, M., Düzen, A., Bayçu, C. et Özata, A. (2002) A transmission electron microscope investigation of the effect of lead acetate on the hepatopancreatic ceca of *Gammarus pulex*. Environmental Toxicology and Pharmacology **12**(3): 181-187.

L

- Labarta, U., Fernández-Reiriz, M., Navarro, J. et Velasco, A. (2002) Enzymatic digestive activity in epifaunal (*Mytilus chilensis*) and infaunal (*Mulinia edulis*) bivalves in response to changes in food regimes in a natural environment. Marine Biology **140**(4): 669-676.
- Lacaze, E. (2011) Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gammarus fossarum*: développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A. et Geffard, O. (2011) DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. Environmental Pollution **159**(6): 1682-1691.
- Ladewig, V., Jungmann, D., Köhler, H.-R., Schirling, M., Triebkorn, R. et Nagel, R. (2006) Population structure and dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) upstream and downstream from effluents of sewage treatment plants. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **50**(3): 370-383.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J. et Ramade, F. (1998). Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement, Tec & Doc-Lavoisier.
- Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F. et Amiard, J. C. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie: aspects fondamentaux Paris, Masson.

- Le Bihan, E., Perrin, A. et Koueta, N. (2004) Development of a bioassay from isolated digestive gland cells of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda): effect of Cu, Zn and Ag on enzyme activities and cell viability. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **309**(1): 47-66.
- Le Bras, S. (1995) Adenosine energy charge (AEC) for *Asellus aquaticus* L. (Crustacea, Isopoda) after lindane contamination during a period of 48 h. Revue des sciences de l'eau/journal of water science. Paris **8**(4): 493-503.
- Le Gal, Y., Lagadic, L., Le Bras, S. et Caquet, T. (1997) Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux. L. Lagadic, Caquet, T., Amiadr, J.-C. and Ramade, F. Paris, Masson Editeur. **Collection d'Ecologie**: 241-285.
- Le Vay, L., Jones, D., Puello-Cruz, A., Sangha, R. et Ngamphongsai, C. (2001) Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **128**(3): 621-628.
- Lebrun, J., Perret, M., Geffard, A. et Gourlay-Francé, C. (2012) Modelling copper bioaccumulation in *Gammarus pulex* and alterations of digestive metabolism. Ecotoxicology **21**(7): 2022-2030.
- Lévêque, C. (1996). Ecosystèmes aquatiques Paris, Hachette.
- Li, N., Zhao, Y. et Yang, J. (2008) Effects of Water-Borne Copper on Digestive and Metabolic Enzymes of the Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **55**(1): 86-93.
- Liess, M. et Schulz, R. (1999) Linking insecticide contamination and population response in an agricultural stream. Environmental Toxicology and Chemistry **18**(9): 1948-1955.
- Lovett, D. L. et Felder, D. L. (1990a) Ontogenetic Change in Digestive Enzyme Activity of Larval and Postlarval White Shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). The Biological Bulletin **178**(2): 144-159.
- Lovett, D. L. et Felder, D. L. (1990b) Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). The Biological Bulletin **178**(2): 160-174.
- Lowe, D. et Clarke, K. (1989) Contaminant-induced changes in the structure of the digestive epithelium of *Mytilus edulis*. Aquatic Toxicology **15**(4): 345-358.

M

- MacNeil, C. (1997). The ecology of freshwater amphipods: a study of invasive and native species, Queen's University of Belfast.
- Macneil, C., Dick, J. T. A. et Elwood, R. W. (1997) The Trophic ecology of freshwater gammarus spp. (crustacea: amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. Biological Review **72**(3): 349-364.
- Macneil, C., Dick, J. T. A. et Elwood, R. W. (1999) The dynamics of predation on Gammarus spp. (Crustacea: Amphipoda). Biological Reviews **74**(4): 375-395.
- Maltby, L. (1994) Stress, shredders and streams: using Gammarus energetics to assess water quality. Water quality & stress indicators in marine and freshwater systems: linking levels of organisation. D. W. Sutcliffe, Freshwater Biological Association. **4**: pp. 98-110.

- Maltby, L. (1995) Sensitivity of the crustaceans *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) to short-term exposure to hypoxia and unionized ammonia: Observations and possible mechanisms. Water Research **29**(3): 781-787.
- Maltby, L., Clayton, S. A., Wood, R. M. et McLoughlin, N. (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**(2): 361-368.
- Maltby, L. et Hills, L. (2008) Spray drift of pesticides and stream macroinvertebrates: Experimental evidence of impacts and effectiveness of mitigation measures. Environmental Pollution **156**(3): 1112-1120.
- Maltby, L. et Naylor, C. (1990) Preliminary observations on the ecological relevance of the *Gammarus* scope for growth assay: effect of zinc on reproduction. Functional Ecology: 393-397.
- Maltby, L., Naylor, C. et Calow, P. (1990) Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate. Ecotoxicology and Environmental Safety **19**(3): 292-300.
- Marazza, D., Bornens, P. et Le Gal, Y. (1996) Effect of Ammonia on Survival and Adenylate Energy Charge in the Shrimp *Palaemonetes varians*. Ecotoxicology and Environmental Safety **34**(2): 103-108.
- Martin, A. (1965) The histochemistry of the moulting cycle in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda). Proceedings of the Zoological Society of London **147**(2): 185-200.
- Maund, S., Taylor, E. et Pascoe, D. (1992) Population responses of the freshwater amphipod crustacean *Gammarus pulex* (L.) to copper. Freshwater Biology **28**(1): 29-36.
- Mazurová, E., Hilscherová, K., Šídllová-Štěpánková, T., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., Jungmann, D., Giesy, J. P. et Bláha, L. (2010) Chronic toxicity of contaminated sediments on reproduction and histopathology of the crustacean *Gammarus fossarum* and relationship with the chemical contamination and in vitro effects. Journal of Soils and Sediments **10**(3): 423-433.
- McCahon, C., Maund, S. et Poulton, M. (1991) The effect of the acanthocephalan parasite (*Pomphorhynchus laevis*) on the drift of its intermediate host (*Gammarus pulex*). Freshwater Biology **25**(3): 507-513.
- McCahon, C. et Pascoe, D. (1988) Culture techniques for three freshwater macroinvertebrate species and their use in toxicity tests. Chemosphere **17**(12): 2471-2480.
- McClintock, J. B., Klinger, T. S., Marion, K. et Hsueh, P. (1991) Digestive carbohydrases of the blue crab *Callinectes sapidus* (Rathbun): implications in utilization of plant-derived detritus as a trophic resource. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **148**(2): 233-239.
- McGrath, C. C. et Matthews, R. A. (2000) Cellulase activity in the freshwater amphipod *Gammarus lacustris*. Journal of the North American Benthological Society **19**(2): 298-307.
- Minguez, L., Buronfosse, T., Beisel, J.-N. et Giambérini, L. (2012) Parasitism can be a confounding factor in assessing the response of zebra mussels to water contamination. Environmental Pollution **162**(0): 234-240.
- Minguez, L., Meyer, A., Molloy, D. P. et Giambérini, L. (2009) Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Importance in ecotoxicological studies. Environmental Research **109**(7): 843-850.

- Moal, J., Le Coz, J., Samain, J. et Daniel, J. (1991) Adenylate energy charge: a possible trophic index for management of oyster intensive aquaculture. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology **100**(1): 201-205.
- Moal, J., Samain, J.-F., Bodoy, A. et Le Coz, J.-R. (1987) Approche de l'état physiologique de l'huître creuse *Crassostrea gigas* au cours d'un cycle saisonnier à Marennes-Oléron. Haliotis **16**: 497-511.
- Moal, J., Samain, J.-F., Le Coz, J.-R. et Daniel, J.-Y. (1989) Responses and adaptations of the adenylate energy charge and digestive enzyme activities to tidal emersion of *Crassostrea gigas* populations in Marennes-Oleron Bay. Scientia Marina **53**(2-3): 699-704.
- Monk, D. C. (1977) The digestion of cellulose and other dietary components, and pH of the gut in the amphipod *Gammarus pulex* (L.). Freshwater Biology **7**(5): 431-440.
- Moolman, L., Van Vuren, J. H. J. et Wepener, V. (2007) Comparative studies on the uptake and effects of cadmium and zinc on the cellular energy allocation of two freshwater gastropods. Ecotoxicology and Environmental Safety **68**(3): 443-450.
- Moore, P. G. et Rainbow, P. (1984) Ferritin crystals in the gut caeca of *Stegocephaloides christianiensis* Boeck and other Stegocephalidae (Amphipoda: Gammaridea): a functional interpretation. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences: 219-245.
- Moritz, K. V., Storch, V. et Buchheim, W. (1973) Zur Feinstruktur der Mitteldarmanhänge von Peracarida (Mysidacea, Amphipoda, Isopoda). Cytobiologie **8**: 39-54.
- Mosleh, Y. Y., Paris-Palacios, S., Ahmed, M. T., Mahmoud, F., Osman, M. et Biagiatti-Risbourg, S. (2007) Effects of chitosan on oxidative stress and metallothioneins in aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae). Chemosphere **67**(1): 167-175.
- Mosleh, Y. Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, M., Biagiatti-Risbourg, S. et Vernet, G. (2005) Metallothionein induction, antioxidative responses, glycogen and growth changes in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) exposed to the fungicide, fenhexamid. Environmental Pollution **135**(1): 73-82.
- Moss, S., Divakaran, S. et Kim, B. (2001) Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture Research **32**(2): 125-131.
- Mouneyrac, C., Perrein-Ettajani, H. et Amiard-Triquet, C. (2010) Influence of anthropogenic stress on fitness and behaviour of a key-species of estuarine ecosystems, the ragworm *Nereis diversicolor*. Environmental Pollution **158**(1): 121-128.
- Muhlia-Almazan, A. et García-Carreño, F. L. (2002) Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology **133**(3): 383-394.
- Muhlia-Almazán, A., Sánchez-Paz, A. et García-Carreño, F. (2008) Invertebrate trypsins: a review. Journal of Comparative Physiology B **178**(6): 655-672.
- Musko, I. (1988) Ultrastructural studies on the alimentary tract of *Eudiaptomus gracilis* (Copepoda, Calanoida). Zoologischer Anzeiger **220**(3-4): 152-162.
- Muysen, B. et Janssen, C. (2001) Zinc acclimation and its effect on the zinc tolerance of *Raphidocelis subcapitata* and *Chlorella vulgaris* in laboratory experiments. Chemosphere **45**(4): 507-514.

Muyssen, B. T., Janssen, C. R. et Bossuyt, B. T. (2002) Tolerance and acclimation to zinc of field-collected *Daphnia magna* populations. Aquatic Toxicology **56**(2): 69-79.

Muzzarelli, R. A. (1977). Chitin, Pergamon Press New York.

N

Nassiri, Y., Rainbow, P. S., Amiard-Triquet, C., Rainglet, F. et Smith, B. D. (2000) Trace-metal detoxification in the ventral caeca of *Orchestia gammarellus* (Crustacea: Amphipoda). Marine Biology **136**(3): 477-484.

Navarrete del Toro, M. d. I. A., García-carreño, F., López, M. D., Celis-guerrero, L. et Saborowski, R. (2006) Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans. Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology **305**(8): 645-654.

Navarro, J., Leiva, G., Martinez, G. et Aguilera, C. (2000) Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **247**(1): 67-83.

Naylor, C., Maltby, L. et Calow, P. (1989) Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore. Hydrobiologia **188-189**(1): 517-523.

Nilsson, L. M. (1974) Energy budget of a laboratory population of *Gammarus pulex* (Amphipoda). Oikos **25**(1): 35-42.

Normant, M. et Lamprecht, I. (2006) Does scope for growth change as a result of salinity stress in the amphipod *Gammarus oceanicus*? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **334**(1): 158-163.

Nygård, H., Wallenschus, J., Camus, L., Varpe, Ø. et Berge, J. (2010) Annual routines and life history of the amphipod *Onisimus litoralis*: seasonal growth, body composition and energy budget. Marine Ecology Progress Series **417**: 115-126.

O

O'Connor, J. D. et Gilbert, L. I. (1968) Aspects of lipid metabolism in crustaceans. American Zoologist **8**(3): 529-539.

Obrdlík, P. (1972) A population of *Rivulogammarus fossarum* Koch (Amphipoda) in a small fishless stream. Hydrobiologia **40**(2): 279-295.

Olsen, G. H., Carroll, J., Sva, E. et Camus, L. (2008) Cellular energy allocation in the Arctic sea ice amphipod *Gammarus wilkitzkii* exposed to the water soluble fractions of oil. Marine Environmental Research **66**(1): 213-214.

Olsen, G. H., Sva, E., Carroll, J., Camus, L., De Coen, W., Smolders, R., Øveraas, H. et Hylland, K. (2007) Alterations in the energy budget of Arctic benthic species exposed to oil-related compounds. Aquatic Toxicology **83**(2): 85-92.

Ong, B. L. et Johnston, D. (2006) Influence of feeding on hepatopancreas structure and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. Journal of Shellfish Research **25**(1): 113-121.

P

- Palais, F., Dedourge-Geffard, O., Beaudon, A., Pain-Devin, S., Trapp, J., Geffard, O., Noury, P., Gourlay-Francé, C., Uher, E., Mouneyrac, C., Biagianti-Risbourg, S. et Geffard, A. (2012) One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Ecotoxicology **21**(3): 888-905.
- Palais, F., Jubeaux, G., Dedourge-Geffard, O., Giambérini, L., Biagianti-Risbourg, S. et Geffard, A. (2010) Amylolytic and cellulolytic activities in the cristalline style and the digestive diverticulae of the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas,1771). Molluscan Research **30**: 29-36.
- Palais, F., Mouneyrac, C., Dedourge-Geffard, O., Giambérini, L., Biagianti-Risbourg, S. et Geffard, A. (2011) One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Chemosphere **83**(8): 1062-1073.
- Papathanassiou, E. et King, P. (1986) Ultrastructural changes in hepatopancreatic cells of the prawn *Palaemon serratus* induced by exposure to acutely toxic cadmium concentrations. Diseases of Aquatic Organisms **2**(1): 39-47.
- Pascoe, D., Kedwards, T., Blockwell, S. et Taylor, E. (1995) *Gammarus pulex* (L.) feeding bioassay - effects of parasitism. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **55**(4): 629-632.
- Pavasovic, M., Richardson, N. A., Anderson, A. J., Mann, D. et Mather, P. B. (2004) Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab, *Scylla serrata*. Aquaculture **242**(1): 641-654.
- Picado, A. et Le Gal, Y. (1990) Assessment of industrial sewage impacts by adenylate energy charge measurements in the bivalve *Cerastoderma edule*. Ecotoxicology and Environmental Safety **19**(1): 1-7.
- Plaistow, S. J., Bollache, L. et Cézilly, F. (2003) Energetically costly precopulatory mate guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences. Animal Behaviour **65**(4): 683-691.
- Plaistow, S. J., Troussard, J. P. et Cézilly, F. (2001) The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. International Journal for Parasitology **31**(4): 346-351.
- Pöckl, M. (1992) Effects of temperature, age and body size on moulting and growth in the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. Freshwater Biology **27**(2): 211-225.
- Pöckl, M. et Humpesch, U. (1990) Intra-and inter-specific variations in egg survival and brood development time for Austrian populations of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda). Freshwater Biology **23**(3): 441-455.
- Prenter, J., MacNeil, C., Dick, J. T., Riddell, G. E. et Dunn, A. M. (2004) Lethal and sublethal toxicity of ammonia to native, invasive, and parasitised freshwater amphipods. Water Research **38**(12): 2847-2850.

R

- Rainer, S., Ivanovici, A. et Wadley, V. (1979) Effect of reduced salinity on adenylate energy charge in three estuarine molluscs. Marine Biology **54**(1): 91-99.
- Ramade, F. (2007). Introduction à l'écotoxicologie: fondements et applications, Tec & Doc.

- Ribeiro, S., Sousa, J., Nogueira, A. et Soares, A. (2001) Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety **49**(2): 131-138.
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J. et Zauke, G.-P. (2000) Crustaceans as bioindicators. Environmental Research Forum **9**: 161-197.
- Roast, S., Widdows, J. et Jones, M. (1999) Scope for growth of the estuarine mysid *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea): effects of the organophosphate pesticide chlorpyrifos. Marine Ecology Progress Series **191**: 233-241.
- Robinson, A. G. et Dillaman, R. M. (1985) The effects of naphthalene on the ultrastructure of the hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca minax*. Journal of Invertebrate Pathology **45**(3): 311-323.
- Rodriguez, A., Le Vay, L., Mourente, G. et Jones, D. (1994) Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. Marine Biology **118**(1): 45-51.
- Rosa, R. et Nunes, M. (2002) Biochemical changes during the reproductive cycle of the deep-sea decapod *Nephrops norvegicus* on the south coast of Portugal. Marine Biology **141**(6): 1001-1009.
- Rosa, R. et Nunes, M. (2003) Tissue biochemical composition in relation to the reproductive cycle of deep-sea decapod *Aristeus antennatus* in the Portuguese south coast. Journal of the Marine Biological Association of the UK **83**(05): 963-970.
- Roux, A. (1970) Le cycle de reproduction de deux espèces étroitement parentes de Crustacés Amphipodes: *Gammarus pulex* et *G. fossarum*. Ann. Limnol **6**(1): 27-49.

S

- Saffo, M. B. (1992) Invertebrates in endosymbiotic associations. American Zoologist **32**(4): 557-565.
- Sancho, E., Villarroel, M., Andreu, E. et Ferrando, M. (2009) Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. Chemosphere **74**(9): 1171-1178.
- Sarà, G., Romano, C., Widdows, J. et Staff, F. (2008) Effect of salinity and temperature on feeding physiology and scope for growth of an invasive species (*Brachidontes pharaonis*-Mollusca: Bivalvia) within the Mediterranean sea. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **363**(1): 130-136.
- Scheil, V., Triebkorn, R. et Köhler, H.-R. (2008) Cellular and stress protein responses to the UV Filter 3-benzylidene camphor in the amphipod crustacean *Gammarus fossarum* (Koch 1835). Archives of Environmental Contamination and Toxicology **54**(4): 684-689.
- Schill, R. O. et Köhler, H.-R. (2004) Does the environment or the source of the population define stress status and energy supply in the freshwater amphipod, *Gammarus fossarum*? Ecotoxicology **13**(7): 683-695.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebkorn, R. et Köhler, H.-R. (2005) Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **49**(1): 53-61.
- Schmitz, E. (1992) Amphipoda. Microscopic anatomy of invertebrates **9**: 443-528.

- Schmitz, E. H. (1967) Visceral anatomy of *Gammarus lacustris lacustris* Sars (Crustacea: Amphipoda). American Midland Naturalist: 1-54.
- Schmitz, E. H. et Scherrey, P. M. (1983) Digestive anatomy of *Halella azteca* (Crustacea, Amphipoda). Journal of Morphology **175**(1): 91-100.
- Schultz, T. W. (1976) The ultrastructure of the hepatopancreatic caeca of *Gammarus minus* (Crustacea, Amphipoda). Journal of Morphology **149**(3): 383-399.
- Schulz, R. et Liess, M. (1999) A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. Aquatic Toxicology **46**(3): 155-176.
- Selye, H. (1976). Stress in health and disease, Butterworths Boston.
- Serrano Jr, A. E. (2012) Ontogeny of endogenous and exogenous amylase and total protease activities in mud crab, *Scylla serrata* larvae fed live food. European Journal of Experimental Biology **2**(5): 1578-1584.
- Serrano Jr, A. E. (2013) Trypsin and leucine aminopeptidase activity contribution of live food to the developing mud crab (*Scylla serrata*) larvae. European Journal of Zoological Research **2**(2): 10-14.
- Skjoldal, H. R. et Bakke, T. (1978) Relationship between ATP and energy charge during lethal metabolic stress of the marine isopod *Cirolana borealis*. Journal of Biological Chemistry **253**(10): 3355-3356.
- Smolders, R., Baillieul, M. et Blust, R. (2005) Relationship between the energy status of *Daphnia magna* and its sensitivity to environmental stress. Aquatic Toxicology **73**(2): 155-170.
- Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W. et Blust, R. (2004) Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. Environmental Pollution **129**(1): 99-112.
- Sobral, P. et Widdows, J. (1997) Effects of elevated temperatures on the scope for growth and resistance to air exposure of the clam *Ruditapes decussatus* (L.), from southern Portugal. Scientia Marina **61**: 163-171.
- Sornom, P., Felten, V., Médoc, V., Sroda, S., Rousselle, P. et Beisel, J.-N. (2010) Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. Environmental Pollution **158**(5): 1288-1295.
- Sova, V., Elyakova, L. et Vaskovsky, V. (1970) The distribution of laminarinases in marine invertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology **32**(3): 459-464.
- Sroda, S. et Cossu-Leguille, C. (2011a) Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor? Ecotoxicology **20**(1): 264-273.
- Sroda, S. et Cossu-Leguille, C. (2011b) Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. Chemosphere **83**(4): 538-544.
- Stelzer, R. S. et Joachim, B. L. (2010) Effects of elevated nitrate concentration on mortality, growth, and egestion rates of *Gammarus pseudolimnaeus* amphipods. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **58**(3): 694-699.
- Storch, V. et Burkhardt, P. (1984) Influence of nutritional stress on the hepatopancreas of *Talitrus saltator* (Peracarida, Amphipoda). Helgoländer Meeresuntersuchungen **38**(1): 65-73.

- Stuart, V., Head, E. et Mann, K. (1985) Seasonal changes in the digestive enzyme levels of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas) in relation to diet. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **88**(3): 243-256.
- Stuhlbacher, A. et Maltby, L. (1992) Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). Archives of Environmental Contamination and Toxicology **22**(3): 319-324.
- Sutcliffe, D. (1984) Quantitative aspects of oxygen uptake by *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): a critical review. Freshwater Biology **14**(5): 443-489.
- Sutcliffe, D., Carrick, T. et Willoughby, L. (1981) Effects of diet, body size, age and temperature on growth rates in the amphipod *Gammarus pulex*. Freshwater Biology **11**(2): 183-214.
- Sutcliffe, D. W. (1992) Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): basic processes. Freshwater Forum **2**(2): 102-128.
- Sutcliffe, D. W. (1993) Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): female strategies. Freshwater Forum **3**(1): 26-64.
- Sylvestre, C., Batrel, Y. et Legal, Y. (1985) La detection des effets subletaux des pollutions: Utilisation in situ d'un indice biochimique, la charge energetique. La Baie de Seine. Colloque National du CNRS, 24-26 avril 1985.

T

- Tanimura, A., Liu, W., Yamada, K., Kishida, T. et Toyohara, H. (2013) Animal cellulases with a focus on aquatic invertebrates. Fisheries Science **79**(1): 1-13.
- Taylor, E., Maund, S., Bennett, D. et Pascoe, D. (1994) Effects of 3, 4-dichloroaniline on the growth of two freshwater macroinvertebrates in a stream mesocosm. Ecotoxicology and Environmental Safety **29**(1): 80-85.
- Thébault, M.-T., Bernicard, A. et Le Gal, Y. (1980) Effect of acclimation on lactate dehydrogenase activity in *Palaemon serratus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **65**(2): 357-361.
- Thompson, R. (1984) Production, reproductive effort, reproductive value and reproductive cost in a population of the blue mussel *Mytilus edulis* from a subarctic environment. Marine ecology. Progress series **16**(3): 249-257.
- Trellu, J. et Ceccaldi, H. (1976) Les esterase de *Palaemon serratus*. J. Rech. Oceanogr **1**: 29-31.
- Trellu, J. et Ceccaldi, H. J. (1980) Influence de la température sur quelques activités enzymatiques chez *Palaemon serratus*. Biochemical Systematics and Ecology **8**(2): 171-179.
- Truhaut, R. (1977) Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. Ecotoxicology and Environmental Safety **1**(2): 151-173.
- Tsangaris, C., Papathanasiou, E. et Cotou, E. (2007) Assessment of the impact of heavy metal pollution from a ferro-nickel smelting plant using biomarkers. Ecotoxicology and Environmental Safety **66**(2): 232-243.
- Tsao, C.-Y., Pan, Y.-Z. et Jiang, S.-T. (2003) Purification and characterization of amylases from small abalone (*Sulculus diversicolor aquatilis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(4): 1064-1070.

U

USEPA (2004). Generic Ecological Assessment Endpoints (GEAE) for Ecological Risk Assessment. Risk Assessment Forum. Washington, DC, U.S. Environmental Protection Agency: 59.

V

Van der Oost, R., Beyer, J. et Vermeulen, N. P. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology **13**(2): 57-149.

Van Handel, E. (1985a) Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. Journal of the American Mosquito Control Association **1**(3): 299-301.

Van Handel, E. (1985b) Rapid determination of total lipids in mosquitoes. Journal of the American Mosquito Control Association **1**(3): 302-304.

Van Praët, M. (1982) Amylase and trypsin-and chymotrypsin-like proteases from *Actinia equina* L.; Their role in the nutrition of this sea anemone. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **72**(3): 523-528.

Van Weel, P. (1960) On the secretion of digestive enzymes by the marine crab, *Thalamita crenata*. Zeitschrift für vergleichende Physiologie **43**(6): 567-577.

Van Wormhoudt, A. (1977) Activités enzymatiques digestives chez *Palaemon serratus*: Variations annuelles de l'acrophase des rythmes circadiens. Biochemical Systematics and Ecology **5**(4): 301-307.

Van Wormhoudt, A. (1980) Régulation d'activité de l' α -Amylase à différentes températures d'adaptation et en fonction de l'ablation des pédoncules oculaires et du stade de mue chez *Palaemon serratus*. Biochemical Systematics and Ecology **8**(2): 193-203.

Van Wormhoudt, A. (1983) Variations immunoquantitatives de l' α amylase au cours du cycle d'intermue à différentes saisons chez *Palaemon serratus* (Crustacea: Decapoda: Natantia). Marine Biology **74**(2): 127-132.

Van Wormhoudt, A., Bourreau, G. et Le Moullac, G. (1995) Amylase polymorphism in Crustacea Decapoda: electrophoretic and immunological studies. Biochemical Systematics and Ecology **23**(2): 139-149.

Van Wormhoudt, A. et Malcoste, R. (1976) Influence d'éclaircements brefs, à différentes longueurs d'onde, sur les variations circadiennes des activités enzymatiques digestives chez *Palaemon serratus* (Crustacea, Natantia). Journal of Interdisciplinary Cycle Research **7**(2): 101-111.

Vandenbrouck, T., Soetaert, A., van der Ven, K., Blust, R. et De Coen, W. (2009) Nickel and binary metal mixture responses in *Daphnia magna* : Molecular fingerprints and (sub) organismal effects. Aquatic Toxicology **92**(1): 18-29.

Vasseur, P. et Cossu-Leguille, C. (2003) Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. Environment International **28**(8): 711-717.

Vega-Villasante, F., Fernández, I., Preciado, R. M., Oliva, M., Tovar, D. et Nolasco, H. (1999) The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Ordway, 1863 (Crustacea: Decapoda: Portunidae). Bulletin of Marine Science **65**(1): 1-9.

- Vega-Villasante, F., Nolasco, H. et Civera, R. (1993) The digestive enzymes of the pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*: I-Properties of amylase activity in the digestive tract. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **106**(3): 547-550.
- Verschraegen, K., Herman, P., Van Gansbeke, D. et Braeckman, A. (1985) Measurement of the adenylate energy charge in *Nereis diversicolor* and *Nephtys sp.*(Polychaeta: Annelida): evaluation of the usefulness of AEC in pollution monitoring. Mar. Biol **86**: 233-240.
- Verslycke, T., Ghekiere, A. et Janssen, C. R. (2004a) Seasonal and spatial patterns in cellular energy allocation in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) of the Scheldt estuary (The Netherlands). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **306**(2): 245-267.
- Verslycke, T. et Janssen, C. R. (2002) Effects of a changing abiotic environment on the energy metabolism in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **279**(1-2): 61-72.
- Verslycke, T., Roast, S. D., Widdows, J., Jones, M. B. et Janssen, C. R. (2004b) Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **306**(1): 1-16.
- Verslycke, T., Vercauteren, J., Devos, C., Moens, L., Sandra, P. et Janssen, C. R. (2003) Cellular energy allocation in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following tributyltin exposure. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **288**(2): 167-179.
- Vetter, R. D., Hwang, H.-M. et Hodson, R. E. (1986) Comparison of glycogen and adenine nucleotides as indicators of metabolic stress in mummichogs. Transactions of the American Fisheries Society **115**(1): 47-51.
- Viarengo, A. et Canesi, L. (1991) Mussels as biological indicators of pollution. Aquaculture **94**(2): 225-243.
- Vinagre, A. S., Nunes do Amaral, A. P., Ribarcki, F. P., Fraga da Silveira, E. et Périco, E. (2007) Seasonal variation of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú Beach (Brazil). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **146**(4): 514-519.
- Vogt, G. (1987) Monitoring of environmental pollutants such as pesticides in prawn aquaculture by histological diagnosis. Aquaculture **67**(1): 157-164.

W

- Wang, W.-N., Wang, A.-L., Liu, Y., Xiu, J., Liu, Z.-B. et Sun, R.-Y. (2006) Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp *Macrobrachium nipponense*. Aquaculture **256**(1): 624-630.
- Wang, W.-N., Wang, A.-L., Wang, D.-M., Wang, L.-P., Liu, Y. et Sun, R.-Y. (2003) Calcium, phosphorus and adenylate levels and Na⁺-K⁺-ATPase activities of prawn, *Macrobrachium nipponense*, during the moult cycle. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology **134**(2): 297-305.
- Watts, M. M., Pascoe, D. et Carroll, K. (2001) Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens. Water Research **35**(10): 2347-2352.

- Watts, M. M., Pascoe, D. et Carroll, K. (2002) Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 α -ethinylestradiol. Environmental Toxicology and Chemistry **21**(2): 445-450.
- Weeks, J. M. (1992) Copper-rich granules in the ventral caeca of talitrid amphipods (Crustacea; Amphipoda: Talitridae). Ophelia **36**(2): 119-133.
- Welton, J. (1979) Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. Freshwater Biology **9**(3): 263-275.
- Widdows, J., Donkin, P., Staff, F. J., Matthiessen, P., Law, R. J., Allen, Y. T., Thain, J. E., Allchin, C. R. et Jones, B. R. (2002) Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea. Marine Environmental Research **53**(4): 327-356.
- Widdows, J. et Johnson, D. (1988) Physiological energetics of *Mytilus edulis*: scope for growth. Marine Ecology Progress Series **46**(1): 113-121.
- Widdows, J., Nasci, C. et Fossato, V. U. (1997) Effects of pollution on the scope for growth of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy. Marine Environmental Research **43**(1): 69-79.
- Wijsman, T. C. (1976) Adenosine phosphates and energy charge in different tissues of *Mytilus edulis* L. under aerobic and anaerobic conditions. Journal of Comparative Physiology **107**(2): 129-140.
- Willoughby, L. et Sutcliffe, D. (1976) Experiments on feeding and growth of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) related to its distribution in the River Duddon. Freshwater Biology **6**(6): 577-586.
- Wu, H., Xuan, R., Li, Y., Zhang, X., Wang, Q. et Wang, L. (2013) Effects of cadmium exposure on digestive enzymes, antioxidant enzymes, and lipid peroxidation in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. Environmental Science and Pollution Research **20**:4085-4092.
- Wu, R. S. et Or, Y. (2005) Bioenergetics, growth and reproduction of amphipods are affected by moderately low oxygen regimes. Marine Ecology Progress Series **297**: 215-223.

X

- Xuereb, B. (2009). Développement de marqueurs de neurotoxicité et de perturbations endocrines chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum* Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz.

Y

- Yan, T., Teo, L. H. et Sin, Y. M. (1996) Effects of Metals on α -Amylase Activity in the Digestive Gland of the Green Mussel, *Perna viridis*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **56**(4): 677-682.

Z

- Zambare, S. et Mahajan, A. (2001) Heavy Metal (Copper and Mercury) Induced Alterations in the Enzyme Secretory Activity of Hepatopancreas of a Freshwater Bivalve *Corbicula striatella*. Pollution Research **20**(1): 143-146.

- Zaroogian, G., Gentile, J., Heltshe, J., Johnson, M. et Ivanovici, A. (1982) Application of adenine nucleotide measurements for the evaluation of stress in *Mytilus edulis* and *Crassostrea virginica*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **71**(4): 643-649.
- Zaroogian, G. et Johnson, M. (1989a) Application of adenylate energy charge and adenine nucleotide measurements as indicators of stress in *Nephtys incisa* treated with dredged material. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **43**(2): 261-270.
- Zaroogian, G. E. et Johnson, M. (1989b) Adenylate energy charge and adenine nucleotide measurements as indicators of stress in the mussel, *Mytilus edulis*, treated with dredged material under laboratory conditions. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **43**(3): 428-435.
- Zilli, L., Schiavone, R., Scordella, G., Zonno, V., Verri, T., Storelli, C. et Vilella, S. (2003) Changes in cell type composition and enzymatic activities in the hepatopancreas of *Marsupenaeus japonicus* during the moulting cycle. Journal of Comparative Physiology B **173**(4): 355-363.
- Zimmer, M. et Bartholmé, S. (2003) Bacterial endosymbionts in *Asellus aquaticus* (Isopoda) and *Gammarus pulex* (Amphipoda) and their contribution to digestion (Amphipoda) and their contribution to digestion. Limnology and Oceanography **48**(6): 2208-2213.
- Zivic, I. et Markovic, Z. (2007) Distribution of the species *Gammarus balcanicus* and *Gammarus fossarum* on the territory of Serbia (central part of the Balkan peninsula). Crustaceana **80**(1): 67-76.

RESUME

Dans le cadre de l'évaluation de la qualité des écosystèmes aquatiques, les réponses en lien avec l'énergie semblent particulièrement pertinentes pour appréhender l'état physiologique des êtres vivants et prévoir des effets populationnels. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été de proposer un biomarqueur de l'assimilation de l'énergie chez un amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. La caractérisation des activités enzymatiques digestives (amylase, cellulase et trypsine) et des réserves énergétiques (glycogène, lipides et protéines) soumises à l'influence de divers facteurs biotiques et abiotiques (sexe, stade reproducteur, température, conductivité et quantité de nourriture) a permis d'identifier l'amplitude des réponses étudiées afin d'améliorer l'interprétation des réponses obtenues en milieu naturel. Ces résultats ont également validé l'utilisation d'organismes mâles standardisés et nourris *ad libitum* dans le cadre d'approche active. D'autre part, la pertinence écologique des enzymes digestives en tant que biomarqueur a été évaluée en étudiant le lien existant entre une perturbation des réponses enzymatiques digestives au niveau sub-individuel et ses conséquences au niveau individuel sur le succès reproducteur des gammarides. Par ailleurs, dans le cadre de deux campagnes de terrain, les mesures des activités enzymatiques digestives réalisées chez les organismes transplantés ont permis de discriminer les sites en fonction de leur qualité chimique et de proposer pour chaque marqueur une valeur référence et seuil traduisant un effet. Ainsi, les activités enzymatiques digestives peuvent être utilisées comme outil pour établir un diagnostic de risque environnemental.

MOTS-CLES : biomarqueurs, métabolisme énergétique, enzymes digestives, *Gammarus fossarum*

Biomarkers linked to energy metabolism in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* : Development, link with reproductive success and *in situ* approach

ABSTRACT

For the assessment of the aquatic ecosystems health, responses related to energy metabolism seem particularly relevant to understanding the physiological state of living organisms and provide population effects. In this context, the objective of this work was to propose a biomarker of energy assimilation in a freshwater amphipod *Gammarus fossarum*. The characterization of digestive enzymes activities (amylase, cellulase and trypsin) and energy reserves (glycogen, lipids and proteins) submitted to the influence of various biotic and abiotic factors (sex, reproductive stage, temperature, conductivity and amount of food) determine the range of responses studied to improve the interpretation of data obtained in the field. These results can also validate the use of standardized male fed *ad libitum* in caging approach. On the other hand, the ecological relevance of digestive enzymes was assessed, the link between digestive enzyme impairments at sub-individual level and its consequences on the fitness of the gammarid population at individual level was established. Furthermore, in the context of two field campaigns, measures of digestive enzyme activities in organisms transplanted allowed to discriminate sites according to their chemical quality and to propose for each marker a benchmark and a threshold value reflecting an effect. Thus, digestive enzyme activities can be used as diagnostic tool for environmental risk assessment.

KEYWORDS : biomarkers, energy metabolism, digestive enzymes, *Gammarus fossarum*

DISCIPLINE : Ecotoxicologie

UMR-I 02 SEBIO

Unité Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques
BP 1039 - 51687 REIMS - Cedex 2 France

