**HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES**

**Université Claude Bernard Lyon 1**

# Proposition d'une espèce bio-indicatrice, *Gammarus fossarum* :

# Démarches, méthodes et outils pour diagnostiquer et comprendre la contamination chimique et la toxicité des milieux aquatiques

Olivier Geffard
Irstea
Unité de recherche Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions
Laboratoire d'écotoxicologie
5 rue de la Doua, Lyon - Villeurbanne

Soutenue le 16 Janvier 2014, devant le jury :

| | |
|---|---|
| Pr Paco Bustamante, | Université La Rochelle |
| Pr. Alain Geffard, | Université de Reims |
| Pr. Pierre Marmonier, | Université Lyon 1 |
| Pr. Christophe Minier, | Directeur adjoint à l'action scientifique et technique ONEMA |
| Pr. Jean-Pierre Thomé, | Université de Liège |
| Pr. Yann Voituron, | Université Lyon 1 |

## Table des matières

**1 INTRODUCTION ..... 7**

**2 INDICATEURS DE LA CONTAMINATION CHIMIQUE BIO-DISPONIBLE ..... 15**

2.1 CONTEXTE ..... 16
2.2 DEMARCHE ..... 19
2.3 DETAIL SUCCINCT DES METHODES MISES EN PLACE ..... 20
2.4 INDICATEUR DE LA CONTAMINATION BIO-DISPONIBLE DES MILIEUX ..... 25

**3 DEVELOPPEMENT DE MARQUEURS DE TOXICITE CHEZ *GAMMARUS FOSSARUM* ..... 33**

3.1 CONTEXTE ..... 34
3.2 ACTIVITES CHOLINESTERASIQUES : BIOMARQUEUR DE NEUROTOXICITE ..... 35
3.3 TEST DES COMETES : IMPACTS GENOTOXIQUES ..... 41
3.4 VITELLOGENINE : MARQUEUR DE PERTURBATIONS ENDOCRINIENNES ..... 44
3.5 TEST DE REPRODUCTION ..... 54

**4 INDICATEURS DE TOXICITE DES MILIEUX : VALEURS SEUIL INTEGRANT LA VARIABILITE NATURELLE DES MARQUEURS DE TOXICITE DEVELOPPES CHEZ *G. FOSSARUM* ..... 61**

4.1 CONTEXTE ..... 62
4.2 ACTIVITE ACETYLCHOLINESTERASE ..... 64
4.3 ESSAI DES COMETES ..... 68
4.4 VITELLOGENINE ..... 70
4.5 MARQUEURS INDIVIDUELS : TEST DE REPRODUCTION ..... 74

**5 LIENS ENTRE LES REPONSES MOLECULAIRES ET INDIVIDUELLES ..... 82**

5.1 CONTEXTE ..... 83
5.2 CAS DE L'ACTIVITE ACHE ET DES DOMMAGES A L'ADN (TEST DES COMETES) ..... 84

**6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ..... 89**

6.1 SORTIES DE CES TRAVAUX ..... 90
6.2 ET MAINTENANT…… ..... 91

**7 REFERENCES ..... 99**

**8 CURRICULUM VITAE ..... 110**

**9 PRINCIPALES PUBLICATIONS ..... 120**

## Liste des Figures

Figure 1 : A : photo de *Gammarus fossarum* mâle utilisé comme espèce et organisme modèle pour le développement d'un indicateur de la contamination chimique des milieux. B : site de prélèvement des organismes contrôles pour les expérimentations de terrain. ..... 20
Figure 2 : Situation géographique des 27 sites sélectionnés en région Rhône-Alpes. Les sites qualifiés de non impactés apparaissent en vert et les sites qualifiés d'impactés en rouge..... 23
Figure 3 : Exemple de valeur seuil déterminée pour le cadmium, selon la méthode statistique. Sur le schéma de gauche (A) sont présentées les concentrations mesurées pour chaque site, triées par ordre croissant. Les points bleus correspondent au plus grand ensemble de données qui suit une distribution Gaussienne, représentée sur le schéma de droite (B). La valeur seuil est calculée comme le 95$^{ème}$ percentile de cette distribution (ligne pointillée, figure de droite)..... 24
Figure 4 : Exemple de valeur seuil déterminée pour le cadmium, selon l'approche cinétique (modèle de Baranyi). Sur la figure, les concentrations mesurées pour chaque site sont triées par ordre croissant. La courbe rouge correspond à l'ajustement moyen du modèle de Baranyi. Les points bleus correspondent à la phase de latence de la cinétique donc ici au «fond chimique ». La valeur seuil (caractérisée par le trait pointillé bleu) correspond à la concentration au *lag* estimé, le point de rupture entre la phase de latence et la phase exponentielle. ..... 25
Figure 5 : Affinité des activités cholinestérasiques chez *G. fossarum* vis-à-vis de trois substrats, l'acétylthiocholine (●), le propionylthiocholine (□) et le butyrylthiocholine (▲). Résultats exprimés en activité mesurée en fonction de la concentration en substrat testée (moy ± E.T, n = 3). ..... 36
Figure 6 : Inhibitions exprimées en % du contrôle (moy ± E.T, n = 3) des activités cholinestérasiques chez *G. fossarum* mesurées à l'aide de plusieurs substrats, l'acétylthiocholine (●), le propionylthiocholine (□) et le butyrylthiocholine (▲), après une exposition aux inhibiteurs, BW284c51 (A) et iso-OMPA (B). ..... 37
Figure 7 : Relation entre la teneur en protéines (g.L$^{-1}$) et l'activité Ache non normalisée (nmol.min$^{-1}$ ; A) et normalisée (nmol.min$^{-1}$.mg de protéines$^{-1}$ ; B). Données obtenues à partir de mâles de taille similaire (entre 15 et 20mg/individu) prélevés sur deux sites non contaminés au cours d'un suivi mensuel sur une année. ..... 39
Figure 8 : relation entre l'activité Ache (nmol.min$^{-1}$) et le poids individuel moyen (mg) chez des mâles *Gammarus fossarum*. ..... 41
Figure 9 : Dommages à l'ADN (% tail DNA, moy ± ET, n = 3) observés au niveau des spermatozoïdes (A) et des ovocytes (B) chez *G. fossarum*, après 0, 2 et 4 de récupération en milieu non contaminé, suite à une exposition à différentes concentrations de MMS. (*) : Différence significative par rapport au jour 0. ..... 44
Figure 10 : Niveaux d'expression du gène codant pour la Vtg chez le mâle *G. fossarum* (♂) et la femelle à différents stades de son cycle de mue – reproduction (♀ A-D2). A-D2 correspondent aux 6 stades d'inter-mue définis par Geffard *et al*. (2010) chez cette espèce. Les données sont exprimées en nombre de copie d'ANDc (moy ± E.T., n = 20 pour les mâles et 10 pour chaque groupe de femelle) quantifié par RT-PCR des ARNm contenus dans 1µg d'ANR total. Lettres identiques : pas de différence significative entre les conditions ($p$ > 0.05)..... 50

Figure 11 : Evolution la quantité de vitellogénine exprimée en pmole de peptide ILIPGVGK par ovocyte (boîtes à moustache bleues, n=5 femelles / stade de mue) au cours de l'ovogenèse et l'embryogenèse ..... 51
Figure 12 : Teneurs en Vtg (exprimées en pmole du peptide ILIPGVGK par mg de poids frais) chez des mâles *G. fossarum* après exposition à diverses molécules modèles ; 20HE : 20-hydroxyecdysone, MF : méthyl-farnésoate, MX : méthoxyfénozide, PZ : propiconazole, BZ : benzophénone, CA : carbamazépine, CY : cyprotérone. Water : témoin, Acetone : témoin solvant à la concentration de 0.005%. La boite à moustache représente le premier et troisième quartile avec la médiane. * = p< 0,05 par rapport aux contrôles. ..... 53
Figure 13 : Caractérisation du cycle de mue chez *Gammarus fossarum*. Les critères pour chaque stade (écrits en noir) se basent sur le développement des tissus à l'extrémité des périopodes..... 56
Figure 14 : Description des différents stades de développement embryonnaire chez *G. fossarum* au cours du cycle de reproduction..... 57
Figure 15 : Variations annuelles de l'activité Ache (nmol.min$^{-1}$, moy ± E.T., n=5) mesurée chez *Gammarus fossarum* de Janvier 2007 à Janvier 2008 sur la Bourbre et la Morcille. La ligne en pointillés représente la moyenne annuelle (8.4 ± 0.5 nmol.min$^{-1}$), et la ligne continue la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% (7.4 nmol.min$^{-1}$) des valeurs d'activité Ache obtenues pour les deux sites. ..... 65
Figure 16 : Sites d'études sur lesquels les tests in situ ont été mis en place. A : Amous ; Bj : Ardière ; S : Saône et B : Bourbre. ● : stations d'étude ; ▲ : Rejet de station d'épuration. ..... 67
Figure 17 : Activité Ache (moy ± E.T., n = 5) mesurée chez *Gammarus fossarum* exposé sur les différentes stations étudiées. Ligne bleu : valeur de référence et lignes en pointillée : limite inférieure et supérieure au-delà desquelles l'activité Ache est significativement différente de son niveau de base. Les points rouges représentent les stations définies *a priori* comme témoins (amont des rejets). ..... 68
Figure 18 : Sites étudiés sur le bassin du Riou Mort. L'étoile rouge localise l'usine métallurgique et les zones grises les zones de stockage des déchets miniers, responsables de la contamination du système aquatique. ..... 69
Figure 19 : Dommages à l'ADN de spermatozoïdes de gammares après 5 jours d'exposition (exprimés en % tail intensity). * significativement différent du témoin. La ligne rouge représente la valeur seuil ..... 70
Figure 20 : Teneurs en Vtg (exprimées en pmole ILIPGVGK/mg) quantifiées chez *Gammarus fossarum* pendant 4 séries de transplantations sur l'Ardières et la Bourbre, sites de référence (Décembre 2008, Avril 2009, Juillet 2009 et Octobre 2009) ..... 71
Figure 21 : Teneurs en Vtg (exprimées en pmole ILIPGVGK/mg, n = 15) quantifiées chez *Gammarus fossarum* exposé sur des sites de référence (R1 à R5) et des sites contaminés (P1 à P16) en Juin 2010. ..... 73
Figure 22 : Evolution au cours du temps de la probabilité que les femelles passent d'un stade de mue au suivant (B/C1, C1/C2, C2/D1, D1/D2, exuvie), probabilité estimée par ajustement de modèles linéaires généralisés aux données observées dans les 6 traitements (3 températures testées : 7, 12 et 16°C et 2 niveaux calciques : 100 et 300 mg.L$^{-1}$ de $CaCO_3$ (les 6 traitements étant ajustés indépendamment). Pour chaque transition entre deux stades de mue, le temps médian et l'intervalle de confiance à 95% sont présentés (barres horizontales)..... 75

Figure 23 : Temps médian de transition d'un stade de mue au suivant, en fonction de la température et du niveau calcique du milieu testé. ..... 76
Figure 24: Paramètres de la reproduction (nombre d'embryons, d'ovocytes et taille des ovocytes) observés au cours du cycle de mue chez les femelles exposées aux différentes températures et teneurs en calcium. Pour la fertilité et la fécondité, les données sont exprimées en différence par rapport aux nombre d'embryons observés en stade 2 et d'ovocytes au stade C1. Pour la croissance ovocytaire, les données sont exprimées en surface ($\mu m^2$). ..... 77
Figure 25 : Distributions observées (O) et prédites (P) des stades de mue chez les femelles *Gammarus fossarum* exposées pour des périodes comprises entre 21 et 36 jours sur les sites référence de l'Ardières (A) et de la Bourbre (B) durant les 4 saisons (entre décembre 2008 et octobre 2009). Les profils de température d'exposition correspondant à chaque campagne sont présentés au-dessus des histogrammes correspondant, avec en rouge la température moyenne (à titre indicatif, les températures relevées chaque heure ayant été utilisées pour les prédictions du modèle). Le chiffre au-dessus de chaque histogramme correspond au nombre total de femelles observées. ..... 79
Figure 26 : Distributions observées (O) et prédites (P) des stades de mue chez les femelles *Gammarus fossarum* exposées sur les sites amont (S1, B1 , B2 et B3) et aval (S2, S3 et B4) des rejets des stations d'épuration de Fontaine sur Saône (S) et de Bourgoin Jailleu (B), et sur deux stations du Bassin Artois Picardie, l'un *a priori* de référence (Courcelle) et le second impacté (Férin). Les profils de température d'exposition correspondant à chaque campagne sont présentés au-dessus des histogrammes correspondant, avec en rouge la température moyenne (à titre indicatif, les températures relevées chaque heure ayant été utilisées pour les prédictions du modèle). Le chiffre au-dessus de chaque histogramme correspond au nombre total de femelles observées. L'étoile (*) au-dessus de certains histogrammes représente une différence significative entre les distributions observées et prédites par le modèle. ..... 81
Figure 27 : Relation entre l'activité Ache (% du contrôle) et (A) le taux d'alimentation (% du contrôle ) et (B) la locomotion (% du contrôle ) chez *G. fossarum* après 96h d'exposition à 5 conditions de chlorpyrifos (CPE) et 6 conditions de méthomyle (MT). Les données sont exprimées en moyenne ± E.T (n = 5 pour la mesure d'Ache et le taux d'alimentation, n = 18 pour la locomotion). La courbe rouge correspond à la relation obtenue utilisant les inhibitions d'Ache observées pour les 48 dernières heures d'exposition pour le chlorpyrifos ..... 86
Figure 28 : Lien entre dommages à l'ADN des spermatozoïdes et le pourcentage d'anomalies sur les embryons issus de parents exposés au MMS (A) et au K2Cr2O7 (B). Le triangle gris représente le pourcentage d'embryons anormaux recalculé par rapport au nombre d'embryons dans le contrôle. ..... 87
Figure 29 : exemple de relation observée entre niveau de contamination bio-disponible et indicateur écologique de communautés, tiré de Luoma *et al.*, 2010. ..... 93

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste et caractéristiques des 12 sites *a priori* peu ou pas impactés ..... 22
Tableau 2 : Liste et caractéristiques des 15 sites *a priori* impactés ..... 22
Tableau 3 : Concentrations en contaminants observées chez les organismes exposés sur les 27 sites étudiés. LQ : limite de quantification. Med, Min et Max sont respectivement les valeurs de la médiane, minimale et maximale des concentrations mesurées. ..... 27
Tableau 4: Valeurs seuils d'une contamination bio-disponible calculées à l'aide d'approches statistique et de modélisation. Les valeurs seuils sont exprimées en µg.g$^{-1}$ de poids sec pour les métaux et en ng.g$^{-1}$ de poids sec pour les composés organiques. ..... 29
Tableau 5: Classification des sites étudiés dans la région Rhône-Alpes à l'aide des valeurs seuils définies (utilisant l'ajustement du modèle de Baranyi). Les cases en gris indiquent que la concentration dans le gammare est supérieure à la valeur seuil considérée (les valeurs sont exprimées en µg.g$^{-1}$ de poids sec pour les métaux et en ng.g$^{-1}$ de poids sec pour les composés organiques). Les sites numérotés de 1 à 12 sont les sites considérés *a priori* comme référence, c'est à dire non soumis à des pressions anthropiques, via les critères de l'agence de l'eau RM&C. Les sites 13 à 27 sont ceux considérés comme soumis à des pressions anthropiques à partir des critères de l'agence de l'eau RM&C. ..... 32
Tableau 6 : Niveaux d'endommagement de l'ADN (% tail DNA, moy ± E.T, n = 3) chez des individus (*G. fossarum*) témoins au laboratoire ou suite à leur encagement sur des sites amont des rejets de stations d'épuration étudiées. ..... 43
Tableau 7 : Niveaux de dommages à l'ADN exprimés en facteur d'induction (rapport entre les % tail DNA observés chez les individus exposés aux plus fortes concentrations en MMS testées ou exposés en aval des rejets de stations d'épuration testés et les % tail DNA observés chez les individus contrôles ou exposés en amont des rejets des stations d'épuration testées). ..... 43
Tableau 8 : Surface ovocytaire (µm$^2$± ET) et nombre d'ovocytes et d'embryons (moyenne ± ET, n = 15; normalisée par la taille des femelles) chez *G. fossarum*, en fonction du stade de mue. ..... 56
Tableau 9 : Conditions du test de reproduction chez *Gammarus fossarum*. ..... 59

# 1 Introduction

Cette première partie de mon document d'HDR a pour objectif de rappeler le contexte dans lequel mes travaux de recherche en écotoxicologie se sont déroulés, ceci dans le but d'aider au diagnostic de la contamination chimique et de la toxicité des milieux aquatiques d'eau douce. Ensuite, les principaux travaux menés sur l'espèce modèle, *Gammarus fossarum*, seront présentés autour de quatre grandes parties. Enfin, les principaux papiers sur lesquels repose ce document seront présentés.

Les milieux aquatiques sont reconnus pour être le réceptacle ultime de nombreux contaminants organiques et inorganiques, d'origine naturelle et anthropique. La récente prise de conscience de l'importance et de la fragilité des biens et services écologiques que procurent les écosystèmes à l'Homme a eu pour conséquence la volonté d'une gestion plus raisonnée des ressources. Cette volonté a notamment conduit à l'émergence de réglementations nationales et européennes, telles que le programme d'enregistrement des substances chimiques, REACH, et la directive cadre sur l'eau, DCE. Ces réglementations conduisent au développement d'outils prédictifs (*a priori*) de l'impact des contaminants et de diagnostic (*a posteriori*) de la contamination chimique et de la toxicité des milieux aquatiques, avec une ambition forte de prédire au mieux le risque écotoxicologique de ces milieux. Dans tous les cas, le développement de ces approches et outils reposent d'une part sur la description, la caractérisation et la formalisation des liens entre causes et effets, c'est-à-dire entre la contamination chimique et les réponses biologiques observées aux niveaux moléculaires et individuels, et d'autre part sur l'extrapolation et l'interprétation de ces effets toxiques à des échelles biologiques écologiquement pertinentes, que sont les populations et les communautés.

La compréhension et la caractérisation fiables de l'exposition des organismes vivants aux polluants chimiques sont aujourd'hui de vastes champs d'investigation scientifique, mais également de réflexions et démarches controversées. Toutefois, le niveau de contamination dans le biote (organismes vivants) est reconnu comme une approche pertinente et est de plus en plus préconisée au sein même de la législation.

En conditions contrôlées de laboratoire, reposant sur l'utilisation de concentrations fortes, le problème de la bio-disponibilité est limité. Par conséquent, une caractérisation simple des niveaux de contamination des milieux d'exposition permet le plus souvent de valider une exposition croissante et d'établir une relation dose-réponse avec les effets observés. En milieux naturels, la caractérisation des niveaux d'exposition auxquels sont soumis les

organismes est beaucoup plus délicate. Pour de nombreux composés hydrophobes, les méthodes analytiques disponibles en routine ne permettent pas de détecter et quantifier de façon fiable ces composés dans l'eau. De plus, le mode de prélèvement n'intègre pas la variabilité des teneurs en contaminants au cours du temps. Enfin, malgré l'utilisation récente de nouvelles méthodes (échantillonneurs passifs) (Stuer-Lauridsen, 2005; Vrana *et al*., 2005), la caractérisation chimique des compartiments environnementaux que sont l'eau et le sédiment permet, sous certaines conditions, d'évaluer les sources et les niveaux de contamination des milieux, mais ne rend pas compte de l'exposition réelle des organismes à ces contaminants. En effet, ces méthodes n'intègrent pas la notion de bio-disponibilité. Dans un contexte de caractérisation de la toxicité des milieux, l'utilisation du biote dans le suivi de la contamination chimique des milieux est aujourd'hui une approche pertinente. Elle permet (1) de répondre aux limites de quantification des contaminants souvent observées avec l'eau, (2) d'intégrer la contamination au cours du temps et enfin (3) de caractériser la fraction bio-disponible des contaminants, *i.e*. la fraction dite toxique (Andral *et al*., 2004; Narbonne 2000). Toutefois, comme pour tout processus biologique, l'interprétation des teneurs en contaminants dans les organismes est sujette aux facteurs de confusion d'origine biotique (espèce, taille, sexe, statut reproducteur, histoire de vie) et environnementale (source de nourriture, température). L'impact de ces facteurs de confusion complique les comparaisons spatio-temporelles et l'interprétation des teneurs en contaminants observées dans les organismes, imposant des contraintes fortes sur les conditions de mise en place des études en chimie environnementale, comme la période de prélèvement des organismes (ROCCH, ancien RNO piloté par Ifremer). Plus récemment, le développement et le déploiement d'expérimentations *in situ* (biomonitoring actif par encagement d'organismes) a reçu une attention toute particulière, permettant de coupler l'intérêt d'utiliser le biote comme matrice pour l'analyse chimique et une méthode contrôlée d'exposition sur le terrain. Cette approche permet notamment de maîtriser les facteurs biotiques (sélection d'organismes calibrés et contrôles), et par conséquent de faire une comparaison fiable des teneurs observées dans le temps et l'espace. Cette problématique a constitué une part de mes activités de recherche durant mes années à Irstea et sera présentée dans ce document.

L'étude de l'impact des contaminants et de leur risque environnemental s'appuie essentiellement sur l'utilisation d'espèces dites proxy (génétiquement standard), dont le maintien et la production en laboratoire sont parfaitement maîtrisés, comme la daphnie

*Daphnia magna*, le chironome, *Chironomus riparius* les amphipodes *Hyalella azteca*, ou les poissons comme *Danio rerio* et le Medaka. L'intérêt des biotests de laboratoire réside dans l'utilisation de conditions standards (température, éclairage, nourriture, etc…) permettant de limiter la dérive de la sensibilité de ces biotests, d'être reproductible et par conséquent conduire à une comparaison fiable des données obtenues dans le temps et entre laboratoires. L'utilisation d'organismes dont le cycle de vie est parfaitement contrôlé permet également de construire des modèles de dynamiques de populations, et ainsi ouvre la possibilité d'extrapoler les effets observés au niveau individuel et de prédire l'impact potentiel sur le maintien de la population (Lopes *et al*., 2005 ; Billoir *et al*., 2007 ; Pery *et al*., 2006). Les conditions de réalisation de ces biotests ne permettent pas de répondre au réalisme environnemental car (1) les méthodes de prélèvements des échantillons environnementaux sont peu représentatifs des milieux, (2) la variabilité des facteurs environnementaux (température, dureté et pH) joue un rôle clef sur la biodisponibilité et donc la toxicité des contaminants et (3) les espèces utilisées comme proxy sont souvent peu pertinentes vis à vis des organismes présents dans nos écosystèmes. Ces limites ont conduit à la mise en place de facteurs de sûreté sur les normes de qualité environnementales définies à partir de ces biotests, afin de protéger au mieux les milieux aquatiques.

Les approches de bio-indication basées sur la structure des communautés ont prouvé leur utilité pour décrire l'état d'un écosystème et mettre en évidence leur dégradation. Cependant, elles se montrent moins pertinentes pour identifier les causes et les modalités de cette perturbation, conditions nécessaires pour la mise en œuvre de programmes d'aménagement et de restauration des milieux aquatiques. La structure d'une communauté est influencée par de nombreux facteurs (habitat, chimiques) et processus (compétition, espèces invasives) qui opèrent à différentes échelles de temps et d'espace. L'identification des causes de perturbations observées *in situ* sur les communautés d'un écosystème, et en particulier de la pression liée à des facteurs de stress d'origine chimique, impose d'établir et quantifier si possible les relations existantes entre causes et effets dans le milieu. Pour cela, il s'avère incontournable de réduire la complexité du système biologique observé, en revenant à un « système biologique » de niveau d'organisation moins élevé : l'organisme, notamment via l'utilisation de biomarqueurs, de traits de vie et/ou d'expérimentations *in situ* (encagement). Dans une analyse de l'impact écologique de pollutions diffuses, van Straalen et van Gestel (2008) soulignent ainsi l'importance et l'intérêt de mettre en place un cadre d'évaluation

multidimensionnelle pour discriminer les effets de la pollution d'autres facteurs de perturbations. De la même façon, Chapman (2007) et Galloway *et al*. (2006) rappellent qu'en complément des approches écosystémiques et de chimie analytique, il est indispensable d'avoir recours à des tests (laboratoire ou terrain) utilisant des niveaux d'organisation biologique moins complexes (sub-individuel et individuel) afin d'établir de façon plus fiable la toxicité des contaminants présents dans un milieu. Ces travaux ont notamment donné lieu à la mise en place d'indicateurs (*i.e.* Biomarker Response Index ; Hagger *et al*., 2008) permettant d'évaluer l'impact chimique des milieux sur l'état de santé d'organismes sentinelles. Si l'intérêt de ces outils moléculaires, cellulaires et physiologiques (biomarqueurs) pour diagnostiquer la toxicité des milieux aquatiques n'est plus à démontrer (Hagger *et al* 2008, Dagnino *et al* 2007, Viarengo *et al* 2007, Chapman 2007), leur utilisation à une échelle régionale et nationale reste très peu développée en milieu continental. Une des principales limites est l'utilisation de populations naturelles et par conséquent ; (1) la difficulté d'obtenir la ou les espèces sentinelles pour lesquelles les méthodes de mesure des biomarqueurs sont disponibles. En effet, et contrairement aux milieux côtier-marins, il est difficile de disposer d'une espèce sentinelle répartie dans l'ensemble des cours d'eau ; (2) la difficulté de connaître le passé des organismes, notamment pour les espèces mobiles (sont-ils représentatifs du milieu étudié ?) et d'appréhender plusieurs facteurs biotiques, comme l'âge, le statut reproducteur ou leur état nutritif, connus pour influencer le niveau de nombreux biomarqueurs et (3) la modulation d'un grand nombre de ces biomarqueurs renseigne peu, voire pas du tout, sur l'impact de ces polluants à des échelles biologiques plus élevées (individu, population), informations aujourd'hui indispensables pour permettre de bonnes évaluations des risques écotoxicologiques. En effet, l'utilisation d'organismes autochtones ne permet pas aisément d'accéder à des variables biologiques qui jouent un rôle clef dans la dynamique démographique des populations, comme la survie, la croissance, le taux d'alimentation ou la reproduction.

Les approches d'expérimentation *in situ* (organismes encagés) sont aujourd'hui reconnues pour améliorer la capacité à faire le lien entre causes et effets dans les études de terrain (Crane *et al*., 2007). Ces méthodologies permettent de coupler l'avantage d'une exposition directement dans le milieu, intégrant ainsi l'effet des nombreux facteurs environnementaux influençant la toxicité des milieux (température, pH, dureté et modulation des teneurs en contaminants au cours du temps) et l'utilisation d'organismes dits « calibrés », c'est à dire ayant les mêmes caractéristiques (âge, état nutritionnel, statut reproducteur,

etc…), provenant d'élevages de laboratoire ou d'une population naturelle contrôle (Liber *et al*., 2007). Ainsi ce type d'approche permet d'appréhender la mesure de biomarqueurs en réduisant l'impact des facteurs de confusion d'origine biotique, alors qu'ils posent classiquement problèmes pour l'interprétation des mesures réalisées sur des organismes autochtones. De plus, ces approches permettent d'étudier des milieux où l'organisme d'intérêt n'est pas présent et, contrairement aux études portant sur les populations et les communautés, de se focaliser sur l'impact des contaminants présents, et limiter les effets liés à l'habitat. Enfin, l'encagement d'organismes permet d'utiliser les traits d'histoire de vie qui caractérisent la dynamique des populations de l'espèce (survie, croissance, taux d'alimentation et reproduction), comme marqueurs de toxicité des milieux. Ainsi, l'extrapolation de ces effets individuels dans des modèles de dynamique des populations permet d'inférer l'impact au niveau de la population et donc la possibilité d'améliorer les évaluations des risques écotoxicologiques des milieux. Toutefois, si les expérimentations *in situ* permettent d'observer les effets biologiques associés à une exposition plus réaliste sur le plan environnemental, l'interprétation fiable de la modulation des marqueurs mesurés (biomarqueurs et traits de vie) en terme de présence de contaminants et de toxicité des milieux se confronte encore à certains verrous scientifiques. En effet, pour atteindre cet objectif, il est indispensable de connaître et de pouvoir prédire la variabilité naturelle de chacun de ces marqueurs en lien avec les variables environnementales non contrôlables (température, dureté, etc..).

Dans la continuité de mes travaux de thèse et de post-doc en milieu marin (que je ne présenterai pas dans ce document), mes questions de recherche se sont continuellement organisées autour d'un objectif : mieux comprendre et caractériser la contamination bio-disponible des milieux aquatiques et sa toxicité associée vis-à-vis des invertébrés. En d'autres termes, être capable d'interpréter de façon fiable la teneur en contaminant dans un organisme en terme de contamination bio-disponible du milieu, ainsi que traduire la modulation de marqueurs (sub-individuels et individuels) en terme de toxicité liée à cette contamination. Par conséquent, les travaux et les développements que j'ai menés ces dernières années ont été construits et structurés autour de l'expérimentation *in situ*. En effet, cette approche me paraît être incontournable et la plus pertinente pour répondre à mes objectifs : pouvoir discriminer les effets liés à la présence de polluants de ceux résultant de l'impact de facteurs de confusion (biotiques et abiotiques). Ce choix m'a conduit à utiliser une espèce d'invertébré pouvant être

utilisée aussi bien en laboratoire (développement et validation des marqueurs) que sur le terrain (encagement), mais surtout dont le rôle dans le fonctionnement des écosystèmes et sa pertinence en écotoxicologie étaient avérés.

L'amphipode *Gammarus fossarum*, sur lequel les questions scientifiques et les travaux présentés dans ce document ont entièrement été développés, est une espèce largement répartie en France et en Europe (Zivic et Markovic 2007). C'est une espèce qui forme des populations de très fortes densités, pouvant atteindre plusieurs milliers d'individus au $m^2$. Ce sont des déchiqueteurs, se nourrissant préférentiellement de la matière détritique et sont la source de nourriture de nombreuses espèces de poissons. Ils jouent un rôle essentiel dans le bon fonctionnement des écosystèmes puisqu'ils ont un rôle clef dans la décomposition et l'incorporation du matériel organique terrestre dans le réseau trophique aquatique et dans la redistribution de la matière et de l'énergie. Enfin, les gammares et en particulier *G. fossarum*, sont de bons indicateurs de la santé des milieux aquatiques d'eau douce. De par leur sensibilité à la pollution chimique, ils sont utilisés et recommandés par de nombreuses équipes d'écotoxicologie (revue de Kunz *et al.*, 2010), et ceci aussi bien pour les études en laboratoire (Leroy et al., 2010) que sur le terrain (Schirling *et al.*, 2005). Enfin, de nombreux marqueurs ont été développés chez cet organisme (1) au niveau de l'individu avec le suivi de la croissance (Roman *et al.*, 2007), du taux de reproduction (Cold et Forbes, 2004), de l'alimentation (Maltby *et al.*, 2002) et du comportement pré-copulatoire (Watts *et al.*, 2001) ; (2) au niveau physiologique avec des mesures d'allocations énergétiques (Maltby, 1992), de respiration (Kedwards *et al.*, 1996) et du maintien de l'homéostasie (i.e., ionorégulation) (Felten *et al.*, 2008) ; (3) au niveau cellulaire avec l'étude d'anomalies gonadiques (Schirling *et al.*, 2006) et enfin (4) au niveau moléculaire avec la mesure de biomarqueurs de neurotoxicité (*i.e.*, activité enzymatique des cholinestérases) (McLoughlin *et al.*, 2000), et de perturbations endocriniennes (*i.e.*, titration de vitellogénine) (Gagné *et al.*, 2005).

Volontairement, je n'ai pas souhaité structurer ce document en respectant l'ordre chronologique avec lequel mes activités de recherche ont été menées. J'ai souhaité faire ressortir les grandes questions autour desquelles mes travaux se sont organisés, avec pour but de proposer des méthodes permettant de mieux comprendre et diagnostiquer la contamination chimique et la toxicité des milieux aquatiques. L'objectif est de disposer d'outils permettant d'établir, en milieux naturels, des relations de causes à effets, ceci dans le but d'améliorer l'évaluation de leurs risques écotoxicologiques. La première partie de ce document présente

l'intérêt de l'expérimentation *in situ* comme une approche pertinente pour la caractérisation et la comparaison fiable des niveaux de contamination bio-disponible des milieux. La seconde partie consiste en une synthèse des travaux menés pour le développement, ou le cas échéant l'amélioration des méthodes de mesure de biomarqueurs et traits de vie proposés comme marqueurs de toxicité. Pour les biomarqueurs, cette partie se focalisera sur la nécessité de mieux comprendre et caractériser l'impact de facteurs physiologiques sur le niveau de réponses de ces marqueurs, afin d'en améliorer le pouvoir discriminant vis à vis des contaminants chimiques. Ensuite, je présenterai les travaux menés et les résultats obtenus pour caractériser et formaliser l'impact des facteurs de confusion environnementaux, nous ayant permis de proposer pour chacun des marqueurs développés une valeur de « référence » et une « valeur seuil » intégrant la variabilité naturelle de ces réponses, et d'améliorer ainsi l'interprétation de ces marqueurs en terme de contamination et de toxicité des milieux étudiés. Enfin, et avant de conclure et de vous présenter les perspectives de ces travaux, dans une quatrième partie, j'aborderai les travaux portant sur l'étude des liens existants entre les réponses sub-individuelles et individuelles, dans l'objectif d'interpréter les réponses moléculaires en terme d'effets sur les traits de vie.

# 2 Indicateurs de la contamination chimique bio-disponible

## 2.1 Contexte

Cette partie de mon activité s'inscrit entièrement dans le cadre de la réglementation, et notamment la Directive Cadre sur l'Eau (DCE ; 2000/60/CE) *via* un financement sur plusieurs années par l'ONEMA (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques) (PC10, PC 11 et PC12). Ce travail (contrat de Jean-Philippe Besse) résulte d'une collaboration étroite entre le laboratoire d'écotoxicologie et le laboratoire de chimie (LAMA, M. Coquery) de Irstea et a fait l'objet du cotrat de J.P. Besse. La DCE impose aux états membres de l'Union Européenne non seulement un suivi des niveaux de contamination des masses d'eau, mais également d'en rendre compte et d'assurer que le bon état chimique des masses d'eau soit atteint pour 2015. Ceci nécessite donc par définition la mise en place d'un réseau basé sur l'utilisation de méthodes fiables en terme de détection des polluants, et reproductibles pour la comparaison des données dans le temps et l'espace. La liste des polluants spécifiques à suivre est actuellement fixée à 41 substances.

Dans ce contexte, un des objectifs consiste à protéger la santé humaine et celle des écosystèmes aquatiques vis à vis de pollutions aigues et chroniques. Cet état chimique des masses d'eau est appréhendé par la définition de normes de qualité environnementale (NQE). Une NQE est définie pour un polluant, ou groupe de polluants, comme la concentration dans l'eau, le sédiment ou le biote qui ne doit pas être dépassée afin de protéger la santé humaine et celle des écosystèmes. Un second objectif de cette directive concerne l'obligation du suivi des tendances pour les substances prioritaires. Pour cela, la directive impose que le suivi soit réalisé sur des matrices autres que l'eau, notamment le biote (European Commission, 2008). En effet, le biote constitue une matrice intégratrice de la contamination au cours du temps, contrairement aux prélèvements ponctuels sur l'eau. Le biote peut être utilisé pour 26 des 41 substances prioritaires de la directive fille (Directive 2008/105/EC, European Commission, 2010). De plus, les caractéristiques physico-chimiques de 12 des 15 nouvelles substances susceptibles d'être intégrées à la liste (European Commission, 2012) font que le biote sera également une matrice utilisable. Par conséquent, les obligations imposées aux états membres *via* ces directives constituent un cadre légal dans lequel le développement d'un réseau de surveillance de la contamination chimique des substances prioritaires dans le biote est devenu pertinent. Si aujourd'hui il existe plusieurs programmes de surveillance en milieux marins et côtiers via diverses conventions internationales (e.g. MEDPOL, HELCOM ou OSPAR commission), l'équivalent n'existe pas en milieu continental.

Deux stratégies existent pour la surveillance de la contamination chimique dans le biote. La première, dite « passive », se base sur le prélèvement d'organismes directement dans les milieux aquatiques (Goldberg, 1975), alors que la seconde, dite « active », fait appel à de l'expérimentation en milieu naturel, par l'encagement d'organismes provenant soit d'une ou de plusieurs populations contrôles, soit d'élevages de laboratoire (Andral *et al*., 2004). La bio-surveillance passive a été la première démarche à avoir vue le jour, notamment en milieu marin, avec les programmes « Mussel Watch » en Amérique du Nord et le programme « Réseau National d'Observation », devenu récemment le « Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du littoral : ROCCH» en France (Goldberg, 1975 ; Borja *et al*., 2008 ; Claisse *et al*., 1992). Ces réseaux de surveillance bénéficient aujourd'hui de plus de 20 ans d'expérience et sont basés sur le suivi de la contamination chimique de populations naturelles de bivalves chez trois espèces largement réparties sur le littoral : une espèce d'huître (*Crassostrea gigas*) et deux espèces de moule (*Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus edulis*). L'utilisation de différentes espèces nécessite cependant une inter-calibration des résultats afin de pouvoir comparer les différents sites. Ce réseau répond aujourd'hui principalement au suivi des tendances temporelles de la contamination et non à l'obligation concernant la conformité des milieux aquatiques au regard des NQEs. En milieu continental, les réseaux existants sont plus récents et beaucoup moins développés à l'échelle du territoire. Les deux réseaux les plus structurés en France sont les suivis de la contamination métallique dans les bryophytes (Tilghman *et al*., 2009) et le plan national PCB sur le suivi de la contamination des poissons par les PCB. Une des limites fortes de la bio-surveillance passive tient dans la nécessité de sélectionner les stations suivies en fonction de la présence ou non de l'espèce sentinelle et dans le choix d'une ou quelques espèces largement et équitablement réparties sur le territoire français, voire européen.

En réponse aux limites observées avec la bio-surveillance passive, des développements ont été menés pour la proposition de méthodologies de bio-surveillance active, ceci aussi bien en milieu littoral que continental. En milieu marin, le Réseau INtégrateur BIOlogique (RINBIO) consiste en l'encagement de moules contrôles (même provenance et même âge) pour une période de 3 mois avant leur utilisation pour l'analyse chimique. En milieu continentale, il n'existe pas de réseau structuré à l'échelle nationale. Cette méthode reste principalement utilisée aujourd'hui dans le cadre de projets de recherche pour évaluer et comprendre la contamination bio-disponible des milieux (Bervoets *et al*., 2009; Koistinen *et al*., 2010 ; Neufeld, 2010), mais également pour le développement et la validation de marqueurs sub-

individuels (Bervoets *et al*., 2009, Reynders *et al*., 2008 ; Barbee *et al*., 2008 ; A5, A31, A38, A39, A41, A51) et individuels (A45). La plus-value de l'approche active réside dans le contrôle de nombreux paramètres biologiques chez les organismes encagés, connus pour être des facteurs de confusion dans l'interprétation des niveaux de contamination et des marqueurs de toxicité. Parmi ces paramètres biologiques, la taille/masse de l'organisme est un facteur important. De nombreuses études ont montré une diminution des teneurs en métaux en fonction de la taille, liée au phénomène de dilution biologique lors de la croissance (A19 ; Conti *et al*., 2008 ; Mubiana *et al*., 2006 ; Fialkowski *et al*., 2003). A l'inverse, pour les composés organiques, on observe une augmentation des teneurs, liée à l'enrichissement des organismes en lipides au cours de leur vie (Gossiaux *et al*., 1996 ; Andral *et al*., 2004). Le cycle de reproduction, plus ou moins lié aux saisons, conduit à de nombreux changements dans la composition biochimique des organismes, influençant fortement leur capacité d'accumulation (Phillips, 1986, cité par Kwan *et al*., 2003). Chez les bivalves par exemple, la gamétogénèse s'accompagne d'une augmentation des teneurs lipidiques et par conséquent d'une plus grande affinité à accumuler les composés organiques (Bruner *et al*., 1994). Enfin, plusieurs paramètres environnementaux constituent également des facteurs de confusion rendant difficile les comparaisons inter-sites des teneurs en contaminants observés dans les organismes autochtones. Parmi eux, il y a bien sûr la contamination et l'adaptation des organismes à la pollution. Chez *Gammarus pulex*, Khan *et al*. (2011) ont rapporté une différence de contamination métallique entre des organismes autochtones et des organismes encagés provenant d'un site de référence. Des concentrations en métaux plus faibles ont été observées sur les organismes autochtones, laissant penser que ces organismes ont mis en place des mécanismes d'adaptation à la contamination afin de limiter leur capacité d'accumulation.
L'utilisation d'une approche active permet de contrôler la majorité de ces facteurs de confusion, offrant ainsi une méthodologie fiable de comparaisons inter-sites, dans l'espace et le temps, des teneurs en contaminants dans les organismes encagés et de répondre aux exigences de la DCE en termes de suivi des tendances.

Suite au projet PP1 et à la thèse de B. Xuereb, nous avons développé une méthode d'encagement chez le gammare. De plus, l'étude de l'éco-physiologie chez cette espèce (A19, A25, A27, A34) nous a permis de sélectionner des organismes en fonction de leur taille et de leur sexe. Enfin, nous disposons depuis plusieurs années d'une population contrôle utilisée comme source d'organismes. Par conséquent, nous étions dans les conditions optimales pour

engager une étude sur la possibilité et l'intérêt d'une approche de bio-surveillance active chez cette espèce d'intérêt écologique. Ce travail avait pour buts (1) de répondre à une demande de l'ONEMA sur le développement d'outils pour le suivi des tendances de la contamination chimique des milieux et (2) de proposer une approche fiable pour la caractérisation chimique des milieux, étape essentielle pour la suite de mes travaux. En effet, une des limites fortes dans la validation ou l'étude de la sensibilité de biomarqueurs ou réponses individuels comme outils de diagnostic des milieux concerne la sélection et le choix de sites dits contrôles et contaminés.

## 2.2 Démarche

L'encagement d'organismes contrôles sur le terrain permet d'étudier les hydrosystèmes dans lesquels cette espèce n'est pas présente, mais surtout permet de limiter fortement l'impact de paramètres biologiques sur les teneurs en contaminants mesurées. En effet, les organismes proviennent de la même population, sont de la même taille et du même sexe, sont alimentés de la même façon dans le cas du gammare, et enfin le temps d'exposition des organismes est similaire et contrôlé, ceci conduisant à une comparaison fiable des données entre sites et dans le temps (Bourgeault *et al.*, 2010; Bervoets *et al.*, 2005).

Le premier objectif était d'évaluer la pertinence et la robustesse d'une stratégie de bio-surveillance active avec *Gammarus fossarum* pour suivre les tendances de la contamination biodisponible en métaux et en composés organiques hydrophobes dans les milieux continentaux. Le deuxième objectif était de bénéficier de cette approche d'encagement pour construire une méthodologie permettant de déterminer des « valeurs seuils de contamination bio-disponible » dans les organismes, au-dessus de laquelle toute concentration mesurée est représentative d'une contamination bio-disponible sur le site d'étude. Ceci se base sur le fait, qu'à partir d'une méthodologie d'encagement maîtrisée et une période d'exposition contrôlée, on peut faire l'hypothèse que les teneurs en contaminant dans les organismes exposés sur des sites non soumis à des rejets anthropiques ou sources naturelles de contamination bio-disponibles, doivent se distribuer aléatoirement autour d'un niveau de base (« bruit de fond ») et suivre par exemple une loi normale en première hypothèse.

Pour répondre à ces deux objectifs, des organismes mâles calibrés ont été encagés pendant 7 jours sur 27 stations de la région Rhône-Alpes et sur lesquels 49 contaminants (11 métaux et

38 composés hydrophobes) ont été analysés. Les sites ont été sélectionnés pour répondre à une grande diversité en terme de taille de bassins versants, de caractéristiques physico-chimiques (e.g. dureté, température) et de pressions anthropiques.

## 2.3 Détail succinct des méthodes mises en place

### *2.3.1 Prélèvement et stabulation des organismes*

Les gammares ont été prélevés à « La Tour du Pin », une station de référence située sur la Bourbre, Isère (38) (Figure 1). La Bourbre est un affluent du Rhône en amont de Lyon. Ce cours d'eau affiche une bonne qualité de l'eau selon les données du réseau de contrôle de surveillance national (RCS) ; cette station présente également une forte densité de gammares, compatible avec des études à large échelle.

A B

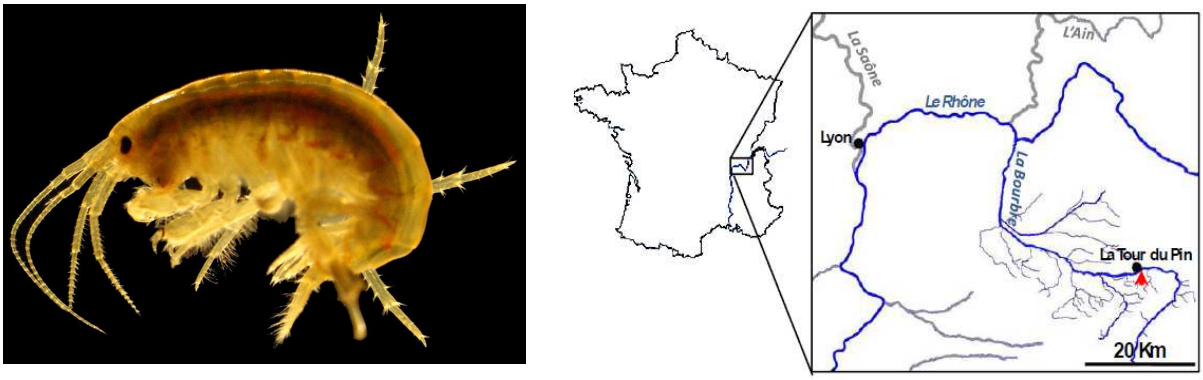



**Figure 1 : A : photo de *Gammarus fossarum* mâle utilisé comme espèce et organisme modèle pour le développement d'un indicateur de la contamination chimique des milieux. B : site de prélèvement des organismes contrôles pour les expérimentations de terrain.**

Les gammares ont été prélevés à l'aide d'un filet de type troubleau puis tamisés (mailles de 2 et de 2,5 mm) afin de séparer les individus adultes des juvéniles. Ils sont ensuite rapidement transportés dans des glacières au laboratoire où ils sont maintenus en stabulation pendant 15 jours dans des aquariums de 30 L, sous aération constante, à 12 ± 0,2°C et une photopériode de 16h de jour / 8h de nuit. Sur les deux premiers jours de stabulation, les organismes sont progressivement acclimatés à l'eau de forage disponible au laboratoire. En fonction des niveaux de dureté des sites à expérimenter, un groupe d'organismes est acclimaté à une dureté de 110 $mg.L^{-1}$ de $CaC0_3$ et un second à 220 $mg.L^{-1}$ $CaC0_3$. Les gammares sont nourris *ad libitum* à l'aide de feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) récoltées sur un site non anthropisé dans les Monts du Lyonnais. Deux fois par semaine, les organismes ont reçu comme supplément protéique des vers lyophilisés de *Tubifex sp*.

### *2.3.2 Sélection des sites d'études*

Les sites ont été choisis parmi les stations du réseau français de contrôle de surveillance (RCS), en concertation avec les différents gestionnaires impliqués dans ce projet (PC8 - PC11) : l'ONEMA et l'agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse. Le choix des sites a reposé sur les critères suivants : (1) représentatifs des différents systèmes hydrologiques de la région Rhône-Alpes ; (2) une sélection de 12 sites *a priori* peu ou pas anthropisés et de 15 sites *a priori* exposés à une contamination chimique d'origine anthropique. Depuis la mise en œuvre de la DCE, environ 50 stations de référence ont été sélectionnées au sein de la région administrative Rhône-Alpes. Ces stations sont classées soit comme « référence » (sans altérations anthropiques), soit comme « référence par défaut » (soumis à des altérations anthropiques, mais avec un très faible impact sur les communautés du milieu). Parmi ces sites, 12 ont été retenus et sont présentés dans le Tableau 1. Pour le détail des caractéristiques physico-chimiques, voir A52. La sélection des sites dits « impactés » a été basée sur l'état des lieux des masses d'eau réalisé pour les services de l'état en 2003 dans le cadre de la mise en œuvre de la DCE. Au total 15 sites ont été retenus montrant une mauvaise qualité chimique de l'eau et/ou des indices écologiques faibles. Pour les sites choisis, le type et l'intensité des pressions sont présentés dans le Tableau 2. Pour le détail des caractéristiques physico-chimiques, voir A52.

Sur chacun des sites retenus (Figure 2), des organismes mâles de taille similaire (9 ± 1 mm) ont été exposés pour une période de 7 jours. Suite à l'exposition, les organismes ont été ramenés au laboratoire, comptés (pour déterminer le taux de survie) et congelés par pool de 5 (pour les métaux) ou de 125 individus (pour les composés organiques). Sur chaque site, la température a été enregistrée en continu à l'aide de sondes immergées. Enfin, une caractérisation physico-chimique des milieux a été réalisée en début et fin d'exposition.

Pour chaque station, un total de 49 contaminants a été recherché dans les organismes exposés, incluant 22 molécules inscrites sur la liste prioritaire de la DCE (EC, 2008) : 11 métaux (Cd, Pb, Hg, Ni, Ag, As, Co, Cr, Cu, Se et Zn) et 38 composés organiques (log Kow > à 3), incluant des pesticides (lindane ; hexachlorobenzene : HCB ; dichlorodiphenyltrichloroethane: DDT, des isomères et métabolites : 2,40-DDE; 4,40-DDE + dieldrin; 2,40-DDD; 4,40-DDD; 2,40-DDT; 4,40-DDT) ; l'heptachlore et l'heptachlore époxyde ; 7 PCB indicateurs (28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180) ; 4 congénères de PBDE (47, 99, 119 et 153) et 16 HAP (naphthalene, anthracene, fluoranthene, benzo(a)pyrene,

benzo(b,k,j)fluoranthenes, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(g,h,i)perylene ; acenaphthylene, acenaphtene, fluorene, phenanthrene, pyrene, benzo(a)anthracene, benzo(e)pyrene, triphene + chrysene, perylene et dibenzo(a)anthracene+dibenzo(c)anthracene.

**Tableau 1 : Liste et caractéristiques des 12 sites *a priori* peu ou pas impactés**

| Code | Rivière | Nom du Site | Rang de Strahler [a] | Taille [b] | Référence par défaut |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Doux | Labatie d'Andaure | 3 | P | Non |
| 2 | Cance | Saint Julien Vocance | 2 | TP | Non |
| 3 | Gier | la Valla en Gier | 3 | P | Non |
| 4 | Ain | Saint Maurice de Gourdans | 5 | G | Oui |
| 5 | Albarine | Chaley | 3 | P | Oui |
| 6 | Mandorne | Oncieu | 2 | TP | Non |
| 7 | Varèze | Cours et Buis | 2 | TP | Non |
| 8 | Galaveyson | Saint Clair sur Galaure | 1 | TP | Non |
| 9 | Drevenne | Rovon | 3 | P | Non |
| 10 | Guiers Mort | Saint Laurent du pont | 3 | P | Oui |
| 11 | Ardières | Ardillats | 1 | TP | Non |
| 12 | Ergues | Poules les Echarmeaux | 1 | TP | Non |

[a] : indicateur simple de classification de l'importance d'un cours d'eau : il démarre à la valeur 1 à la source de tout ruisseau. Les rangs de 1 à 3 caractérisent les petits cours d'eau ou têtes de bassin. Les rangs de 4 à 8 caractérisent les cours d'eau les plus larges et les fleuves.
[b] : indication sur la taille du cours d'eau : TP = très petit, P = petit et G = grand.

**Tableau 2 : Liste et caractéristiques des 15 sites *a priori* impactés**

| Code | Rivière | Nom du Site | Aval référence | Pression [1] | Contaminants [2] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | métaux | pesticides | autres |
| 13 | Doux | St Jean de Muzols | Oui | Ind, Agri, Urb | | | |
| 14 | Cance | Sarras | Oui | Ind, Urb | | | |
| 15 | Albarine | Saint Rambert en Bugey | Non | Ind 1, Urb 2 | | | |
| 16 | Veyle | Lent | Non | Agri 3 | | | |
| 17 | Veyle | Servas | Non | Agri 3 | | | |
| 18 | Ange | Brion | Non | Ind 3, Urb 2 | | | |
| 19 | Drac | Fontaine | Oui | Ind 3 | | | |
| 20 | Turdine | l'Arbresle | Oui | Ind 3, Urb | | | |
| 21 | Azergues | Legny | Oui | | | | |
| 22 | Azergues | Lucenay | Oui | Agri 3, Ind 2 | | | |
| 23 | Gier | Givors | Oui | Urb | | | |
| 24 | Rhône | aval Givors | Non | Urb, Ind | | | |
| 25 | Bourbre | Pont de Cheruy | Non | Urb 2, ind 2 | | | |
| 26 | Saône | Ile Barbe | Non | Urb, Ind | | | |
| 27 | Ardières | Saint Jean d'Ardières | Oui | Agri 3, Ind 2 | | | |

1 : Les chiffres indiquent l'intensité d'impact de la pression : 3 = fort ; 2 = moyen ; 1 = faible.

2 : Les cellules colorées indiquent le niveau d'impact de la contamination sur le milieu : rouge =fort ; orange=intermédiaire ; jaune=moyen.

Ind : industriel ; Urb : urbain ; Agri : agricole

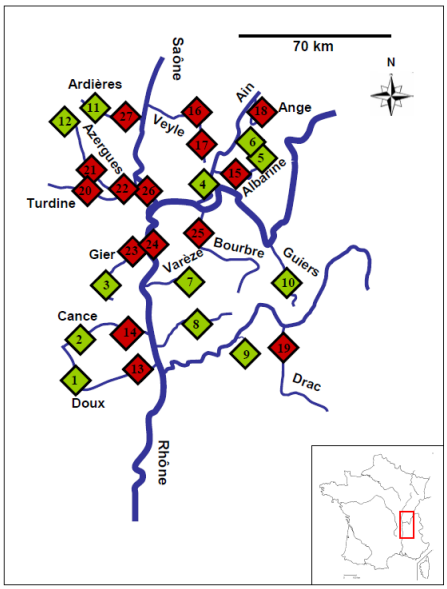



**Figure 2 : Situation géographique des 27 sites sélectionnés en région Rhône-Alpes. Les sites qualifiés de non impactés apparaissent en vert et les sites qualifiés d'impactés en rouge.**

### *2.3.3 Analyse statistique et modèle pour déterminer les valeurs seuil*

Deux approches ont été développées et comparées, se basant sur des hypothèses et une description différentes des données. La première approche, statistique, est basée sur l'hypothèse que les niveaux de contamination dans les organismes sont distribués selon une loi normale uniquement sur des sites dépourvus de toute contamination bio-disponible naturelle ou anthropique (au-delà d'une contamination de fond). Pour calculer la valeur seuil pour un contaminant donné, les sites ont été classés par niveau de concentration croissante dans les organismes. Puis, nous avons testé si l'ensemble des données suivait une distribution Gaussienne, en utilisant le test de normalité de Shapiro-Wilk. Dans le cas contraire, le site le plus contaminé a été retiré du jeu de données, et la normalité testée à nouveau. Ce processus itératif a été mené jusqu'à l'obtention d'un jeu de données distribuées normalement. La valeur seuil pour chaque contaminant a ensuite été déterminée comme le 95$^{ème}$ percentile (risque de faux négatif à 5 %) de la distribution théorique Gaussienne obtenue. La Figure 3 présente un exemple pour la détermination de la valeur seuil avec les données obtenues pour le Cd.

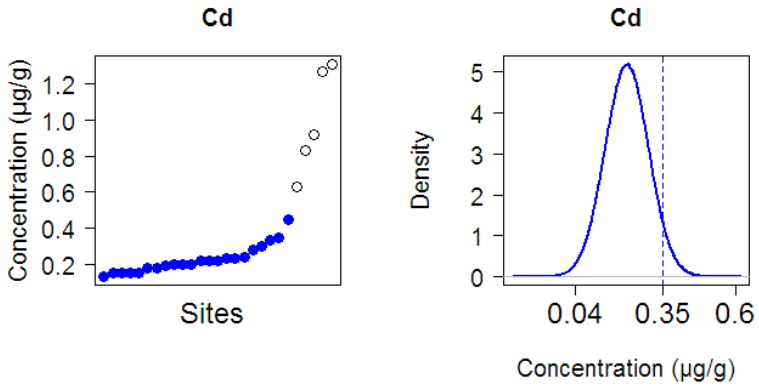



**Figure 3 : Exemple de valeur seuil déterminée pour le cadmium, selon la méthode statistique. Sur le schéma de gauche sont présentées les concentrations mesurées pour chaque site, triées par ordre croissant. Les points bleus correspondent au plus grand ensemble de données qui suit une distribution Gaussienne, représentée sur le schéma de droite. La valeur seuil est calculée comme le 95$^{ème}$ percentile de cette distribution (ligne pointillée, figure de droite).**

La seconde approche a été basée sur l'observation que les niveaux de contamination pour chaque composé, triés par valeurs croissantes, suivent un modèle de croissance comparable aux modèles de croissance bactérienne : avec une phase de latence correspondant au « bruit de fond » et une phase exponentielle correspondant à une accumulation significativement plus forte que le bruit de fond. Ces types de modèles de croissance bactérienne permettent de déterminer (et d'estimer) un paramètre correspondant au « point de rupture » entre les deux phases, appelé ici « *lag* » (voir équation ci-dessous). Par analogie, la concentration observée au point de rupture correspond à la concentration seuil qui permet de séparer le niveau de contamination de « fond » d'une concentration significativement supérieure à ce niveau «de fond». C'est le modèle de Baranyi (équation ci-dessous ; Baranyi *et al*., 1993) qui a été ajusté à l'ensemble des données :

$$\log_{10}(C(t)) = \log_{10}(C_{\max}) + \log_{10}\left(\frac{-1+\exp(\mu * t)+\exp(\mu * lag)}{-1+\exp(\mu * t)+\exp(\mu * lag) * 10^{(C_{\max}-C_0)}}\right)$$

Avec :
***C(t)* :** concentration mesurée au site t ;
***Cmax* :** concentration maximale estimée ;
***μ* :** taux d'accumulation estimé ;
***lag*** : site à partir duquel l'accumulation des contaminants dans les organismes est significative ;
***$C_0$* :** concentration minimale estimée.

La Figure 4 présente un exemple, basé sur les données obtenues pour le Cd, de détermination d'une valeur seuil à l'aide du modèle cinétique de Baranyi. La valeur seuil est déterminée par la concentration estimée au « *lag* ». Les paramètres du modèle de Baranyi (Cmax, lag, µ et

$C_0$) ont été estimés par maximum de vraisemblance, en utilisant le package «*nlstools*» du logiciel statistique R.

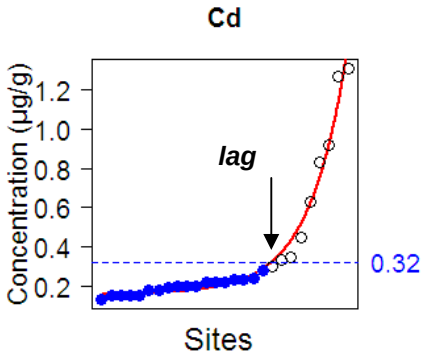



**Figure 4 : Exemple de valeur seuil déterminée pour le cadmium, selon l'approche cinétique (modèle de Baranyi). Sur la figure, les concentrations mesurées pour chaque site sont triées par ordre croissant. La courbe rouge correspond à l'ajustement moyen du modèle de Baranyi. Les points bleus correspondent à la phase de latence de la cinétique donc ici au «bruit de fond ». La valeur seuil (caractérisée par le trait pointillé bleu) correspond à la concentration au *lag* estimé, le point de rupture entre la phase de latence et la phase exponentielle.**

## 2.4 Indicateur de la contamination bio-disponible des milieux

### *2.4.1* G. fossarum *comme accumulateur*

La majorité des contaminants a été quantifiée dans les organismes après 7 jours d'exposition ( Tableau 3). Les ratios obtenus entre les plus fortes et les plus faibles valeurs de concentrations observées, montrent que le gammare est un bon accumulateur des polluants inorganiques et organiques, remplissant ainsi les conditions préalables pour être sélectionner comme espèce sentinelle dans le suivi de la contamination chimique (Rainbow, 2002). Seul pour le Cu et Zn, deux éléments essentiels fortement régulés chez les gammaridés, les capacités d'accumulation sont faibles.

### *2.4.2 Robustesse de la méthode : impact de facteurs biotiques et abiotiques.*

Les facteurs biotiques comme la taille, le sexe et le statut reproducteur sont connus pour influencer fortement le niveau de contamination des polluants dans les organismes, via la bio-dilution (croissance) ou la facilitation à accumuler les composés organiques (taux de lipides) (Andral *et al.*, 2004 ; Conti *et al.*, 2008 ; A19 ; Mubiana *et al.*, 2006). Le protocole d'exposition défini pour le gammare permet d'éviter l'impact de ces facteurs. Contrairement à

l'utilisation des bivalves, la possibilité de maîtriser la quantité et la qualité de la nourriture donnée aux gammares constitue un atout majeur. Ainsi, et ceci aussi bien pour l'ensemble du jeu de données ou uniquement pour les données inférieures aux valeurs seuils, aucune corrélation significative n'a été observée entre le poids moyen des organismes et les teneurs observées pour chacun des composés recherchés.

Les facteurs abiotiques, comme la température et la dureté ($Ca^{2+}$ et $Mg^{2+}$), ne peuvent être contrôlés lors de l'exposition des organismes. Par conséquent, leur impact doit être évalué et le cas échéant intégré à la définition des valeurs seuils. Au cours de cette étude, aucune influence de la température (comprise entre 9 et 19°C) sur les niveaux de contamination des gammares n'a été observée, corroborant les observations faites par Blais *et al*. (2003) et Pellet *et al* (2009 ; A30). L'impact de la dureté, notamment des ions $Ca^{2+}$ et $Mg^{2+}$ sur la bio-disponibilité et la toxicité des métaux est aujourd'hui bien connu et documenté (Heijerick *et al*., 2003 ; Lebrun *et al*., 2011 ; Peters *et al*., 2011 ; Wright et Frain, 1981). Ces ions interagissent aux niveaux des transporteurs ioniques, en compétition avec les ions métalliques, jouant ainsi un rôle protecteur pour les organismes vivants. L'impact de ces ions sur la physiologie des organismes, en particulier sur la densité des sites d'échanges, a été peu étudiée, mais semble négligeable. Ainsi, dans notre travail, aucune relation entre la dureté et les concentrations métalliques mesurées dans les organismes exposés n'a été observée. Ces observations sont en accord avec celles faites par Pellet et al. (2009 ; A30) chez *G. pulex* et Ma et al. (1999) chez *Ceriodaphnia dubia*, montrant que l'impact de ces ions sur la capacité physiologique des organismes à accumuler (nombre de canaux ioniques) est faible, voire négligeable. Ainsi, des *C. dubia* cultivées en milieu fortement et faiblement calcique présentent les mêmes capacités d'accumulation. Il est important de rappeler ici que, pour notre étude, les organismes ont été acclimatés durant 15 jours à des niveaux de dureté similaires à ceux des sites sur lesquels ils ont ensuite été exposés. Ces travaux confirment que la méthodologie développée est robuste, reposant sur l'utilisation d'une espèce accumulatrice des contaminants et permettant de contrôler et limiter au maximum l'impact de facteurs de confusion (biotiques et abiotiques). Cette approche de monitoring actif permet ainsi une comparaison fiable, dans le temps et l'espace, des niveaux de contamination biodisponible observés entre les sites étudiés.

**Tableau 3 : Concentrations en contaminants observées chez les organismes exposés sur les 27 sites étudiés. LQ : limite de quantification. Med, Min et Max sont respectivement les valeurs de la médiane, minimale et maximale des concentrations mesurées.**

| Metals | Concentration (µg $g^{-1}$ dw) | | | | | Frequency (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Med | Min | Max | Max/Min | LQ | |
| Cd | 0.22 | 0.13 | 1.31 | 10.4 | 0.04 | 100 |
| Pb | 0.28 | 0.14 | 1.39 | 9.9 | 0.07 | 93 |
| Hg | 0.049 | 0.040 | 0.107 | 2.7 | 0.010 | 100 |
| Ni | 0.48 | 0.27 | 1.29 | 4.8 | 0.19 | 85 |
| Ag | <LQ | <LQ | <LQ | – | 0.80 | 0 |
| As | 1.62 | 0.95 | 2.72 | 2.9 | 0.20 | 100 |
| Cr | 0.48 | 0.20 | 1.06 | 5.3 | 0.20 | 70 |
| Cu | 72.1 | 50.7 | 85.3 | 1.7 | 0.20 | 100 |
| Co | 0.32 | 0.13 | 0.96 | 7.4 | 0.08 | 100 |
| Se | 2.05 | 1.28 | 2.58 | 2.0 | 0.40 | 100 |
| Zn | 69.7 | 49.5 | 81.9 | 1.6 | 0.80 | 100 |

| Organic substances | Concentration (ng $g^{-1}$ dw) | | | | | Frequency (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Med | Min | Max | Max/Min | LQ | |
| Hexachlorobenzene | 0.5 | 0.4 | 10.0 | 27.5 | 0.3 | 41 |
| Lindane | 0.3 | 0.1 | 7.8 | 78.0 | 0.3 | 37 |
| Heptachlor | <LQ | <LQ | <LQ | – | 0.3 | 0 |
| Heptachlor epoxide | <LQ | <LQ | <LQ | – | 0.3 | 0 |
| 2,4′-DDE | 1.0 | 0.3 | 10.6 | 35.3 | 0.3 | 44 |
| 4,4′-DDE + dieldrin | 3.4 | 1.9 | 62.9 | 33.1 | 0.3 | 100 |
| 2,4′-DDD | <LQ | <LQ | <LQ | – | 0.3 | 0 |
| 4,4′-DDD | 2.9 | 1.4 | 44.6 | 31.8 | 0.3 | 100 |
| 2,4′-DDT | 1.3 | 0.6 | 59.2 | 98.7 | 0.3 | 100 |
| 4,4′-DDT | 1.7 | 1.0 | 48.4 | 48.4 | 0.3 | 52 |
| Naphthalene | 19.9 | 8.5 | 36.8 | 4.3 | 0.3 | 100 |
| Anthracene | 0.6 | 0.3 | 9.1 | 91.0 | 0.3 | 41 |
| Fluoranthene | 2.1 | 0.7 | 33.7 | 48.1 | 0.3 | 96 |
| Benzo(b,k,j) fluoranthene | 1.8 | 0.4 | 19.4 | 48.5 | 0.3 | 96 |
| Benzo(a)pyrene | 1.0 | 0.3 | 3.3 | 11.0 | 0.3 | 63 |
| Indeno(1,2,3-cd) pyrene | 0.9 | 0.4 | 4.8 | 12.0 | 0.3 | 59 |
| Benzo(g,h,i) perylene | 0.9 | 0.3 | 3.8 | 12.7 | 0.3 | 63 |
| Acenaphthylene | 0.7 | 0.3 | 2.7 | 9.37 | 0.3 | 85 |
| Acenaphthene | 1.5 | 0.8 | 5.6 | 6.84 | 0.3 | 100 |
| Fluorene | 2.0 | 0.4 | 8.3 | 20.9 | 0.3 | 96 |
| Phenanthrene | 4.1 | 0.4 | 39.9 | 100.5 | 0.3 | 93 |
| Pyrene | 2.0 | 0.4 | 47.7 | 124 | 0.3 | 100 |
| Benzo(a) anthracene | 1.2 | 0.3 | 14.7 | 48.9 | 0.3 | 100 |
| Benzo(e)pyrene | 0.7 | 0.3 | 5.7 | 20.6 | 0.3 | 70 |
| Triphene + chrysene | 1.7 | 0.6 | 23.8 | 41.1 | 0.3 | 100 |
| Perylene | 0.4 | 0.3 | 1.9 | 7.4 | 0.3 | 59 |
| DaA + DaC | 0.9 | 0.4 | 2.6 | 6.84 | 0.3 | 52 |
| CB 50 + 28 | 1.8 | 0.3 | 13.2 | 44.0 | 0.3 | 100 |
| CB 52 | 3.9 | 1.9 | 33.8 | 17.8 | 0.3 | 100 |
| CB 101 | 3.9 | 1.9 | 24.5 | 12.9 | 0.3 | 100 |
| CB 118 | 3.6 | 1.0 | 20.7 | 20.7 | 0.3 | 100 |
| CB 138 | 6.5 | 3.3 | 45.5 | 13.8 | 0.3 | 100 |
| CB 153 | 8.0 | 4.1 | 50.8 | 12.4 | 0.3 | 100 |
| CB 180 | 2.3 | 1.3 | 16.6 | 12.8 | 0.3 | 100 |
| BDE 47 | 2.4 | 0.9 | 5.0 | 5.5 | 0.3 | 100 |
| BDE 119 | <LQ | <LQ | <LQ | – | 0.3 | 0 |
| BDE 99 | 1.2 | 0.5 | 3.2 | 6.4 | 0.3 | 100 |
| BDE 153 | <LQ | <LQ | <LQ | – | 0.3 | 0 |

### *2.4.3 Valeurs seuil de la contamination bio-disponible*

Une fois la robustesse et la fiabilité de la méthodologie proposée validée, il a été possible d'utiliser ces données pour définir des valeurs seuils, en confrontant les deux méthodes (statistique et mathématique) présentées précédemment. Il est important de rappeler ici que, par « valeurs seuils », on entend toute valeur au-dessus de laquelle une concentration mesurée dans les organismes exposés peut être interprétée comme une contamination significative, soit supérieure au fond « régional » mesuré en l'absence de contamination du milieu. Une valeur de contamination dans les gammares supérieure à la valeur seuil signe un apport de contamination bio-disponible pour les gammares au niveau du site étudié. Les valeurs seuils obtenues à partir des deux approches sont présentées dans le Tableau 4. Pour une substance donnée, la valeur seuil définie est dite « valide » lorsque (1) une valeur a pu être calculée avec les deux approches mises en jeu (statistique et modélisation) et (2) lorsque les valeurs obtenues avec les deux approches sont similaires. Pour vérifier ce deuxième point, la différence entre les deux valeurs seuils obtenues pour chaque composé a été comparée à la concentration maximale mesurée chez les organismes encagés pour ce même composé, à l'aide de l'équation suivante :

$$Ratio\ de\ validité = \left| \frac{BBAC_{stat} - BBAC_{fit}}{C\max} \right| \times 100$$

Avec :
**BBAC stat :** valeur seuil déterminée selon l'approche statistique
**BBAC fit :** valeur seuil déterminée selon le modèle cinétique
**Cmax :** concentration maximale mesurée dans les organismes

Plus le ratio est faible, plus les valeurs seuils obtenues pour un composé sont fiables et pertinentes. Le Tableau 4 montre que pour 35 composés, les deux méthodes permettent de définir des valeurs seuils pertinentes, avec un ratio très faible (< 0,1, c'est-à-dire inférieur à 10 % de variabilité) pour 30 d'entre eux. Les ratios les plus forts (0,3) ont été observés pour le Hg et le BDE 99.

**Tableau 4: Valeurs seuils d'une contamination bio-disponible calculées à l'aide d'approches statistique et de modélisation. Les valeurs seuils sont exprimées en µg.g$^{-1}$ de poids sec pour les métaux et en ng.g$^{-1}$ de poids sec pour les composés organiques.**

| Investigated substances | | Threshold values | | Threshold validity | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Statistical approach | Model fit | Reliability ratio | Validity |
| Metals (µg g$^{-1}$ dw) | Cd | 0.3 | 0.3 | 0.00 | Valid |
| | Pb | 0.4 | 0.3 | 0.07 | Valid |
| | Hg | 0.06 | 0.09 | 0.30 | Valid |
| | Ni | 0.7 | 0.7 | 0.00 | Valid |
| | As | 2.5 | nd | nd | Not valid |
| | Co | 0.5 | 0.5 | 0.00 | Valid |
| | Cr | 0.9 | nd | nd | Not valid |
| | Cu | 73.9 | nd | nd | Not valid |
| | Se | 2.5 | nd | nd | Not valid |
| | Zn | 84.7 | nd | nd | Not valid |
| Pesticides (ng g$^{-1}$ dw) | Hexachlorobenzene | 0.6 | 1.0 | 0.04 | Valid |
| | Lindane | 0.4 | 0.7 | 0.04 | Valid |
| DDTs (ng g$^{-1}$ dw) | 2,4'-DDE | 1.9 | 1.6 | 0.03 | Valid |
| | 4,4'-DDE + dieldrin | 4.8 | 6.0 | 0.02 | Valid |
| | 4,4'-DDD | 3.9 | 5.0 | 0.02 | Valid |
| | 2,4'-DDT | 1.6 | 3.1 | 0.03 | Valid |
| | 4,4'-DDT | 2.8 | 3.2 | 0.01 | Valid |
| HAPs (ng g$^{-1}$ dw) | Naphthalene | 32.7 | nd | nd | Not valid |
| | Anthracene | 1.5 | 1.3 | 0.02 | Valid |
| | Fluoranthene | 3.5 | 3.3 | 0.01 | Valid |
| | Benzo(b,k,j)fluoranthène | 3.8 | 3.1 | 0.04 | Valid |
| | Benzo(a)pyrène | 1.3 | 0.9 | 0.12 | Valid |
| | Indeno(1,2,3-cd)pyrene | 1.7 | 1.6 | 0.02 | Valid |
| | Benzo(g,h,i)perylene | 1.3 | 1.1 | 0.05 | Valid |
| | Acenaphtene | 2.6 | 2.7 | 0.02 | Valid |
| | Acenaphthylene | 1.3 | 0.9 | 0.15 | Valid |
| | Fluorene | 2.9 | 1.6 | 0.16 | Valid |
| | Phenanthrene | 6.8 | 3.7 | 0.08 | Valid |
| | Pyrene | 3.3 | 3.1 | 0.00 | Valid |
| | Benzo(a)anthracene | 2.2 | 1.8 | 0.03 | Valid |
| | Benzo(e)pyrene | 1.3 | 1.1 | 0.04 | Valid |
| | Triphene + chrysene | 2.6 | 2.9 | 0.01 | Valid |
| | DaA–DaC | 1.6 | nd | nd | Not valid |
| | Perylene | 0.3 | 0.6 | 0.16 | Valid |
| PCBs (ng g$^{-1}$ dw) | 50 + 28 | 3.5 | 2.9 | 0.05 | Valid |
| | 52 | 4.9 | 7.9 | 0.01 | Valid |
| | 101 | 5.8 | 6.6 | 0.03 | Valid |
| | 118 | 5.5 | 4.3 | 0.06 | Valid |
| | 138 | 8.3 | 10.9 | 0.06 | Valid |
| | 153 | 11.5 | 13.3 | 0.04 | Valid |
| | 180 | 3.3 | 3.8 | 0.03 | Valid |
| PBDEs (ng g$^{-1}$ dw) | 47 | 4.3 | nd | nd | Not valid |
| | 99 | 2.1 | 1.1 | 0.30 | Valid |

nd, not determined.

Pour 8 des composés recherchés dans les organismes (As, Cr, Se, Zn, naphthalene, DaA+DaC and BDE 47), seule la méthode statistique a permis de définir une valeur seuil. Cette difficulté s'explique soit par l'absence de contamination sur la totalité des sites, ou inversement, par une contamination biodisponible sur l'ensemble des sites étudiés. Pour ces composés, l'ensemble des données disponibles suivent une distribution normale. Par conséquent, si on fait l'hypothèse que les niveaux de contamination des organismes ne peuvent suivre une loi normale uniquement qu'en milieux non contaminés, alors ces résultats suggèrent que les concentrations mesurées pour ces 8 composés représentent uniquement la contamination de « fond », c'est à dire la valeur observée en milieu contrôle sans apports

naturels ou anthropiques de contamination biodisponible. Ceci est en accord avec le fait qu'à partir du modèle d'ajustement, il n'a pas été possible d'estimer le « *lag* », c'est à dire le point de rupture à partir duquel les concentrations sont significativement différentes du niveau du « fond ». Cette dernière hypothèse a pu être vérifiée pour le Zn, en incluant des données de sites contaminés (allant jusqu'à 237 $\mu g.g^{-1}$ de poids sec) obtenues dans les mêmes conditions méthodologiques lors d'une de nos études sur le bassin versant du Riou Viou (A41). Une valeur seuil, légèrement plus élevée que la valeur maximale observée dans cette étude régionale, a pu être déterminée à l'aide des deux méthodes de calcul. Ces résultats soulignent la nécessité de disposer de données représentatives de sites contaminés pour déterminer des valeurs seuils valides.

### *2.4.4 Première application des valeurs seuil*

Afin d'évaluer la pertinence des valeurs seuils proposées, le classement initial proposé par l'Agence RM&C a été croisé avec une classification basée sur les valeurs seuils définies *via* le modèle de Baranyi (Tableau 5). Dans l'ensemble, excepté quelques sites et quelques composés, on retrouve le classement fait *a priori* par les gestionnaires des milieux, sur les sites non impactés (sites 1 à 12) et impactés (13 à 27).

Pour les contaminants organiques, excepté pour le site 12, les sites 1 à 11 montrent une faible contamination en composés organiques comme défini *a priori* par les experts de l'Agence de l'eau. A l'inverse, pour le site 12 classé *a priori* comme « référence », une contamination bio-disponible marquée en HAPs et en PCBs a été observée. De la même façon, les sites 13, 16 et 18, définis *a priori* comme impactés, n'ont qu'une très faible contamination bio-disponible avec des valeurs seuils dépassées pour seulement un composé organique. Ces différences entre le classement défini *a priori* par les experts de l'Agence de l'eau RM&C et le classement à l'aide des valeurs seuils définies peuvent s'expliquer par les raisons suivantes : (1) les conclusions obtenues auprès d'experts ne prennent pas en compte les paramètres physico-chimiques des sites d'étude, alors qu'ils jouent un rôle clé dans la bio-disponibilité des polluants ; (2) les niveaux de contamination ont été déterminés dans les organismes encagés sur une durée d'exposition d'une semaine, et par conséquent n'intègrent pas la variabilité de la contamination qui peut exister dans les systèmes aquatiques sur une

durée plus élevée et (3) les sites peuvent être contaminés par d'autres substances organiques que celles étudiées ici.

Toutefois, cette première application des valeurs seuils montre également un autre intérêt. Ces valeurs seuils permettent de caractériser, parmi les composés recherchés, quels sont les plus problématiques. Par exemple, ces résultats montrent que les sites 12, 23, 24 et 27 sont marqués par une contamination en HAP et en PCB. Le site 19 affiche une contamination spécifique en pesticides et en PCB.

Pour les métaux, cette nouvelle classification a montré que seuls 10 sites parmi les 27 étudiés ne présentent pas de concentrations plus élevées que les valeurs seuils, mais surtout qu'elle diffère de la classification faite par les experts de l'Agence de l'eau RM&C. Par exemple, les sites 1 à 3 et 10 à 12 sont marqués par une contamination bio-disponible en Cd et en Pb, marquant soit une pression anthropique non pré-identifiée, soit la présence de fonds géochimiques élevés. Actuellement, les informations disponibles sont trop faibles pour en tirer une conclusion définitive, mais nous pouvons constater d'une part que ces sites se trouvent en tête de bassin, à l'amont de toutes activités humaines, et d'autre part sont localisés dans la partie occidentale de la région Rhône-Alpes, près du Massif Central, connu pour présenter des fonds géochimiques élevés en As, Cd et Pb ((cf. programme de cartographie géochimique de référence FOREGS; http://www.gsf.fi/publ/foregsatlas)

**Tableau 5 : Classification des sites étudiés dans la région Rhône-Alpes à l'aide des valeurs seuils définies (utilisant l'ajustement du modèle de Baranyi). Les cases en gris foncé indiquent que la concentration dans le gammare est supérieure à la valeur seuil considérée (les valeurs sont exprimées en µg.g$^{-1}$ de poids sec pour les métaux et en ng.g$^{-1}$ de poids sec pour les composés organiques). Les sites numérotés de 1 à 12 sont les sites considérés *a priori* comme référence, c'est à dire non soumis à des pressions anthropiques, via les critères de l'agence de l'eau RM&C. Les sites 13 à 27 sont ceux considérés comme soumis à des pressions anthropiques à partir des critères de l'agence de l'eau RM&C.**

| Study sites | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Investigated substances | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 |
| Cd | 0.83 | 1.31 | 1.27 | 0.18 | 0.15 | 0.15 | 0.17 | 0.23 | 0.23 | 0.22 | 0.63 | 0.2 | 0.45 | 0.33 | 0.21 | 0.19 | 0.12 | 0.15 | 0.28 | 0.24 | 0.3 | 0.91 | 0.21 | 0.14 | 0.2 | 0.2 | 0.35 |
| Pb | <LQ | 0.17 | 0.31 | 0.22 | 0.16 | 0.14 | 0.14 | 0.43 | 0.19 | 0.27 | 0.46 | 0.85 | <LQ | 0.4 | 0.27 | 0.2 | 0.24 | 0.17 | 0.28 | 1.39 | 0.82 | 0.89 | 0.95 | 0.29 | 0.46 | 0.18 | 0.92 |
| Hg | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.05 | 0.11 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| Ni | 0.53 | 1.28 | 0.43 | 0.6 | 0.68 | 0.33 | 0.26 | <LQ | <LQ | 0.5 | 0.35 | 0.45 | 0.48 | 1.27 | 0.37 | 0.37 | 0.34 | 0.59 | 0.88 | 0.45 | <LQ | <LQ | 1.01 | 0.69 | 0.58 | 0.4 | 0.36 |
| Co | 0.33 | 0.23 | 0.27 | 0.33 | 0.13 | 0.14 | 0.14 | 0.47 | 0.27 | 0.31 | 0.33 | 0.39 | 0.46 | 0.32 | 0.28 | 0.27 | 0.29 | 0.26 | 0.96 | 0.24 | 0.43 | 0.44 | 0.5 | 0.39 | 0.36 | 0.23 | 0.34 |
| Hexachlorobenzene | 0.4 | <LQ | <LQ | <LQ | 0.4 | 0.5 | <LQ | <LQ | <LQ | 0.4 | <LQ | 0.9 | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | 10.0 | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | 0.6 | <LQ | 0.6 | 0.5 |
| Lindane | 0.3 | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | 0.4 | <LQ | <LQ | <LQ | 0.3 | 0.4 | 0.4 | <LQ | 0.4 | <LQ | 7.8 | 0.4 | <LQ | 0.4 | 1.4 | <LQ | 0.6 | <LQ | <LQ |
| 2,4'-DDE | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | 1.7 | 0.3 | 1.1 | 1.5 | <LQ | 0.6 | 0.3 | 10.6 | <LQ | <LQ | 0.4 | 2.1 | 0.9 | 1.0 | <LQ | 0.7 |
| 4,4'-DDE + dieldrin | 2.4 | 2.9 | 2.6 | 2.5 | 3.2 | 2.3 | 2.4 | 1.9 | 2.3 | 2.3 | 3.9 | 3.4 | 4.2 | 4.2 | 3.3 | 3.1 | 3.6 | 3.5 | 37.0 | 3.9 | 3.9 | 6.9 | 5.5 | 5.1 | 3.4 | 10.4 | 62.9 |
| 4,4'-DDD | 2.0 | 1.9 | 1.9 | 1.9 | 1.9 | 2.0 | 2.3 | 1.6 | 2.4 | 2.1 | 3.6 | 3.7 | 1.4 | 3.5 | 2.3 | 3.0 | 1.8 | 3.3 | 44.6 | 3.4 | 2.9 | 4.3 | 6.3 | 5.2 | 3.3 | 5.9 | 24.3 |
| 2,4'-DDT | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.1 | 0.8 | 0.9 | 0.6 | 0.8 | 0.7 | 0.9 | 1.3 | 2.2 | 1.3 | 3.1 | 2.9 | 2.3 | 2.6 | 59.2 | 2.3 | 2.3 | 2.4 | 2.3 | 1.9 | 1.5 | 1.2 | 2.8 |
| 4,4'-DDT | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | 1.2 | 1.3 | 1.7 | 1.9 | 1.7 | 1.7 | 48.4 | 2.8 | 2.3 | 2.1 | 2.9 | 1.4 | 1.0 | <LQ | 12.5 |
| Anthracene | <LQ | <LQ | 0.7 | <LQ | 0.4 | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | 1.7 | <LQ | <LQ | 0.5 | 1.0 | <LQ | 0.3 | <LQ | 0.9 | <LQ | 0.7 | 3.7 | 9.1 | 0.4 | 0.3 | 1.2 |
| Fluoranthene | 0.9 | 0.7 | 1.4 | 1.7 | 1.6 | 1.0 | 0.8 | 1.2 | <LQ | 1.0 | 1.7 | 7.3 | 0.7 | 2.0 | 3.4 | 2.3 | 3.4 | 2.9 | 1.5 | 6.5 | 2.3 | 4.8 | 33.7 | 24.2 | 4.3 | 2.3 | 9.8 |
| Benzo(b,k,j) fluoranthene | 0.4 | 0.6 | 1.0 | 1.2 | 1.7 | <LQ | 0.6 | 1.4 | 0.6 | 1.6 | 1.5 | 5.6 | 0.8 | 1.7 | 3.2 | 2.1 | 2.8 | 2.0 | 1.0 | 4.7 | 3.2 | 3.7 | 19.4 | 7.8 | 3.1 | 1.9 | 8.7 |
| Benzo(a)pyrene | <LQ | <LQ | <LQ | 0.5 | <LQ | <LQ | <LQ | 0.5 | <LQ | <LQ | 0.3 | 0.6 | <LQ | 1.1 | 1.0 | 0.9 | 1.1 | 0.7 | <LQ | 1.2 | 1.1 | 1.2 | 3.0 | 3.3 | 0.3 | 0.6 | 2.8 |
| Indeno(1,2,3-cd) pyrene | <LQ | <LQ | <LQ | 0.5 | 0.4 | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | <LQ | 1.4 | <LQ | 0.5 | 0.9 | 0.9 | 1.0 | 0.7 | <LQ | 0.9 | 1.3 | 1.1 | 4.8 | 1.7 | 0.7 | 0.6 | 1.8 |
| Benzo(g,h,i) perylene | <LQ | <LQ | <LQ | 0.3 | 0.4 | <LQ | <LQ | 0.6 | <LQ | <LQ | <LQ | 1.6 | <LQ | 0.5 | 0.9 | 0.6 | 0.7 | 0.6 | 0.1 | 0.9 | 1.0 | 1.1 | 3.8 | 2.2 | 0.9 | 0.9 | 2.1 |
| Acenaphthylene | 0.4 | 0.5 | 0.3 | <LQ | 0.7 | 0.4 | 0.3 | <LQ | <LQ | 0.3 | 0.3 | 0.9 | 0.6 | 0.6 | 0.9 | <LQ | 1.0 | 0.7 | 1.1 | 1.4 | 0.9 | 1.1 | 1.2 | 2.7 | 1.0 | 0.5 | 0.8 |
| Acenaphthene | 1.5 | 1.5 | 1.9 | 0.8 | 1.7 | 1.4 | 1.3 | 1.0 | 0.9 | 1.3 | 0.9 | 5.6 | 1.7 | 1.3 | 1.9 | 1.2 | 1.5 | 1.5 | 2.2 | 2.5 | 1.4 | 1.6 | 3.1 | 2.9 | 1.9 | 1.5 | 2.2 |
| Fluorene | 1.2 | 1.2 | 2.7 | 0.7 | 1.9 | 1.4 | 0.7 | 0.7 | <LQ | 0.5 | 0.6 | 6.1 | 2.6 | 1.8 | 2.2 | 1.5 | 2.0 | 2.1 | 2.6 | 2.7 | 1.4 | 2.4 | 8.3 | 6.5 | 4.8 | 0.4 | 5.1 |
| Phenanthrene | 2.2 | 2.0 | 8.7 | 2.1 | 4.4 | 3.5 | 0.6 | 2.1 | <LQ | 1.6 | 0.7 | 17.2 | 4.2 | 3.0 | 6.3 | 2.6 | 4.1 | 5.5 | 4.8 | 3.3 | 0.4 | 5.3 | 39.9 | 37.8 | 12.5 | <LQ | 26.6 |
| Pyrene | 0.7 | 0.5 | 2.1 | 1.1 | 1.3 | 0.5 | 0.8 | 1.1 | 0.4 | 1.2 | 1.5 | 6.0 | 0.8 | 2.1 | 2.4 | 1.9 | 2.6 | 3.0 | 2.0 | 8.0 | 2.0 | 4.1 | 40.7 | 47.7 | 5.4 | 2.9 | 10.8 |
| Benzo(a)anthracene | 0.6 | 0.3 | 0.6 | 0.9 | 0.8 | 0.5 | 0.6 | 1.0 | 0.3 | 0.6 | 0.8 | 2.2 | 0.6 | 1.3 | 1.8 | 1.3 | 1.5 | 1.2 | 1.1 | 4.8 | 1.9 | 2.2 | 14.7 | 11.4 | 2.4 | 1.3 | 3.9 |
| Benzo(e)pyrene | <LQ | <LQ | <LQ | 0.3 | 0.4 | <LQ | <LQ | 0.3 | <LQ | 0.4 | 0.4 | 1.5 | <LQ | 0.4 | 0.7 | 0.6 | 0.8 | 0.5 | <LQ | 1.2 | 0.9 | 1.1 | 5.7 | 2.6 | 0.9 | 0.7 | 2.3 |
| Triphene + chrysene | 0.6 | 0.6 | 1.1 | 1.5 | 1.5 | 0.7 | 0.6 | 1.2 | 0.6 | 1.5 | 1.6 | 4.1 | 0.7 | 1.7 | 2.4 | 1.8 | 2.1 | 2.0 | 1.4 | 6.0 | 2.4 | 4.0 | 23.8 | 13.4 | 4.6 | 2.8 | 9.1 |
| Perylene | <LQ | <LQ | <LQ | 0.3 | 0.4 | <LQ | <LQ | 0.3 | <LQ | 0.4 | 0.4 | 1.5 | <LQ | 0.3 | 0.3 | 0.7 | 0.5 | 0.3 | <LQ | <LQ | 0.3 | 0.5 | 1.2 | 0.8 | 0.4 | 0.3 | 1.9 |
| PCB 50 + 28 | 2.0 | 1.6 | 1.6 | 1.5 | 3.8 | 1.8 | 0.6 | 0.3 | 1.0 | 1.6 | 0.6 | 5.9 | 1.2 | 2.2 | 2.1 | 1.1 | 2.9 | 1.8 | 13.2 | 1.2 | 0.7 | 1.5 | 4.7 | 3.2 | 5.3 | 2.6 | 2.3 |
| PCB 52 | 3.9 | 2.6 | 3.5 | 3.5 | 4.2 | 2.7 | 2.5 | 2.7 | 2.7 | 3.9 | 2.4 | 8.6 | 4.1 | 7.7 | 9.8 | 2.2 | 4.3 | 3.8 | 33.8 | 3.2 | 1.9 | 2.7 | 8.3 | 4.6 | 9.4 | 3.9 | 5.6 |
| PCB 101 | 3.9 | 4.7 | 3.6 | 3.8 | 3.9 | 2.3 | 2.9 | 1.9 | 2.6 | 3.6 | 3.3 | 9.3 | 3.7 | 9.8 | 13.5 | 2.7 | 4.0 | 3.7 | 24.5 | 5.0 | 3.6 | 7.3 | 14.9 | 7.6 | 8.7 | 4.8 | 4.8 |
| PCB 118 | 2.9 | 3.4 | 2.7 | 3.5 | 2.7 | 1.4 | 1.2 | <LQ | 1.0 | 2.7 | 2.8 | 13.5 | 3.7 | 11.0 | 16.3 | 3.9 | 4.0 | 3.8 | 20.7 | 1.8 | 2.0 | 5.7 | 8.7 | 3.6 | 7.1 | 2.9 | 4.0 |
| PCB 138 | 5.3 | 6.1 | 6.6 | 7.4 | 6.6 | 3.4 | 4.1 | 3.3 | 3.4 | 4.9 | 5.8 | 10.6 | 6.0 | 14.0 | 16.6 | 5.3 | 6.1 | 5.8 | 45.5 | 9.9 | 5.1 | 23.5 | 31.8 | 12.9 | 12.0 | 10.8 | 6.5 |
| PCB 153 | 6.8 | 8.4 | 8.2 | 8.9 | 8.0 | 4.6 | 5.4 | 4.1 | 4.9 | 6.9 | 7.5 | 10.6 | 7.6 | 16.7 | 16.5 | 6.5 | 7.4 | 6.8 | 50.8 | 12.1 | 5.7 | 30.8 | 36.6 | 16.7 | 13.7 | 16.7 | 7.6 |
| PCB 180 | 1.6 | 1.6 | 2.3 | 2.6 | 2.5 | 2.0 | 1.9 | 1.7 | 2.0 | 2.2 | 2.8 | 2.4 | 1.6 | 3.8 | 4.1 | 1.8 | 1.4 | 1.3 | 16.6 | 3.0 | 1.4 | 9.1 | 14.2 | 4.9 | 3.8 | 3.5 | 2.1 |
| BDE 99 | 1.3 | 1.9 | 1.0 | 1.1 | 1.8 | 0.9 | 1.0 | 0.5 | 1.0 | 0.7 | 1.7 | 1.4 | 0.8 | 1.4 | 1.4 | 0.6 | 0.6 | 0.9 | 1.5 | 1.3 | 0.5 | 0.6 | 3.2 | 1.7 | 2.7 | 1.2 | 2.2 |

LQ, limit of quantification.

# 3 Développement de marqueurs de toxicité chez *Gammarus fossarum*

## 3.1 Contexte

Le développement de méthodes pour la mesure des biomarqueurs chez les invertébrés pose différentes questions : quels biomarqueurs est-il pertinent et judicieux de développer ?, Quelle démarche faut-il mettre en place pour choisir ces biomarqueurs ? Peut-on dans tous les cas utiliser ou adapter les méthodes développées et disponibles chez les vertébrés ?

Aujourd'hui, un grand nombre de publications sont disponibles sur le développement de biomarqueurs chez les invertébrés, passant par (1) la mesure d'activités enzymatiques pour le suivi d'enzymes impliquées dans l'influx nerveux (activité cholinestérasique), les mécanismes de défense (GST, EROD) et le métabolisme énergétique (enzymes digestives) ; (2) la mesure de protéines telles que la métallothionène et la vitellogénine, ou encore (3) la mesure de modification de molécules clefs comme l'ADN, les adduits, les cassures (essai des Comètes) ou les micronoyaux. Si des méthodes existent aujourd'hui pour permettre d'intégrer l'ensemble de ces biomarqueurs en un indicateur unique IBR (Beliaeff et Burgeot, 2002), il n'en demeure pas moins qu'il reste difficile d'appréhender la redondance de certains biomarqueurs entre eux. Par ailleurs, il est difficile de les hiérarchiser et les pondérer les uns par rapport aux autres en fonction de l'information qu'ils donnent, d'une part sur la typologie des contaminants présents et responsables de leur modulation, et d'autre part sur la prédiction d'effets toxiques aux niveaux supérieurs d'organisation biologique.

Dans ce contexte, j'ai choisi d'orienter mes activités de recherche, chez *G. fossarum*, vers le développement de biomarqueurs, non pas directement liés à des modes d'action spécifiques de polluants, mais spécifiques de grandes fonctions physiologiques ayant un lien direct avec la fitness des organismes et le maintien des populations. Les biomarqueurs sélectionnés sont la mesure des activités cholinestérasiques (neurotoxicité), des cassures à l'ADN *via* le test des Comètes (génotoxicité) et de la vitellogènine chez les mâles (perturbation endocrinienne). Ces travaux ont également eu pour objectifs de développer un biotest pour étudier l'impact des polluants sur la reproduction de cette espèce. Cette partie du manuscrit porte sur le développement de méthodes robustes et fiables et leur validation en laboratoire.

## 3.2 Activités cholinestérasiques : biomarqueur de neurotoxicité

### *3.2.1 Généralité*

Le système nerveux est le centre de contrôle du fonctionnement des activités végétatives et motrices des métazoaires. Il réceptionne les informations sensorielles et motrices en provenance du milieu extérieur ou du corps lui-même, et les véhicule directement ou *via* le système hormonal vers les organes effecteurs, en vue d'une réponse volontaire ou en attente d'une régulation réflexe adéquate. La fonction nerveuse conditionne directement la capacité d'un organisme à évoluer et à survivre dans son environnement. Durant ces dernières décennies, plusieurs centaines de composés chimiques ont été identifiés comme neurotoxiques pour les organismes (Hoffman *et al*., 2003). Il est généralement établi que les changements dans la chimie du système nerveux, suite à l'exposition à des neurotoxiques, précèdent généralement de graves altérations de la santé de l'organisme (Stamler *et al*., 2005). Ces changements (*i.e*., le niveau des neurotransmetteurs, l'activité des enzymes de métabolisation ainsi que l'occurrence et le fonctionnement des récepteurs) peuvent être utilisés pour diagnostiquer l'exposition à ces composés neurotoxiques (Manzo *et al*., 2001).

La mesure de l'activité des cholinestérases (ChE) est de loin le biomarqueur de neurotoxicité qui a été le plus étudié et le plus utilisé, ces dernières années, en écotoxicologie des milieux aquatiques. Les autres marqueurs, comme le métabolisme de l'acide γ-aminobutyric, les niveaux de monoamines (e.g., la sérotonines et dopamine) ou l'activité des monoamine-oxidase, n'ont fait l'objet que d'études ponctuelles (e.g., Gagné *et al*., 2007).

### *3.2.2 Identification et caractérisation*

Le nombre d'isoformes de l'enzyme cholinestérase (ChE), ainsi que leur sensibilité vis-à-vis des composés anti-ChE, peuvent varier en fonction du taxon considéré. Ainsi, la première étape de ces travaux a été d'identifier la ou les isorformes présentes chez notre espèce modèle, *G. fossarum*, et de proposer une méthode de quantification fiable et robuste de cette activité. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de la thèse de B. Xuereb et d'un projet Ecco (PP1).

La caractérisation biochimique et pharmacologique des activités cholinestérases chez *G. fossarum* a permis de mettre en évidence qu'il existe qu'une seule isoforme présentant les propriétés d'une acétylcholinestérase (Ache) de vertébrés, puisqu'elle (1) hydrolyse préférentiellement l'acétylthiocoline en comparaison aux autres substrats testés (la butyrylthiocholine et la propionylthiocholine) (Figure 5) et (2) est spécifiquement inhibée par l'ésérine sulfate (inhibiteur des cholinestérases en général) et par le BW284c51 (inhibiteur spécifique des acétylcholinestérases de vertébrés), mais non par l'iso-OMPA (spécifique de la butyrylcholinestérase de vertébrés) (Figure 6). Cette isoforme (Ache de vertébrés) a également été identifiée chez plusieurs espèces de crustacés marins (Cunha *et al.*, 2005 ; Forget and Bocquene, 1999 ; Forget *et al.*, 2002 ; Frasco *et al.*, 2006 ; Garcia de la Perra *et al.*, 2006), alors que peu de données sont disponibles pour les espèces d'eau douce.

Enfin, des relations dose-réponse ont été observées pour deux classes de composés anti-Ache, l'organophosphoré chlorpyrifos et le carbamate méthomyl, pour des concentrations réalistes (de l'ordre du $\mu g.l^{-1}$) par rapport à celles observées dans les milieux, confirmant la sensibilité des crustacés vis-à-vis de ces composés et l'intérêt de cette espèce comme organisme sentinelle.

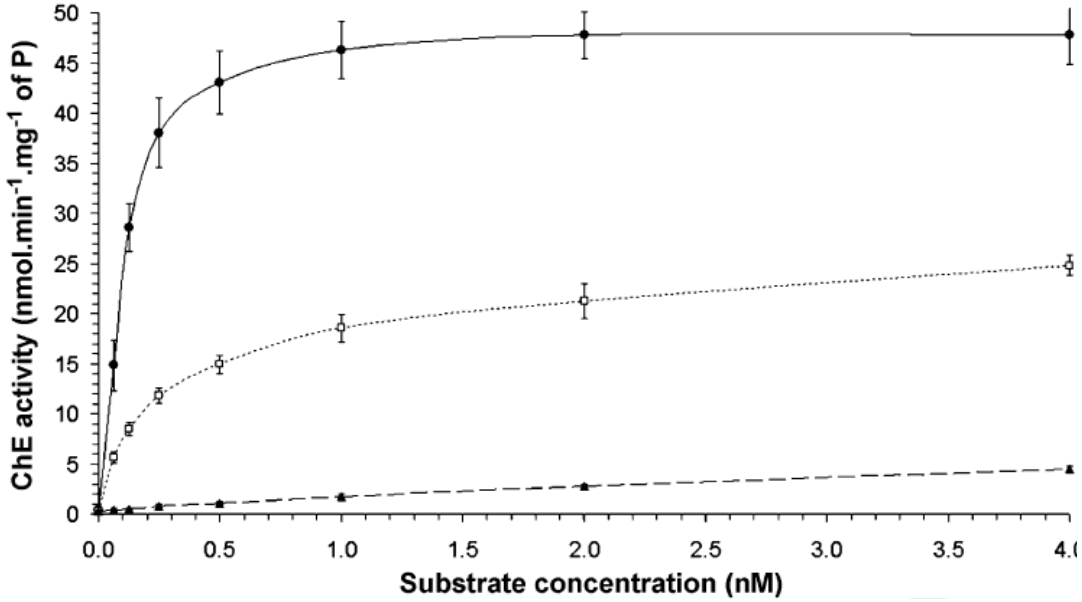



**Figure 5 : Affinité des activités cholinestérasiques chez *G. fossarum* vis-à-vis de trois substrats, l'acétylthiocholine (●), le propionylthiocholine (□) et le butyrylthiocholine (▲). Résultats exprimés en activité mesurée en fonction de la concentration en substrat testée (moy ± E.T, n = 3).**

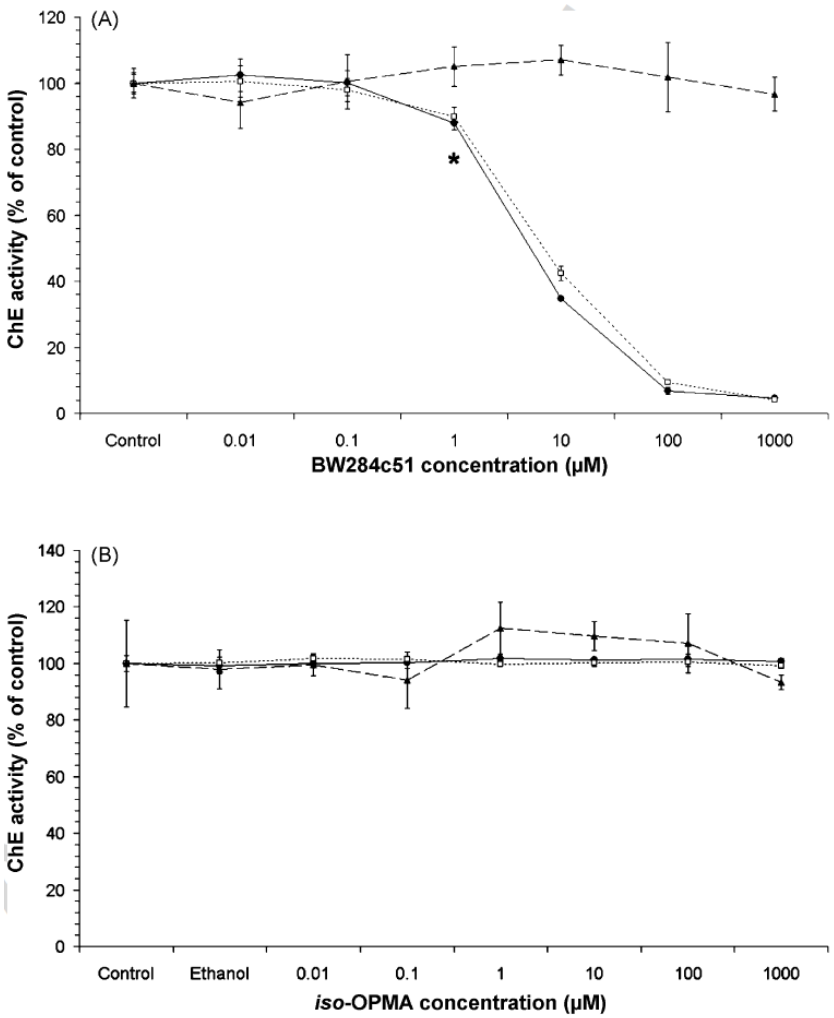



**Figure 6 : Inhibitions exprimées en % du contrôle (moy ± E.T, n = 3) des activités cholinestérasiques chez *G. fossarum* mesurées à l'aide de plusieurs substrats, l'acétylthiocholine (●), le propionylthiocholine (□) et le butyrylthiocholine (▲), après une exposition aux inhibiteurs, BW284c51 (A) et iso-OMPA (B).**

### *3.2.3 Source d'erreurs dans l'interprétation*

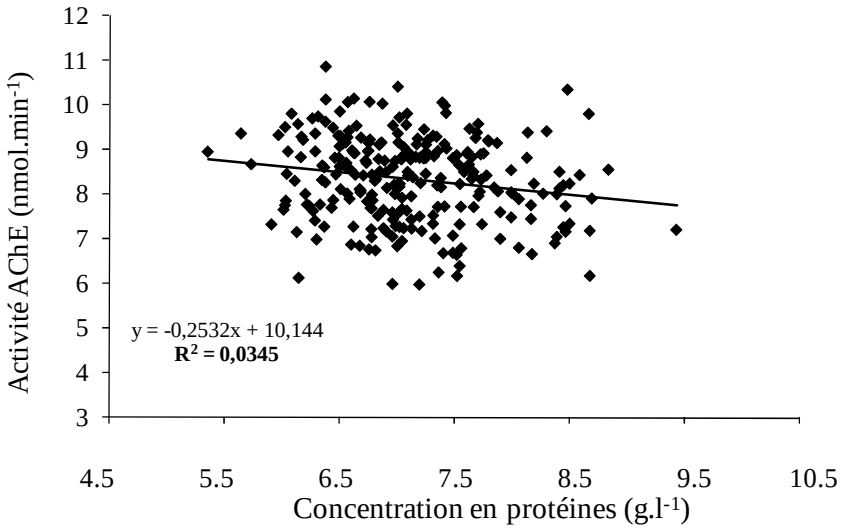
La quantification d'une activité enzymatique tient aux méthodes d'extraction, aux conditions de protocoles (e.g. concentration en substrat), mais également à l'unité utilisée pour exprimer les mesures. Concernant l'activité Ache, les données de la littérature sont principalement exprimées (1) à l'aide d'unité relative ($DO.mL^{-1}$) ou en pourcentage d'inhibition du contrôle (Forget et Bocquene, 1999, Forget *et al.*, 2002 ; Kuhn and Streit, 1994), rendant impossible les comparaisons entre espèces, mais également entre expérimentations au sein d'une même espèce ; (2) en quantité de substrat hydrolysée en fonction du temps, normalisée par la teneur en protéines de l'échantillon. Cette normalisation à l'aide de la teneur en protéines, initialement utilisée pour la mesure dans des tissus

spécifiques (muscle, foie et cerveau) de vertébrés, a pour but de corriger des différences d'efficacité d'extraction lors du broyage, pouvant avoir lieu entre opérateurs et selon la méthode utilisée. Si cette approche peut être acceptable lors d'utilisation de tissus spécifiques pour lesquels nous pouvons faire l'hypothèse que les teneurs en protéines restent constantes au cours du temps, son utilisation chez les invertébrés, chez qui l'organisme entier est utilisé pour une question de taille, doit être validée. En effet, le recours à cette normalisation impose soit que les teneurs en protéines des organismes ne varient pas, soit que la teneur totale en protéines des organismes soit directement corrélée à la teneur en enzyme acétylcholinestérase.

Les résultats d'un suivi de l'activité Ache chez des mâles de taille similaire (15 – 20 mg) sur deux stations non contaminées sont présentés en Figure 7. Ces résultats montrent que les teneurs en protéines des organismes varient considérablement (de 5,5 à 9,5 $mg.L^{-1}$) au cours. De plus, aucune corrélation entre les teneurs en protéines et les activités Ache non normalisées a été observée (Figure 7A). A l'inverse, une corrélation significative est obtenue entre les activités enzymatiques normalisées et les teneurs en protéines (Figure 7B). Contrairement à ce qui est couramment fait dans la littérature, ces résultats montrent que la teneur en protéine des organismes ne peut pas être utilisée pour normaliser les activités Ache mesurées sur organisme entier chez cette espèce. Des observations identiques ont été rapportées pour d'autres espèces d'invertébrés comme les mollusques (Radenac *et al*., 1998; Owen *et al*., 2002; Lau *et al*., 2004; Leinio et Lehtonen, 2005) et les micro-crustacés (Printes et Callaghan, 2004, chez *Daphnia magna*), et ceci aussi bien pour des mesures réalisées sur des organismes entiers que sur des tissus spécifiques. Par conséquent, et en accord avec les conclusions d'Owen *et al*. (2002), les activités Ache mesurées chez *G. fossarum* ont été exprimées en $nmol.min^{-1}$ pour la suite de nos travaux, en proposant un protocole précis à respecter.

Bien que l'intérêt des biomarqueurs dans l'évaluation de l'impact toxique des milieux ne soit plus à démontrer, leur utilisation dans la surveillance reste anecdotique car, pour un grand nombre d'entre eux, il reste encore difficile de relier directement leur modulation à une contamination chimique des milieux étudiés. Le biomarqueur « idéal » doit être modulé uniquement par la présence d'une contamination biodisponible ; or, en réalité, ceci n'a que très peu de chance de se produire (Sheelan & Power, 1999 ; Menezes *et al*., 2006).

**A**




**B**

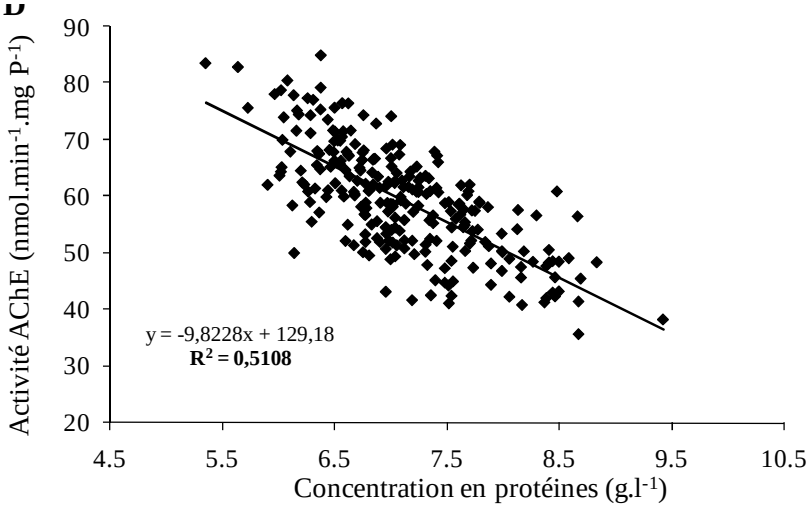



**Figure 7 : Relation entre la teneur en protéines (g.L$^{-1}$) et l'activité Ache non normalisée (nmol.min$^{-1}$ ; A) et normalisée (nmol.min$^{-1}$.mg de protéines$^{-1}$ ; B). Données obtenues à partir de mâles de taille similaire (entre 15 et 20mg/individu) prélevés sur deux sites non contaminés au cours d'un suivi mensuel sur une année.**

La réponse des biomarqueurs est sous l'influence de nombreux facteurs biotiques (espèce, taille, sexe, statut reproducteur) et abiotiques (facteurs environnementaux, voir partie 4.2.1). Ce sont ces contraintes qui ont limité l'utilisation des biomarqueurs dans la surveillance des milieux aquatiques.

Pour l'Ache, et dans le but de proposer la mesure de cette activité enzymatique comme outil robuste et fiable, nous avons cherché à définir s'il était nécessaire de sélectionner « un organisme standard » permettant de minimiser la variabilité inter-individuelle. Pour cela, nous avons étudié le niveau d'activité de cette enzyme en fonction de diverses variables physiologiques, comme le sexe et la taille. Ces travaux menés dans le cadre de la thèse de B. Xuereb (A27) ont montré qu'il n'existe aucune différence d'activité de base entre les mâles et les femelles chez cette espèce, en accord avec ce qui a déjà été observé chez des poissons (Payne *et al*., 1994; Flammarion *et al*., 2002a; Solé *et al*., 2006; Pathiratne *et al*., 2008) et des crustacés (Forget *et al*., 2003; Solé *et al*., 2006). Toutefois, une modulation significative de l'activité a pu être observée chez les femelles au cours de l'ovogénèse (croissance ovocytaire). Cette diminution d'activité correspond à un artéfact de mesure du à la dilution biologique liée à la croissance des gonades, représentant jusqu'à 15% du poids de la femelle en fin d'ovogénèse. Par conséquent, et pour limiter cette variabilité, les individus mâles ont été choisis comme support biologique pour la mesure de cette activité enzymatique.

En revanche, ces études ont montré que la taille est un facteur important à prendre en compte. Le niveau d'activité Ache est inversement proportionnel à la taille des organismes (Figure 8). Les fortes activités observées chez les jeunes diminuent de façon exponentielle au cours de la croissance et tendent à se stabiliser chez les adultes d'un poids supérieur à 20 mg. Des résultats similaires ont été obtenus aussi bien chez les poissons (Burgeot *et al*., 1996; Flammarion *et al*., 2002b) que chez des crustacés comme *Daphnia magna* (Printes et Callaghan, 2003), le copépode *Tigriopus brevicornis* (Forget et Bocquene, 1999) et la crevette *Palaemonetes pugio* (Hoguet et Key, 2007). Ainsi, ce sont les individus mâles d'un poids compris entre 15 et 20 mg qui ont été retenus pour la proposition d'un protocole robuste et fiable. La pertinence de ce protocole pour diagnostiquer la présence de composés anti-cholinestérasiques a été validée *via* l'établissement de relations dose-réponse pour deux molécules modèles, un organophosphoré (le chlorpyrifos) et un carbamate (le méthomyl) (A20 et A28).

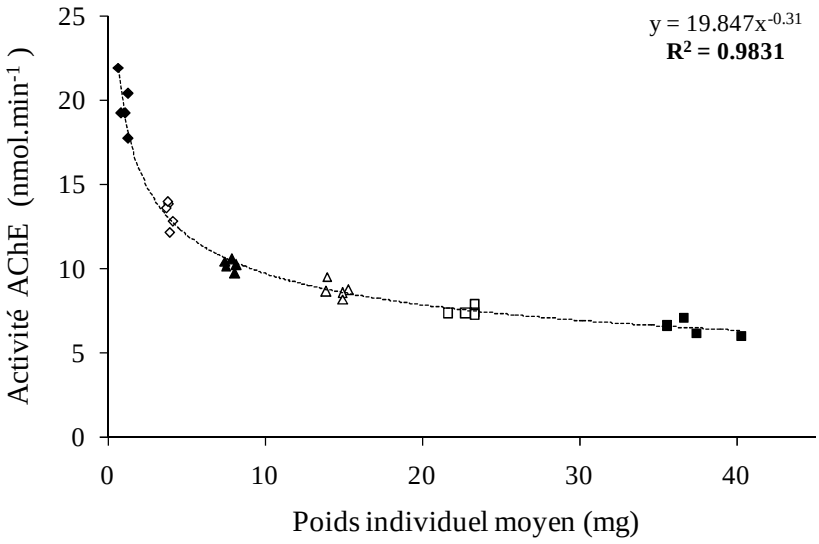



**Figure 8 : Relation entre l'activité Ache (nmol.min$^{-1}$) et le poids individuel moyen (mg) chez des mâles *Gammarus fossarum*.**

### 3.3 Test des Comètes : impacts génotoxiques

L'ADN, support moléculaire de l'hérédité, assure le fonctionnement cellulaire de tout organisme et permet à la cellule d'être réactive aux messages de son environnement. Elle assure la transmission des informations en général, qui dans certains cas peuvent être «toxiques». Ainsi, parmi les contaminants potentiels de la biosphère, ceux qui peuvent interagir directement ou indirectement avec le matériel génétique présentent un intérêt d'étude tout particulier car ils peuvent interférer avec l'ensemble du métabolisme cellulaire, et conduire à la transmission d'informations erronées, entraînant des perturbations au niveau du cycle cellulaire, de la croissance, de la différentiation. L'évaluation de la génotoxicité des milieux aquatiques se fait par deux approches : la première repose sur la mise en oeuvre d'essais bactériens, tels que le test d'Ames, le SOS chromotest et le SOS/umu test ; la deuxième est basée sur l'utilisation d'essais sur organismes aquatiques, tels que la mesure d'adduits par post marquage au $^{32}$P, l'essai micronoyau et le test des Comètes.

Le test des Comètes en conditions alcalines repose sur une microélectrophorèse de noyaux de cellules isolées, en gel d'agarose sur microlames. C'est un essai applicable à de nombreux types cellulaires. Il apparaît aujourd'hui comme une technique efficace et sensible pour l'étude des dommages primaires à l'ADN, dans le domaine de l'écotoxicologie

aquatique (Jha, 2008 ; Dhawan *et al*., 2009). Toutefois, bien que fréquemment utilisé sur les invertébrés tels que les bivalves, il n'a été que très peu exploré chez les crustacés (Lee & Steinert, 2003) et jamais chez un crustacé d'eau douce d'intérêt écologique, comme le gammare.

Cette partie des travaux, réalisée dans le cadre de la thèse d'E. Lacaze (co-encadrement A. Devaux, INRA-ENTPE) et du projet ANR-CES, (Resyst, A. Feurtet-Mazel, PC4), avait pour objectif de mettre en place et de valider l'utilisation de l'essai des Comètes chez *G. fossarum* (A35). Ces travaux se sont basés sur l'étude de trois types cellulaires : les hémocytes et les gamètes mâles et femelles. Au-delà de la sensibilité, le rôle fonctionnel du type cellulaire est également un critère de choix important. La majorité des études menées sur l'impact génotoxique de polluants en milieux aquatiques utilise les hémocytes ou érythrocytes (Jha *et al*., 2005 ; Hagger *et al*., 2005 ; Tran *et al*., 2007). Ces cellules circulantes présentent l'intérêt d'être directement en contact avec le milieu extérieur, donc les polluants, et constituent un bon indicateur de l'état de santé des organismes. D'un point de vue technique, l'échantillonnage de ces cellules est simple et la plupart du temps non invasif. Les gamètes sont bien plus rarement utilisés en écotoxicologie aquatique, ceci malgré leur rôle fonctionnel dans la reproduction et donc le maintien des populations. Des travaux existent uniquement chez le pétoncle *Chlamys farreri* (Jing-Jing *et al*., 2009) et sur les oeufs non fécondés d'oursins (*Paracentrotus lividus* et *Sphaerechinus granularis*) (Nahon *et al*., 2008). Quelques études sont disponibles pour les spermatozoïdes, chez l'huître *Crassostrea gigas* (Gwo *et al*., 2003), les moules *Mytilus edulis* et *Perna viridis* (Nagarajappa *et al*, 2006 ; Lewis et Galloway, 2009), l'oursin *Sphaerechinus granularis* (Pruski *et al*., 2009), et le polychète *Arenicola marina* (Lewis et Galloway, 2008).

Pour sélectionner le type cellulaire le plus sensible et le plus discriminant, les niveaux de base de dommages à l'ADN et la sensibilité aux contaminants ont été recherchés à l'aide d'approches *in vitro* (exposition des cellules aux polluants), *in vivo* (exposition des organismes aux polluants) et *in situ* (encagement d'organismes en milieux naturels). Pour l'ensemble des approches, des niveaux faibles de dommages ont été observés sur les trois types cellulaires en conditions contrôles Tableau 6, avec des valeurs (% tail DNA) similaires à celles couramment observées dans la littérature. Suite aux expériences *in vitro* et *in vivo* réalisées à l'aide de MMS (methyl-methane-sulfonate), des relations dose-réponse ont été

observées pour l'ensemble des tissus testés (Tableau 6 et Tableau 7), validant ainsi le protocole mis en œuvre pour l'utilisation de cet essai sur les trois types cellulaires. Toutefois, lors d'expérimentations *in situ*, seule l'utilisation des spermatozoïdes a permis de discriminer de façon significative l'impact génotoxique de rejets de stations d'épuration, avec des facteurs d'induction compris entre 3,5 et 4, contre des facteurs d'induction ne dépassant jamais 1,4 pour les deux autres types cellulaires. Ainsi, les spermatozoïdes sont apparus comme le tissu cible de choix pour la suite de nos travaux, d'une part en regard à leur sensibilité vis à vis des contaminants, et d'autre part en lien avec leur rôle fonctionnel dans la reproduction.

**Tableau 6 : Niveaux d'endommagement de l'ADN (% tail DNA, moy ± E.T, n = 3) chez des individus (*G. fossarum*) témoins au laboratoire ou suite à leur encagement sur des sites amont des rejets de stations d'épuration étudiées.**

| | *In vitro* | *In vivo* | *In situ* | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Témoin PBS (1 h) | Témoin Milieu de stabulation (5 jours) | Ardière (15 jours) | Bourbre (15 jours) | Saône (15 jours) |
| Spermatozoïdes | 4,7 ± 2,3 | 2,8 ± 0,9 | 3,8 ± 0,3 | 3,5 ± 0,5 | 3,7 ± 0,8 |
| Ovocytes | 9,5 ± 2,7 | 4,8 ± 2,1 | 9,4 ± 2,3 | 6,4 ± 0,4 | 6,8 ± 0,8 |
| Hémocytes | 4,6 ± 0,7 | 2,8 ± 0,7 | 2,2 ± 0,1 | 3,9 ± 1,5 | 4,9 ± 0,1 |

**Tableau 7 : Niveaux de dommages à l'ADN exprimés en facteur d'induction (rapport entre les % tail DNA observés chez les individus exposés aux plus fortes concentrations en MMS testées ou exposés en aval des rejets de stations d'épuration testés et les % tail DNA observés chez les individus contrôles ou exposés en amont des rejets des stations d'épuration testées).**

| | *In vitro* | *In vivo* | *In situ* | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 10 mM MMS (1 h) | 100 µM MMS (5 jours) | Ardière (15 jours) | Bourbre (15 jours) | Saône (15 jours) |
| Spermatozoïdes | **10,8** | **24,8** | **4,3** | **4,0** | **3,5** |
| Ovocytes | 4,2 | 4,6 | 1,3 | 1,4 | 1,3 |
| Hémocytes | 8,9 | 10,8 | 1,4 | 1,1 | 1,2 |

Les différences de sensibilité observées s'expliquent en partie par les différences structurales existantes entre ces cellules et leur rôle. Les hémocytes jouent un rôle de transporteur et sont en perpétuel renouvellement, ayant une durée de vie beaucoup plus courte que les deux autres types cellulaires. De plus, et contrairement aux cellules somatiques et aux ovocytes, les spermatozoïdes sont généralement considérés comme ayant peu, voire pas, de mécanismes de réparation de l'ADN et de défense contre le stress oxydatif. Pour répondre en partie à cette question, des expérimentations de récupération ont été réalisées sur les spermatozoïdes et les ovocytes à l'aide de deux molécules modèles, le MMS (Figure 9) et le

bichromate de potassium (stress oxydatif ; résultats non présentés). Dans les deux cas, et après 4 jours d'exposition (J0 sur la Figure 9), des relations dose-réponse entre les niveaux d'exposition et les dommages observés sur ces deux types cellulaires ont été obtenues. Au cours de la récupération, c'est à dire une fois les organismes replacés en milieu non contaminé, une décroissance rapide des dommages à l'ADN est observée pour les ovocytes, alors que les effets restent stables pour les spermatozoïdes. Ces résultats soutiennent l'importance des caractéristiques structurales des cellules dans leur sensibilité et leur pouvoir discriminant, et donc dans le choix des cellules cibles pour diagnostiquer la présence d'impacts génotoxiques, en laboratoire et en milieux naturels. Ces travaux confirment l'utilisation des spermatozoïdes comme tissu de choix pour la mise en place d'un indicateur d'impacts génotoxiques des milieux via l'utilisation d'organismes encagés.

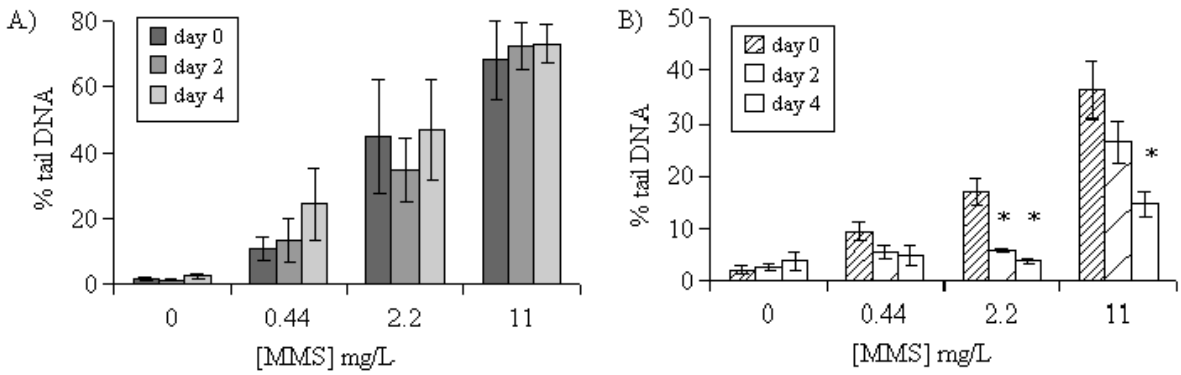



**Figure 9 : Dommages à l'ADN (% tail DNA, moy ± ET, n = 3) observés au niveau des spermatozoïdes (A) et des ovocytes (B) chez *G. fossarum*, après 0, 2 et 4 de récupération en milieu non contaminé, suite à une exposition à différentes concentrations de MMS. (*) : Différence significative par rapport au jour 0.**

## 3.4 Vitellogénine : marqueur de perturbations endocriniennes

### *3.4.1 Contexte actuel*

Au cours de la dernière décennie, le nombre croissant de publications liées à la problématique des perturbateurs endocriniens (PE) traduit une forte préoccupation scientifique quant à l'impact de ces composés dans les milieux aquatiques. Jusqu'ici, les travaux se sont principalement intéressés d'une part à la régulation hormonale en lien avec la reproduction des organismes, étant donné son rôle crucial dans le maintien des populations, et d'autre part aux vertébrés aquatiques, notamment les poissons (Matthiessen, 2003; Langston

*et al.*, 2005 ; Hinfray *et al.*, 2010 ; Villeret *et al.*, 2013). Ces travaux ont conduit au développement d'outils de diagnostic pouvant être utilisés *in situ*, tels que l'induction de la vitellogénine (Vtg) chez les mâles et les juvéniles, l'inhibition de la croissance testiculaire, le retard dans la maturité sexuelle, la présence d'individus intersexués, la féminisation ou la masculinisation des caractères sexuels secondaires ou enfin la concentration anormale en hormones stéroïdiennes circulantes. En revanche, et ceci bien qu'ils représentent la majorité des espèces animales et jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, peu voire pas d'outils sont actuellement disponibles chez les invertébrés et utilisables sur le terrain. Ce constat résulte en partie d'une mauvaise connaissance de leur système de régulation hormonale, d'une part liée au fait que l'on a à faire à des systèmes endocriniens très différents de ceux des vertébrés, notamment pour les crustacés, et d'autre part que les espèces d'intérêt en écotoxicologie sont des espèces à cycle de vie court et par conséquent de petite taille, ce qui constitue un frein méthodologique fort à la mise en place d'études d'endocrinologie.

Au même titre que chez les vertébrés et leurs « proches » cousins deutérostomiens (e.g. prochordés, échinodermes), les invertébrés protostomiens régulent leurs grandes fonctions physiologiques, telles que la croissance, la reproduction ou le développement, *via* des hormones de signalisation dont la régulation peut être modulée par la présence de contaminants (Mu & LeBlanc, 2004 ; Wang *et al.*, 2005). Cependant, étant donné la distance phylogénétique entre espèces et par conséquent les divergences existantes entre les systèmes endocriniens, les invertébrés protostomiens ne peuvent pas être simplement considérés comme des vertébrés par simple transposition des outils lorsqu'il s'agit de biomarqueurs dont la modulation est directement en lien avec des effets toxiques sur les systèmes hormonaux. Par conséquent, avant leur utilisation chez les invertébrés, les biomarqueurs disponibles chez les vertébrés doivent être confirmés et re-validés aussi bien par leur identification moléculaire que par leur interprétation en terme de fonction biologique.

Chez les crustacés, dont fait partie *G. fossarum* sélectionné comme espèce sentinelle dans mes travaux de recherche, la régulation hormonale de la reproduction repose sur des hormones ecdystéroïdiennes (hormone de mue) et sesquiterpénoïdes, connues sous le nom d'hormones juvéniles chez les insectes et de methyl-farnésoate chez les crustacés (Verslycke *et al.*, 2007). L'étude de l'impact de composés PE chez les invertébrés a fait l'objet, ces

dernières années, d'une attention toute particulière, se traduisant par une augmentation du nombre de publications et de revues (Verslycke *et al*., 2007 ; Le Blanc, 2007 ; Mazurova *et al*., 2008 ; Matozzo *et al*., 2008). Une synthèse des papiers concernant les crustacés montre que les études se sont articulées autour de deux grands axes. Le premier se focalise sur l'étude de l'impact de composés conçus pour moduler la régulation des hormones juvéniles présentes chez les insectes (pesticides), ceci dans un objectif d'évaluer leurs effets sur des espèces non-cibles (similitude des systèmes endocriniens) et d'améliorer les connaissances sur la régulation endocrine des crustacés. Le second axe s'intéresse plus particulièrement à des composés reconnus comme PE chez les vertébrés (17-β-ethyniloestradiol, bisphenol A, nonylphénols, diethylstilbestrol) et à leur impact chez les invertébrés, ceci dans un but d'améliorer l'évaluation du risque environnemental de ces composés.

Les études d'impact des pesticides tels que le fenoxycarbe, le pyriproxyfene ou le methoprene (analogues aux hormone juvéniles) ont montré, à de nombreuses reprises, des effets néfastes sur le développement embryonnaire et la mue de plusieurs espèces de crustacés, tels que *Neomysis bahia* (McKenney, 2005), *Neomysis integer* (Ghekiere *et al*., 2006), et *Daphnia magna* (Tatarazako et Oda, 2007), ceci pour des concentrations d'exposition bien inférieures aux concentrations létales. Ces travaux mettent non seulement en évidence la nécessité d'évaluer le risque de ce type de composés sur les crustacés (espèces non cibles), mais également constituent un faisceau de preuves sur le rôle du méthyl-farnésoate dans la régulation endocrine des crustacés dits inférieurs. Cependant, excepté chez *D. magna*, ces différentes études se sont basées sur la mesure de réponses au niveau individuel, ne permettant pas de décrire les mécanismes moléculaires mis en jeu, et surtout de confirmer que les effets observés résultent bien d'une modulation de la régulation hormonale.

Plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude, principalement en laboratoire, de l'impact des hormones stéroïdiennes présentes chez les vertébrés (œstrogènes, progestogènes et androgènes) et de composés reconnus comme PE chez ces derniers (17-β-ethyniloestradiol, bisphenol A, nonylphénols, diethylstilbestrol et certains PCB) sur la croissance, le développement, la mue et la survie de nombreux crustacés (revue de LeBlanc, 2007 ; Forget-Leray *et al*., 2005 ; Ghekiere *et al*., 2006 ; Lye *et al*., 2008). Si ces études montrent la pertinence, dans un but d'évaluation des risques, de prendre en compte leurs effets sur les crustacés, en revanche, elles ne permettent pas de conclure sur une modulation de la régulation hormonale en lien avec les effets observés. Plusieurs études menées sur des

crustacés marins (*Tisbe battagliai*, *Nicotra spinipes* et *Palaemon elegans*) montrent que les composés tels que le 17-β-éthinyloestradiol, le 17-α-éthinyloestradiol, l'oestrone et le 4-nonylphenol présentent peu d'impacts sur la survie, le développement, la reproduction et le sex-ratio de ces espèces à des concentrations réalistes. De plus, la mortalité, la réduction de la fécondité, de la reproduction et de la croissance, peuvent être des indicateurs d'une perturbation de la régulation hormonale ; cependant, ces réponses peuvent résulter d'autres mécanismes tels que la modulation de l'allocation énergétique, la perturbation du système nerveux et/ou le transfert d'anomalies génétiques suite à une exposition à des composés génotoxiques.

Toutefois, dans le milieu naturel, bien que les mécanismes d'action ne soient pas aussi clairement identifiés que pour les vertébrés, plusieurs observations permettent de soupçonner l'occurrence de perturbations endocriniennes chez les crustacés. De nombreuses publications relatent de la présence de phénomènes d'inter-sexués. Jungmann *et al*. (2004) montrent que le pourcentage d'organismes inter-sexués, sur cinq populations de *G. fossarum* étudiées, varient de 0,2 à 24 % et que la fréquence d'organismes inter-sexués augmente lorsque des organismes, prélevés sur des sites ayant un faible pourcentage d'individus inter-sexués, sont transplantés sur les sites où les populations ont les plus forts taux d'intersexualité. Cependant, et en accord avec les travaux de Gross *et al*. (2001), chez *Gammarus pulex*, ces travaux montrent qu'il n'existe pas de relation directe entre le pourcentage d'organismes inter-sexués et les niveaux de contamination des milieux, notamment en terme de rejets de stations d'épuration, connus pour être les principales sources de composés PE avérés chez les vertébrés. Ces travaux montrent que les crustacés, au même titre que les vertébrés, sont la cible de composés PE pouvant impacter les populations. Cependant, tenant compte de la particularité de leur régulation hormonale, l'étude de l'impact des PE dans les milieux aquatiques ne peut pas se contenter des informations obtenues à partir des études de suivis réalisées chez les vertébrés.

Au regard des développements réalisés chez les vertébrés aquatiques, aujourd'hui, le développement de biomarqueurs spécifiques d'une exposition aux PE chez les invertébrés se focalise principalement sur la mise en place de méthodes de mesure de la vitellogénine (Vtg), protéine précurseur du vitellus (réserve énergétique nécessaire aux organismes au cours de leur développement embryonnaire) et par conséquent fortement impliquée dans la

reproduction. Toutefois, les méthodes de mesure existantes reposent principalement sur des approches dites « indirectes » comme l'ALP (Alkali-Labile Phosphate) et l'utilisation d'anticorps (e.i. ELISA). Ces approches ont été utilisées dans plusieurs travaux et semblent mettre en évidence que la synthèse de la Vtg peut être la cible d'effet de perturbateurs endocriniens chez les crustacés, confirmant son intérêt comme biomarqueur. Par exemple, Gagné et Blaise, (2004) et Gagné *et al*. (2005) ont montré, chez *Gammarus spp* et *Artemia franciscana*, que les teneurs en Vtg (méthode ALP) sont significativement modulées par la présence de contaminants. De la même façon, Ghekiere *et al*. (2006), après avoir développé un test ELISA pour la mesure de la Vtg chez *Neomysis integer*, ont mis en évidence, chez des individus femelles, que la teneur de cette protéine était significativement induite par le nonylphenol.

Les études menées chez les crustacés se sont exclusivement focalisées sur l'utilisation des femelles, alors que ce sont les mâles et les juvéniles qui sont clairement les cibles d'intérêt. Chez la femelle et pour interpréter de façon fiable une modulation de la synthèse de la Vtg en lien avec l'exposition à un PE, il est nécessaire de connaître et maîtriser parfaitement les variations naturelles de cette protéine au cours du cycle de reproduction. Par conséquent, lors d'utilisation d'organismes femelles, il est indispensable de pouvoir disposer de critères morphologiques ou physiologiques permettant de définir exactement dans quel stade de leur cycle de reproduction elles se trouvent, ce qui est quasiment jamais le cas dans la littérature. Enfin, la méthode ALP, ne nécessitant pas une caractérisation complète de la protéine ou du gène codant pour celle-ci, a été la plus largement utilisée aussi bien en laboratoire que sur le terrain. Cependant, certaines précautions doivent être prises lors de son utilisation, particulièrement chez les crustacés, chez qui il existe d'autres sources importantes de phosphates pouvant affecter les mesures (Mazurova *et al*., 2008) et rendant cette approche peu fiable. De plus, plusieurs études chez les mollusques montrent, en conditions contrôles non contaminées, des teneurs en ALP similaires chez les mâles et femelles, posant clairement la question de la spécificité de la protéine étudiée comme biomarqueur d'une perturbation endocrine (Quinn et al., 2004).

### *3.4.2 Développement de méthodes spécifiques chez* Gammarus fossarum

L'objectif de cette partie a été de développer des approches spécifiques chez *G. fossarum* pour étudier la Vtg, *via* l'expression du gène codant pour cette protéine (thèse de B. Xuereb en collaboration avec L. Bezin de Lyon 1, dans le cadre d'un projet PNRPE : PC3) et la quantification absolue de celle-ci par HPLC-MS/MS (thèse de G. Jubeaux, co-encadrement avec A. Salvador, Anabio de Lyon1 et dans le cadre d'un projet PNRPE : PP2). Le but ici était d'une part de mettre en place des méthodes analytiques permettant d'identifier et quantifier aussi bien l'expression du gène que la production de cette protéine d'intérêt, et d'autre part, et en raison de la diversité structurale et fonctionnelle de cette protéine au cours de l'évolution, de valider son rôle dans la reproduction de cette espèce avant de pouvoir évaluer son intérêt comme biomarqueur spécifique d'une exposition aux PE.

A partir d'une séquence partielle du gène codant pour la Vtg chez *G. pulex* (Sambles, comm. Personnelle), une séquence partielle a pu être définie chez *G. fossarum* (GU985184). A l'aide de cette séquence, il a été possible (1) de construire des amorces pour quantifier l'expression de ce gène par RT-PCR et (2) développer une méthode de mesure de cette protéine par HPLC-MS/MS. A partir de la séquence partielle, une séquence protéique a été traduite et utilisée pour prédire *in silico* les peptides protéotypiques susceptibles d'être utilisés comme rapporteurs de cette protéine d'intérêt. Huit peptides protéotypiques ont été détectés avec une bonne sensibilité analytique (A36). Sur ces 8 peptides candidats, 7 se sont montrés spécifiques de cette protéine avec de très bonnes corrélations entre eux quelle que soit la concentration en Vtg dans l'échantillon. Enfin, et parmi ces différents candidats, un peptide spécifique (ILIPGVGK) a été sélectionné comme rapporteur pour la quantification absolue de la Vtg, *via* l'utilisation d'un peptide marqué comme étalon interne.

Comme souligné par Nikinmaa & Rytkonen (2011), il est fondamental de vérifier la fonction des protéines identifiées avant d'évaluer leur intérêt comme biomarqueur spécifique. La validation de la fonction physiologique de cette protéine, dite Vtg, a été réalisée en mettant en regard l'évolution de la surface des ovocytes (traduisant l'ovogenèse ; A34, voir partie 3.5) et l'expression du gène d'intérêt d'une part (Figure 10) et la teneur du peptide rapporteur ILIPGVGK d'autre part (Figure 11). Ces résultats montrent que l'expression du gène codant pour la Vtg est très faible chez les mâles, avec des valeurs de deux à trois ordres de grandeurs plus faibles que les valeurs de base (hors vitellogénèse) observées chez les femelles. De la

même façon, les teneurs en Vtg (peptide rapporteur) mesurées chez les mâles sont 700 fois plus faibles que celles mesurées chez les femelles hors vitellogénèse (résultats non présentés). Des résultats identiques ont été rapportés chez des crustacés copépodes (Lee *et al*., 2008 ; Volz et Chandler, 2004) et décapodes (Sagi *et al*., 1999 ; Shechter *et al*., 2005). Concernant la femelle, et comme attendu, nous avons observé une sur-expression du gène Vtg aux cours des stades C2 et D1 correspondant aux phases de croissance ovocytaire les plus importantes, c'est-à-dire à l'activité de vitellogénèse la plus intense. Ces observations sont renforcées par les données obtenues pour les teneurs en cette protéine (Figure 11) où la plus forte production a été observée. Enfin, la fonction de cette protéine dans la reproduction a été confirmée par des observations faites sur les embryons au cours de leur développement (Figure 11), puisque les résultats montrent clairement une diminution et utilisation rapide de cette protéine au cours de l'embryogenèse. Ces résultats valident d'une part les méthodes analytiques développées pour la mesure de l'expression du gène codant pour la Vtg et la quantification absolue de cette protéine et d'autre part le rôle de cette protéine dans la reproduction chez cette espèce et plus particulièrement comme source de réserves pour le développement des embryons.

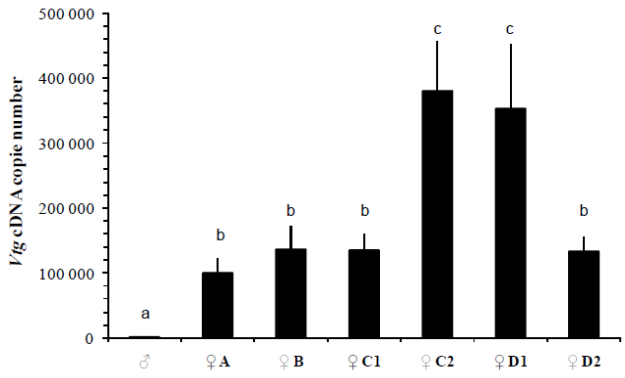



**Figure 10 : Niveaux d'expression du gène codant pour la Vtg chez le mâle *G. fossarum* (♂) et la femelle à différents stades de son cycle de mue – reproduction (♀ A-D2). A-D2 correspondent aux 6 stades d'inter-mue définis par Geffard *et al*. (2010) chez cette espèce. Les données sont exprimées en nombre de copie d'ANDc (moy ± E.T., n = 20 pour les mâles et 10 pour chaque groupe de femelle) quantifié par RT-PCR des ARNm contenus dans 1µg d'ANR total. Lettres identiques : pas de différence significative entre les conditions ($p > 0.05$).**

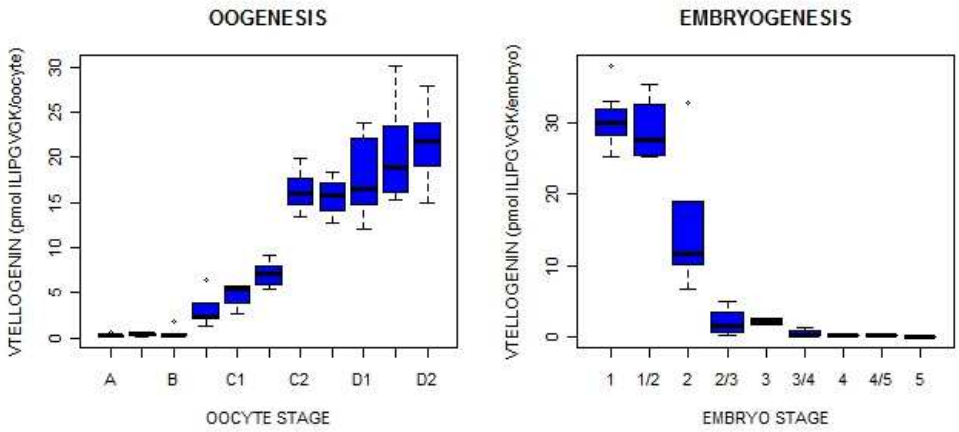



**Figure 11 : Evolution la quantité de vitellogénine exprimée en pmole de peptide ILIPGVGK par ovocyte (boîtes à moustache bleues, n=5 femelles / stade de mue) au cours de l'ovogenèse et l'embryogenèse**

### *3.4.3 Validation au laboratoire*

L'intérêt de la mesure de la Vtg comme biomarqueur spécifique d'une perturbation endocrinienne a été évalué en laboratoire via l'exposition d'organismes mâles à divers molécules modèles. Aujourd'hui, une des limites dans le développement de biomarqueurs moléculaires spécifiques d'une perturbation endocrinienne chez les crustacés mâles est le choix de molécules modèles à utiliser pour valider ces biomarqueurs. Par conséquent, nous avons choisi de tester plusieurs familles de composés : (1) des hormones de crustacés, la 20-hydroxyecdysone et le méthyl-farnésoate, pour lesquelles des données sont disponibles, mais uniquement chez les femelles ; (2) des composés pharmaceutiques comme l'anti-cancéreux (le cyprotérone), l'anti-épileptique (la Carbamazépine), l'anti-UV (benzophénone) couramment détectés et quantifiés dans les rejets de stations d'épurations et pour lesquels une demande forte d'informations sur leur impact chez les invertébrés existe (Ferrari *et al.*, 2003 ; Fent *et al.*, 2006) et (3) des pesticides avec le méthoxyfénozide, interagissant avec le récepteur EcR-USP chez les insectes et le propiconazole, un fongicide azolé, largement utilisé en agriculture, et qui inhibe l'expression du gène codant pour le Vtg chez *D. magna* (Soetaert *et al.*, 2006).

Des gammares mâles ont été exposés en laboratoire à ces différentes substances et à des concentrations comprises entre 10 $ng.L^{-1}$ et 1000 $\mu g.L^{-1}$. La 20-hydroxyecdysone n'a conduit à aucune induction de la Vtg chez les mâles, alors que le méthylfarnésoate a induit la production de cette protéine chez les organismes exposés (Figure 12). En se basant sur les

connaissances disponibles concernant l'endocrinologie des amphipodes, une des hypothèses est que ces molécules interfèrent avec l'hormone androgène qui régule négativement la synthèse de cette protéine. De nombreux pesticides sont conçus pour mimer le rôle de ces deux hormones dans le but de contrôler la croissance, le développement et la reproduction des arthropodes nuisibles de l'agriculture. Le méthoxyfénozide est un insecticide récent qui a une très grande affinité avec le récepteur à l'ecdysone chez les insectes lépidoptères (Carlson *et al*., 2001). Il agit comme un agoniste de l'hormone de mue, la 20-hydroxyecdysone. Les données disponibles à ce jour montre que cet insecticide possède un très faible risque pour les espèces non-cibles comme les coléoptères (Trisyono *et al*., 2000) et les acariens (Villanueva et Walgenbach, 2005). Cependant, une induction de Vtg a été observée chez les mâles exposés à la plus faible concentration, alors qu'aucune induction n'a été observée aux plus fortes concentrations. Peu de données sont disponibles dans la littérature sur le potentiel perturbateur endocrinien de cette molécule, afin de les confronter à nos résultats. Le second pesticide testé est le propiconazole pour lequel une relation dose-réponse en cloche (induction à faibles doses et inhibition à fortes doses) a été obtenue avec une induction significative de Vtg à la concentration de 0,1 $\mu g.L^{-1}$. Contrairement à nos données, Soetaert *et al*. (2006) observent une inhibition de l'expression du gène codant pour la Vtg chez *Daphnia magna* exposée à 1 mg/L. Cependant, il est important de noter que cette étude a été conduite avec de très fortes concentrations et chez des femelles.

Les composés pharmaceutiques sont couramment détectés dans les rejets de stations d'épuration. La toxicité de certains d'entre eux a été évaluée à l'aide de tests aigus. Cependant, leurs effets sub-létaux n'ont été que marginalement étudiés (Fent *et al*., 2006). La cyprotérone est un anti-androgène, un dérivé synthétique de la progestérone, couramment utilisé dans le traitement du cancer de la prostate. Dans cette étude, nos résultats ont montré qu'une exposition à des concentrations réalistes au plan environnemental conduit à une induction significative de la Vtg chez les mâles. L'autre composé pharmaceutique testé, la carbamazépine, est connu pour être un des composés les plus problématiques d'un point de vu du risque environnemental (Ferrari *et al*., 2003 ; Fent *et al*., 2006). Toutefois, aucune induction de Vtg n'a été observée chez les mâles exposés à ce composé.

Au cours de ces travaux, toutes les inductions de Vtg observées ne suivent pas une relation dose-réponse classique avec une augmentation en fonction de la concentration d'exposition, mais s'observent uniquement aux plus faibles concentrations. Nous avons

observé des résultats similaires pour le suivi de l'expression de gènes (non présentés), avec des inductions obtenues aux faibles concentrations testées et non aux plus fortes. Ce type de profil peut être expliqué en partie par l'apparition d'effets sub-létaux aux plus fortes concentrations. Sanders *et al*. (2005) ont obtenu des observations similaires avec le nonylphénol chez des larves de *P. elegans* où les plus fortes inductions de Vtg sont observées aux plus faibles concentrations testées. De nombreux perturbateurs endocriniens, en particulier les xénoestrogènes, présentent des effets biologiques suivant ce type de relations dose-réponse, appelés aussi des effets à faibles doses (Markey *et al*., 2003), compliquant fortement leur utilisation comme biomarqueurs. Les résultats de ces travaux montrent que les niveaux d'expression du gène codant pour la Vtg, mais également la teneur en cette protéine, mesurés chez les mâles révèlent un stress, avec des niveaux d'expression et de production pouvant atteindre ceux observés chez des femelles hors cycle de reproduction. Cependant, actuellement, il est encore difficile de conclure sur la possibilité d'utiliser la Vtg comme biomarqueur spécifique d'une perturbation endocrinienne chez les mâles. En effet, la plus forte induction observée suite à ces expositions en laboratoire est de 10, ce qui est bien loin de ce qui peut être observé chez les poissons, ou des inductions de $10^4$ peuvent être facilement observées.

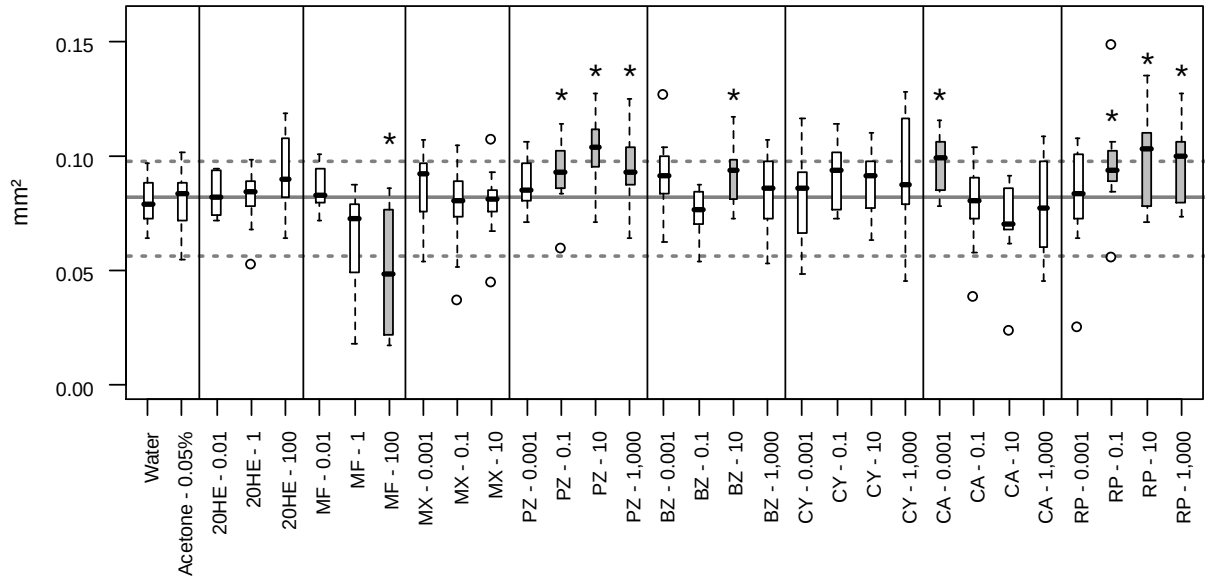



**Figure 12 : Teneurs en Vtg (exprimées en pmole du peptide ILIPGVGK par mg de poids frais) chez des mâles *G. fossarum* après exposition à diverses molécules modèles ; 20HE : 20-hydroxyecdysone, MF : méthyl-farnésoate, MX : méthoxyfénozide, PZ : propiconazole, BZ : benzophénone, CA : carbamazépine, CY : cyprotérone. Water : témoin, Acetone : témoin solvant à la concentration de 0.005%. La boite à moustache représente le premier et troisième quartile avec la médiane. * = p< 0,05 par rapport aux contrôles.**

## 3.5 Test de reproduction

### *3.5.1 Besoin de méthodes chez les amphipodes*

La contamination des milieux aquatiques est traditionnellement abordée par la mise en place de mesures analytiques sur les sédiments, les eaux et dans les organismes. Cependant, bien que ces approches se montrent pertinentes pour la compréhension des cycles bio-géochimiques de contaminants, elles se révèlent peu appropriées pour définir la qualité biologique des milieux étudiées. Pour ceci, les biotests de laboratoire et/ou sur le terrain, basés sur l'étude de réponses au niveau individuel et sub-individuel, constituent des outils de choix pour évaluer l'impact biologique de mélange de contaminants, tenir compte de la fraction bio-disponible de ces derniers et enfin mettre en évidence la présence et la toxicité de composés non identifiés par les approches chimiques (Narraci *et al*., 2009). Les amphipodes sont couramment choisis comme organismes tests car ils sont reconnus pour être sensibles à de nombreux contaminants (Pascoe *et al*., 1994; Neuparth *et al*., 2005; Mazurova *et al*., 2008), facilement utilisables au laboratoire et sur le terrain (Gross *et al*., 2001; Neuparth *et al*., 2005; Costa *et al*., 2005) et parce qu'il existe des tests de toxicité aigu et chronique, dont certains sont standardisés (USEPA, 2001).

Un des objectifs fondamentaux de l'écotoxicologie est d'établir comment les polluants affectent les populations d'organismes (Watt *et al*., 2002). Cependant, ce niveau d'organisation biologique est, pour de nombreuses espèces, difficile à utiliser au laboratoire. Dans ce contexte, une des approches les plus prometteuses est l'utilisation de modèles de dynamique de populations (Forbes *et al*., 2008). Cette approche implique l'utilisation et la mesure des effets toxiques au niveau de l'individu, utilisant des variables biologiques jouant un rôle clef dans la dynamique de population comme la survie, la croissance, le développement et la reproduction qui seront ensuite intégrés et projetés dans des modèles de population afin de prédire les effets au niveau populationel (Raimondo & McKenney 2005; Widarto *et al*., 2007). En Europe, deux espèces de gammare très proches (*Gammarus fossarum* et *Gammarus pulex*) sont reconnues comme espèces d'intérêt et ont été très utilisées en écotoxicologie. Aujourd'hui, de nombreuses données existent sur l'impact de sédiments et polluants sur des réponses létales et sub-létales comme la croissance (Blockwell *et al*., 1996; Roman *et al*., 2007), le taux d'alimentation, le comportement sexuel (Pascoe *et al*., 1994;

Watts *et al*., 2001) et la locomotion (De Lange *et al*., 2006), montrant la sensibilité et la pertinence écologique de ces approches. En revanche, et à l'inverse des espèces marines et estuariennes (Lawrence et Poulter, 2001; Scarlett *et al*., 2007), aucune méthodologie de test permettant d'évaluer l'impact de toxiques et/ou échantillons naturels sur le succès reproducteur n'est actuellement disponible pour des espèces dulçaquicoles. Dans le cadre d'un projet Ecco (PP1) et de la thèse de B. Xuereb, nous avons décrit le cycle de mue et de reproduction, et proposé un biotest permettant d'évaluer l'impact de polluants sur ces deux processus physiologiques (A34). Comme chez toutes les espèces de gammare, le cycle de reproduction et le cycle de mue sont synchronisés. Le développement embryonnaire et la croissance ovocytaire (vitellogénèse) se déroulent en même temps que le cycle de mue, car les femelles pondent et s'accouplent immédiatement après la mue.

### *3.5.2 Description du cycle de mue et de reproduction*

Dans un premier temps et à partir des travaux de Blanchet (1980) chez *Orchestia gammarelus*, différents stades de mue (post-, inter et pré-mue) ont été décrits en se basant sur l'observation de la structure tissulaire de la 3$^{ème}$ et 4$^{ème}$ paires de périopodes (dactylopodite et protopodite). Le cycle de mue est divisé en trois périodes : la post-, inter et pré-mue. Ces phases sont respectivement caractérisées par le durcissement de la nouvelle cuticule, la rétractation de l'épiderme par rapport à la cuticule et enfin par la sécrétion de la nouvelle cuticule. En accord avec les observations de Sutcliffe (1993), à 12°C le cycle de mue est de 30 jours. Six stades ont été identifiés (Figure 13). Deux stades de post-mue (A et B) dont la durée est respectivement de 1 et 3 jours, deux stades d'inter-mue (C1 et C2) de 9 jours chacun et deux stades de pré-mue (D1 et D2) de 3 et 5 jours.

Pour chaque stade de mue, diverses variables en lien avec la reproduction ont été décrites, telles que la surface ovocytaire, le nombre d'ovocytes, le développement embryonnaire et le nombre d'embryons. Concernant la fertilité et la fécondité, les valeurs obtenues ont été normalisées par la taille des femelles. Les niveaux des variables biologiques retenues au cours du cycle de mue sont présentés dans le Tableau 8 et la Figure 14. Etant donné que le stade de mue A est très court, les stades de post-mue (A et B) ont été regroupés en un seul stade identifié AB.

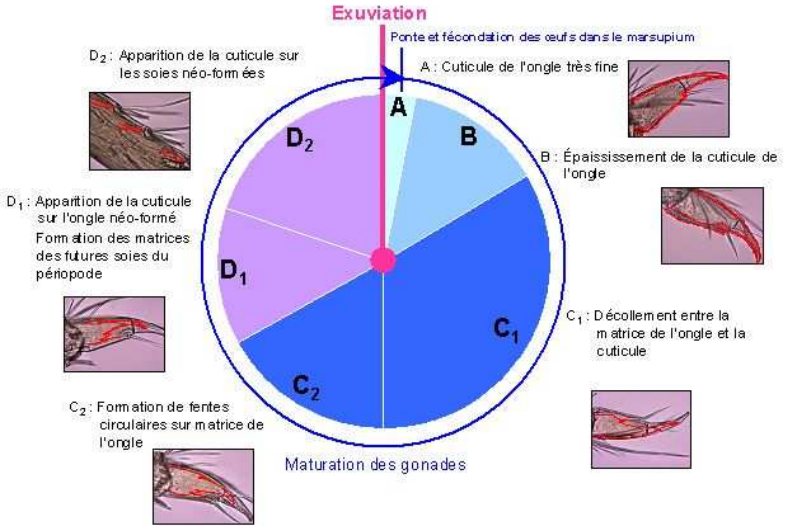



**Figure 13 : Caractérisation du cycle de mue chez *Gammarus fossarum*. Les critères pour chaque stade (écrits en noir) se basent sur le développement des tissus à l'extrémité des périopodes.**

La surface moyenne des ovocytes augmente au cours du cycle de reproduction avec des valeurs comprises entre 22 000 et 164 000 µm$^2$ pour les stades AB et D2. La plus forte croissance, correspondant à la mise en place de la vitellogènése secondaire, a lieu pour les stades C2 et D1. Concernant le nombre moyen d'ovocytes, une diminution significative est observée entre les stades C1 et C2. Ces résultats montrent que la vitellogénèse secondaire ne se met pas en place pour l'ensemble des ovocytes rentrés en pré-vitellogénèse et disponibles dans la gonade, et ainsi qu'un taux fiable de fertilité ne peut être déterminé que chez des femelles au moins en C2. Concernant les embryons, aucune différence significative ($p > 0.05$) n'a été observée en fonction des différents stades. Il est également observé qu'il n'existe pas de différence significative entre le nombre d'ovocytes observé au stade C2, D1 et D2 et le nombre d'embryons. Ces résultats montrent qu'il y a un taux de fertilité proche des 100 % chez cette espèce.

**Tableau 8 : Surface ovocytaire (µm$^2$± ET) et nombre d'ovocytes et d'embryons (moyenne ± ET, n = 15; normalisée par la taille des femelles) chez *G. fossarum*, en fonction du stade de mue.**

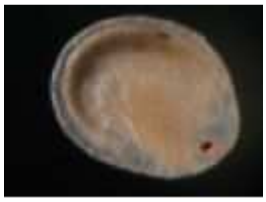
| Stade de mue | Surface ovocytaire (µm$^2$) | Nombre d'ovocyte | Nombre d'embryon |
|---|---|---|---|
| AB | 21 900 ± 1 800 | 2.5 ± 0.25 | 1.3 ± 0.18 |
| C1 | 39 400 ± 4 500 | 2.4 ± 0.43 | 1.4 ± 0.35 |
| C2 | 106 000 ± 6 800 | 1.6 ± 0.17 | 1.6 ± 0.24. |
| D1 | 133 000 ± 3 300 | 1.6 ± 0.28 | 1.4 ± 0.38 |
| D2 | 164 000 ± 5 800 | 1.5 ± 0.35 | |

La Figure 14 présente les différents stades de développement embryonnaire observés chez les femelles de *G. fossarum* en fonction de leur cycle de mue. En accord avec les observations de Sutcliffe (1993), les embryons d'une même portée ont un développement synchrone, avec plus de 90 % des individus au même stade. Les œufs sont de forme elliptique, avec un pôle arrondi et un pôle plus pointu sur l'axe longitudinal. A la ponte, ils sont violets, homogènes, opaques et délimités par une fine membrane. Cet aspect homogène et opaque est caractéristique du stade 1 qui est observé chez les femelles en stade de mue AB. Ensuite, une flexion ventrale apparaît chez les embryons, caractéristique du stade 2, observée chez les femelles en stade de mue C1. Le stade embryonnaire 3 se caractérise par l'apparition du bourgeon céphalique et apparaît chez les femelles ayant un stade de mue C2. La présence d'omatidies complétement formés et de couleur rouge est le critère pour le passage en stade 4 que l'on retrouve chez les femelles en stade de mue D1. Le dernier stade (stade 5) correspond à l'éclosion et la présence de juvéniles dans le marsupium. Ce stade 5 est observé chez des femelles proches de la mue, au stade D2. Ces travaux confirment que les cycles de mue, de reproduction et le développement des embryons sont parfaitement synchronisés. Une description aussi fine du cycle de reproduction était une phase indispensable pour la validation fonctionnelle de biomarqueurs comme la mesure de la Vtg (partie2).

Stade 1 : L'embryon est ovoïde et homogène

Stade 2 : Apparition de la ventro-flexion

Stade 3 : Formation du bourgeon céphalique



Stade 4 : Omatidies complètement formés de couleur rouge

Stade 5 : éclosion, juvéniles

**Figure 14 : Description des différents stades de développement embryonnaire chez *G. fossarum* au cours du cycle de reproduction**

### *3.5.3 Proposition d'un biotest*

Le protocole du biotest de reproduction proposé est résumé dans le Tableau 9. A 12°C, nous avons défini une exposition de 21 jours comme étant un bon compromis entre la durée d'un test de laboratoire et la nécessité d'utiliser des organismes en stade C2 permettant de décrire de façon fiable les paramètres liés à la reproduction. En effet, au stade C2 de la mue, la vitellogènése est mis en place et les embryons sont en stade 3, c'est à dire avec une organogénèse bien avancé. Le bio-test proposé permet, en comparaison au contrôle, d'évaluer de façon très ciblée l'impact de contaminants sur ces processus physiologiques liés à la reproduction que sont la mue, le développement embryonnaire et la croissance ovocytaire (vitellogénèse secondaire). L'utilisation simultanée de ces «endpoints», normalement parfaitement synchronisés, permet d'identifier et/ou de mieux évaluer le mode d'action des composés testés sur la reproduction de cette espèce. Au stade de mue C2, le nombre d'ovocytes est similaire au nombre d'embryons et donc peut être utilisé comme un indicateur pertinent de la fécondité et de la fertilité. Par conséquent, en plus de la comparaison au contrôle, la comparaison de ces deux paramètres peut être utilisée pour discriminer l'impact spécifique d'un polluant sur l'un de ces deux marqueurs. En général, les méthodologies disponibles pour étudier l'impact de contaminants ou échantillons environnementaux sur la reproduction des amphipodes reposent sur la mesure du nombre de juvéniles produits par femelles vivantes (Costa *et al.*, 2005 ; Ringenary *et al.*, 2007; Scarlett *et al.*, 2007) et ne permettent pas de discriminer ou déterminer si les effets observés résultent d'un inhibition de la production d'ovocytes, de la qualité (taille) des ovocytes, d'anomalies du développement embryonnaires, ou d'une perturbation de la mue.

Au cours de travaux de thèse (B. Xuereb et G. Jubeaux) et de plusieurs projets (PC3, PC5 et PC6), ce biotest a été utilisé pour évaluer d'une part la toxicité de composés chimiques connus pour leur toxicité ou émergents, et d'autre part la toxicité de rejets hospitaliers et urbains. Ces travaux ont notamment permis de mettre en évidence que le methoxyfénozide, un pesticide, s'est montré spécifiquement perturbateur de la mue, au même titre que la 20-hydroxyecdysone (hormone de mue), conduisant à un retard de celle-ci. Des observations similaires ont été faites avec des rejets hospitaliers (psychotropes). Ainsi, suite aux 21 jours d'exposition, au lieu d'observer des femelles en stade de mue C2, la majorité d'entre elles se trouvaient encore en stade AB et C1, mais avec des tailles d'ovocytes et des embryons correspondant à des femelles en stade de mue C2. De la même façon, ces travaux ont montré

que le nonylphénol affecte spécifiquement le développement embryonnaire, dès une concentration d'exposition très faible (*i.e.*, 0.05 µg.l$^{-1}$).

**Tableau 9 : Conditions du test de reproduction chez *Gammarus fossarum*.**

| | |
|---|---|
| Eau | Eau naturelle de forage, 12 °C, conductivité 600 ± 50µS/cm |
| Organismes | Provenant de la Bourbre (Tour du Pin, Isère) |
| Stabulation | 2-3 semaines à 12° |
| Photopériode | 10h de lumière et 14h d'obscurité |
| Becher | Polypropylene pour les composes inorganique et verre pour les composés organiques. |
| Renouvellement | Continu ou semi-continu selon le composé |
| Stade des femelles | Femelles en fin de cycle de reproduction (juvéniles dans le marsupium, gonades visibles et en couples). |
| Taille des femelles | 8 – 10 mm |
| Nombre de d'organismes par becher | 7 couples |
| Alimentation | Feuille d'aulne |
| Aeration | continue |
| pH | 7.8 – 8.3 |
| Durée du test | 21 jours; une période de 3 à 4 jours est nécessaire pour que la mue s'opère chez toutes les femelles. |
| Variables biologiques étudiées | Survie, mue, fertilité, fécondité croissance ovocytaire et développement embryonnaire. |

# 4 Indicateurs de toxicité des milieux : valeurs seuil intégrant la variabilité naturelle des marqueurs de toxicité développés chez *G. fossarum*

## 4.1 Contexte

La surveillance de populations et communautés autochtones d'organismes aquatiques constitue encore aujourd'hui la principale démarche pour évaluer la qualité des cours d'eau. Ces mesures ont prouvé leur utilité pour décrire l'état d'un écosystème et mettre en évidence leur perturbation, mais se montrent moins pertinentes pour identifier les causes de cette perturbation, condition pourtant nécessaire pour tout processus d'aménagement et de restauration des milieux aquatiques. En effet, la structure d'une communauté est influencée par de nombreux facteurs et processus qui opèrent à différentes échelles de temps et d'espace. L'absence d'une espèce dans une communauté peut être le résultat de l'impact direct d'un facteur de stress (physique et/ou chimique) sur cette espèce, mais peut également résulter d'un changement chez d'autres espèces (effet indirect), qui soit se nourrissent, soit sont la proie et/ou sont en compétition avec cette espèce. Elle peut également découler de changements dans d'autres habitats du bassin versant ou du milieu aquatique, qui agissent comme source d'organismes et/ou de colonisation pour l'écosystème d'intérêt. La nécessité de devoir identifier l'origine d'une perturbation et de discriminer un facteur de stress d'origine physique (habitat), écologique (compétition, prédation) ou chimique (polluant) impose d'établir et de quantifier les liens existants entre causes et effets, et par conséquent de revenir à des «systèmes biologiques» simplifiés (niveaux biologiques moins élevés) que sont la cellule et l'organisme. C'est dans ce contexte que les biomarqueurs ont été proposés comme outils pertinents dans les schémas d'évaluation des risques environnementaux. Les études utilisant les biomarqueurs dans les milieux naturels ont essentiellement consisté en des approches de type amont/aval, encadrant une source de pollutions que ce soit par des prélèvements de populations naturelles ou par l'encagement d'organismes de laboratoire ou prélevés sur un site non contaminé. L'approche par encagement a de plus l'avantage de donner accès à la mesure de traits de vie (survie, croissance, reproduction et taux d'alimentation) et de pouvoir les utiliser comme marqueurs de toxicité. De nombreuses études et projets européens (BEEP et ECOMAN) ont montré l'intérêt de ces outils d'écotoxicité dans le cadre de programmes d'évaluation du risque environnemental (Adams *et al.*, 1999 ; Beliaeff et Burgeot, 2002 ; Galloway *et al.*, 2004 ; Narbonne *et al.*, 2005 ; Pampanin *et al.*, 2006 ; Picado *et al.*, 2007). Il est toutefois important de rappeler ici que l'utilisation de ces outils pour évaluer la qualité environnementale n'est pas encore généralisée et se trouve confrontée à plusieurs verrous techniques et scientifiques. Parmi ces verrous, l'un des plus contraignants est l'absence de

référentiel, c'est à dire d'un cadre de lecture permettant d'interpréter, dans le temps et l'espace, la modulation de ces marqueurs directement en termes de contamination bio-disponible ou d'impact toxique. Au même titre que pour les indicateurs de contamination (accumulation, voir partie 2), les réponses moléculaires et physiologiques utilisées comme marqueurs de toxicité peuvent non seulement être modulées par la présence de contaminants, mais sont également sensibles à d'autres paramètres (facteurs de confusion) liés à la biologie de l'organisme et/ou la physico-chimie des milieux étudiés. De nombreuses études, provenant de la littérature et de nos travaux (partie 3), ont mis en évidence que l'état physiologique de l'organisme peut fortement influencer la réponse d'un marqueur de toxicité (A8, A19, A27, A42 ; Printes et Callaghan, 2003 ; Hoguet et Key, 2007 ; Lewis et Galloway, 2008 ; Fossi Tankoua *et al*., 2011). De la même façon, de nombreux travaux rapportent l'influençait de facteurs environnementaux sur la réponse des outils d'écotoxicité. Pfeifer *et al*. (2005) et Buschini *et al*. (2003) ont respectivement montré que la température influençait fortement le niveau de l'activité enzymatique Ache et le niveau de dommage à l'ADN chez les mollusques. De la même façon, Hagger *et al*. (2010) ont observé une variation saisonnière pour de nombreux biomarqueurs mesurés chez la moule *Mytilus edulis*, pouvant être liée soit au cycle de reproduction, soit à la quantité de nourriture disponible. Ce sont ces contraintes (facteurs de confusion) qui ont limité l'utilisation des marqueurs d'écotoxicité à des applications amont/aval de rejets ponctuels, espérant ainsi limiter au maximum l'impact de ces facteurs de confusion. Afin d'affiner la discrimination entre variations naturelles et variations causées par un facteur anthropique, l'influence des paramètres biotiques et abiotiques sur la réponse de marqueurs d'écotoxicité doit être appréhendée. La caractérisation, la compréhension et la prédiction de l'impact de ces facteurs de confusion sur la réponse des marqueurs d'écotoxicité doit permettre d'une part de proposer des protocoles robustes et reproductibles pour leur mesure (voir partie 3, effet des paramètres biologiques), et d'autre part permettre de définir des valeurs de référence et seuils (au-delà desquelles l'effet est significatif) intégrant la variabilité naturelle de ces marqueurs en regard des facteurs environnementaux. La définition de telles valeurs doit rendre possible une application de ces outils à large échelle, au-delà d'une approche amont/aval, et une interprétation fiable de leur niveau en terme de contamination bio-disponible et de toxicité des milieux. L'utilisation de la transplantation, basée sur l'encagement d'organismes contrôles (provenant d'une même population et calibrés en taille, genre etc..) permet de s'affranchir de l'impact des facteurs de confusions biologiques internes à l'organisme.

Cette partie de mon travail a consisté à définir, pour chaque marqueur de toxicité développé chez *G. fossarum* (partie 3), des valeurs de référence et seuils et à évaluer leur pertinence pour le diagnostic de la toxicité des milieux à large échelle. Pour ceci, nous avons décrit et formaliser, en laboratoire et sur le terrain en milieux non contaminés, l'impact de facteurs environnementaux (température et dureté) et l'effet spatial et saisonnier sur les divers marqueurs développés précédemment. Sur le terrain, la définition d'une station comme site de référence non contaminé s'est appuyée sur l'utilisation des indicateurs chimiques présentés précédemment (partie 1), à partir de gammares encagés. Un site est défini comme non contaminé lorsqu'aucune concentration en polluants ne dépasse les valeurs seuils associées.

## 4.2 Activité acétylcholinestérase

### *4.2.1 Variabilité naturelle*

Concernant cette activité enzymatique, ces travaux ont été réalisés dans le cadre de la thèse de B. Xuereb et de projets nationaux (PP1, PP2, PC3 et PC14). A l'aide du protocole défini chez cette espèce (partie 2), basé sur l'utilisation d'organismes mâles de taille homogène (entre 15 et 20 mg), la variabilité de ce biomarqueur au regard des facteurs environnementaux a été étudiée *via* un suivi mensuel sur un an et deux sites de référence : l'un fortement (Bourbre : 125 mg.$L^{-1}$ de $Ca^{2+}$) et l'autre faiblement calcique (Morcille : 9 mg.$L^{-1}$ de $Ca^{2+}$). Ces deux sites présentent des variations de température similaires et très marquées au cours de l'année (de 2 à 17°C). Dans le même but, une expérimentation d'encagement à l'échelle de la région Rhône-Alpes a été menée sur une dizaine de sites non contaminés et caractérisés par des températures (de 11 à 19°C) et des niveaux calciques très variables (de 4 à 130 mg.$L^{-1}$ de $Ca^{2+}$). La Figure 15 présente les données obtenues pour le suivi sur les sites de la Bourbre et de la Morcille. Ces résultats montrent que les activités sont similaires entre les deux bassins et constantes au cours du temps, avec des coefficients de variation de 8,4 et 6,2 % pour la Bourbre et la Morcille respectivement. Ainsi, aucune corrélation significative n'a pu être observée entre les niveaux d'activité mesurés et les principaux paramètres physico-chimiques de l'eau (*i.e.*, température, pH, dureté et débit). Par conséquent, et sur la base de ces données, nous avons pu définir une valeur de référence (*i.e.*, moyenne annuelle : 8,4 nmol.$min^{-1}$) et une valeur seuil (*i.e.*, intervalle de confiance à 95 % : 7,4 nmol.$min^{-1}$) au-dessous de laquelle l'activité Ache mesurée (moyenne de 5 réplicats) peut

être interprétée comme significativement différente d'un niveau « normal », et donc traduit une exposition à des composés neurotoxiques anti-Ache. Ces résultats vont à l'encontre des observations rapportées chez le copépode *T. brevicornis* (Forget *et al.*, 2003), ainsi que chez diverses espèces de bivalves (Robillard *et al.*, 2003 ; Lau *et al.*, 2004 ; Leinio et Lehtonen, 2005), qui montrent que les niveaux d'Ache varient de manière saisonnière. Toutefois, dans ces dernières études, les niveaux d'activité Ache sont normalisés par la teneur en protéines des organismes, expliquant en partie ces observations (Radenac *et al.*, 1998 ; voir partie 2). Les données obtenues sur les sites non contaminés de la région Rhône-Alpes confirment ces résultats, avec des niveaux d'activité Ache supérieurs à la valeur seuil précédemment définie. Dans la littérature, il est généralement admis qu'une inhibition d'activité Ache doit excéder 20-30 % des valeurs observées sur le site de référence pour refléter une exposition à un composé anti-Ache (Escartin et Porte, 1996 ; Owen *et al.*, 2002). Dans le cas de *G. fossarum*, une inhibition supérieure à 12 % peut être interprétée comme une modulation résultante de l'exposition à une contamination.

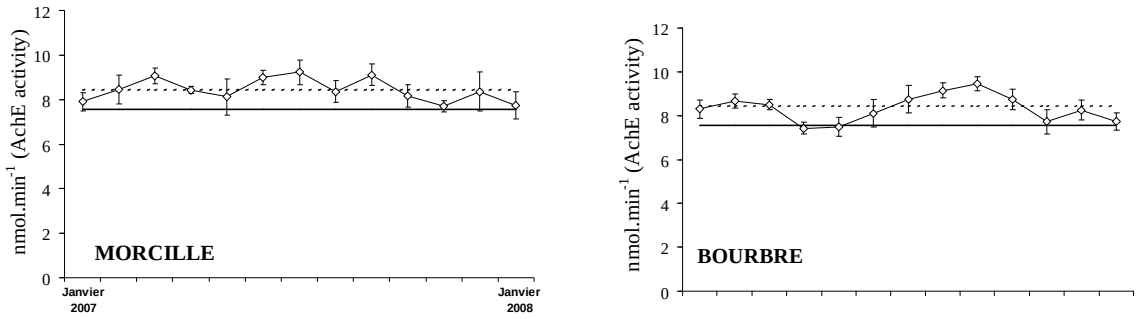



**Figure 15 : Variations annuelles de l'activité Ache (nmol.min$^{-1}$, moy ± E.T., n=5) mesurée chez *Gammarus fossarum* de janvier 2007 à janvier 2008 sur la Bourbre et la Morcille. La ligne en pointillés représente la moyenne annuelle (8,4 ± 0,5 nmol.min$^{-1}$), et la ligne continue la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% (7,4 nmol.min$^{-1}$) des valeurs d'activité Ache obtenues pour les deux sites.**

### *4.2.2 Application et interprétation au regard de la valeur seuil*

Dans le but d'évaluer la pertinence de disposer de valeurs seuils pour l'utilisation et l'interprétation des biomarqueurs dans l'évaluation de la qualité des milieux, une étude a été menée sur diverses sources de contamination, *via* une approche classique amont/aval. Trois rejets de station d'épuration (Beaujeu sur l'Ardière, Fontaine sur la Saône et Bourgoin sur la Bourbre) et un rejet minier (Amous) ont été étudiés (Figure 16). Des gammares ont été encagés sur des stations en amont (témoin) et en aval des rejets étudiés.

La rivière Amous se caractérise par une contamination spécifique en métaux (As, cd, Pb et Zn), provenant des déchets de l'ancienne mine de Carnoulès (Casiot *et al*., 2009). Deux sites de référence (en amont du rejet = Reigous) ont été sélectionnés, l'un sur l'Amous (nommé A1) et un second sur un tributaire (site A2). Les sites à l'aval se situent à 1500 (site A3) et 3000 m (site A4) du rejet (confluence Amous-Reigous). Un suivi sur trois semaines a été réalisé avec des prélèvements toutes les semaines.

L'Ardière se caractérise par une pression agricole qui résulte en grande partie d'une très forte activité liée à la vigne (Dorigo *et al*., 2007). Sur cette rivière, c'est la STEP de Beaujeu qui a été étudiée en Novembre 2007 et Juin 2008. Deux stations en amont ont été étudiées, Bj1 très en amont dans une zone non soumise à la pression viticole, et Bj2 à 50 m à l'amont de la station d'épuration. Deux stations en avals ont également été suivies, Bj3 et Bj4 à 20 et 200 m du rejet respectivement.

Le bassin versant de la Saône est soumis à une pression de type urbaine et industrielle, celui de la Bourbre se caractérise plus par une pression agricole de type céréalière (Réseau National de Bassin; http://sierm.eaurmc.fr/eaux-superficielles/index.php). Sur la Saône, seule une station témoin a été mise en place, juste à l'amont proche de la STEP de Fontaine (S1). Deux stations à l'aval du rejet ont été étudiées (S2 et S3). Ces travaux ont été réalisés à deux périodes, en Novembre 2007 et en Juin 2008. Enfin, pour la STEP de Bourgoin, quatre stations ont été étudiées en Juin 2007. Deux stations ont été suivies sur la Bourbre à l'amont de la STEP, l'une proche (B2) et la seconde en tête de bassin (B1). Une troisième station en amont du rejet a été étudiée (B3), elle se trouve sur le Bion qui est la rivière dans laquelle la STEP se rejette. Enfin, une station en aval de la STEP (B4) a été étudiée, se situant à la confluence du Bion et de la Bourbre.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 17. Avec une approche classique basée sur la comparaison amont/aval et la recherche d'une différence statistiquement significative entre les sites définis *a priori* comme témoins et contaminés, les résultats montrent une inhibition significative de l'activité Ache sur le site aval de Beaujeu en 2001 (site Bj4) et les sites aval de l'Amous (sites A3 et A4) après deux et trois semaines d'exposition (T2 et T3). Si les données sont maintenant interprétées au regard de la valeur seuil définie pour cette activité, alors les inhibitions observées sur les sites aval de l'Amous sont en réalité des faux positifs.

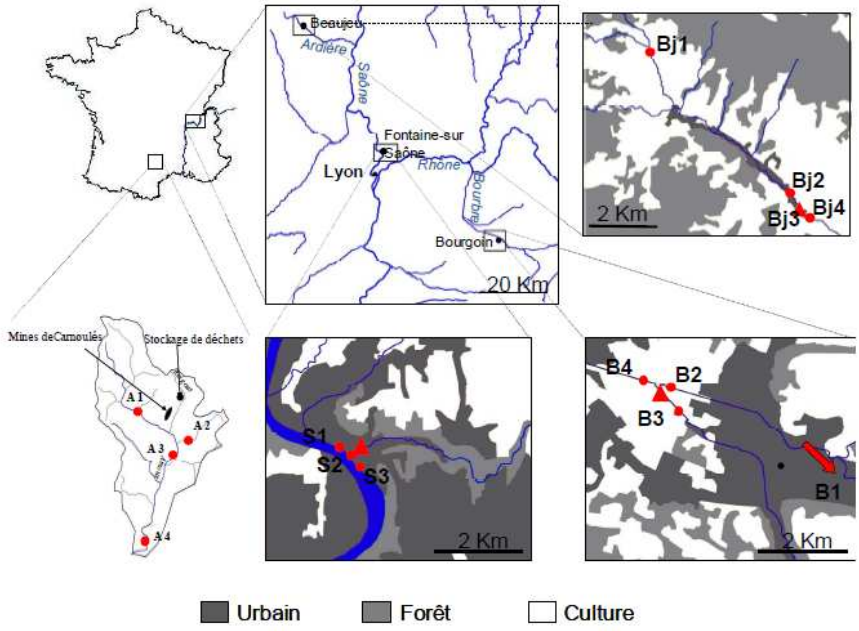



**Figure 16 : Sites d'études sur lesquels les tests *in situ* ont été mis en place. A : Amous ; Bj : Ardière ; S : Saône et B : Bourbre. ● : stations d'étude ; ▲ : Rejet de station d'épuration.**

Les différences significatives observées sont de l'ordre de la variabilité qui peut être observée dans la mesure de cette activité. La définition d'un protocole robuste, basé sur l'utilisation d'organismes calibrés (mâles de taille homogène, voir partie 2) accentue la possibilité de décrire des faux positifs dans les approches amont/aval. De plus, l'utilisation de la valeur seuil disponible pour la mesure de l'activité Ache permet également de mettre en évidence le risque de faux négatifs. En effet, avec une comparaison amont/aval, la présence de composés anti-cholinestérasiques conduisant à l'inhibition significative observée pour les deux sites amont (sites B2 et B3) et sur le site aval (B4) ne peut être identifiée. La lecture des données au regard de la valeur seuil montre que les sites amont sont impactés, que la qualité de l'eau de la rivière est déjà dégradée, et enfin que le rejet de la STEP n'accentue pas l'impact neurotoxique observé.

La présentation de ces résultats montre l'intérêt de disposer de valeurs seuil pour d'une part permettre une interprétation fiable des données en milieux naturels, et d'autre part sortir d'une approche amont/aval contraignante, et rendre possible l'interprétation des stations prises individuellement et l'application de ce biomarqueur à large échelle.

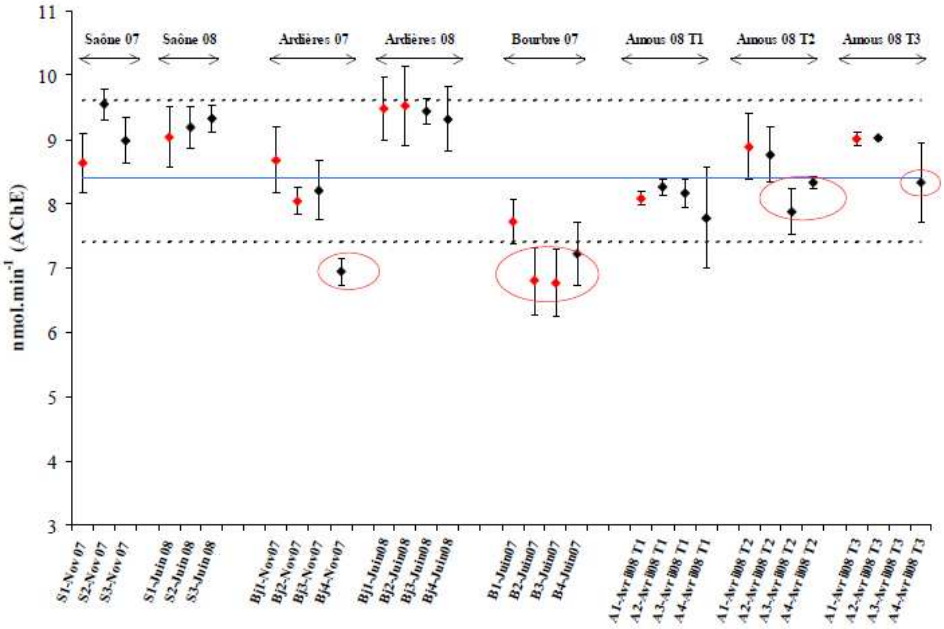



**Figure 17 : Activité Ache (moy ± E.T., n = 5) mesurée chez *Gammarus fossarum* exposé sur les différentes stations étudiées. Ligne bleu : valeur de référence et lignes en pointillée : limite inférieure et supérieure au-delà desquelles l'activité Ache est significativement différente de son niveau de base. Les points rouges représentent les stations définies *a priori* comme témoins (amont des rejets).**

## 4.3 Essai des Comètes

Concernant l'utilisation de l'essai des Comètes pour diagnostiquer l'impact génotoxique des milieux aquatiques, ces travaux ont principalement été réalisés dans le cadre de la thèse de E. Lacaze (co-encadrement avec A. Devaux, INRA-ENTPE) et supportés divers projets (PC4 et PC14), notamment l'ANR Resyst sur l'évaluation de la gestion de déchets miniers sur la qualité des milieux dans le bassin minier de Decazeville. Sur la base du protocole défini et présenté précédemment (partie 2), une approche similaire à celle utilisée pour l'activité Ache a été réalisée pour déterminer et proposer une valeur seuil pour les niveaux de dommages à l'ADN. Ces travaux ont concerné (1) l'étude en laboratoire des dommages à l'ADN chez des organismes exposés durant 15 jours à différentes températures (6 à 24°C) et duretés (de 100 à 300 $mg.L^{-1}CaCO_3$) en conditions non contaminées; (2) un suivi mensuel sur un an des niveaux de dommages à l'ADN chez des organismes prélevés sur les deux sites de référence utilisés pour l'activité Ache, la Bourbre fortement calcique (125 $mg.L^{-1}$ de $Ca^{2+}$) et la Morcille faiblement calcique (9 $mg.L^{-1}$ de $Ca^{2+}$) et enfin (3) via l'encagement d'organismes sur une dizaine de sites de référence. Je ne détaillerai pas les résultats obtenus pour ces travaux (voir articles A41 et A42), car les observations sont similaires à celles obtenues pour

l'Ache. Aucune influence des facteurs environnementaux, des saisons et de la localisation géographique n'a été observée sur le niveau de dommages à l'ADN. Des niveaux de dommages faibles et similaires pour l'ensemble des expérimentations ont été obtenus, permettant de définir facilement une valeur seuil (5 % Tail DNA).

La pertinence de cet outil de génotoxicité a été évaluée notamment *via* une étude de terrain (encagement d'organismes contrôles) sur le bassin versant du Riou Mort, ancien bassin minier (PC4). Des encagements ont été réalisés environ tous les trois mois sur deux ans. Les objectifs étaient (1) d'évaluer la toxicité de plusieurs stations déjà bien caractérisées chimiquement et (2) d'évaluer l'évolution de l'impact génotoxique de ces sites, suite à la mise en place de travaux en 2009 pour mieux assurer le stockage des déchets. La contamination métallique des sites retenus (Figure 18) a été étudiée à plusieurs reprises (Andrès *et al*, 1999 ; Audry *et al*., 2004 ; Morin *et al*., 2008 ; A41 : résultats non présentés). Les sites Up.Lot et Decazeville sont définis comme référence/témoin puisqu'ils ont une très faible contamination métallique, toutefois le site nommé Decazeville se situe en zone urbaine. Les trois autres stations se caractérisent par une contamination métallique, Joany ayant les plus fortes teneurs, souvent létales pour le gammare.

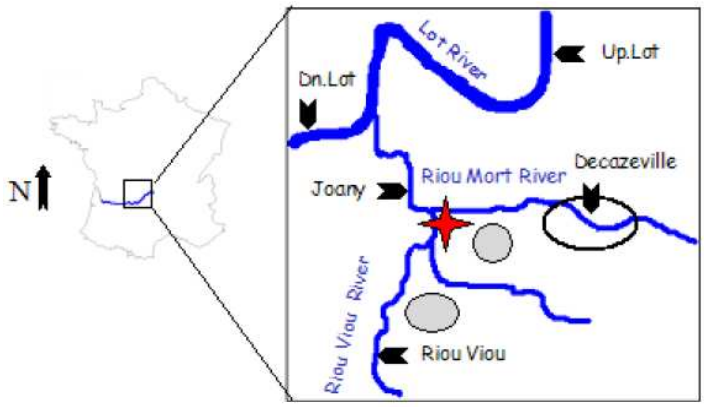



**Figure 18 : Sites étudiés sur le bassin du Riou Mort. L'étoile rouge localise l'usine métallurgique et les zones grises les zones de stockage des déchets miniers, responsables de la contamination du système aquatique.**

Tout d'abord, ces résultats mettent en évidence l'intérêt de l'approche de l'encagement d'organismes pour le diagnostic de la contamination et de la toxicité des milieux aquatiques dans le but d'aider à la gestion des milieux. Un tel suivi sur deux ans, garantissant une comparaison fiable des données dans le temps et dans l'espace, est tout à fait impossible *via* l'utilisation d'organismes autochtones, notamment en regard de la variabilité des types et tailles des écosystèmes étudiés. Les résultats obtenus confirment que le site Up.Lot est bien

un site de référence/contrôle concernant l'impact génotoxique, avec des valeurs de dommages à l'ADN inférieures à 5% sur l'ensemble du suivi. De la même façon, l'absence de variation saisonnière du niveau de base des dommages à l'ADN est confirmée. A l'inverse, le site de Decazeville, bien que faiblement exposé à la pollution métallique, ne constitue pas un site de témoin, avec des dommages à l'ADN régulièrement supérieurs à la valeur seuil. Ceci montre une nouvelle fois la limite des approches amont/aval, nécessitant de définir *a priori* un site témoin ayant des caractéristiques proches des sites à étudier. Ces travaux montrent également que l'impact génotoxique d'un milieu est fortement variable dans le temps et que les travaux de gestion des déchets se traduisent par une empreinte génotoxique plus faible en 2010 qu'en 2009.

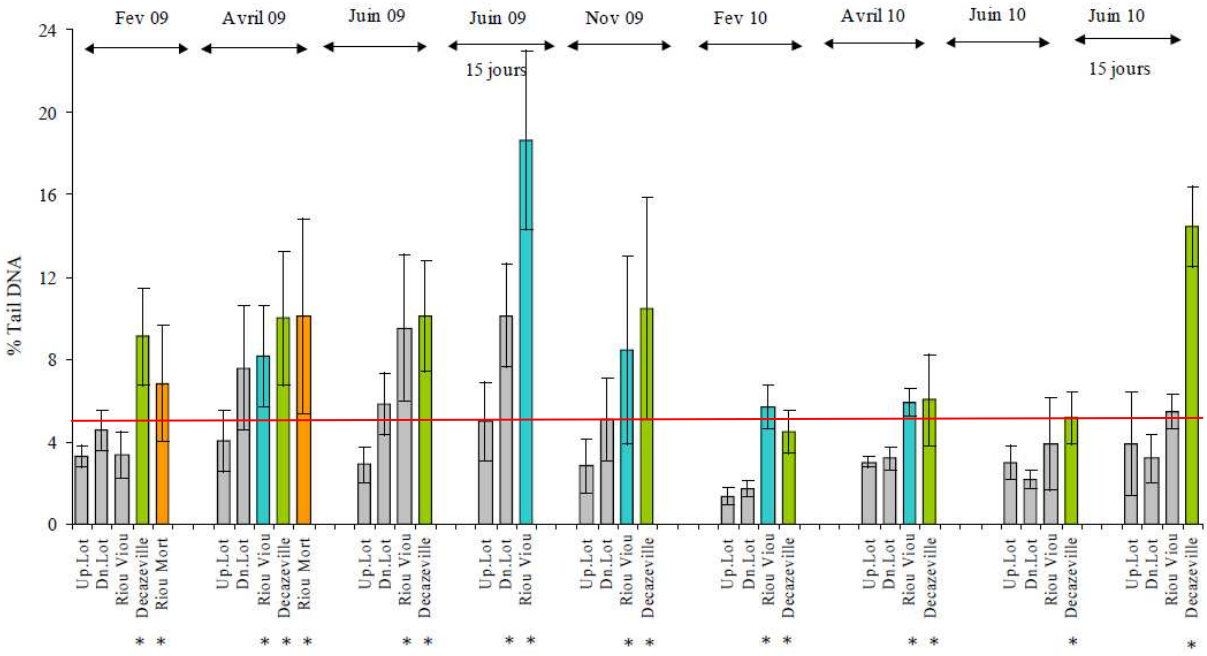



**Figure 19 : Dommages à l'ADN de spermatozoïdes de gammares après 5 jours d'exposition (exprimés en % tail intensity). * significativement différent du témoin. La ligne rouge représente la valeur seuil.**

## 4.4 Vitellogénine

### *4.4.1 Impact de facteurs environnementaux et effet de la saison*

La variabilité naturelle (saisonnière et spatiale) des teneurs en Vtg dans les gammares mâles a fait l'objet des travaux de thèse de G. Jubeaux (A51) et d'un projet PNRPE que j'ai piloté (PP2) dans le but de définir une valeur seuil permettant d'utiliser ce biomarqueur dans la surveillance. La Figure 20 présente les teneurs en cette protéine observées chez des organismes mâles exposés sur deux sites de référence (Bourbre et Ardières présentés

précédemment) caractérisés par des paramètres physico-chimiques très différents. Un impact fort de la période sur les niveaux de Vtg a été observé, avec de fortes augmentations au printemps et en été sur l'Ardières et, en été sur la Bourbre. Ces modulations n'ont pas pu être corrélées aux températures relevées au cours des expérimentations. Le niveau de Vtg observé sur l'Ardières en Avril pour une température de 12°C est beaucoup plus fort (facteur de 5) que les niveaux que l'on a observés au laboratoire en conditions non contaminées et pour la même température (Figure 12). Plusieurs études ont également montré des variabilités temporelles de la teneur en Vtg chez le poisson mâle, sans pour autant qu'elles puissent être corrélées à la température (e.g.,Solé *et al*., 2002 ; Hotta *et al*., 2003 ; Ma *et al*., 2005 ; Deng *et al*., 2007). Les niveaux mesurés pour les autres saisons et sur les deux sites étudiés sont en revanche comparables avec les niveaux de Vtg mesurés chez les mâles au laboratoire (Figure 12), montrant que la dureté de l'eau n'a aucune influence sur le niveau de cette protéine. Dans la littérature, il n'y a pas d'études comparables chez les crustacés, permettant de les confronter à nos observations. Ces travaux montrent que des facteurs environnementaux non identifiés influencent la teneur en Vtg chez les mâles, et par conséquent qu'il n'est pas possible de décrire et formaliser correctement ces variations et donc de proposer une valeur seuil intégrant cette variabilité naturelle. Toutefois, cette variabilité naturelle non « maîtrisée » ne préjuge pas de la pertinence et de la sensibilité de l'utilisation de la mesure de la Vtg comme biomarqueur spécifique d'une perturbation endocrine chez cette espèce, ceci étant directement liée aux inductions potentiellement observables en milieux naturels.

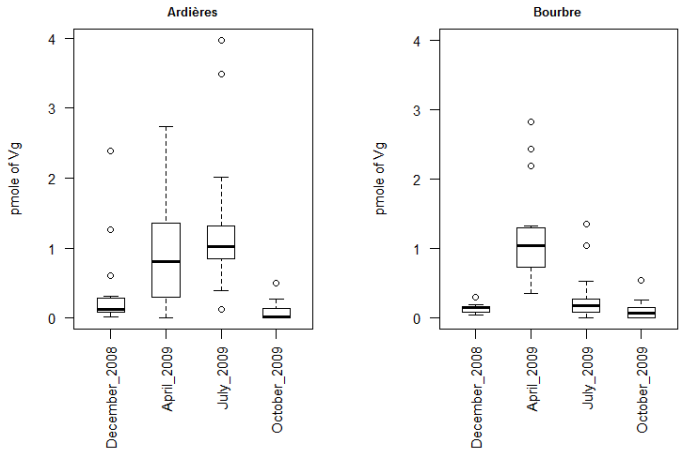



**Figure 20 : Teneurs en Vtg (exprimées en pmole ILIPGVGK/mg) quantifiées chez *Gammarus fossarum* pendant 4 séries de transplantations sur l'Ardières et la Bourbre, sites de référence (Décembre 2008, Avril 2009, Juillet 2009 et Octobre 2009).**

### *4.4.2 La vitellogénine est- elle un biomarqueur spécifique chez* G. fossarum ?

Dans le but d'évaluer la pertinence de la Vtg chez *Gammarus fossarum* comme outil de la perturbation endocrinienne utilisable sur le terrain, une campagne de transplantation à large échelle géographique a été réalisée sur 21 sites de la région Rhône-Alpes. A partir des travaux de Besse *et al*. (2013 ; A52) sur la caractérisation de la contamination chimique bio-disponible d'une trentaine de sites de la région (Tableau 5), 5 sites dits «de référence» (pour lesquels tous les polluants mesurés se trouvaient en dessous des seuils de contamination définis) ont été sélectionnés ainsi que 16 sites dits « contaminés ». Parmi les sites contaminés, certains sont caractérisés par une contamination spécifique par des métaux (sites P2 et P4), d'autres par des pesticides (site P7) ou encore des composés organiques (sites P3, P8 et P11). En juin 2010, des gammares mâles standard (taille et en amplexus) ont été encagés sur ces différents sites à des températures allant de 9 à 18°C. La Figure 21 présente les teneurs en Vtg observées chez les organismes exposés. Dans un premier temps, ces résultats montrent une forte variabilité inter-individuelle, limitant la sensibilité de cet outil et ne permettant de faire ressortir que deux inductions significatives, pour les sites P10 et P11, et avec des facteurs d'inductions faibles (environ 10). Des observations similaires ont été observées pour l'expression du gène codant pour cette protéine chez cette même espèce dans la thèse de B. Xuereb (A43). Il existe très peu d'études chez des crustacés autres que des décapodes (e.g., *Carcinus maenas* : Lye *et al*., 2005; *Carcinus aestuarii* : Ricciardi *et al*., 2010; *Litopenaeus setiferus* : Zapata-Perez *et al*., 2005). Néanmoins, ces travaux confirment également l'absence d'inductions marquées et une forte variabilité inter-individuelle, contrairement à ce que l'on peut observer classiquement chez les poissons mâles, avec des valeurs d'induction allant jusqu'à $10^5$. Ces résultats confirment que la teneur en Vtg est modulée par des facteurs environnementaux non identifiés et qu'il conviendra de comprendre à l'avenir pour rendre utilisable cet outil en surveillance.

Toutefois, il est également important de noter que plusieurs auteurs ont récemment souligné les fonctions pléiotropiques du gène de la Vtg, indiquant un rôle non-exclusif dans la reproduction chez les vertébrés et les invertébrés (Zhang *et al*., 2011). Les rôles de la Vtg semblent être étendus au-delà de sa fonction de protéine de stockage/réserve. Par exemple chez l'abeille la Vtg est impliquée dans l'organisation sociale, la répartition du travail, la régulation des dynamiques hormonales et les changements dans les réponses gustatives (Adam *et al*., 2003 ; Guidugli *et al*., 2005a ; Guidugli *et al*., 2005b ; Nelson *et al*., 2007).

Même si cela reste souvent à confirmer, la Vtg semble avoir un rôle d'anti-oxydant chez plusieurs espèces d'invertébrés (e.g., crustacés : Tokishita *et al*., 2006 ; Chen *et al*., 2011 ; insectes : Seehuus *et al*., 2006), mais également des propriétés de défenses immunitaires (e.g., insectes : Rono *et al*., 2010 ; amphioxus : Zhang *et al*., 2005). Il est intéressant de constater qu'une injection de la bactérie *Escherichia coli* chez le poisson mâle conduit à une augmentation de la Vtg dans le sérum (Shi *et al*., 2006). De la même façon, Tong *et al*. (2010) ont montré que l'injection de liposaccharide et d'acide lipotéique chez *Danio rerio* entraîne une augmentation marquée de l'expression de la Vtg. Par ailleurs, le domaine C-terminal bien conservé de la Vtg (*i.e*., von Willebrand domain, vWD), trouvé chez la plupart des métazoaires (Avarre *et al*., 2007) est connu pour être impliqué dans le processus de coagulation chez les vertébrés (Finn, 2007). Ces travaux indiquent que la Vtg est une protéine susceptible d'être impliquée dans divers mécanismes de défenses, pouvant expliquer en partie les fortes variabilités inter-individuelles observées, rendant difficile à l'heure actuelle son utilisation comme un biomarqueur spécifique d'une perturbation endocrinienne chez notre espèce sentinelle *G. fossarum*.

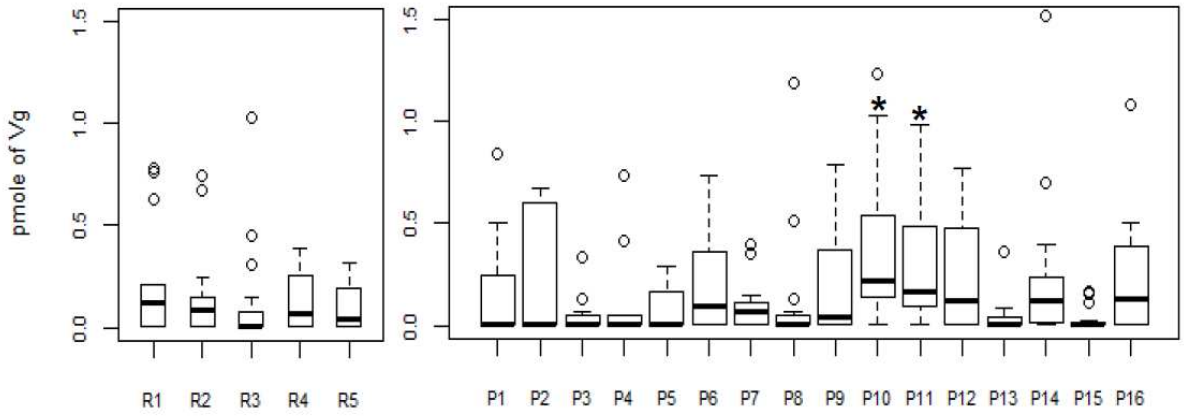



**Figure 21 : Teneurs en Vtg (exprimées en pmole ILIPGVGK/mg, n = 15) quantifiées chez *Gammarus fossarum* exposé sur des sites de référence (R1 à R5) et des sites contaminés (P1 à P16) en Juin 2010.**

## 4.5 Marqueurs individuels : test de reproduction

Les travaux concernant l'impact des facteurs environnementaux sur la reproduction ont été principalement menés dans le cadre de la thèse de R. Coulaud (Direction A. Chaumot) et ont été soutenus par des financements de l'ONEMA (PC10) et de l'agence de l'eau RM&C (PC14). Contrairement aux observations faites pour les mesures de l'activité Ache et des dommages à l'ADN via le test des Comètes, nous allons voir que le cycle de mue et le développement embryonnaire sont contrôlés par la température. Ainsi, la caractérisation et la formalisation de l'impact de ce facteur pour la proposition de valeurs de référence constitue sans aucun doute l'exemple scientifiquement le plus intéressant de l'intérêt et la pertinence de ces approches. Une démarche en deux étapes a été mise en place ; (1) caractérisation en laboratoire et formalisation par modélisation de l'impact de la température et de la dureté sur le cycle de mue et de reproduction chez *G. fossarum* et (2) validation de ce modèle en milieu naturel, *via* l'encagement d'organismes sur des stations de référence, et étude de la pertinence de cet outil *via* des expérimentations sur des stations contaminées.

### *4.5.1 Modélisation du cycle de mue et valeur de référence*

Au laboratoire, et à partir du protocole défini pour le test de reproduction (Tableau 9), un plan d'expérimentation a été mis en place pour tester deux niveaux calciques (100 et 300 $mg.L^{-1}$ de $CaCO_3$) et trois températures différentes (7, 12 et 16°C). Pour chaque condition, un nombre suffisant de femelles en couple a été utilisé afin de pouvoir observer les divers paramètres de reproduction (mue, fertilité, fécondité, stade embryonnaire et surface ovocytaire) à des intervalles de temps respectivement de 72, 48 et 36h au cours du cycle de mue (entre deux exuvies) et ceci sur 6 individus à chaque pas de temps.

La Figure 22 présente, pour chaque condition, la probabilité de passer d'un stade de mue au suivant en fonction du temps. Des profils similaires ont été obtenus entre les deux niveaux calciques montrant que ce paramètre n'a aucun impact sur ce processus physiologique. Il est important de noter que, avant de mener les expérimentations, les organismes utilisés ont été acclimatés durant 15 jours aux différentes teneurs en calcium testées. En revanche, ces résultats montrent que la température est un facteur déterminant qui influence significativement la durée du cycle de mue. Ces observations sont en accord avec des précédents travaux menés chez des amphipodes ou d'autres crustacés, concluant que le

principal facteur environnemental qui contrôle la durée du cycle de mue et de reproduction est la température (Pockl 1992 ; Cuzin-Roudy et Buchholz 1999). Toutefois, nos travaux sont les premiers à (1) mettre en évidence que l'effet de la température se répercute de façon proportionnel sur les différents stades de mues, excepté pour la transition entre les stades D1 et D2 (Figure 22) et (2) proposer un modèle mathématique permettant de décrire et par conséquent de prédire quelle probabilité chaque femelle a de se trouver à un stade de mue donné en fonction de la température à laquelle elle est exposée et la durée d'exposition après la mue (Figure 23). On peut ainsi prédire le temps médian de transition d'un stade au suivant (et donc la durée moyenne des différents stades de mue) en fonction de la température à laquelle les femelles sont exposées. Des résultats identiques ont été observés pour le développement embryonnaire (non présentés) ; seule la température a également été identifiée comme facteur déterminant, modulant significativement la durée du développement embryonnaire. Comme pour la mue, un modèle a ainsi été développé pour prédire la probabilité avec laquelle les embryons doivent se trouver en un stade précis, ceci en fonction du temps d'exposition et de la température après la ponte.

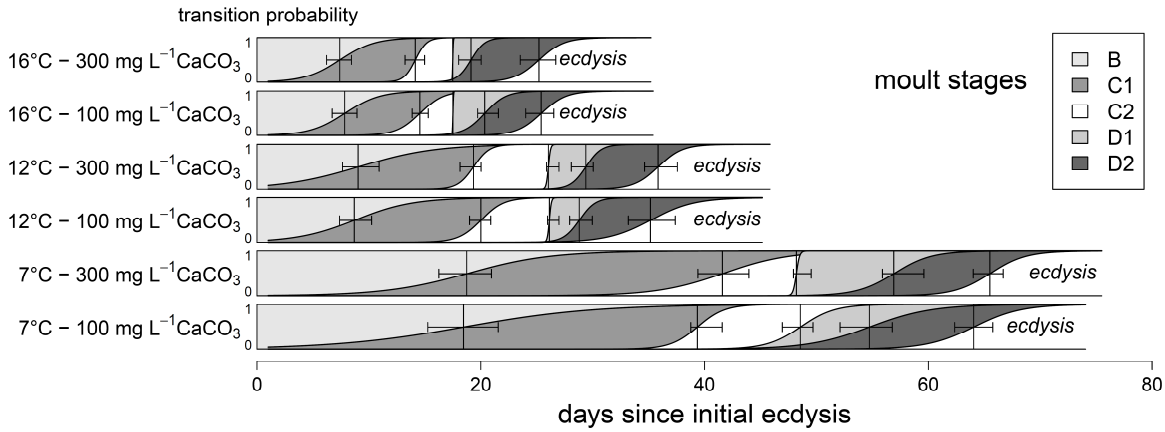



**Figure 22 : Evolution, au cours du temps, de la probabilité que les femelles passent d'un stade de mue au suivant (B/C1, C1/C2, C2/D1, D1/D2, exuvie), probabilité estimée par ajustement de modèles linéaires généralisés aux données observées dans les 6 traitements (3 températures testées : 7, 12 et 16°C et 2 niveaux calciques : 100 et 300 mg.L$^{-1}$ de $CaCO_3$ (les 6 traitements étant ajustés indépendamment). Pour chaque transition entre deux stades de mue, le temps médian et l'intervalle de confiance à 95% sont présentés (barres horizontales).**

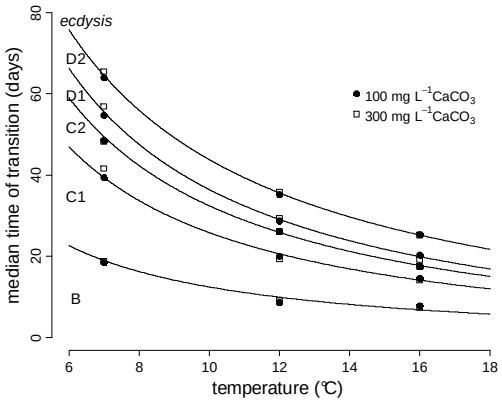



**Figure 23 : Temps médian de transition d'un stade de mue au suivant, en fonction de la température et du niveau calcique du milieu testé.**

Concernant les paramètres lies à la reproduction (Figure 24), ces résultats confirment la réduction du nombre d'ovocytes dans les gonades entre le stade de mue C1 et C2, c'est à dire que seule une partie des ovocytes rentrés en pré-vitellogénèse vont poursuivre en vitellogénèse secondaire. Par conséquent il est indispensable d'être au moins en stade C2 pour déterminer de façon fiable la fertilité. Ces travaux confirment également qu'il n'existe pas d'évolution du nombre d'embryons présents dans le marsupium au cours de leur développement. Comme proposé dans le protocole du test de reproduction, une détermination du nombre d'ovocytes au stade C2 constitue un indicateur fiable de la production de jeunes et est donc un marqueur écologiquement pertinent. Enfin, pour chaque condition, l'évolution des surfaces ovocytaires est identique à celle observée en partie 3.5.2., qui concernait la description du cycle de reproduction pour proposer un biotest. Interprétés en fonction des stades de mues et stades embryonnaires (fortement dépendants de la température), les résultats de la Figure 24 soulignent qu'aucun effet de la température et de la dureté n'a été observé sur la fertilité et la fécondité. La croissance ovocytaire est également indépendante de la température et de la dureté du milieu testé, des profils identiques ont été obtenus pour l'ensemble des conditions testées, avec des valeurs similaires aux surfaces mesurées dans la partie 3.5.2. (Tableau 8). De plus, et pour l'ensemble des conditions, le cycle de mue et de croissance ovocytaire restent parfaitement synchronisés. Par conséquent, la croissance ovocytaire est dépendante de la plasticité du cycle de mue en réponse à la température et donc est également indirectement influencé par la température.

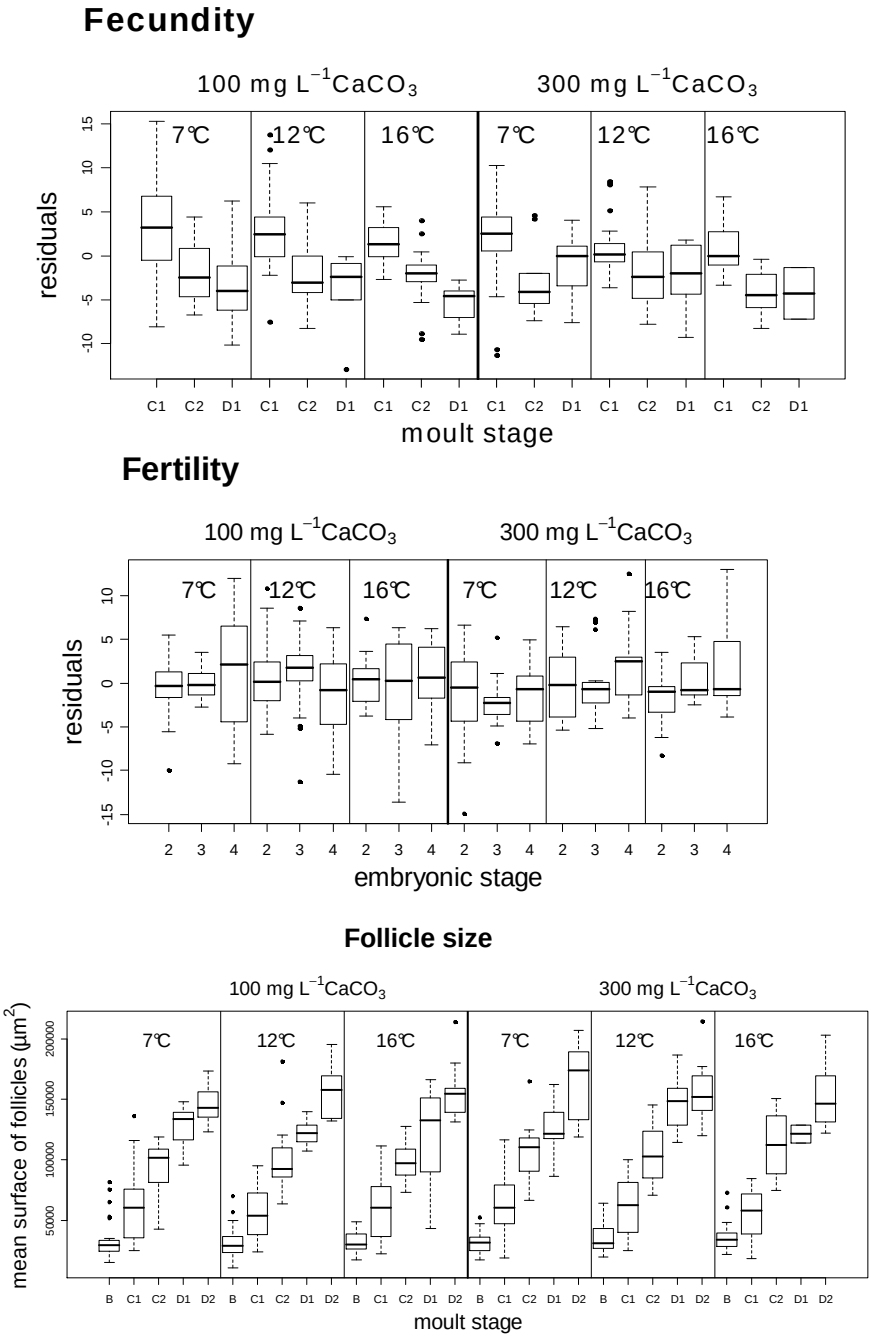



**Figure 24: Paramètres de la reproduction (nombre d'embryons, d'ovocytes et taille des ovocytes) observés au cours du cycle de mue chez les femelles exposées aux différentes températures et teneurs en calcium. Pour la fertilité et la fécondité, les données sont exprimées en différence par rapport aux nombre d'embryons observés en stade 2 et d'ovocytes au stade C1. Pour la croissance ovocytaire, les données sont exprimées en surface (µm$^2$).**

### *4.5.2 Validation du modèle en milieu naturel et comme outil de diagnostic*

Concernant l'utilisation de ce test de reproduction sur le terrain, les résultats obtenus ont deux sorties. La première est que le modèle défini pour décrire le cycle de mue en fonction de la température peut être proposé pour déterminer, en fonction de la température des milieux testés, la durée d'exposition nécessaire pour permettre à la majorité des femelles d'atteindre le stade C2. Ainsi, les paramètres de reproduction peuvent être mesurés et directement comparés aux valeurs seuils définis au laboratoire (partie 3.5.2), étant donné que l'ensemble des marqueurs de reproduction n'est pas influencé par les facteurs environnementaux.

Une seconde sortie pertinente de ces travaux est l'utilisation du modèle développé pour une interprétation fiable des mesures sur le cycle de mue en milieu naturel. En effet, comme discuté dans la partie 3.5.2, certains contaminants à fort potentiel perturbateur endocrinien peuvent impacter de façon spécifique la mue, ce qui en fait un marqueur pertinent pour diagnostiquer la toxicité des milieux. Toutefois, au vu des résultats obtenus ci-dessus, une interprétation fiable de cette réponse en milieu naturel nécessite d'intégrer l'effet de la température, qui varie continuellement sur la période d'exposition. Dans ce contexte, le modèle développé ici peut être proposé comme référence « universelle », permettant à partir de la température d'exposition, de prédire la distribution des stades de mue que l'on doit observer chez les femelles si le milieu n'est pas perturbé. Cet objectif permettrait, comme pour l'activité Ache et la mesure des dommages à l'ADN, de pouvoir s'affranchir des démarches amont/aval et de permettre une interprétation fiable de valeurs obtenues sur des stations déconnectées d'une source de contamination connue et distribuées à large échelle.

Afin d'évaluer l'utilisation de ce modèle (1) pour définir la durée d'exposition optimale permettant d'obtenir des femelles en stade de mue C2 et (2) pour prédire la distribution de référence des stades de mue et faire une interprétation fiable de la mue comme marqueur de toxicité des milieux, nous avons cherché à valider et évaluer la pertinence de ce modèle en conditions naturelles. Pour ceci, des expérimentations en milieux non contaminés et en milieux contaminés, via une approche classique amont/aval.

Concernant la validation du modèle en milieux non contaminés, des femelles en couples ont été exposées sur les mêmes sites contrôles que ceux utilisés pour l'étude de l'activité Ache et de la Vtg en milieux naturels : les sites de l'Ardières et de la Bourbre (Figure 20), caractérisés par des niveaux calciques très différents (respectivement de 4 à 130 $mg.L^{-1}$ de $Ca^{2+}$).

La Figure 25 présente les données observées sur les sites de l'Ardières et de la Bourbre. Dans un premier temps, les résultats montrent que le cycle de mue est plus long à faible température. En effet, après 36 jours d'exposition en hiver sur le site de l'Ardières, la majorité des femelles sont en stade de mue C2, alors qu'elles sont majoritairement en stade D1 après seulement 21 jours d'exposition en été, à des températures moyennes de 15°C. Enfin, ces résultats permettent de valider le modèle construit sur la base des expérimentations de laboratoire (adapté dans son formalisme à des températures variables dans le temps), pour une application sur le terrain. En effet, pour l'ensemble des saisons, les distributions de stades de mue prédites sont similaires et non significativement différentes de celles observées. Ces travaux permettent de proposer ce modèle comme outil pertinent pour définir correctement le temps d'exposition nécessaire pour obtenir une majorité de femelles en stade C2 dans le but de mesurer les divers paramètres liés à la reproduction et présentés plus haut.

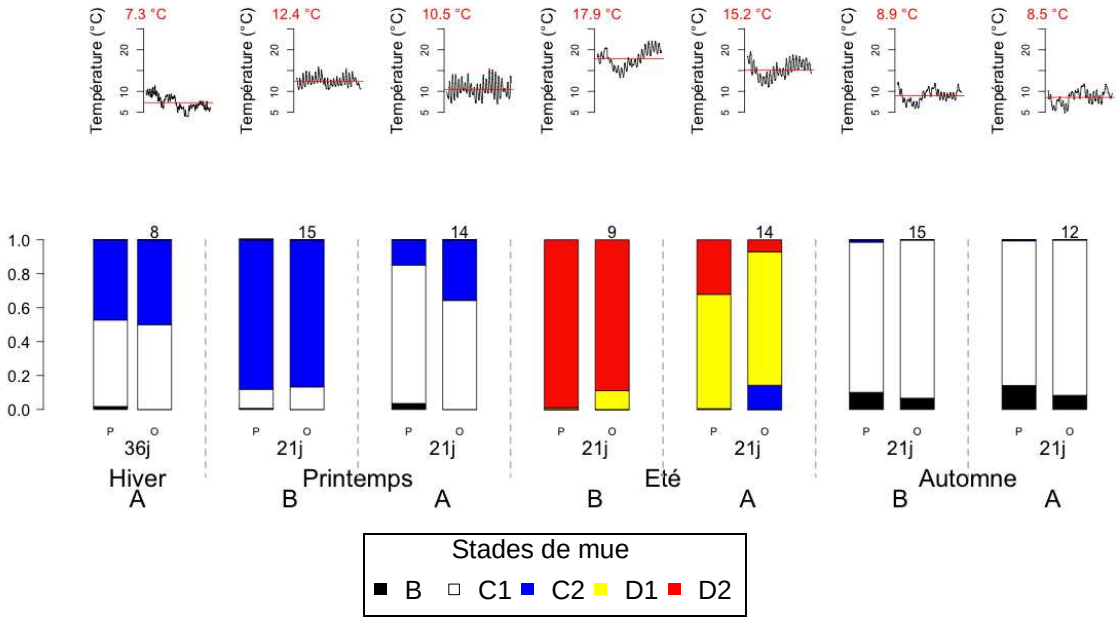



**Figure 25 : Distributions observées (O) et prédites (P) des stades de mue chez les femelles *Gammarus fossarum* exposées pour des périodes comprises entre 21 et 36 jours sur les sites référence de l'Ardières (A) et de la Bourbre (B) durant les 4 saisons (entre décembre 2008 et octobre 2009). Les profils de température d'exposition correspondant à chaque campagne sont présentés au-dessus des histogrammes correspondant, avec en rouge la température moyenne (à titre indicatif, les températures relevées chaque heure ayant été utilisées pour les prédictions du modèle). Le chiffre au-dessus de chaque histogramme correspond au nombre total de femelles observées.**

La Figure 26 illustre les données prédites et observées chez les femelles exposées d'une part à l'amont et l'aval de rejet de stations d'épuration, et d'autre part sur deux sites du bassin Artois-Picardie. Cette illustration a pour objectif de mettre en évidence la pertinence et l'intérêt de disposer d'un modèle permettant de prédire la distribution des stades de mue en

fonction de la température, pour limiter les faux-positifs et faux-négatifs et par conséquent interpréter correctement les données. Sur la station de Fontaine/Saône, un retard du cycle de mue a été observé sur les sites aval au rejet (S2 et S3), laissant penser à un impact du rejet. Toutefois, des températures légèrement plus faibles ont été observées sur les sites en aval, liées au fait que le rejet se fait dans un petit affluent qui se jette ensuite dans la Saône. Cette différence de température pourrait expliquer la différence de distribution entre le site amont et les sites aval. L'utilisation de notre modèle, et donc la comparaison entre les données prédites et observées, confirme l'impact du rejet sur le cycle de mue et un retard de ce dernier. En effet les différences de température entre les stations ne permettent pas d'expliquer les retards de mue observées sur les sites en aval. Sur la station d'épuration de Bourgoin, de la même façon, les différences de distribution observées entre les stations amont et aval ne reflètent pas l'impact de contaminants, mais sont uniquement le résultat des différences de températures entre les stations. Enfin, si l'on compare les données observées entre les sites de Courcelle et de Férin, on constate que les femelles sont respectivement et majoritairement en C2 et D1. Une interprétation classique de ces observations conduirait à observer un retard de mue sur le site de Courcelle, bien qu'il ait été défini *a priori* comme référence. Sur la base des suivis de températures obtenus sur les deux sites, les prédictions faites à l'aide de notre modèle montre que les distributions observées sur le site de Courcelle sont parfaitement cohérentes avec ce que l'on devrait obtenir sur une site non contaminé et par conséquent qu'il n'y a pas d'impact sur ce site. En revanche, et ceci malgré des stades plus avancés, il y a un décalage significatif entre prédit et observé sur le site de Férin, traduisant un retard de mue significatif et par conséquent un impact toxique.

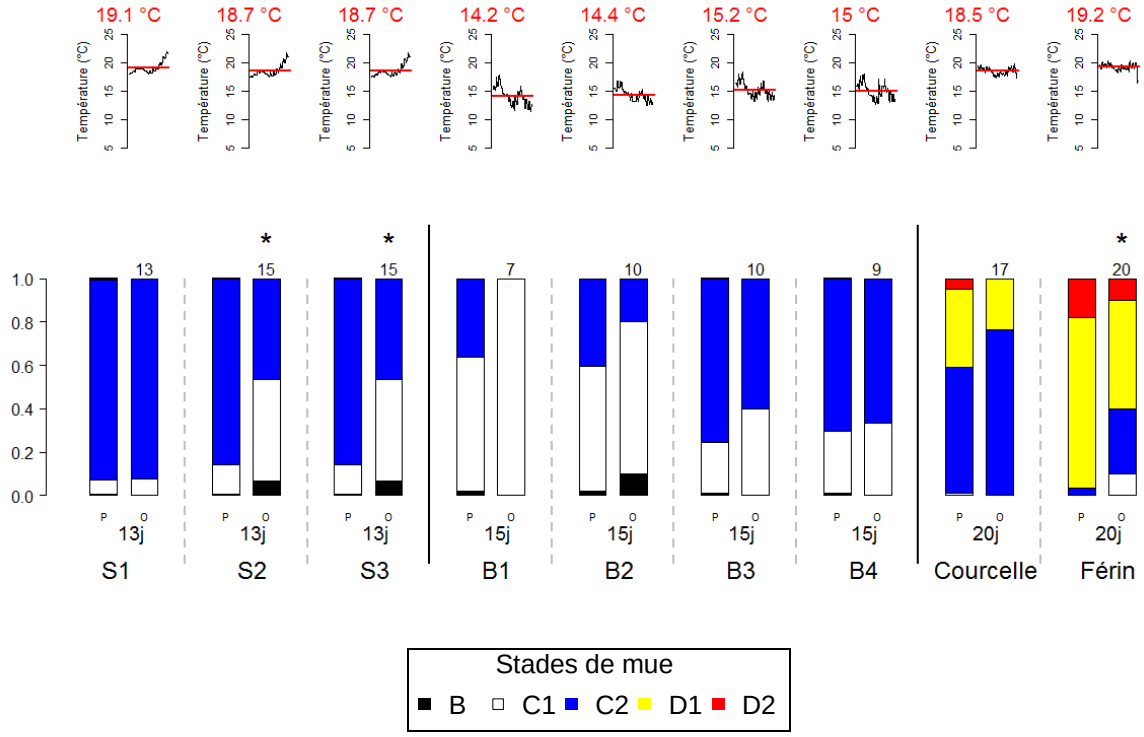



**Figure 26 : Distributions observées (O) et prédites (P) des stades de mue chez les femelles *Gammarus fossarum* exposées sur les sites amont (S1, B1 , B2 et B3) et aval (S2, S3 et B4) des rejets des stations d'épuration de Fontaine sur Saône (S) et de Bourgoin Jailleu (B), et sur deux stations du Bassin Artois Picardie, l'un *a priori* de référence (Courcelle) et le second impacté (Férin). Les profils de température d'exposition correspondant à chaque campagne sont présentés au-dessus des histogrammes correspondant, avec en rouge la température moyenne (à titre indicatif, les températures relevées chaque heure ayant été utilisées pour les prédictions du modèle). Le chiffre au-dessus de chaque histogramme correspond au nombre total de femelles observées. L'étoile (*) au-dessus de certains histogrammes représente une différence significative entre les distributions observées et prédites par le modèle.**

# 5 Liens entre les réponses moléculaires et individuelles

## 5.1 Contexte

Un des objectifs majeurs de l'écotoxicologie est d'intégrer toutes les informations depuis la source de pollution jusqu'aux conséquences au niveau des populations, afin d'atteindre une échelle pertinente en terme de fonctionnalité des écosystèmes (Newman et Clements, 2008). Au-delà des effets avérés aux niveaux moléculaire, cellulaire ou tissulaire, il s'agit de savoir si ces effets peuvent être traduits à un niveau d'organisation biologique supérieur, comme l'individu et la population. Donner un sens écologique à la réponse du biomarqueur valide son utilité pour l'évaluation du risque environnemental. Pourtant, si la valeur prédictive du biomarqueur est l'aspect le plus important, c'est aussi le plus polémique (Forbes *et al*., 2006). Le pouvoir prédictif du biomarqueur tient au fait que la réponse sub-individuelle, plus précoce et sensible que la réponse individuelle ou populationnelle, pourrait avoir des conséquences à des niveaux biologiques supérieurs. Toutefois, le caractère même de ce lien est ambigu. S'agit-il de lien empirique, mécaniste, ou de corrélations utilisant un faisceau d'évidence pour appuyer la signification du biomarqueur en terme d'effet ? Comprendre la signification de la réponse d'un biomarqueur couvre deux aspects. Le premier consiste à comparer les effets d'un contaminant à plusieurs niveaux d'organisation biologique et de corréler ces réponses. Cette approche permet de mettre en évidence d'une part la présence de contaminant via la mesure de biomarqueurs, et d'autre part un impact toxique via l'utilisation d'indicateurs individuels ou populationnels (Clements, 2000 ; Rose *et al*., 2006). Cette approche peut aider à identifier et comprendre les conséquences d'une contamination. Toutefois cette approche ne permet pas d'être prédictif, c'est à dire de pouvoir généraliser cette observation à un autre contexte et prédire de façon fiable un impact toxique sur la base de mesures de biomarqueurs. Le manque d'études établissant un lien clair et irréfutable entre la réponse d'un biomarqueur et un effet individuel a engendré de nombreuses critiques mettant à mal l'idée que le biomarqueur puisse être prédictif. Pour Forbes et al. (2006), la précocité du biomarqueur est nulle en l'absence de preuve directe de liens. C'est pour palier à ces critiques qu'une seconde approche a récemment été adoptée. Elle repose sur l'établissement de liens mécanistes quantifiables, permettant de vérifier les hypothèses sur lesquelles se fonde le changement d'échelle (Allen et Moore, 2004). Il existe peu de données quant à la relation entre réponse biochimique et conséquence au niveau individuel. La reproduction, le comportement, le développement et la croissance sont autant de traits de vie

permettant de relier les effets d'une contamination à différents niveaux organisationnels (Lewis et Galloway, 2009).

Comme présenté plus haut, mes travaux de recherches se sont focalisés principalement sur le développement de biomarqueurs moléculaires en lien avec de grandes fonctions physiologiques liées à la fitness des organismes plutôt que sur l'impact spécifique de contaminants. En effet, la mesure de l'activité Ache, indicateur de l'influx nerveux, est bien entendu en lien direct avec le comportement de l'organisme, comme la mobilité et l'activité alimentaire, qui jouent un rôle clef aussi bien dans la dynamique de la population que dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques (dégradation de la matière organique). De la même façon, l'apparition de dommages à l'ADN chez les spermatozoïdes peut évidemment conduire à des erreurs dans le transfert du patrimoine génétique à la descendance.

Dans la dernière partie de cette synthèse de mes activités, je vous présente les travaux réalisés sur l'établissement de liens entre la réponse de biomarqueurs moléculaires (Ache et dommages à l'ADN chez les spermatozoïdes) et celle de variables physiologiques (comportement et reproduction).

### 5.2 Cas de l'activité Ache et des dommages à l'ADN (test des Comètes)

L'objectif ici était d'établir d'une part les liens entre l'inhibition de l'activité Ache et des altérations du comportement (locomotion et taux d'alimentation) chez *Gammarus fossarum* (A28 et thèse de B. Xuereb), et d'autre part le lien entre le niveau de dommages à l'ADN et le taux d'anomalies embryonnaires observées suite à la reproduction (A40 et thèse d'E. Lacaze). Pour ceci, des composés modèles ont été sélectionnés : deux insecticides anti-Ache (le chlorpyrifos et le méthomyle) et deux génotoxiques (le MMS, methyl-methane-sulfonate et le K2Cr2O7, bichromate de potassium).

La Figure 27 présente les résultats obtenus suite à l'exposition d'organismes mâles de taille homogène à diverses concentrations en chlorpyrifos et méthomyl durant 96h. Les activités Ache et les taux d'alimentation ont été suivis au cours du temps (24, 48 et 96h), alors que la locomotion (distance parcourue) a été mesurée uniquement à la fin des 96h d'exposition. Une relation significative avec les activités Ache a été observée aussi bien pour la locomotion que pour le taux d'alimentation. Il est notamment important de noter que, pour les deux réponses comportementales étudiées, les relations établies pour les deux composés testés sont similaires. Par exemple, une inhibition comprise entre 23 et 38 % pour la locomotion, et 72 et

94 % pour le taux d'alimentation sont prédites suite à un eonhibition de l'activité Ache de 60%. Des relations qualitatives ont été rapportées précédemment chez d'autres espèces d'invertébrés d'eau douce comme chez le mollusque *Corbicula fulminea* (Cooper et Bidwell, 2006) et l'oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Kristoff *et al*., 2006) exposés à des organophosphorés. L'utilisation de composés appartenant à deux familles d'inhibiteur (i.e., CPE et MT) a également permis de démontrer que la mortalité n'est pas directement liée à l'inhibition de l'Ache chez *G. fossarum*. En effet, aucun impact sur la survie n'a été observé chez les gammares traités avec le MT (résultats non présentés), bien qu'une inhibition de l'activité Ache de 65 % ait été mesurée après seulement 24 h d'exposition à la plus forte concentration. En revanche, chez les organismes exposés au CPE, des effets sur la survie ont été observés pour des inhibitions de 50% après seulement 24-48 h d'exposition. Chez les organismes pulmonés, il a été clairement établi qu'une inhibition de l'activité Ache supérieure à 50% se traduisait obligatoirement par de la mortalité. L'impact d'une telle inhibition sur la survie des organismes aquatiques à respiration branchiale (*i.e*., poissons et invertébrés) n'a pas été entièrement élucidé, puisque l'eau qui traverse passivement les organes respiratoires permet le transfert d'oxygène (Barata *et al*., 2004). Nos résultats viennent renforcer l'hypothèse selon laquelle la mortalité observée avec le chlorpyrifos n'est pas liée à l'inhibition de l'activité Ache (Schoor et Brausch, 1980 ; Printes et Callaghan, 2004). Par exemple, comme pour tous les organophosphorés (OP) de type thion, le CPE doit être transformé en forme oxon pour devenir un inhibiteur efficace (Schoor et Brausch, 1980). Cependant, cette forme oxon est également reconnue pour induire un stress oxydant fort, ce qui expliquerait l'apparition de la mortalité parallèlement à l'inhibition d'Ache.

Concernant les dommages à l'ADN sur les spermatozoïdes, des gammares matures ont été exposés à deux génotoxiques modèles, le MMS et le dichromate de potassium, puis transférés en milieu non contaminé juste avant la fécondation. Une partie des organismes mâles ont été utilisés pour déterminer les niveaux de dommages à l'ADN, l'autre a été maintenue 21 jours à 12°C afin que les embryons aient atteint le stade 3. Suite aux 21 jours, le nombre d'embryons vivants et normaux a été déterminé pour chaque condition. La Figure 28 montre la relation obtenue entre le niveau de dommage à l'ADN observé sur les spermatozoïdes et le pourcentage d'embryons anormaux.

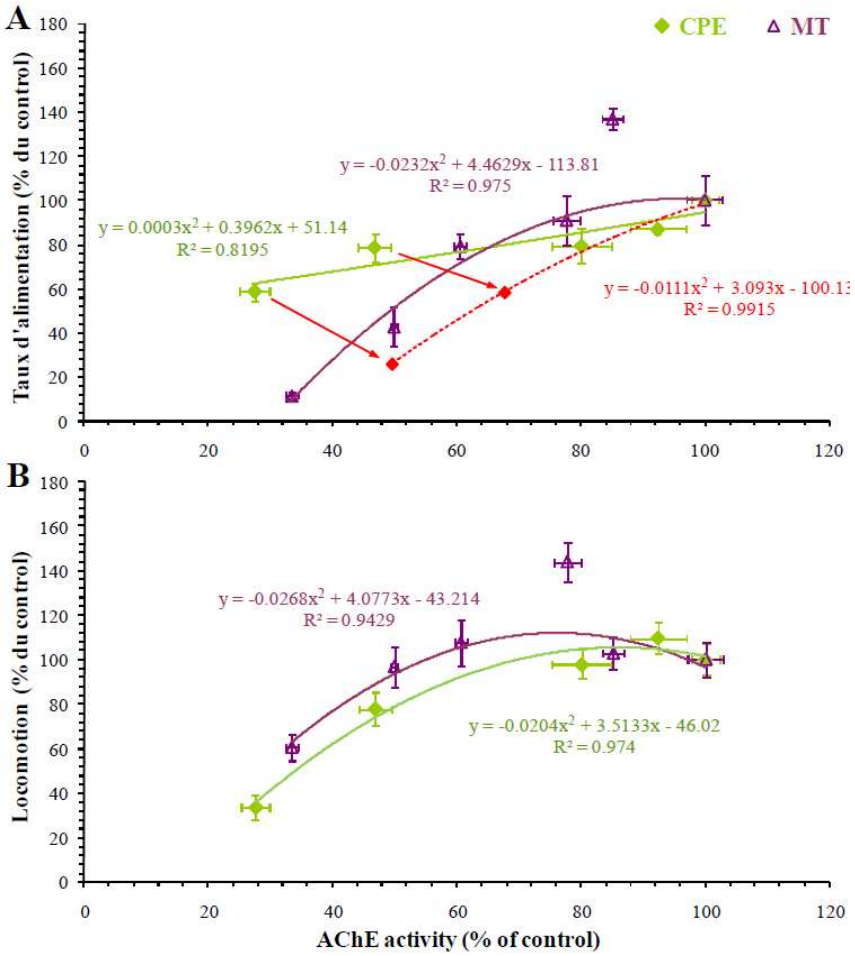



**Figure 27 : Relation entre l'activité Ache (% du contrôle) et (A) le taux d'alimentation (% du contrôle ) et (B) la locomotion (% du contrôle ) chez *G. fossarum* après 96h d'exposition à 5 conditions de chlorpyrifos (CPE) et 6 conditions de méthomyle (MT). Les données sont exprimées en moyenne ± E.T (n = 5 pour la mesure d'Ache et le taux d'alimentation, n = 18 pour la locomotion). La courbe rouge correspond à la relation obtenue utilisant les inhibitions d'Ache observées pour les 48 dernières heures d'exposition pour le chlorpyrifos**

Plus les dommages à l'ADN sont élevés, plus le pourcentage d'embryons anormaux est fort (A40), montrant qu'un transfert et une pérennisation d'un message toxique sur l'ADN se transmettent et impactent la descendance. Il convient de souligner que le lien établi entre les dommages à l'ADN des spermatozoïdes et le taux d'anomalies embryonnaires est différent en fonction du type de contaminant génotoxique.Dans le cas du MMS, aucune anomalie embryonnaire n'est détectée pour des dommages à l'ADN des spermatozoïdes inférieurs à 20 % tail DNA, alors que dans le cas du K2Cr2O7, les anomalies sont significatives dès une valeur de dommages de 10 % tail DNA. Il est envisageable que le mode d'action du contaminant entraîne des réponses cellulaires, génétiques mais aussi physiologiques (détoxification, réparation) différentes, se traduisant par le transfert d'un message toxique différent.

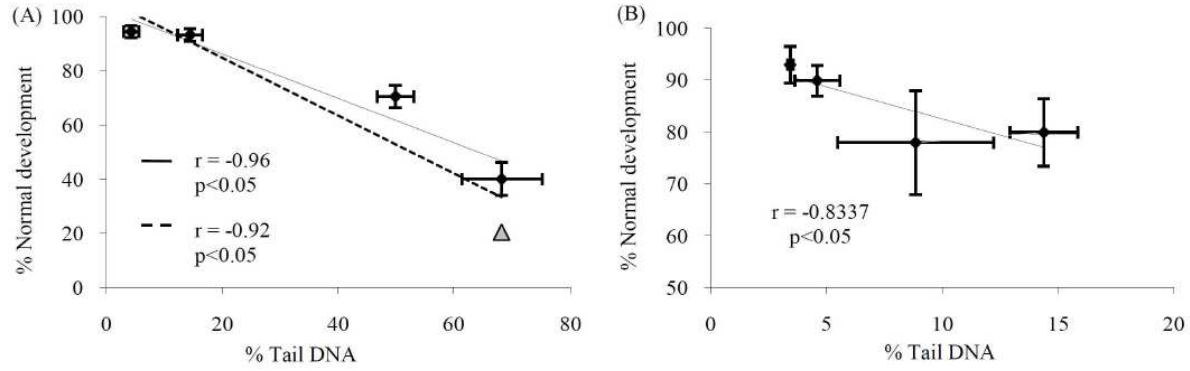



**Figure 28 : Lien entre dommages à l'ADN des spermatozoïdes et le pourcentage d'anomalies sur les embryons issus de parents exposés au MMS (A) et au K2Cr2O7 (B). Le triangle gris représente le pourcentage d'embryons anormaux recalculé par rapport au nombre d'embryons dans le contrôle.**

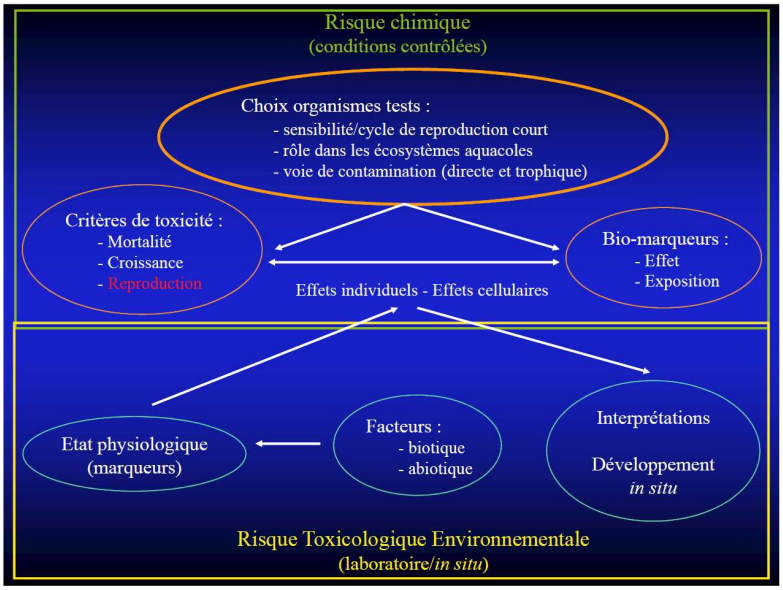
Ces travaux montrent qu'il est possible d'établir et formaliser les liens existants entre la modulation d'un biomarqueur et son effet au niveau de l'individu, permettant ainsi de traduire ou interpréter la mesure d'un biomarqueur en terme d'impact toxique sur l'individu et par conséquent de définir des niveaux de gravité dans la réponse d'un biomarqueur. Toutefois, comme observé avec le test des Comètes qui constitue une mesure globale des dommages à l'ADN, la typologie ou le type de dommages considérés peut conduire à un impact différencié sur l'organisme. Ainsi, il semble préférable d'établir ces liens à partir de réponses moléculaires spécifiques. Cependant, ces travaux permettent clairement de montrer que pour des dommages à l'ADN supérieurs à 20 % chez les spermatozoïdes, il existe un risque d'observer un impact sur le développement embryonnaire de *G. fossarum* et par conséquent pour le maintien de la population.

A l'aide de ces travaux sur les liens existant entre réponses moléculaires et individuelles, une nouvelle lecture des données présentées dans la Figure 17 pour l'utilisation de l'activité Ache et la Figure 19 pour la mesure des dommages à l'ADN dans le diagnostic des milieux se traduit par l'absence de risque d'effet sur le comportement (locomotion et taux d'alimentation) pour les sites de Bourgoin (B2 à B4) et de Beaujeu (Bj4), mais en revanche un risque d'impact sur le développement embryonnaire sur le site du Riou Viou lié au niveau de dommages à l'ADN mesuré sur les spermatozoïdes.

# 6 Conclusions et perspectives

## 6.1 Sorties de ces travaux

Les conclusions de cette synthèse de mes recherches ont été présentées tout au long de ce document, à chacune des étapes du développement, de la validation et de l'application des marqueurs chez *Gammarus fossarum*. Je souhaite profiter de ces conclusions pour remercier Irstea qui m'a recruté il y a 10 ans. Bien sûr pour avoir cru en moi et avoir parié sur mes capacités après un concours de 30 minutes en tout et pour tout, mais surtout pour m'avoir laissé une grande liberté dans la mise en place de mes activités de recherche et leurs orientations. La figure ci-dessous, qui est une copie de la diapositive de synthèse de mon projet de recherche présenté lors de mon recrutement, témoigne de la grande liberté que j'ai eu sur ces 10 dernières années. Je suis retombé dessus il y a peu de temps. A sa lecture, je me suis dit que j'avais eu de la chance que l'on me laisse développer un tel projet de recherche, qui s'inscrivait déjà sur du très long terme et portait la vision que j'avais sur la démarche à adopter pour développer des outils permettant de comprendre l'impact des contaminants dans les milieux et aller vers la proposition d'indicateurs en toxicologie environnementale (ou écotoxicologie). J'ai pu bénéficier du temps nécessaire pour sa mise en place, allant du choix de l'espèce à son utilisation dans le milieu, en passant par le développement de marqueurs à diverses échelles biologiques et la compréhension de leur variabilité naturelle sur le terrain. Je souhaite à chaque jeune chercheur d'avoir cette chance au démarrage de sa carrière, mais surtout « que cela continue pour moi dans les prochaines années ».



La seconde sortie des travaux présentés ici sur le gammare concerne le transfert de ces outils vers la création de la startup BioMA-monitoring. A la suite des divers projets réalisés en collaboration avec les acteurs de l'eau, publics et privés, et qui ont soutenus en partie ces travaux, nous avons été de plus en plus sollicités pour la mise en place et l'utilisation de ces outils afin de répondre à des questions de gestions environnementales. Très rapidement, il nous a fallu comprendre comment mettre à disposition ces outils aux acteurs de l'eau, sans pour autant détourner les objectifs d'activités de notre laboratoire, c'est-à-dire nous positionner comme « prestataire de ce service ». Cette réflexion nous a conduit à constater le manque d'organisation et de structures permettant un transfert efficace (c'est-à-dire n'entraînant pas une perte de qualité de ces outils aussi bien dans la mise en place que la mesure des marqueurs) vers la sphère des gestionnaires des milieux aquatiques et des acteurs privés. Pour ceci, un projet de transfert de ce savoir-faire vers une entité privée a été initié, a reçu le soutien du concours Bpi en émergence (ex Oséo) et a été accepté pour être incubé chez Crealys Lyon. Ce projet est aujourd'hui principalement porté par G. Jubeaux et L. Viviani, auquel participe également Arnaud Chaumot, Marina Coquery et Pascal Boistard. J'ai choisi ce point pour conclure sur mes travaux parce qu'un tel projet de transfert signifie pour moi que la qualité de nos travaux a été reconnue non seulement au plan scientifique (par la valorisation de publications), mais également par les gestionnaires pour les aider dans la gestion des milieux. De plus, ce projet de transfert me tient particulièrement à cœur puisqu'il fait partie de la vision que j'ai de la recherche finalisée, c'est à dire d'une part créer de la connaissance dans le domaine de la toxicité des contaminants, et d'autre part utiliser les travaux de la recherche comme levier (1) pour mieux répondre aux préoccupations des gestionnaires et (2) créer de l'emploi et offrir des perspectives aux personnes que l'on forme dans nos laboratoires. Enfin, cette belle et nouvelle expérience tient également à la rencontre humaine qui lui est associée, nouvelle, récente et pour certain déjà de longue date.

### 6.2 Et maintenant……

La suite de ces travaux s'organise aujourd'hui autour de trois axes. Le premier concerne les indicateurs de la contamination chimique proposés chez le gammare encagé, et particulièrement d'une part d'évaluer la pertinence de ces indicateurs à l'échelle nationale, et d'autre part de construire et proposer des indicateurs chimiques ayant un sens en terme d'impacts toxiques et de bio-indication. Le second axe traite de la variabilité des marqueurs de toxicité, moléculaires et individuels, développés chez notre population de référence de

*Gamamrus fossarum* en regard à la diversité d'espèces chez le genre *Gammarus*. Cette question sera abordée *via* l'étude de la variabilité des réponses des marqueurs entre espèces de gammares, représentatives des milieux aquatiques français, et entre populations de notre espèce modèle *G. fossarum*. Le dernier axe sera le développement de nouveaux biomarqueurs, en se basant sur l'identification et la quantification spécifiques de protéines d'intérêt chez notre espèce modèle. Pour ceci, nous avons engagé, en collaboration avec Jean Armengaud du CEA Marcoule, un travail innovant et ambitieux autour des dernières approches Omique.

### *6.2.1 Pertinence toxicologique et écologique des indicateurs chimiques*

Dans un premier temps, et à partir de la méthodologie utilisée pour établir les indicateurs chimiques en région Rhône-Alpes (partie 2), un projet financé par l'ONEMA (PC 12) est actuellement en cours (CDD de Jean-Philippe Besse) pour valider les indicateurs définis au niveau régional à l'échelle du territoire national et le cas échéant en proposer de nouveaux.

Dans un second temps, nous travaillerons à évaluer si un sens écotoxicologique et écologique peut être donné aux indicateurs de la contamination bio-disponible, déterminée via la mesure de l'accumulation chez les organismes encagés. Comme présenté par Rainbow *et al*. (2012), il est très difficile de démontrer et isoler l'impact d'un facteur particulier, notamment un facteur de stress chimique, sur la diversité ou le fonctionnement des écosystèmes naturels, et encore moins sur la toxicité de ces milieux. Toutefois, mieux comprendre les liens entre la pression chimique et les impacts sur les milieux aquatiques est devenu incontournable pour les démarches de restauration. Aujourd'hui, des bio-indicateurs de la structure (IBGN) et du fonctionnement (E2M2) des écosystèmes aquatiques sont disponibles et mis en place pour caractériser leur qualité. Ainsi, depuis quelques années, des travaux ont été initiés dans le but de calibrer la mesure de contaminants dans les organismes à l'aide des réponses écologiques (structure des communautés et assemblages d'espèces) (Luoma *et al*., 2010 ; Rainbow *et al*., 2012). Cependant, ces travaux ont été réalisés sur des zones géographiques très limitées, afin de limiter l'impact de facteurs de confusion (biotiques et abiotiques) sur la lecture des niveaux de contamination des organismes. La Figure 29 illustre un exemple de relation établie dans les travaux de Luoma *et al*., (2010). Ces travaux montrent qu'il est envisageable, pour un contaminant donné, de définir une teneur dans

l'organisme au-delà de laquelle un effet sur la communauté est observé. En collaboration avec le laboratoire d'hydroécologie quantitative (Y. Souchon et A. Chandéris) et le laboratoire de chimie (M. Coquery) de Irstea Lyon, un projet a été initié pour aborder ces questions, en se basant sur l'utilisation de l'encagement de gammares permettant une comparaison fiable de la contamination bio-disponible dans l'espace. Pour ceci, et pour un nombre de sites d'environ 120, nous établirons les relations d'une part entre le niveau de contamination bio-disponible et les indicateurs de structure et de fonctionnement des communautés, et d'autre entre le niveau de contamination bio-disponible et les indicateurs de toxicité de ces milieux, à l'aide des outils développés chez le gammare. Pour chaque composé, nous chercherons à définir une gamme de concentration bio-disponible au-delà de laquelle un effet toxique ou un impact sur la structure des communautés est observé dans les milieux.

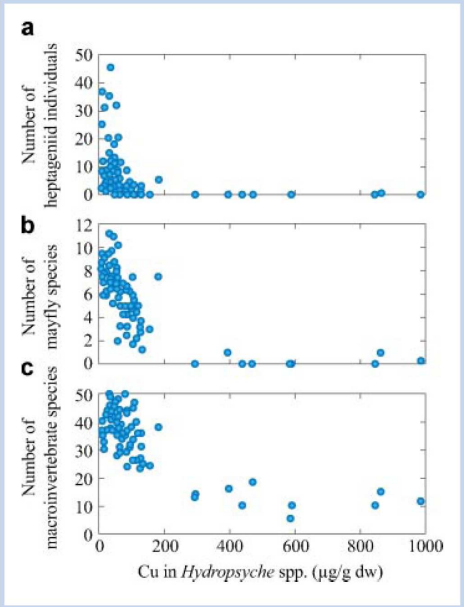



**Figure 3.** Three measures of ecological community structure from the Clark Fork River, Silverbow Creek, and 3 tributaries of the Clark Fork, as a function of copper concentrations in the biomonitor *Hydropsyche* spp. The ecological measures are **a**) average among 3 replicates of the abundance of individual heptageniid mayflies (number found in 0.1 square meter), **b**) average number of mayfly species (mayfly richness) found in 4 replicate 0.1 square meter Hess samples, and **c**) average number of benthic macroinvertebrate species (invertebrate species richness) found in 4 replicate 0.1 square meter samples. Samples were collected from Clark Fork, Silverbow and other tributary sites repeatedly over a period of 15 years in August of each year.

**Figure 29 : Exemple de relation observée entre niveau de contamination bio-disponible et indicateur écologique de communautés, tiré de Luoma *et al.*, 2010.**

### *6.2.2 Incertitudes autour des indicateurs de contamination et de toxicité développés chez G. fossarum*

L'évaluation prédictive du danger avant la mise sur le marché de composés chimiques, et donc sa présence dans les milieux aquatiques, se base sur la réalisation de biotests en

laboratoire à l'aide d'organismes dits « modèles », c'est à dire des clones ou souches parfaitement connus et contrôlés. Ces biotests permettent l'acquisition de données reproductibles et comparables entre laboratoires. Cependant, les conditions de leur réalisation sont peu représentatives ni des caractéristiques physico-chimiques, ni de la diversité biologique présentes dans les milieux naturels. L'évaluation du risque proposée doit être pertinente vis à vis des écosystèmes naturels et donc pour un ensemble d'individus dans des conditions physico-chimiques et d'habitat variées, de populations ayant un historique leur étant propre, et appartenant à un ensemble d'espèces multiples dont l'espèce modèle a été prise comme proxy. Ainsi pour limiter les incertitudes liées aux méthodes utilisées pour acquérir ces données de toxicité, des facteurs de sûreté sont appliqués lors de l'élaboration des normes de qualité environnementale.

Ces mêmes questionnements se posent dans le cadre du diagnostique de la contamination et de la toxicité des milieux à l'aide des outils présentés comme chez le gammare. L'expérimentation *in situ* permet une exposition réaliste tout en limitant l'impact de facteurs de confusion liés à la physiologie et à l'histoire de vie des organismes. En effet, l'utilisation d'une seule population de référence et d'organismes calibrés, pour lesquels ont été établis des valeurs seuil intégrant l'impact des facteurs environnementaux, limite la modulation des marqueurs de toxicité par des variables autres que la contamination bio-disponible présente. Toutefois, la représentativité de la population et de l'espèce choisie comme source d'organismes sentinelles pose la question de la pertinence des informations obtenues vis-à-vis des populations des milieux. Les données de toxicité obtenues via l'utilisation d'une population contrôle permettent-elles de préserver l'ensemble des populations et espèces proches présentes dans les milieux ? La divergence possible des traits de vie et des réponses à l'exposition aux contaminants entre populations peut être le fruit de processus neutres de dérive, ou de processus déterministes d'adaptation aux conditions locales d'habitat. Appréhender cette source d'incertitude pour l'évaluation écotoxicologique est un enjeu majeur pour la pertinence de l'évaluation proposée.

Dans le cadre du projet ANR GAMMA (PP3), un des objectifs est de caractériser et quantifier la variabilité des niveaux de base (valeurs de référence) et la sensibilité aux contaminants pour chacun des marqueurs (moléculaires et traits de vie) développés et validés chez notre population référence de *G. fossarum*. Pour ceci, aussi bien à l'aide d'expérimentations de laboratoire (molécules modèles) que sur le terrain, les niveaux des divers marqueurs de toxicité seront comparés pour plusieurs populations contrôles de *G. fossarum*, mais également

pour des populations de *G. pulex* et *G. roeseli*, ceci aussi bien en milieux non contaminés que contaminés. Des travaux similaires sont également engagés sur la capacité d'accumulation chez les gammares *via* la thèse de N. Urien (co-encadrement avec J. Lebrun Irstea Antony). L'objectif ici est d'évaluer les coefficients d'accumulation de divers métaux chez plusieurs populations de *G. fossarum* et *G. pulex* et de les comparer aux valeurs précédemment définies chez notre population de référence.

### *6.2.3 Approche de rupture pour le développement de biomarqueurs chez* Gammarus fossarum *: perturbations endocriniennes*

L'objectif de cette partie de mon projet de recherche vise à développer des biomarqueurs protéiques spécifiques d'un dysfonctionnement du système endocrinien contrôlant la reproduction chez *Gammarus fossarum*. Ce projet vise à proposer une démarche de rupture dans le domaine du développement et de l'utilisation des biomarqueurs chez les invertébrés pour la surveillance des milieux aquatiques. Pour ceci, il est proposé de mettre à profit les dernières avancées en matière de génomique et protéomique, pour d'une part identifier et caractériser les protéines impliquées dans l'ovogénèse et la spermatogénèse chez les gammaridés, et d'autre part proposer une méthode de mesure par protéomique ciblée de ces biomarqueurs qui soit transférable d'une espèce de gammare à l'autre. Enfin un dernier objectif est, *via* l'utilisation de l'approche Luminex xMAP®, de proposer une méthode de mesure multipléxée (mesure simultanée, spécifique et quantifiée) des nouveaux biomarqueurs de perturbations endocrines proposés chez les gammaridés

L'étude de l'impact des perturbateurs endocriniens (PE) est une problématique majeure des pouvoirs publics comme en témoigne le dernier rapport du groupe de travail sur « propositions pour une stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens ». Les études environnementales se focalisent principalement sur la régulation hormonale en lien avec la reproduction, étant donné l'importance de ce trait de vie pour le maintien des populations. Comme présenté dans la partie 3.4 de ce document, peu de biomarqueurs sont disponibles et validés pour évaluer l'impact des PE chez les invertébrés alors que leur diversité et leur rôle dans le fonctionnement des écosystèmes plaident pour leur prise en compte. Ce constat résulte d'une mauvaise connaissance de leurs systèmes endocriniens et de la stratégie adoptée depuis plusieurs années pour le développement des biomarqueurs, consistant principalement à transférer les méthodes développées spécifiquement chez les vertébrés vers les invertébrés.

Les connaissances actuelles sur la diversité phylogénétique moléculaire acquise au cours de l'évolution remettent totalement en cause cette stratégie. Des travaux récents menés notamment dans le cadre d'un de nos projets PNRPE (PP2), sur la mesure de la vitellogénine, ont mis en évidence (1) la non transférabilité des méthodes de mesures développées chez les vertébrés vers les invertébrés, mais également entre invertébrés due à la forte divergence de séquences protéiques et (2) une évolution de la fonction de cette protéine et par conséquent une perte de son intérêt comme biomarqueur spécifique. Les deux synthèses bibliographiques récentes de Scott (2012 et 2013) montrent que la régulation hormonale des mollusques est très éloignée de celle connue chez les vertébrés, et va à l'encontre de l'hypothèse longtemps soutenue. Par conséquent, il n'est pas pertinent d'utiliser les biomarqueurs de PE spécifiques des vertébrés chez les mollusques. Toutefois de nombreux exemples chez les crustacés et les mollusques montrent qu'ils sont également la cible d'impacts de PE, notamment *via* l'apparition de phénomènes d'inter-sexualités, pouvant atteindre jusqu'à 24% chez certaines populations de gammare (Schirling *et al.*, 2005). Ces travaux confirment la nécessité de développer des outils permettant de prédire, comprendre et diagnostiquer la présence et les effets de PE chez les invertébrés présents dans les milieux aquatiques européens. Enfin, ces travaux imposent aussi que le développement de biomarqueurs de PE chez les invertébrés doit absolument passer par la mise en place de méthodes permettant une identification et quantification spécifiques des protéines d'intérêt chez l'espèce cible (sentinelle) et faire l'objet d'une validation fonctionnelle.

Les méthodes de séquençages génomique et protéomique permettent aujourd'hui l'acquisition d'information à haut débit sur de nouvelles espèces sentinelles, notamment les espèces d'intérêt en écotoxicologie et permettent d'identifier rapidement des protéines d'intérêt. Récemment, et en collaboration avec le laboratoire de biochimie des systèmes perturbés du CEA (Jean Armengaud), une approche dite de « protéogénomique » a été mise en place chez *Gammarus fossarum*, couplant séquençage du transcriptome (RNAseq) et caractérisation à haut débit du protéome par spectrométrie de masse. Ces travaux, initiés dans le cadre de la thèse de J. Trapp (2012 – 2014, co-encadrement Jean Armengaud et A. Chaumot), ont permis d'une part de fournir une base de données transcriptomiques chez cette espèce, et d'autre part d'identifier des protéines spécifiques d'organes fortement impliqués dans la régulation hormonale et la reproduction : le céphalon, les ovaires et les testicules. Toutefois, l'identification spécifique de ces protéines ne renseigne pas de leur rôle fonctionnel dans les processus liés à la reproduction comme la mue, l'ovogénèse et la spermatogénèse, du

fait notamment de la faible efficacité des méthodologies d'annotation fonctionnelle automatique car cette espèce est distante des modèles très documentés en termes d'annotation expérimentale (insectes, vertébrés, nématodes…). Par conséquent, cette question de caractérisation fonctionnelle sera abordée. Le profil des protéines spécifiques de chaque tissu sera décrit au cours du cycle de mue et de la gamétogénèse chez des organismes mâles et femelles contrôles. Ces travaux permettront d'identifier les protéines pouvant être potentiellement proposées comme biomarqueurs. Ensuite, les protéines réellement pertinentes comme biomarqueurs seront sélectionnées sur la base d'exposition d'organismes à des molécules modèles.

Pour la surveillance, un des défis est de fournir des outils pour évaluer les effets toxiques sur l'ensemble des taxons des écosystèmes, intégrant notamment l'hétérogénéité inter-espèces dans la sensibilité aux contaminants, qui s'explique en partie par la diversité moléculaire des systèmes biologiques qui ont émergé au cours de l'évolution. L'applicabilité inter-espèces des biomarqueurs est un point crucial en écotoxicologie. Les gammaridés illustrent pleinement cette problématique de la diversité. Ils sont aujourd'hui considérés comme des espèces modèles incontournables en écotoxicologie pour la surveillance des milieux d'eaux douces. Cependant, au sein du groupe *G. pulex*, deux morpho-espèces européennes, *G. pulex* et *G. fosssarum* ont été décrites. De plus, l'existence de lignées d'ADNmt très divergentes suggère une diversité cryptique au sein de ces espèces (Meyran *et al*., 1997 ; Hou et Li, 2010). Face à cette diversité, la protéomique dite « bottum-up » par spectrométrie de masse en tandem pourrait offrir des biomarqueurs applicables sur des espèces sans avoir besoin de nouveaux développements pour chaque population, lignée ou espèce locale, lors de chaque étude de cas spécifique d'une région ou d'un habitat particulier. En effet, parce que l'identification des protéines par spectrométrie s'appuie sur la détection de petits peptides (de 6 à 20 acides aminés), il est possible de tirer parti de la conservation de motifs peptidiques (du fait de contraintes fonctionnelles évolutives agissant sur des clusters spécifiques d'acides aminés dans la séquence des protéines) pour élaborer des biomarqueurs applicables pour des groupes de populations ou d'espèces phylogénétiquement proches. Pour ceci, l'objectif est de décrire le profil protéique des espèces de gammare les plus présentes en France et en Europe et de proposer, pour chaque protéine d'intérêt définie précédemment, des peptides rapporteurs « universels » permettant d'identifier et de quantifier ces biomarqueurs pour l'ensemble de ces espèces.

Au-delà de la robustesse des méthodes disponibles, une des limites fortes dans l'utilisation pratique des biomarqueurs pour la surveillance des milieux réside dans le fait qu'il n'existe pas de méthodes multi-cibles. En effet, étant donné que la majorité des biomarqueurs sont mesurés *via* des méthodes dites indirectes (colorimétrie, ELISA, etc…), chacun doit être mesuré par une méthode spécifique, conduisant à une demande en matériel biologique, mais également en temps, peu soutenable pour une utilisation à large échelle. A partir des peptides rapporteurs de chaque nouveau biomarqueur et en collaboration avec S. Azoulay de l'université de Nice, une nouvelle approche de dosage, basée sur la technologie Luminex xMap, sera développée. La technologie Luminex, fondée sur le principe de la cytométrie en flux à base d'anticorps, permet le dosage simultané et rapide de plus 100 analytes, ceci indépendamment de leur poids moléculaire. Le développement d'une analyse immunologique unique et rapide constitue une approche complètement nouvelle qui facilitera grandement l'extension du suivi environnemental et les études multiparamétriques.

# 7 Références

Allen, I.J. and Moore, M.N. (2004) Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Marine Environmental Research* 58(2-5), 227-232.

Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P. (2004) Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin* 49(9-10): 704-712.

Andrès, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C. and Boudou, A. (1999). Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(11): 2462-2471.

Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G. and Jouanneau, J.M. (2004). Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). *Environmental Pollution* 132(3): 413-426.

Avarre, J. C., Lubzens, E. and Babin, P. J. (2007). Apolipocrustacein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipophorin II/I and vertebrate apolipoprotein B. *BMC Evolutionary Biology* **7**.

Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* 10 (1): 43-59.

Barbee, G.C., Barich, J., Duncan, B., Bickham, J.W., Matson, C.W., Hintze, C.J., Autenrieth, R.L., Zhou, G.D., McDonald, T.J., Cizmas, L., Norton, D., Donnelly, K.C. (2008). *In situ* biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(2): 454-464.

Beliaeff, B. and Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(6): 1316-1322.

Bervoets, L., Voets, J., Covaci, A., Chu, S., Qadah, D., Smolders, R., Schepens, P., Blust, R. (2005). Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in flemish surface waters. *Environmental Science and Technology* 39(6): 1492-1505.

Bervoets, L., Van Campenhout, K., Reynders, H., Knapen, D., Covaci, A., Blust, R. (2009). Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(3): 720-728.

Billoir E, Péry ARR, Charles S (2007). Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: A combination of the DEBtox and matrix population models, *Ecological Modelling* 203: 207-214

Blais, J.M., Wilhelm, F., Kidd, K.A., Muir, D.C.G., Donald, D.B., Schindler, D.W. (2003). Concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in amphipods (*Gammarus lacustris*) along an elevation gradient in mountain lakes of western Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(11): 2605-2613.

Blanchet-Tournier, M.-F. (1980). Mue et vitellogénèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarelus* (PALLAS) : Controles endocries et interactions. Sciences Naturelles. Paris, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)**:** 175.

Blockwell, S. J., Pascoe, D. and Taylor, E. J. (1996a). Effects of lindane on the growth of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Chemosphere* 32(9): 1795-1803.

Borja, A., Bricker, S.B., Dauer, D.M., Demetriades, N.T., Ferreira, J.G., Forbes, A.T., Hutchings, P., Jia, X., Kenchington, R., Marques, J.C., Zhu, C. (2008). Overview of integrative tools and methods in assessing ecological integrity in estuarine and coastal systems worldwide. *Marine Pollution Bulletin* 56(9): 1519-1537.

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(5): 468-478.

Burgeot, T., Bocquene, G., Porte, C., Dimeet, J. and Santella, R.M. (1996). Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean sea. *Marine Ecology-Progress Series* 131: 125-141.

Bruner, K.A., Fisher, S.W., Landrum, P.F. (1994). The role of the zebra mussel, *Dreissenia polymorpha*, on contaminant cycling: I. The effect of body size and lipid content on the bioconcentration of PCBs and PAHs. *Journal of Great Lakes Research* 20(4): 725-734.

Buschini A, Carboni P, Martino A, Poli P, Rossi C (2003). Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes *of Dreissena polymorpha*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 537(1): 81-92.

Carlson, G. R., Dhadialla, T. S., Hunter, R., Jansson, R. K., Jany, C. S., Lidert, Z. and Slawecki, R. A. (2001). The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal ecdysteroid agonist. *Pest Management Science* 57(2): 115-119.

Casiot, C., Egal, M., Elbaz-Poulichet, F., Bruneel, O., Banconmontigny, C., Cordier, M.-A., Gomez, E. and Aliaume, C. (2009). Hydrological and geochemical control of metals and arsenic in a Mediterranean river contaminated by acid mine drainage (the Amous River, France) ; preliminary assessment of impacts on fish (*Leuciscus cephalus*). . *Applied Geochemistry*, *24*, 787-799.

Chapman PM (2007). Determining when contamination is pollution - Weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International* 33(4): 492-501.

Chen, S., Chen, D. F., Yang, F., Nagasawa, H. and Yang, W. J. (2011). Characterization and processing of superoxide dismutase-fused vitellogenin in the diapause embryo formation: A special developmental pathway in the brine shrimp, *Artemia parthenogenetica*. *Biology of Reproduction* 85(1): 31-41.

Claisse, D., Joanny, M., Quintin, J.Y. (1992) Le réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO). *Analusis* 20(6): 19-22.

Clements, W.H. (2000) Integrating effects of contaminants across levels of biological organization: An overview. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 7(2): 113-116.

Cold, A. and 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.

Cooper, N.L. and Bidwell, J.R. (2006). Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide. *Aquatic Toxicology*, 76: 258-267.

Conti, M.E., Iacobucci, M., Cecchetti, G., Alimonti, A. (2008). Influence of weight on the content of trace metals in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819): A forecast model. *Environmental Monitoring and Assessment* 141(1-3): 27-34.

Costa, F. O., Neuparth, T., Correia, A. D. and Helena Costa, M. (2005). Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: II. Organism and population-level endpoints. *Marine Environmental Research* 60(1): 93-110.

C.E. (2008). Directive 2008/105/CE du parlement Européen et du conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau. *Journal officiel de l'Union Européenne* L348/85.

C.E. (2010). CMA. Guidance on Surface Water Chemical Monitoring under the Water Framework Directive. Guidance Document no 25. Technical Report 210.3991. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive, EC, Brussels, Belgium. 82p.

Crane M, Burton GA, Culp JM, Greenberg MS, Munkittrick KR, Ribeiro R *et al.* (2007). Review of aquatic *in situ* approaches for stressor and effect diagnosis. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3(2): 234-245.

Cunha, I., Garcia, L.M. and Guilhermino, L. (2005). Sea-urchin (*Paracentrotus lividus*) glutathione S-transferases and cholinesterase activities as biomarkers of environmental contamination. *Journal of Environmental Monitoring* 7: 288-294.

Cuzin-Roudy, J. and Buchholz, F. (1999). Ovarian development and spawning in relation to the moult cycle in Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica* (Crustacea: Euphausiacea), along a climate gradient. *Marine Biology* 133(2): 267-281.

De Lange, H. J., Noordoven, W., Murk, A. J., Lürling, M. and Peeters, E. T. H. M. (2006). Behavioural responses of Gammarus pulex (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 78(3): 209-216.

Deng, X., Rempel, M. A., Armstrong, J. and Schlenk, D. (2007). Seasonal evaluation of reproductive status and exposure to environmental estrogens in hornyhead turbot at the municipal wastewater outfall of Orange County, CA. *Environmental Toxicology* 22(5): 464-471.

Dhawan, A., Bajpayee, M. and Parmar, D. (2009). Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology* 25(1): 5-32.

Dorigo, U., Leboulenger, C., Berard, A., Bouchez, A., Humbert, J.F. and Montuelle, B. (2007). Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area. *Aquatic Microbial Ecology* 50: 91-102.

Escartin, E. and Porte, C. (1996). Acetylcholinesterase Inhibition in the Crayfish *Procambarus clarkii* Exposed to Fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34: 160-164.

Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J. and Geffard, O. (2008). Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 86(3): 413-425.

Fent, K., Weston, A. A. and Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76(2): 122-159.

Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R. L., Pollio, A. and Garric, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55(3): 359-370.

Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Smith, B.D., Zmudzinski, L. (2003). Seasonal variation in trace metal concentrations in three talitrid amphipods from the Gulf of Gdansk, Poland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 288(1): 81-93.

Finn, R. N. (2007). Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other subdomains in vitellogenins. *Biology of Reproduction* 76(6): 926-935.

Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P.and Garric, J. (2002a). Multibiomarker Responses in Fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51: 145-152.

Flammarion, P., Noury, P. and Garric, J. (2002b). The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution* 120: 325-332.

Forbes VE, Palmqvist A, Bach L (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology And Chemistry* 25(1): 272-280.

Forbes VE, Calow P, Sibly RM (2008). The extrapolation problem and how population modeling can help. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(10): 1987-1994.

Forget, J. and Bocquene, G. (1999). Partial purification and enzymatic characterization of acetylcholinesterase from the intertidal marine copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 123: 345-350.

Forget, J., Livet, S. and Lboulenger, F. (2002). Partial purification and characterization of acetylcholinesterase (AChE) from the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 132: 85-92.

Forget, J., Beliaeff, B. and Bocquene, G. (2003). Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology* 62: 195-204.

Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C. and Leboulenger, F. (2005). Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60(3): 288-294.

Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F. and Guilhermino, L. (2006). Cholinesterase from the common prawn (*Palaemon serratus*) eyes: Catalytic properties and sensitivity to organophosphate and carbamate compounds. *Aquatic Toxicology* 77: 412-421.

Gagné, F. and Blaise, C. (2004). Shell protein characteristics and vitellogenin-like proteins in brine shrimp *Artemia franciscana* exposed to municipal effluent and 20-hydroxyecdysone. *Comparative Biochemistry and Physiology , C: Toxicology and Pharmacology* 138(4): 515-522.

Gagné, F., Blaise, C. and Pellerin, J. (2005). Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus sp.* collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada. *Environmental Research* 98(1): 89-99.

Gagné, F., Cejka, P., André, C., Hausler, R. and Blaise, C. (2007). Neurotoxicological effects of a primary and ozonated treated wastewater on freshwater mussels exposed to an experimental flow-through system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 146: 460-470.

Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Depledge MH, *et al.* (2006). The ECOMAN project: A novel approach to defining sustainable ecosystem function. *Marine Pollution Bulletin* 53(1): 186-194.

Garcia-de-la-Parra, L.M., Bautista-Covarrubias, J.C., Rivera-de la Rosa, N., Betancourt-Lozano, M. and Guilhermino, L. (2006). Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65: 372-380.

Ghekiere, A., Verslycke, T. and Janssen, C. (2006). Effects of methoprene, nonylphenol, and estrone on the vitellogenesis of the mysid *Neomysis integer*. *General and Comparative Endocrinology* 147(2): 190-195.

Goldberg, E.D. (1975) The mussel watch. A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 6(7): 111.

Gossiaux, D.C., Landrum, P.F., Fisher, S.W. (1996). Effect of temperature on the accumulation kinetics of PAHs and PCBs in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Journal of Great Lakes Research* 22(2): 379-388.

Gross, M. Y., Maycock, D. S., Thorndyke, M. C., Morritt, D. and 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.

Guidugli, K. R., Nascimento, A. M., Amdam, G. V., Barchuk, A. R., Omholt, S., Simões, Z. L. P. and Hartfelder, K. (2005a). Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters* 579(22): 4961-4965.

Guidugli, K. R., Piulachs, M. D., Bellés, X., Lourenço, A. P. and Simões, Z. L. P. (2005b). Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of Apis mellifera. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 59(4): 211-218.

Gwo, J.C., Wu, C.Y., Chang, W.S.P. and Cheng, H.Y. (2003). Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay. *Cryo-Letters* 24(3): 171-180.

Hagger, J.A., Depledge, M.H. and Galloway, T.S. (2005). Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin* 51(8-12): 811-816.

Hagger JA, Jones MB, Lowe D, Leonard DRP, Owen R, Galloway TS (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.

Hagger, J. A., Lowe, D., Dissanayake, A., Jones, M. B. and Galloway, T. S. (2010). The influence of seasonality on biomarker responses in *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology* 19(5): 953-962.

Heijerick, D.G., Janssen, C.R., De Coen, W.M. (2003). The combined effects of hardness, pH, and dissolved organic carbon on the chronic toxicity of Zn to *D. magna*: Development of a surface responses model. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 210-217.

Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A.J. and Cairns, J.J. (2003). *Handbook of ecotoxicology, 2nd edition*. Boca Raton (Florida): CRC Press

Hoguet, J. and Key, P.B. (2007). Activities of biomarkers in multiple life stages of the model crustacean, *Palaemonetes pugio*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 353: 235-244.

Hotta, K., Watanabe, T., Kishida, C., Nakamura, Y., Ohkubo, N., Matsubara, T., Adachi, S. and Yamauchi, K. (2003). Seasonality of serum levels of vitellogenin in male Japanese whiting, Sillago japonica, reared under natural temperature and photoperiod. *Fisheries Science* 69(3): 555-562.

Jha, A.N., Dogra, Y., Turner, A. and Millward, G.E. (2005). Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 586(1): 47-57.

Jha, A.N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23(3) : 207-221.

Jing-jing, M., Lu-qing, P., Jing, L. and Lin, Z. (2009). Effects of benzo[a]pyrene on DNA damage and histological alterations in gonad of scallop *Chlamys farreri*. *Marine Environmental Research* 67(1): 47-52.

Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwichowski, K.-U., Petzsch, P. and Nagel, R. (2004). Intersexuality in *Gammarus fossarum* KOCH - a common inducible phenomenon? *Archiv für Hydrobiologie* 159: 511-529.

Kedwards, T. J., Blockwell, S. J., Taylor, E. J. and Pascoe, D. (1996). Design of an electronically operated flowtrough respirometer and its use to investigate the effects of copper on the respiration rate of *Gammarus pulex* (L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57: 610-616.

Khan, F.R., Irving, J.R., Bury, N.R., Hogstrand, C. (2011). Differential tolerance of two *Gammarus pulex* populations transplanted from different metallogenic regions to a polymetal gradient. *Aquatic Toxicology* 102(1-2): 95-103.

Kristoff, G., Guerrero, N.V., De d'Angelo, A.M.P. and Cochon, A.C. (2006). Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. *Toxicology* 222 : 185-194.

Koistinen, J., Herve, S., Ruokojärvi, P., Koponen, J., Vartiainen, T. (2010) Persistent organic pollutants in two Finnish watercourses: Levels, congener profiles and source estimation by mussel incubation. *Chemosphere* 80(6): 625-633.

Kuhn, K. and Streit, B. (1994). Detecting sublethal effects of organophosphates by measuring acetylcholinesterase activity in *Gammarus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 53*, 398-404.

Kunz, P.Y., Kienle, C. and Gerhardt, A. (2010) *Gammarus* spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: Toward integrated multilevel tests, pp. 1-76.

Kwan, K.H.M., Chan, H.M., de Lafontaine, Y. (2003). Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence river. *Environmental Monitoring and Assessment* 88(1-3): 193-219.

Langston, W. J., Burt, G. R., Chesman, B. S. and Vane, C. H. (2005). Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in the aquatic environment. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85(1): 1-31.

Lau, P.S., Wo,g, H.L. and Garrigues, P. (2004). Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong. *Continental Shelf Research* 24: 1969-1987.

LeBlanc, G. A. (2007). Crustacean endocrine toxicology: A review. *Ecotoxicology* 16(1): 61-81.

Lebrun, J.D., Perret, M., Uher, E., Tusseau-Vuillemin, MH., Gourlay-Francé, C. (2011). Waterborne nickel bioaccumulation in *Gammarus pulex*: Comparison of mechanistic models and influence of water cationic composition. *Aquatic Toxicology* 104: 161-167.

Lee, R.F. and Steinert, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 544(1): 43-64.

Lee, K. W., Hwang, D. S., Rhee, J. S., Ki, J. S., Park, H. G., Ryu, J. C., Raisuddin, S. and Lee, J. S. (2008). Molecular cloning, phylogenetic analysis and developmental expression of a vitellogenin (Vg) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 150(4): 395-402.

Leinio, S. and Lehtonen, K.K. (2005). Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology* 140: 408-421.

Leroy, D., Haubruge, E., De Pauw, E., Thomé, J.P. and Francis, F. (2010) Development of ecotoxicoproteomics on the freshwater amphipod *Gammarus pulex*: Identification of PCB

biomarkers in glycolysis and glutamate pathways. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(3): 343-352.

Lewis, C. and Galloway, T. (2008). Genotoxic damage in polychaetes: A study of species and cell-type sensitivities. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 654(1): 69-75.

Lewis, C. and Galloway, T. (2009). Reproductive consequences of paternal genotoxin exposure in marine invertebrates. *Environmental Science and Technology* 43(3): 928-933.

Liber K, Goodfellow W, den Besten P, Clements W, Galloway T, Gerhardt A, *et al.* (2007). *In situ*-based effects measures: considerations for improving methods and approaches. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3(2): 246-258.

Lopes C, Péry ARR, Chaumot A, Charles S (2005). Ecotoxicology and population dynamics: Using DEBtox models in a Leslie modeling approach, *Ecological Modelling*, vol. 188 pp.30-40.

Lye, C.M., Bentley, M.G., Clare, A.S. and Sefton, E.M. (2005). Endocrine disruption in the shore crab *Carcinus maenas* - a biomarker for benthic marine invertebrates? *Marine Ecology Progress Series* 288: 221-232.

Lye, C. M., Bentley, M. G. and Galloway, T. (2008). Effects of 4-nonylphenol on the endocrine system of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Environmental Toxicology* 23(3): 309-318.

Ma, H., Kim, S.D., Cha, D.K., Allen, H.E. (1999). Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (5): 828-837.

Ma, Y. X., Matsuda, K. and Uchiyama, M. (2005). Seasonal variations in plasma concentrations of sex steroid hormones and vitellogenin in wild male Japanese dace (*Tribolodon hakonensis*) collected from different sites of the Jinzu River basin. *Zoological Science* 22(8): 861-868.

Maltby, L. (1992). The use of the physiological energetics of *Gammarus pulex* to assess toxicity: A study using artificial streams. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 79-85.

Maltby, L., Clayton, S. A., Wood, R. M. and 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.

Manzo, L., Castoldi, A.F., Coccini, T. and Prockop, L.D. (2001). Assessing effects of neurotoxic pollutants by biochemical markers. *Environmental Research*, 85: 31-36.

Markey, C.M., Rubin, B.S., Soto, A.M. and Sonnenschein, C. (2003). Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *83*, 235-244.

Matthiessen, P. (2003). "Endocrine disruption in marine fish." *Pure. Appl. Chem.* 75: 2249-2261.

Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M. G., Ricciardi, F. and Blaise, C. (2008). Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environment International* 34(4): 531-545.

Mazurová, E., Hilscherová, K., Triebskorn, R., Köhler, H. R., Maršálek, B. and Bláha, L. (2008). Endocrine regulation of the reproduction in crustaceans: Identification of potential targets for toxicants and environmental contaminants. *Biologia* 63(2): 139-150.

McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R. M. and Yu, H. (2000). Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(8): 2085-2092.

Menezes S, Soares AMVM, Guilhermino L, R. Peck M (2006). Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: Temperature, salinity and handling stress effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 335(1): 114-122.

McKenney, C. L., Jr. (2005). The influence of insect juvenile hormone agonists on metamorphosis and reproduction in estuarine Crustaceans. *Integrative and Comparative Biology* 45(1): 97-105.

Morin, S., Duong, T.T., Dabrin, A., Coynel, A., Herlory, O., Baudrimont, M., Delmas, F., Durrieu, G., Schäfer, J., Winterton, P., Blanc, G. and Coste, M. (2008). Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France. *Environmental Pollution* 151(3): 532-542.

Mu, X. and LeBlanc, G. A. (2004). Synergistic interaction of endocrine-disrupting chemicals: Model development using an ecdysone receptor antagonist and a hormone synthesis inhibitor. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(4): 1085-1091.

Mubiana, V.K., Vercauteren, K., Blust, R. (2006). The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution* 144(1): 272-279.

Nagarajappa, Ganguly, A. and Goswami, U. (2006). DNA damage in male gonad cells of Green mussel (*Perna viridis*) upon exposure to tobacco products. *Ecotoxicology* 15(4): 365- 369.

Nahon, S., Charles, F. and Pruski, A.M. (2008). Improved comet assay for the assessment of UV genotoxicity in Mediterranean sea urchin eggs. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49(5): 351-359.

Nelson, C. M., Ihle, K. E., Fondrk, M. K., Page Jr, R. E. and Amdam, G. V. (2007). The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology* 5(3): 0673-0677.

Neufeld, D.S.G. (2010). Mercury accumulation in caged Corbicula: Rate of uptake and seasonal variation. *Environmental Monitoring and Assessment* 168(1-4): 385-396.

Neuparth, T., Correia, A. D., Costa, F. O., Lima, G. and Costa, M. H. (2005). Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: I. Biochemical endpoints. *Marine Environmental Research* 60(1): 69-91.

Newman, M.C. and Clements, W.H. (eds) (2008) Ecotoxicology: a comprehensive treatment, CRC Press.

Nikinmaa, M. and Rytkönen, K. T. (2011). Functional genomics in aquatic toxicology—Do not forget the function. *Aquatic Toxicology* 105 (3-4, Supplement): 16-24.

Owen, R., Buxton, L., Sarkis, S., Toaspern, M., Knap, A. and Delpedge, M. (2002). An evaluation of hemolymph cholinesterase activities in the tropical scallop, *Euvola (Pecten) ziczac*, for the rapid assessment of pesticide exposure. *Marine Pollution Bulletin* 44: 1010-1017.

Pascoe, D., Kedwards, T. J., Maund, S. J., Muthi, E. and Taylor, E. J. (1994). Laboratory and field evaluation of a behavioural bioassay - The *Gammarus pulex* (L.) precopula separation (GaPPS) test. *Water Research* 28(2): 369-372.

Pathiratne, A., Chandrasekera, L.W.H.U. and De Seram, P.K.C. (2008). Effects of biological and technical factors on brain and muscle cholinesterase in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Implications for biomonitoring neurotoxic contaminations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54: 309-317.

Payne, J.F., Melvin, W., Mathieu, A. and Fancey, L.L. (1994). Biomarkers of stress in urban rivers: mixed-function oxygenase and acetylcholinesterase effects in brown trout in rivers in St. John's, ewfoundland. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences, 1947*, 1-23.

Pellet, B., Geffard, O., Lacour, C., Kermoal, T., Gourlay-Francé, C., Tusseau-Vuillemin, M.H. (2009). A model predicting waterborne cadmium bioaccumulation in *Gammarus pulex*: the effects of dissolved organic ligands, calcium, and temperature. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(11): 2434-2442.

Peters, A., Lofts, S., Merrington, G., Brown, B., Stubblefield, W., Harlow, K. (2011). Development of biotic lignad models for chronic manganese toxicity to fish, invertebrates, and algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(11): 2407-2415.

Pfeifer, S., Schiedek, D. and Dippner, J. W. (2005). Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus sp* from the south-westem Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 320(1): 93-103.

Phillips, D.J.H. (1986). Quantitative aquatic biological indicators: their use to monitor trace metal and organochlorine pollution. Elsevier Applied Science, London.

Pockl , M. (1992). Effect 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.

Printes, L.B. and Callaghan, A. (2003). Intraclonal variability in *Daphnia* acetylcholinesterase activity: The implications for its applicability as a biomarker. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2042-2047.

Printes, L.B. and Callaghan, A. (2004). A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1241- 1247.

Pintes, L.B. and Callaghan, A. (2003). Intraclonal variability in *Daphnia* acetylcholinesterase activity: The implications for its applicability as a biomarker. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2042-2047.

Pruski, A.M., Nahon, S., Escande, M.L. and Charles, F. (2009) Ultraviolet radiation induces structural and chromatin damage in Mediterranean sea-urchin spermatozoa. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 673(1): 67-73.

Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J. and Mothersill, C. (2004). The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology* 66(3): 279-292.

Radenac, G., Bocquene, G., Fichet, D. and Miramand, P. (1998). Contamination of a dredged-material disposal site (La Rochelle Bay, France). The use of the acetylcholinesterase activity of *Mytilus edulis* (L.) as a biomarker of pesticides: the need for a critical approach. *Biomarkers* 3: 305-315.

Rainbow, P.S. (2002). Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: Why and so what? *Environmental Pollution* 120(3): 497-507.

Reynders, H., Bervoets, L., Gelders, M., De Coen, W.M., Blust, R. (2008). Accumulation and effects of metals in caged carp and resident roach along a metal pollution gradient. *Science of the Total Environment* 391(1): 82-95.

Ricciardi, F., Matozzo, V., Binelli, A. and Marin, M. G. (2010). Biomarker responses and contamination levels in crabs (Carcinus aestuarii) from the Lagoon of Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments. *Water Research* 44(6): 1725-1736.

Robillard, S., Beauchamp, G. and Laulier, M. (2003). The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology* 135: 49-59.

Roman, Y. E., De Schamphelaere, K. A. C., Nguyen, L. T. H. and Janssen, C. R. (2007). Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: Sensitivity comparison and preliminary risk assessment. *Science of the Total Environment* 387(1-3): 128-140.

Rono, M. K., Whitten, M. M. A., Oulad-Abdelghani, M., Levashina, E. A. and Marois, E. (2010). The major yolk protein vitellogenin interferes with the anti-plasmodium response in the malaria mosquito *anopheles gambiae*. *PLoS Biology* 8(7).

Rose, W.L., Nisbet, R.M., Green, P.G., Norris, S., Fan, T., Smith, E.H., Cherr, G.N. and Anderson, S.L. (2006) Using an integrated approach to link biomarker responses and physiological stress to growth impairment of cadmium-exposed larval topsmelt. *Aquatic Toxicology* 80(3): 298-308.

Sagi, A., Khalaila, I., Abdu, U., Shoukrun, R. and Weil, S. (1999). A newly established ELISA showing the effect of the androgenic gland on secondary-vitellogenic-specific protein in the hemolymph of the crayfish Cherax quadricarinatus. *General and Comparative Endocrinology* 115(1): 37-45.

Sanders, M. B., Billinghurst, Z., Depledge, M. H. and Clare, A. S. (2005). Larval development and vitellin-like protein expression in *Palaemon elegans* larvae following xeno-oestrogen exposure. *Integrative and Comparative Biology* 45(1): 51-60.

Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebskorn, R. and 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: 53-61.

Seehuus, S. C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T. and Amdam, G. V. (2006). Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 103(4): 962-967.

Shechter, A., Aflalo, E.D., Davis, C. and Sagi, A. (2005). Expression of the reproductive female-specific vitellogenin gene in endocrinologically induced male and intersex *Cherax quadricarinatus* crayfish. *Biology of Reproduction* 73: 72-79.

Sheehan D, Power A (1999). Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 123(3): 193-199.

Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebskorn, R. and 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: 53-61.

Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwichowski, K. U., Nagel, R., Kohler, H. R. and Triebskorn, R. (2006). Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicology* **15**(2): 143-156.

Shi, X., Zhang, S. and Pang, Q. (2006). Vitellogenin is a novel player in defense reactions. *Fish and Shellfish Immunology* 20(5): 769-772.

Schoor, P. and Brausch, J. (1980). The inhibition of acetylcholinesterase activity in pink shrimp (*Penaeus duorarum*) by methyl parathion and its oxon. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 9*, 599-605.

Soetaert, A., Moens, L. N., Van Der Ven, K., Van Leemput, K., Naudts, B., Blust, R. and De Coen, W. M. (2006). Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 142(1-2): 66-76.

Solé, M., Barceló, D. and Porte, C. (2002). Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants. *Aquatic Toxicology* 60(3-4): 233-248.

Solé, M., Garcia-de la Parra, L.M., Alejandre-Grimaldo, S. and Sarda, F. (2006). Esterase activities and lipid peroxidation levels in offshore commercial species of the NW Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* 52: 1708-1716.

Stamler, C.J., Basu, N. and Chan, H.M. (2005). Biochemical markers of neurotoxicity in wildlife and human populations: considerations for method development. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 68: 1413-1429.

Tilghman, A., Garric, J., Coquery, M. (2009) La mesure des contaminants dans le biote : avantages et inconvénients pour la surveillance chimique du milieu continental, Cemagref.

Tokishita, S., Kato, Y., Kobayashi, T., Nakamura, S., Ohta, T. and Yamagata, H. (2006). Organization and repression by juvenile hormone of a vitellogenin gene cluster in the crustacean, *Daphnia magna*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345(1): 362-370.

Tran, D., Moody, A.J., Fisher, A.S., Foulkes, M.E. and Jha, A.N. (2007). Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. *Aquatic Toxicology* 84(1): 11-18.

Trisyono, A., Puttler, B. and Chippendale, G. M. (2000). Effect of the ecdysone agonists, methoxyfenozide and tebufenozide, on the lady beetle, *Coleomegilla maculata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 94(1): 103-105.

van Straalen NM, van Gestel CAM (2008). A stress ecology framework for comprehensive risk assessment of diffuse pollution. *Science of the Total Environment* 406(3): 479-483.

Verslycke, T., Ghekiere, A., Raimondo, S. and Janssen, C. (2007). Mysid crustaceans as standard models for the screening and testing of endocrine-disrupting chemicals. *Ecotoxicology* 16(1): 205-219.

Viarengo A, Dondero F, Pampanin DM, Fabbri R, Poggi E, Malizia M, *et al.* (2007). A biomonitoring study assessing the residual biological effects of pollution caused by the HAVEN wreck on marine organisms in the Ligurian sea (Italy). *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology* 53(4): 607-616.

Volz, D. C. and Chandler, G. T. (2004). An enzyme-linked immunosorbent assay for lipovitellin quantification in copepods: A screening tool for endocrine toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(2): 298-305.

Wang, H. Y., Olmstead, A. W., Li, H. and LeBlanc, G. A. (2005). The screening of chemicals for juvenoid-related endocrine activity using the water flea *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 74(3): 193-204.

Watts, M. M., Pascoe, D. and 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. and Carroll, K. (2002). Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17α-ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(2): 445-450.

Wright, D.A. and Frain, J.W. (1981). The effects of calcium on cadmium toxicity in the freshwater amphipod, *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 10: 321-328.

Zapata-Perez, O., Del-Rio, M., Dominguez, J., Chan, R., Ceja, V. and Gold-Bouchot, G. (2005). Preliminary studies of biochemical changes (ethoxycoumarin O-deethylase activities and vitellogenin induction) in two species of shrimp (*Farfantepenaeus duorarum* and *Litopenaeus setiferus*) from the Gulf of Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61: 98-104.

Zhang, S., Sun, Y., Pang, Q. and Shi, X. (2005). Hemagglutinating and antibacterial activities of vitellogenin. *Fish and Shellfish Immunology* 19(1): 93-95.

Zhang, S., Wang, S., Li, H. and Li, L. (2011). Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 43(3): 303-305.

Živić, I. and Marković, 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.

# 8 Curriculum Vitae

**Olivier Geffard**
Adresse professionnelle :
Irstea,
Laboratoire d'écoxicologie,
UR MALY,
5 rue de la Doua
69626, Villeurbanne
France

Tel : 04 72 20 87 85
E-mail : olivier.geffard@irstea.fr

## Chargé de Recherche en Ecotoxicologie

### EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

Depuis 2012 **Animateur de l'équipe de recherche en écotoxicologie** Irstea Lyon

- L'équipe est composée de 6 chercheurs et 6 personnels techniques. Les travaux de l'équipe se concentrent sur l'étude et la compréhension du transfert et de l'impact des polluants sur les invertébrés d'eau douce, dans le but de mieux en prédire le risque écotoxicologique des milieux. Ces travaux s'articulent autour de plusieurs axes thématiques, comme l'étude et la modélisation des contaminants, l'expérimentation *in situ* via l'encagement d'organismes, le développement de marqueurs sub-individuels et individuels, la compréhension et formalisation de leur variabilité naturelle dans les milieux, ainsi que le changement d'échelle du niveau sub-individuel à celui de la population.
- En plus d'une activité propre de recherche, mon rôle consiste à assurer l'animation scientifique de l'équipe, le montage et la gestion de projets, la gestion technique de l'équipe.
- Je porte également un projet de transfert d'outils écotoxicologiques sur le gammare, *Gammarus fossrum*, via la création d'une startup Bi*o*MA-monitoring.

2003/2012 **Chargé de recherche en écotoxicologie**

- Mes travaux ont contribué à étudier et comprendre la biodisponibilité et la toxicité des contaminants dans les milieux aquatiques, *via* l'utilisation d'une espèce modèle *Gammarus fossarum*. Ceci passe par la mise en place de collaborations dans le but de développer, adapter et évaluer l'intérêt des nouvelles approches en toxicologie moléculaire (protéomique et génomique) pour l'écotoxicologie aquatique.
- Encadrement de personnes (doctorants, post-doctorants et stagiaires).
- Développement de collaborations avec les partenaires publics (Université de Lyon 1, de Reims, de Dijon, de Montpellier, d'Aix en Provence, de Bordeaux, du Havre, le CEA de Marcoule, INRA-ENTPE de Lyon), les gestionnaires des milieux aquatiques (ONEMA, Agence de l'eau Artois Picardie et Rhône-Méditerranée-Corse) et des laboratoires de recherche industriels (Veolia, Suez-environnement).

- Animation et participation à des projets de recherche sur financement académique (ANR, INSU, Anses) et à but finalisé avec les acteurs de la gestion de l'eau (ONEMA, Agences de l'Eau).

## COMPETENCES

**Recherche scientifique**

- Toxicologie, biochimie et ecophysiologie des crustacés, expérimentation *in situ* et contamination des organismes.
- Conduite de projets de recherche pluridisciplinaires, fondamentaux et finalisés.
- Démarche de valorisation et transfert des outils issus de la recherche vers le secteur privé.
- Collaborations avec des partenaires académiques, industriels et des acteurs de la gestion de l'environnement.
- Evaluation de projets scientifiques nationaux (INSU, Anses).

**Management**

- Animation d'une équipe de recherche pluridisciplinaire en écotoxicologie (entre 12 et 20 personnes : 6 chercheurs, 3 ingénieurs, 2 Assistant Ingénieurs et 1 technicien, 2 post-docs, 3 doctorants et stagiaires).
- Co-encadrements de 3 thèses depuis 2005 et de 2 post-docs depuis 2006. Encadrements et co-encadrements de 7 stagiaires de 3$^{ème}$ cycle depuis 2003.

## FORMATION

**1998/2001**

Thèse de doctorat, spécialité : Ecotoxicologie à l'université Bordeaux 1. Thèse réalisée sous la direction de Mr Edouard His, Directeur de Recherche à IFREMER Arcachon. L'intitulé de la thèse : « Toxicité Potentielle des Sédiments Marins et Estuariens Contaminés : Evaluation Chimique et Biologique, Biodisponibilité des Contaminants Sédimentaires ». Mention très honorable.

**1997**

DEA « Toxicologie de l'Environnement », Centre des Sciences de l'Environnement, Université de Metz. Mention bien

**1996**

Maîtrise « Biologie des Populations et des Ecosystèmes, mention Environnement », Université de La Rochelle. Mention assez-bien

## ENCADREMENTS ET ENSEIGNEMENTS

**Thèses**

Benoit Xuereb (50%) 2009. Développement de marqueurs de neurotoxicité et de perturbations endocrines chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. Université de Metz.

Emilie Lacaze (50%) 2011. Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gamamrus fossarum* : développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel. Université de Metz.

Guillaume Jubeaux (50%) 2012. Développement, généralisation et validation de la mesure de la vitellogénine comme biomarqueur chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*. Université Lyon1.

Laëtitia Charron (25%) 2013. Biomarqueurs énergétiques chez un amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum* : développement, lien avec le succès reproducteur et application *in situ*. Université de Reims.

Sondes Abidi (50%) 2013, thèse en co-tutelle France-Tunisie. Le gammare, une espèce sentinelle de la qualité des milieux dulçaquicoles : développement et proposition d'indicateurs pertinents et utilisables à large échelle, Université Lyon1 – Faculté des sciences de Bizerte.

Judith Trapp (50%) 2014. Séquençage, caractérisation et quantification absolue de protéines d'intérêt chez les invertébrés d'eau douce : nouvelle approche pour le développement de biomarqueurs. Université Lyon 1.

Amandine Vigneron (20%) 2014. Adaptation à la contamination : modifications des sensibilités toxicologiques, modifications des histoires de vie. Université Lyon 1.

Nastasia Urien (50%) 2015. Variabilité environnementale de l'accumulation des métaux par les gammares indicateurs de la contamination biodisponible des milieux aquatiques. Université Lyon 1.

**Post-doc**

Vincent Felten (100%) 2007. Développement des marqueurs comportementaux et physiologiques chez *Gammarus fossarum*.

Olivier Adam (50%) 2010. Plasticité naturelle ou perturbation toxique de la reproduction chez *Gammarus fossarum* ? Evaluation de la variabilité pour le développement de tests *in situ* et l'extrapolation populationnelle.

**Enseignement**

13h d'enseignement par an : formations en écotoxicologie aquatique et méthodes d'évaluation des risques dans des cursus de 3$^{ème}$ cycle : Master 2 BEEB de l'université Lyon 1, Master 2 SAGE de Pont Paris Tech et Licence pro, département de chimie de l'IUT Lyon 1.

## PROJETS DE RECHERCHE

**Porteur**

- PP1 - INSU, programme ECCO-ECODYN, 2005. Etude de l'impact des contaminants sur les écosystèmes d'eau courante : développement d'une approche intégrée à différents niveaux d'organisation biologique sur une espèce cible, *Gammarus pulex*.
- PP2 - PNRPE, 2008. La vitellogénine comme biomarqueur d'exposition et d'effet aux perturbateurs endocriniens chez *Gammarus fossarum* et *Eurytemora affinis*.
- PP3 - ANR-CESA, 2012. Variabilité – adaptation – diversité et Ecotoxicologie des gammaridés.

**En collaboration**

*Financements académiques* :

- PC1 - PNETOX, 2004, Criqualadim. CRItères de QUAlité pour les eaux de surface : métaux Labiles, Dissous, ou associés aux matières en suspension ? (porté par MH. Tusseau-Vuillemin, Cemagref).

- PC2 - PNETOX, 2004, EMMCC. Effets des Mélanges sur la base de Concentrations Cytosoliques (porté par A. Pery, Cemagref).
- PC3 - PNRPE, 2005, SURVAQUA. Evaluation de l'impact des perturbateurs endocriniens sur les milieux aquatiques. (porté par J.M. Porcher, INERIS).
- PC4 - ANR-CES, 2008, Resyst. REcupération d'un SYSTème fluvial pollué par les métaux (Cd, Zn) après remédiation d'un site industriel (porté par A. Feurtet-Mazel, Université Bordeaux 1).
- PC5 - ANR-Ecotech, 2010, Echibioteb. Outils innovants d'échantillonnage, d'analyse chimique et biologique pour le suivi de traitements avancés d'eaux usées et de boues (porté par C. Miège, Irstea Lyon).
- PC6 - Anses, 2010, Psycheau. Les médicaments psychotropes en milieu aquatique. Quels effets sur les écosystèmes aquatiques ? Quelles implications au niveau sociétal ? (porté F. Geret, Université d'Albi).
- PC7 - Anses, 2010, Tronano. Etude du transfert trophique de nanomatériaux et des conséquences sur les organismes aquatiques d'eau douce (porté par J. Garric, Irstea Lyon).

*Financements acteurs de l'eau publics* :

- PC8 - ONEMA, 2009, action 25. Effets des substances chimiques sur les organismes aquatiques : sous-action « batterie d'indicateurs invertébrés transplantés » (porté par J. Garric, Irstea Lyon).
- PC9 - ONEMA, 2010, action 25. Effets des substances chimiques sur les organismes aquatiques : sous-action « batterie d'indicateurs invertébrés transplantés » (porté par J. Garric, Irstea Lyon).
- PC10 - ONEMA, 2012, action 45. Effets des substances chimiques sur les organismes aquatiques : sous-action « batterie d'indicateurs invertébrés transplantés, modélisation » (porté par A. Chaumot, Irstea Lyon).
- PC11 - ONEMA, 2012, action 20. Surveillance des substances prioritaires dans le biote : développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des milieux (porté par M. Coquery, Irstea Lyon).
- PC12 - ONEMA, 2013 - 2015, action 36. Surveillance des substances prioritaires dans le biote : développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des milieux (porté par M. Coquery, Irstea Lyon).
- PC13 - Plan Ecophyto 2018, ONEMA, 2012 – 2014. Développement d'outils et d'indicateurs pour mieux évaluer et gérer la chaîne pressions-impacts des pesticides sur l'eau de surface (porté par V. Gouy, Irstea Lyon).
- PC14 - Agence de l'eau RM&C, 2006. Développement d'outils pour l'évaluation de l'impact de perturbateurs endocriniens issus de stations d'épuration sur les milieux aquatiques (porté J. Garric, Irstea, Lyon).
- PC15 - Agence de l'Eau Seine-Normandie, 2012 – 2014. Biomarq'Indic : Complémentarité des biomarqueurs et bioindicateurs pour évaluer l'état écologique des cours d'eau (Porté par D. Pont et J. Lebrun, Irstea Antony).

*Financements acteurs de l'eau privés* :

- PC16 – EDF 2001 – 2003. Etude de la contamination et des effets de sédiments de retenue (Porté par J. Garric, Irstea Lyon).
- PC17 – Veolia, 2012 – 2013. Evaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques (Porté par J. Garric, Irstea Lyon).

## PRODUCTION SCIENTIFIQUE

**Articles dans des revues internationales à comité de lecture**

A1. His E, H Budzinski, O Geffard, R Beiras. 1997. Action d'un sédiment pollué par les hydrocarbures sur la métamorphose de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *C R Acad Sci Paris* 320:797-803.

A2. Bougrier S, B Collet, P Geairon, O Geffard, M Héral, JM Deslous-Paoli. 1998. Respiratory time activity of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J Exp Mar Biol Ecol* 219:205-216.

A3. His E, I Heyvang, O Geffard, X de Montaudouin. 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Wat Res* 33:1706-1718.

A4. Geffard O, H Budzinski, S Augagneur, MNL Seaman, E His. 2001. Assessment of sediment contamination by spermiotoxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). *Environ Toxicol Chem* 20(7) 1605-1611.

A5. Geffard O, His E, Budzinski H, Seaman M, Garrigues P. 2001. Qualité biologique de l'eau de mer évaluée *in situ* par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus gallorpovincialis*. *C R Acad Sci Paris* 324:1149-1155.

A6. Geffard O, Budzinski H, His E, Seaman M.N.L, Garrigues P. 2002. Relationships between contaminant levels in marine sediments and their biological effects on embryos of oysters, *Crassostrea gigas*. *Environ Toxicol Chem* 21(11):2310-2318.

A7. Geffard O, Budzinski H, His E. 2002. The effects of elutriates from PAH and Heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology* 11:403-416.

A8. Geffard A, Geffard O, Amiard-Triquet C, His E, Aimard JC. 2002. Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Mar. Ecol. Prog. Ser* 233:131-142.

A9. Geffard O, Geffard A, His E, Budzinski H. 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Mar Pollut Bull* 46(4):481-490.

A10. Geffard O, Budzinski H, His E. 2004. The effects of decanted sediments on embryogenesis in oysters, *Crassostrea gigas*. *Environ Toxicol Chem* 23(7) :1655-1661.

A11. Geffard O, His E, Budzinski H, Chiffoleau, Coynel A, Etcheber H. 2004. Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of oysters *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution* 129:457-465.

A12. Geffard O, Budzinski H, LeMenach K. 2004. Chemical and ecotoxicological characterization of the "*Erika*" petroleum : Bio-tests applied to petroleum water-accommodated fractions and natural contaminated samples. *Aquat Living Resour* 17:289-296.

A13. Geffard O, Geffard A, Budzinski H, Crouzet C, Menasria R, et Amiard-Triquet C. 2005. Mobility and potential toxicity of sediment-bound metals in a tidal estuary. *Environmental Toxicology*, 20(4):407-417.

A14. Rocher B, Le Goff J, Peluhet L, Briand M, Manduzio M, Gallois J, Devier MH, Geffard O, Gricourt L, Augagneur S, Budzinski H, Pottier D, André V, Lebailly P, Cachot J. 2006. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically

exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquatic Toxicology*. 79(1):65-77.

A15. Cachot J, Geffard O, Augagneur S, Lacroix S, Le Menach K, Peluhet L, Couteau J, Denier X, Devier MH, Pottier D, Budzinski H. 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology*. 79(3):257-267.

A16. Noury P, Geffard O, Tutundjian R, Garric J. 2006. Non destructive *in vivo* measurement of ethoxyresorufin biotransformation by zebrafish prolarva: Development and application. Environmental Toxicology. 21(4):324-331.

A17. Fraysse B, Geffard O, Berthet B, Quéau H, Biagianti-Risbourg S, Geffard A. 2006. Importance of metallothioneins in the cadmium detoxification process in *Daphnia magna*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 144(3):286-293.

A18. Geffard A, Geffard O, Amiard J-C, His H, Amiard-Triquet C. 2007. Bioaccumulation of metals in sediments elutriates and their effects on growth condition index and metallothionein contents in oyster larvae. Archive Environmental Contamination and Chemistry, 53: 57-65.

A19. Geffard A, Quéau H, Dedourge O, Biagianti-Risboug S, Geffard O. 2007. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol, 145 :632-640.

A20. Xuereb B, Noury P, Felten V, Garric J, Geffard O. 2007. Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos. Toxicology, 236 (178-189).

A21. Felten V, Charmantier G, Charmantier-Daures M, Aujoulat F, Garric J, Geffard O. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* exposed to acid stress. 2008 Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 147 (2):189-197.

A22. Geffard O. Geffard A., Chaumot A., Alvarez C., Vollat B., Tusseau-VuilleminJ. MH., Garric. 2008. Effects of chronic dietary and water-borne Cd exposures on contamination level and reproduction of *Daphnia Magna*. *Environ Toxicol Chem*, 27(5) :1128-1134.

A23. Gagnaire B, Geffard O, Xuereb B, Margoum C and Garric J. 2008. Cholinesterase activities as potential biomarkers : characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774). Chemosphere, 71(3):553-560

A24. Roulier JL, Tusseau-Vuillemin MH, Coquery M, Geffard O and Garric J. 2008. Measurement of dynamic mobilization of trace metals in sediments using DGT and comparison with bioaccumulation in Chironomus riparius: First results of an experimental study. Chemosphere, 70(5) : 925-932.

A25. Felten V, Charmantier G, Charmantier-Daures M, Aujoulat F, Mons R, Geffard A, Rouselle P, Garric J, Geffard O. 2008. Physiological and behavioral responses of *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda) exposed to Cadmium. Aquatic Toxicology. 86, 413-425.

A26. Billoir E, Delignette-Muller ML, Pery A, Geffard O, Charles S. 2008. Statistical cautions when estimating DEBtox parameters. *Journal of Theoretical Biology*. 254 (1), 55-64.

A27. 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. Aquatic Toxicology, 93: 225-233.

A28. Xuereb B, Lefèvre E, Garric J, Geffard O. 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. Aquatic Toxicology, 94: 114-122.

A29. Chaumot A., Gos P., Garric J. 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: 294-299.

A30. Pellet B.J., Geffard O., Lacour C., Kermoal T., Gourlay-Francé C., Tusseau-Vuillemin MH. 2009. A model predicting waterborne cadmium bioaccumulation in *Gammarus pulex*: The effects of dissolved organic ligands, calcium and temperature. Environmental Toxicology and Chemistry. 28(11): 2434-2442.

A31. 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 11:1569-1576.

A32. Gagnaire B, Geffard O, Noury P, Garric J. 2010. *In vivo* Indirect Measurement of Cytochromr P450-Associated Activities in Freshwater Gasteropod Molluscs. Environmental. 25 (6):545-553

A33. Geffard A., Sartelet H., Garric J., Biagianti-Risbourg S., Delahaut L., Geffard O. 2010. Subcellular compartmentalization of cadmium, nickel, and lead in *Gammarus fossarum*: Comparison of methods. Chemosphere. 78(7): 822-829.

A34. 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 (10): 2249-2259.

A35. Lacaze E., Geffard O., Bony S., Devaux A. 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 700 (1-2): 32-38.

A36. Simon R., Jubeaux G., Chaumot A., Lemoine J., Geffard O., Salvador A. 2010. Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*). Journal of Chromatography A, 1217 (31): 5109-5115.

A37. Issartel, J., Boulo, V., Wallon, S., Geffard, O., Charmantier, G. 2010. Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). Chemosphere, 81:701-710.

A38. Gust M., Buronfosse T., Geffard O., Mons R., Queau H., Mouthon J., Garric. J. 2010. In situ biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) exposed to waste water treatment plant (WWTP) effluent discharges. *Water Research*, 44 (15): 4517-4528.

A39. Gust M., Buronfosse T., Geffard O., CoqueryM., Mons R., Abbaci K., Giamberini L., Garric J.2011. Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). Aquatic Toxicology, 101 (1):100 - 108.

A40. Lacaze E., Geffard O., Goyet D., Bony S., Devaux A. 2011. Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. Environmental Research. 111(5): 626-634.

A41. 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.

A42. Lacaze E. Devaux A., Jubeaux G., Mons R., Gardette M., Bony S., Garric J., Geffard O. 2011. DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure : intrinsic variability and reference level. Science of the Total Environment, 409 (17): 3230-3236.

A43. Xuereb B., Bezin L., Chaumot A., Budzinski H., Augagneur S., Tutundjian R., Garric J., Geffard O. 2011. Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization in females and potential for use of use as an endocrine disruption biomarker in males. Ecotoxicology. 20(6): 1286-1299.

A44. 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 Research. 45(19):6417-6429.

A45. Artigas J., Arts G., Babut M., Caracciolo A., Charles S., Chaumot A., Combourieu B., Dahllöf A., Despréaux D., Ferrari B., Friberg N., Garric J., Geffard O., Gourlay-Francé C., Hein M., Hjorth M., Krauss M., De Lange H., Lahr J., Lehtonen K.K., Lettieri T., Liess M., Lofts S., Mayer P., Morin S., Paschke A., Svendsen C., Usseglio-Polatera P., van den Brink N., Vindimian E., Williams R. 2012. Towards a renewed research agenda in ecotoxicology. Environmental Pollution. 201-206.

A46. Jubeaux G., Simon R., Salvador A., Quéau H., Chaumot A., Geffard O. 2012. Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) : Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. Aquatic Toxicology. 112-113: 72-82

A47. 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.

A48. Dabrin, A., Durand, C.L., Garric, J., Geffard, O., Ferrari, B.J.D., Coquery, M. 2012. Coupling geochemical and biological approaches to assess the availability of cadmium in freshwater sediment. Science of Total Environment. 424: 308-315

A49. Besse, J.P., Geffard, O., Coquery, M. 2012. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. Trends in Analytical Chemistry, 36:113-127.

A50. Jubeaux, G., Audouard-Combe, F., Simon, R., Tutundjian, R., Salvador, A., Geffard, O., Chaumot, A. 2012. Vitellogenin-like protein among invertebrate species diversity : potentiel of proteomic mass spectrometry (LC-MS/MS) for biomarker development. Environmental Science & Technology, 46 : 6315-6323.

A51. Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Lopes, C., Lacaze, E., Quéau, H., Chaumot, A., Geffard, O. 2012. Vitellogenin-like protein measurement in caged *Gammarus fossarum* males as a biomarker of endocrine disruptor exposure: inconclusive experience. Aquatic Toxicology, 122-123 : 9-18.

A52. 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.

A53. Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Budzinski, H., Morin, B. 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Marine Pollution Bulletin. 64 : 2663-2670.

A54. 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, in press.

A55. 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

**Contributions à des ouvrages**

O1. Burgeot T, Bocquené G, His E, Vincent F, Geffard O, Beiras R, Quiniou F, Goraguer H, Galgani F. 2001. Procedures for Cholinesterase Determination in Fish and Mussel. In : Biomarker in Marine Organisms : A pratical Approach. Edited by Ph Garrigues, H Barth, CH Walker and JF Narbonne. 487-489.

O2. Burgeot T, Bocquené G, His E, Vincent F, Geffard O, Beiras R, Goraguer H, Galgani F. 2001. Monitoring of biological effects of pollutants: Filed application. In : Biomarker in Marine Organisms : A pratical Approach. Edited by Ph Garrigues, H Barth, CH Walker and JF Narbonne. 179-213.

O3. Amiard, J.C., Chaumot, A., Couderc, M., Garric, J., Geffard, O., Xuereb, B. 2012. Impairments of endocrine functions: causes and consequences. *Ecological biomarkers : Indicators of ecotoxicological effects, Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S.,* CRC Press, p. 187 – 218.

O4. Garric, J., Geffard. O., Schmidt-Lainé, C., Chocat B. 2011. Des sentinelles pour nos rivières. *Rhône Alpes et l' Environnement 100 Questions pour la Recherche, Clusters de Recherche Rhône Alpes Environnement, Region Rhône Alpes, p. 122 - 123*

O5. Chaumot, A., Ferrari, B., Garric, J., Geffard, O. in press. Ecotoxicology, Aquatic invertebrates. *Encyclopedia of Toxicology, 3rd Edition. Wexler, P., Greim, H., Moser, V., Wiegand,T.J., Tarazona Lafarge, J.V., de Peyster, A., Harper, S., Abdollahi, M., Cox Gad, S., Ray, S.D.* , Elsevier, New York, USA.

O6. Ferrari, B.J.D., Geffard, O., Chaumot, A. in press. *In situ* aquatic bioassays. In: Encyclopedia of aquatic ecotoxicology, Férard J-F & Blaise C. (Eds), Springer publishers.

# 9 Principales publications.