



N° ordre NNT : 2023LYO10212

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

**Ecole Doctorale N° 341
Evolution, Ecosystème, Microbiologie, Modélisation**

Spécialité de doctorat : Ecologie des communautés, fonctionnement des écosystèmes, écotoxicologie

Discipline : Ecotoxicologie évolutive

Soutenue publiquement le 10/11/2023, par :

Auréline Lalouette

Place de la plasticité dans la variabilité de la sensibilité toxicologique et des traits d'histoire de vie des populations de *Gammarus fossarum* exposées à la contamination chronique des cours d'eau par le cadmium

Devant le jury composé de :

GEFFARD, Alain
PELOSI, Céline
DE VAUFLEURY, Annette
DEVIN, Simon
PLENET, Sandrine
CHAUMOT, Arnaud
DEGLI ESPOSTI, Davide

Professeur des Universités
Directrice de Recherche
Maître de Conférences
Professeur des Universités
Maître de Conférences
Directeur de Recherche
Chargé de Recherche

Université de Reims
INRAE Avignon
Université de Franche-Comté
Université de Lorraine
Université Lyon 1
INRAE Lyon-Villeurbanne
INRAE Lyon-Villeurbanne

Rapporteur
Rapporteuse
Examinatrice
Examinateur
Examinatrice
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse

Remerciements

Merci. Je ne crois pas qu'il existe un mot plus sincère que celui-ci pour vous exprimer à toutes et tous ma reconnaissance. Je commencerais alors cette partie en exprimant **un grand merci** à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail de thèse.

Je vous voir venir, vous qui vous reconnaissez, en vous disant « ça y ait, encore des remerciements à rallonge ». Et bien vous avez raison. Pour être honnête, une page ne suffirait pas à tous vous remercier et pour vous exprimer à quel point je suis reconnaissante et heureuse d'avoir fait ce petit bout de chemin à vos côtés (presque 4 ans tout de même !). Lorsque j'ai rejoint le laboratoire écotox de Lyon, je ne pensais pas que ce jour arriverait aussi vite et c'est avec un grand pincement au cœur que j'écris ces remerciements tout en sachant qu'ils sont également là pour vous dire au revoir (mais pas adieu !).

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de thèse **Arnaud Chaumot**, sans qui toute cette aventure n'aurait été possible. Merci à toi de m'avoir fait confiance deux fois, lors de mon stage de master 2 et pour la thèse. Merci de m'avoir fait découvrir ces mignonnes et si intéressantes petites crevettes que sont les gammares, mais également, merci de m'avoir transmis ton savoir et ta passion pour la recherche et l'écotoxicologie. Merci d'avoir toujours été disponible, pour ton soutien et pour avoir su me guider, me rassurer et me conseiller lorsque j'en avais besoin. Merci également de m'avoir si souvent dit « ça va aller » ou « moi je ne m'inquiète pas pour toi », me redonnant ainsi le sourire et confiance en moi. Merci pour ces moments partagés au cours de ces quatre années, que ce soit au cours des différentes pêches, des lancements de manip, durant les conférences ou au cours de moult discussions... Un grand merci pour tout. J'aimerais également remercier mon deuxième directeur de thèse, **Davide Degli Esposti**. Merci à toi d'avoir accepté de codiriger cette thèse, de m'avoir ouvert le monde de la biologie moléculaire et d'avoir partagé avec moi ta passion et tes connaissances. Je te remercie également pour ton soutien, ta patience, tes nombreuses explications pour que j'y voie plus clair, mais également pour ta gentillesse. Merci d'avoir partagé ton expérience avec moi ainsi que tes conseils, merci pour ton soutien et de m'avoir redonné confiance lorsque j'en avais besoin. J'aimerais également remercier **Laura Garnero** qui m'a été d'un énorme soutien tout au long de ces quatre années. Laura, merci pour ton aide et d'avoir toujours répondu présente lors de tous les lancements de manip et les pêches que j'ai eu à faire. Je me souviendrais toujours des moments passés ensemble (ça va me manquer crois moi !), que ce soit au cours des pêches, lors de nos innombrables discussions, ou encore lorsque l'on s'occupait de nos petits gammares. Merci pour tous nos fous rires et tous nos bavardages. Je n'oublierais pas non plus tous les drôles de souvenirs que l'on a ensemble : aux Ardillats alors qu'il

avait neigé et que l'on n'arrivait plus à remonter la pente, lorsque l'on est tombé en panne de batterie au Séran, lorsque l'on manquait de se faire embarquer par le courant, ou encore lorsque l'on a manqué de finir dans un ravin à Baculy (et qu'il a fallu jouer de ruse pour pouvoir repartir). Merci d'avoir toujours été présente, pour ton soutien et pour ta bienveillance, merci pour tout. Merci à **Nicolas Delorme** (je ne ferais pas la blague haha), notamment pour toutes les dissections réalisées, je suis sûre que tu es devenu un pro de la dissection branchies, caeca grâce à moi ! Merci de ton aide pour les pêches, les manips, les rigolades et les bons gâteaux. Merci de m'avoir fait découvrir le Beaujolais lors de nos sorties terrain (et son vin !). Petite pensée tout de même à la fois où tu as manqué de rester coincer à la cascade de Cerveyrieu. Merci également à toi **Rémi Recoura Massaquant**. Merci pour ton aide lors des manips, merci de m'avoir accompagné plus d'une fois sur le terrain, merci pour tous les bons moments et les fous rires que l'on a pu avoir ensemble (et il y en a plus d'un !). On se souviendra de notre repas sandwich se transformant en un super repas de restaurant durant le covid lorsque l'on a été pêché à Baculy ou encore des attaques de moustiques au Séran ! Merci à **Olivier Geffard**. Merci de m'avoir fait regarder mes résultats plus d'une fois sous un autre angle et de m'avoir incité à toujours aller voir plus loin. Merci également pour tous tes conseils avisés, pour ta bonne humeur et ta gentillesse. Merci à **Hervé Quéau** pour toutes tes blagues, pour tes conseils et ton aide. Merci **Anabelle Espeyte** de m'avoir accueilli au laboratoire, merci pour ton aide, pour nos discussions et pour tous les bons moments passés ensemble. Merci également à toutes les autres personnes du laboratoire écotox avec qui j'ai passé de très bons moments : **Patrice Noury** (je te souhaite de bien profiter de ta retraite !), **Carmen Gonzalez-Fernandez** (je suis heureuse d'avoir pu faire ta connaissance et d'avoir passé ces quelques mois avec toi, bon courage pour la suite !), **Khédidja Abbaci** et **Renaud Tutundjian**. À vous tous du laboratoire écotox, je vous remercie de votre accueil, de votre bonne humeur quotidienne, pour les apéros du vendredi (et même en semaine !) et les repas de Noël. Je vous remercie pour votre bienveillance et de votre soutien dans ces travaux de thèse. C'est avec les larmes aux yeux et une grande tristesse que je vous dis au revoir et que je vous souhaite le meilleur pour les années à venir. Vous allez grandement me manquer !

Merci également à toute la bande, variable au cours du temps, que l'on a été au cours de ces années. Merci pour ces moments de rigolade, pour les discussions, pour nos sorties, nos apéros et nos soirées. **George Ruck**, mon collègue de thèse et de bureau, je suis vraiment reconnaissante que l'on soit arrivé en même temps et d'avoir pu passer ces trois années de thèse avec toi, je n'aurais pu rêver meilleur acolyte. Merci pour ton aide avec l'anglais, pour nos discussions, merci de m'avoir fait tant rire, mais également, merci d'avoir compati avec moi lors du traitement de nos résultats ou dans l'écriture de la

thèse. **Corentin Bon**, mon deuxième collègue de bureau, merci d'avoir toujours répondu présent lorsque j'avais besoin d'aide pour les pêches ou lorsque j'avais un pépin dans mes manips et merci de m'avoir fait partager ta passion pour le parapente et pour tes conseils avisés en matière de montagne. Merci également à **Maxime Leprêtre**, merci pour ton aide, pour ton soutien et pour tes paroles d'encouragement. Merci pour ta gentillesse et pour les moments passés ensemble. Petite pensée également pour **Sarah Bancel, Rayan Aboud, Mélaine Claitte, Michael Demortier, Isis Lorenzo-Colina, Amélie Lafond, Marion Beaupère, Vivien Lecomte, Christopher Bosc** et **Marc Rollin**. Merci également à tous mes stagiaires : **Louveline Lepeule** (merci pour toutes les extractions de MTs que tu as réalisé au cours de ton stage, merci pour les bons moments passés ensemble), **Clément Colomb** (un sacré stage et un sacré stagiaire ! Merci pour tout ce que tu as réalisé, pour tous les moments passés ensemble, notamment sur le terrain !), **Lison Geay** (merci pour tout le travail que tu as réussi à accomplir en deux mois !), mais également un grand merci à **Sarah Oddoux** et à **Maxence Ruby** pour votre aide. Enfin, un grand merci à **Natacha Koenig** et à **Ophélie Gestin** pour leur précieuse aide et leur soutien lors de l'écriture de mon manuscrit. Merci à toutes les deux d'avoir toujours répondu présente lorsque j'en avais le plus besoin et pour vos messages de soutien. Merci également pour tous les moments passés ensemble. Natacha, merci d'avoir été là et de m'avoir encouragé lors de ma première conférence orale à Rennes (le jour de mes 25 ans en plus !).

Merci également à tous les membres du laboratoire BF2i de l'INSA. Je tenais tout particulièrement à remercier **Fédérica Calevro** d'avoir accepté d'être ma tutrice de thèse, pour ta gentillesse et pour tes précieux conseils. Merci également d'avoir accepté de nous prêter la machine qPCR. Merci à **Anna Zaidman-Rémy** de m'avoir fait confiance pour la création et la réalisation du TP gammare à destination des étudiants, merci pour ta gentillesse. Merci également à **Abdelaziz Heddi, Mélanie Ribeiro Lopes** et **Karen Gaget** avec qui j'ai eu le plaisir de codiriger les TP au cours de mes trois années de thèse.

Je voudrais également remercier l'équipe du LAMA de INRAE à Lyon et notamment **Lysiane Dherret** de m'avoir montré comment on réalisait les mesures de contamination métallique à l'aide de l'ICP-MS. Merci pour ta gentillesse et pour avoir analysé tous mes échantillons rapidement.

Merci aux membres de mes comités de thèse : **Muriel Raveton, Patricia Gibert, Emilien Luquet** et ma tutrice E2M2 **Fédérica Calevro**, merci pour vos encouragements et vos conseils.

Je voudrais également remercier celles et ceux qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse : **Annette De Vaufleury**, **Simon Devin** et **Sandrine Plénet**. Et je remercie également les deux rapporteurs qui ont accepté d'évaluer ce manuscrit de thèse : **Alain Geffard** et **Céline Pélosi**.

Je voudrais remercier mes amis, notamment Agathe, Valentine, Carole, Alexandre et Morgane pour votre soutien et d'avoir toujours été là malgré les kilomètres. Merci également d'avoir compris mes absences à de nombreux évènements. Enfin, je voudrais remercier ma famille pour leur soutien sans faille. À mes **grands-parents**, merci à vous d'avoir toujours été présents pour moi et de ne pas trop m'en avoir voulu d'avoir quitté Le Havre (croyez-moi, vous me manquez énormément !). Merci d'être les grands-parents que vous êtes, pour votre générosité, votre tendresse et votre amour. Merci également à mon petit frère **Julien**, bien que loin, toujours complice et présent. Mais également à mes **cousins**, **cousines**, **oncles**, **tantes**, à ma **marraine** et à mon **parrain**. Ne m'en voulez pas de ne pas vous citer individuellement, vous savez bien que la famille est grande ! Mais soyez sûre que je pense très fort à vous. Merci à ma **belle-famille** pour l'intérêt que vous avez porté à mes travaux de thèse et pour avoir pris de mes nouvelles si souvent. Merci de m'avoir accueillie dans votre famille, je suis très heureuse d'en faire partie. **Elisa**, merci pour tes petits messages, pour ton soutien et pour les petites soirées. À toi, mon amour de **François**. Il y a tant de remerciements que j'aimerais te faire que je ne sais par où commencer. Tout d'abord, merci de m'avoir rejoint à Lyon. Merci d'être l'homme merveilleux que tu es, mais également merci de prendre soin de moi, de toujours trouver les bons mots, merci pour ton soutien indéfectible et tes conseils. Merci pour ton amour et d'être toujours présent, même à des milliers de kilomètres. Merci pour tous ces merveilleux moments passés ensemble et pour tous ceux qui sont à venir. Je voudrais terminer en remerciant **mes merveilleux parents**. Merci à vous deux de m'avoir permis de faire les études que je voulais, et de m'avoir fait confiance même quand je ne savais pas où j'allais. Je ne serais pas là où j'en suis sans vous. Merci pour votre soutien et votre amour indéfectible qui m'ont été si précieux pour ces dernières années d'études et même au-delà. Merci pour nos appels réguliers, pour vos visites à Lyon, pour tous les moments passés ensemble, pour vos précieux conseils et d'avoir toujours été là pour moi. Merci d'être les deux merveilleuses personnes que vous êtes, je suis si fière et heureuse d'être votre fille. Merci à vous tous, je vous aime fort.

Table des matières

Remerciements.....	I
Table des matières.....	V
Liste des abréviations et des composés chimiques.....	IX
Liste des figures et des tableaux.....	XI
Liste des articles et des communications	XXIII
Introduction générale	1
Chapitre I : Nature et conséquences des processus évolutifs en réponse à des expositions long terme à la contamination chez les populations d'invertébrés aquatiques	9
1. Réponses évolutives des populations lors d'exposition sur plusieurs générations à la contamination chimique environnementale	9
1.1. Modification de la sensibilité toxicologique des populations	9
1.1.1. Constat de la modification des sensibilités chez les invertébrés	9
1.1.2. Adaptation génétique ou acclimatation à l'origine de la tolérance toxicologique.....	11
1.1.3. Une transmission non génétique possible de la tolérance à la descendance : la plasticité transgénérationnelle.....	14
1.1.4. Difficulté de l'étude expérimentale des acquisitions de tolérance induites par l'exposition long-terme à la contamination environnementale	16
1.2. Modification des traits d'histoire de vie des populations	18
1.2.1. Aggravation des effets toxiques directs	22
1.2.2. Coûts de la tolérance.....	23
1.2.3. Adaptation des histoires de vie des populations.....	24
2. Tolérance et gestion du contaminant chez les arthropodes : le cas particulier des éléments traces métalliques	37
2.1. Mécanismes de gestion des métaux	37
2.1.1. Les métallothionéines (MTs)	38
2.1.2. Les granules riches en métaux (MRG)	44
2.1.3. Les phytochélatines (PCs)	45
2.1.4. Autres mécanismes existants dans la gestion des métaux.....	46
2.2. Tolérance des populations et modulation des mécanismes de gestion des métaux.....	47
3. Les amphipodes comme modèle d'intérêt pour l'étude des réponses évolutives induites par la contamination des milieux aquatiques.....	54
3.1. Les amphipodes.....	54
3.1.1. Généralités	54
3.1.2. Morphologie générale	54
3.1.3. Cycle de vie et de reproduction.....	56
3.2. Un amphipode d'eau douce bien connu en écotoxicologie : l'espèce <i>Gammarus fossarum</i>	57
3.2.1. Cycle de reproduction	57
3.2.2. Cinétique de bioaccumulation du cadmium dans les organes de <i>G. fossarum</i>	59

3.3. Les amphipodes en écotoxicologie évolutive.....	60
4. Objectif et projet expérimental.....	64
Chapitre II : Matériel et méthodes	67
1. Sélection et caractérisation de l'habitat des populations d'étude de <i>Gammarus fossarum</i>	68
1.1. Choix des populations d'étude.....	68
1.2. Caractérisation de la contamination métallique biodisponible	72
1.3. Caractérisation des conditions d'habitat des populations.....	73
2. Prélèvement et maintien des populations au laboratoire	75
2.1. Prélèvement des populations	75
2.2. Conditions générales de stabulation au laboratoire et maintien des populations au laboratoire en milieu propre (common-garden).....	76
3. Expérimentations multigénérationnelles.....	77
3.1. Isolement de cohortes de descendants	77
3.2. Croisement entre populations	79
3.3. Exposition d'une population naïve à des concentrations représentatives de l'environnement.....	80
3.3.1. Exposition durant un cycle de reproduction	80
3.3.2. Exposition multigénérationnelle	81
4. Mesure de la sensibilité au cadmium	84
5. Mesure des traits d'histoire de vie	85
5.1. Taux de croissance	85
5.2. Taux d'alimentation	86
5.3. Mesures démographiques (structure de taille des populations <i>in situ</i>).....	86
6. Mesure de l'expression de gène des métallothionéines.....	89
Chapitre III : Etude de la variabilité de la sensibilité et des traits d'histoire de vie de populations naturellement exposées au cadmium.....	91
1. Modification de la sensibilité toxicologique	92
1.1. Publication n°1 : L'acclimatation et la plasticité transgénérationnelle expliquent la tolérance au cadmium chez les populations de <i>Gammarus</i> exposées à la contamination naturelle par les métaux dans les cours d'eau de tête de bassin versant	92
1.2. Note n°1 : Complément à la publication n°1.....	128
2. Modification des traits d'histoire de vie	130
2.1. Publication n°2 : Modification des traits d'histoire de vie des populations de <i>G. fossarum</i> dans les cours d'eaux de tête de bassin versant exposés à la contamination cadmique chronique naturelle.....	130
2.2. Note n°2 : Compléments à la publication n°2	157
2.3. Note n°3 : Variabilité des traits d'histoire de vie après un retour en eau propre au laboratoire .	160
2.4. Note n°4 : Etude de l'effet du Cd sur la surface des branchies	162
Conclusions du Chapitre III	165

Chapitre IV : Etude de la covariation des niveaux d'expression de la métallothionéine et de la tolérance au cadmium chez des populations naturelles de <i>G. fossarum</i>	167
1. Identification et profil d'expression organise-spécifique de deux métallothionéines chez l'espèce <i>G. fossarum</i>	168
2. Variabilité intraspécifique de l'expression de la métallothionéine en lien avec l'exposition chronique cadmique des populations.....	186
2.1. Publication n°4 : Covariation des niveaux d'expression des métallothionéines et de la tolérance au cadmium dans les populations naturelles de <i>Gammarus fossarum</i>	186
2.2. Note n°5 : Complément à la publication n°3.....	216
Conclusions du Chapitre IV	218
Chapitre V : Etude de la modification de la sensibilité et des traits d'histoire de vie de <i>G. fossarum</i> lors d'une exposition cadmique multigénérationnelle au laboratoire	219
1. Exposition de géniteurs naïfs pendant 21 jours	220
2. Exposition multigénérationnelle	222
2.1. Validation de l'exposition au Cd durant l'exposition multigénérationnelle.....	222
2.2. Une exposition supérieure à 3 générations semble nécessaire pour acquérir une tolérance au cadmium.....	223
2.3. Variabilité des traits d'histoires de vie	226
2.3.1. Taille des femelles	226
2.3.2. Taux de croissance.....	228
2.3.3. Taux d'alimentation.....	230
Conclusion du Chapitre V	232
Chapitre VI : Discussion générale	233
1. Pertinence du jeu de populations établi pour étudier les effets long terme induits par l'exposition chronique cadmique en milieu naturel.....	233
2. La tolérance au Cd chez les populations de <i>G. fossarum</i> relève de processus d'acclimatation plastique et d'hérédité non génétique	236
3. Les métallothionéines : l'un des mécanismes moléculaires sous-jacents à la mise en place de la tolérance au Cd chez <i>G. fossarum</i> ?	242
4. L'épigénétique comme mécanisme déterminant la tolérance au Cd ?	248
5. La modification des traits d'histoire de vie	252
Conclusion générale et perspectives.....	255
Références bibliographiques	259
Annexes.....	291
Résumé	305
Abstract.....	307

Liste des abréviations et des composés chimiques

Abréviations

ADN (ou DNA)	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN (ou RNA)	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BBAC	Bioavailable Background Assessment Concentrations (limite supérieure de la contamination biodisponible nationale française à ne pas dépasser)
CAT	Catalase
Coh	Cohorte
DCE	Directive cadre sur l'eau
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-transférase
LC50 (ou CL50)	Concentration létale provoquant une mortalité égale à 50% des individus à un temps donné
LQ	Limite de quantification
LT50	Temps nécessaire pour observer 50% de mortalité
miARN	micro-ARN
MRG	Granules riches en métaux (metal rich granules)
MT	Métallothionéine
MRE	Metal Responsive Element
NQE-MA	Norme de Qualité Environnementales – Moyenne annuelle
ORF	Cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame)
PCA	Analyse en composante principale (Principal Component Analysis)
qPCR	PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative
ROS	Espèce réactives à l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
RT	Retrotranscription
SOD	Superoxyde dismutase
SIDI	Indice de diversité de SIDI

piARN	ARN interagissant avec Piwi
siARN	petit ARN interférent

Composés chimiques

Ag	Argent
CaCO ₃	Carbonate de calcium
Cd	Cadmium
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cr	Chrome
Cu	Cuivre
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
H ₂ O	Eau
Hg	Mercure
HNO ₃	Acide nitrique
Ni	Nickel
O ₂	Dioxygène
O ₂ ⁻	Superoxyde
OH	Hydroxyle
Pb	Plomb
TBT	Tributylétain
TBTO	Oxyde de tributylétain
Zn	Zinc

Liste des figures et des tableaux

LISTE DES FIGURES

Chapitre I : Nature et conséquences des processus évolutifs en réponse à des expositions long terme à la contamination chez les populations d'arthropodes aquatiques

Figure I-1 : Mécanismes entraînant une altération des traits d'histoire de vie en cas d'exposition multigénérationnelle d'une population.....	21
Figure I-2 : Vue d'ensemble de la régulation de MTF-1 (Extraits de Günther et al., 2012).	40
Figure I-3 : Les différents types de granules (Extraits de Ahearn et al., 2004a).....	44
Figure I-4 : Morphologie générale externe d'un amphipode (Extraits de Piscart and Bollache, 2012)	56
Figure I-5 : Couple de <i>G. fossarum</i> en précopulat (adapté de Vigneron, 2015).....	58
Figure I-6 : Synchronisme du cycle de mue et du cycle de reproduction chez <i>G. fossarum</i> (adapté de Crihiu, 2020).	59
Figure I-7 : Concentration de métaux mesurées et prédites (ligne continue pour la médiane et lignes en pointillé pour l'intervalle de confiance à 95%) avec un modèle TKTD à un compartiment pour les caeca (A) et les branchies (B) exposées à 52.1 ng/L de Cd pendant la phase d'absorption (0 à 7 jours) suivie d'une phase de dépuraton (7 à 28 jours). Ces deux phases sont séparées par la ligne verticale en pointillés noirs. Cette figure est adaptée de Gestin et al. (2022).	60
Figure I-8 : Site naturel des Ardillats	62

Chapitre II : Matériel et méthodes

Figure II-1 : Localisation des quinze populations de <i>G. fossarum</i> utilisées au cours de cette thèse. Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent au statut « contaminé », « intermédiaire » et « non contaminé » par du Cd biodisponible de chacun des sites. Ce statut a été défini grâce à un protocole de bioaccumulation active (voir paragraphe 2.2 du Chapitre II).	68
Figure II-2 : Photos des quinze sites utilisés au cours de la thèse avec (A) Ardillats, (B) Poye, (C) Strenbach, (D) Doulonne, (E) Raenthal, (F) Vancelle, (G) Katlen, (H) Reigne, (I) Vernay, (J) Marchampt, (K) Seine, (L) Rombach, (M) Morcille, (N) Séran et (O) Cressonnière.....	71
Figure II-3 : Illustration de la méthodologie d'encagement.....	72
Figure II-4 : Illustration pour le prélèvement des populations de gammarès par la méthode du kick sampling. .	76
Figure II-5 : Maintien des populations durant les expérimentations de déacclimatation	77
Figure II-6 : Design expérimental pour la production de trois cohortes successives de nouveau-nés (Coh1, Coh2, Coh3) relâchés en milieu propre au laboratoire par les populations de terrain.	78
Figure II-7 : Exemple d'un croisement de populations réalisé entre la population tolérante Ardillats et la population sensible Séran.....	79
Figure II-8 : Design expérimental de l'exposition de géniteurs naïfs au Cd (concentrations nominales de 0.1 µg/L ou 1 µg/L) pendant un cycle de reproduction.....	81
Figure II-9 : Design expérimental de l'exposition multigénérationnelle à une concentration de 0.5 µg/L de Cd.	82
Figure II-10 : Dispositif expérimental mis en place pour l'exposition multigénérationnelle.	83
Figure II-11 : Exemple de test de toxicité aiguë (A) chez les adultes et les jeunes à une concentration de 80 µg/L et (B) chez les nouveau-nés à une concentration de 20 µg/L.	85

Figure II-12 : Design expérimental de l'échantillonnage pour les femelles et les mâles réalisé dans l'objectif d'établir les structures de taille des populations..... 88

Chapitre III : Etude de la variabilité de la sensibilité et des traits d'histoire de vie de populations naturellement exposées au Cd

Publication n°1 : L'acclimatation et la plasticité transgénérationnelle expliquent la tolérance au cadmium chez les populations de *Gammarus* exposées à la contamination naturelle par les métaux dans les cours d'eau de tête de bassin versant

Figure 1 : Location of the nine studied *G. fossarum* populations in Eastern France. The stream Cd contamination status (green, yellow, red colours) was established following the active biomonitoring approach (based on *Gammarus* caging) developed to characterise bioavailable contamination water bodies in France (see results in Figure 2). The inset on the bottom right shows a focus on the Beaujolais region encompassing the Ardillats population from Vignerot et al. (2015, 2019)..... 99

Figure 2 : Bioavailable Cd contamination in the sites inhabited by the nine populations of the study (Ardillats, Marchampt, Vernay, Rauenthal, Poye, Séran, Vancelle, Ognon and Cressonnière). Contamination is assessed by accumulated Cd concentrations in $\mu\text{g/g}$ dw (dry weight) in gammarids caged on the study sites for 7 days (organisms transplanted from the reference population of the laboratory). Data are presented for campaigns on different dates. Dashed segments link values between campaigns for each study site. The horizontal dashed line indicates the threshold value of significant contamination defined by Besse et al. (2013), Ciliberti et al. (2017) and Alric et al. (2019), which corresponds to the 95% percentile of the distribution of the background concentrations recorded in French rivers ($0.30 \mu\text{g/g}$ dw for Cd) using the same active biomonitoring protocol. 105

Figure 3 : Cd tolerance of eight field populations assessed through the distribution of individual survival times of male adults exposed to $80 \mu\text{g/L}$ of Cd in the laboratory (Spring 2017), one day after their collection in the field. Red, yellow and green colours correspond respectively to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see Figure 2)..... 106

Figure 4 : Cd tolerance of four field populations assessed for different life stages and different dates of sampling in the year. The boxplots present the distribution of individual survival times of male adults, juveniles and neonates from Ardillats (Ardi), Marchampt (March), Séran and Cressonnière (Cress) populations. Adults and juveniles were exposed to $80 \mu\text{g/L}$ of Cd and neonates to $20 \mu\text{g/L}$ in the laboratory one day after their collection in the field or release from female marsupium in the laboratory for neonates. Red and green colours correspond to Cd contaminated vs uncontaminated status of populations (see Figure 2). 108

Figure 5 : Evolution of Cd tolerance of field populations during maintenance in Cd-free conditions. The boxplots present the distribution of individual survival times of male adults after sampling in the field (T0) and after their maintenance during 2 months in Cd-free water (T2) for Ardillats (Ardi-T0, Ardi-T2), Vernay (Vern-T0, Vern-T2), Marchampt (March-T0, March-T2), Séran (Ser-T0, Ser-T2) and Cressonnière (Cress-T0, Cress-T2) populations. Adults were exposed to $80 \mu\text{g/L}$ of Cd. The experiment was conducted at four different dates (one panel per date of field sampling date). Red and green colours correspond respectively to Cd contaminated and uncontaminated status of populations in their habitat of origin (see Figure 2)..... 109

Figure 6 : Cd tolerance (distribution of individual survival times during exposure to $20 \mu\text{g/L}$ of Cd) of three successive cohorts of neonates produced in Cd-free laboratory conditions by genitors sampled in Ardillats (Ardi-Coh1, Ardi-Coh2, Ardi-Coh3), Vernay (Vern-Coh1, Vern-Coh2, Vern-Coh3), Marchampt (March-Coh1, March-Coh2, March-Coh3), Séran (Ser-Coh1, Ser-Coh2, Ser-Coh3) and Cressonnière populations (Cress-Coh1, Cress-Coh2, Cress-Coh3). Neonates were exposed to Cd individually one day after their release from maternal

marsupium. Red and green colours correspond respectively to Cd contaminated vs uncontaminated status of populations in their habitat of origin (see Figure 2). 111

Figure 7 : Cross-breeding between sensitive and tolerant populations. The figure presents the Cd tolerance of neonates (distribution of individual survival times when exposed to 20 µgCd/L) produced by Cd tolerant populations (Ardillats or Marchampt), uncontaminated population (Cressonnière) and from population cross breeding. For the legend of the different conditions, the first capital letter corresponds to the first letter of the male's population name and the second capital letter correspond to the first letter of the female's population name (notation ♂/♀ : e.g, the condition AC corresponds to the crossing between a male from Ardillats population and a female from Cressonnière population). Neonates were exposed to 20 µg/L of Cd in the laboratory one day after they were released. Panel (A) represents crossing between Ardillats and Cressonnière populations and panel (B) represents crossing between Marchampt and Cressonnière populations. Red and green colours correspond to Cd contaminated vs uncontaminated status of populations (see Figure 2). 113

Supplementary Figure 1 : Regression between the 25th percentile (LT25), the median (LT50) and the 75th percentile (LT75) of adults survival time (days) and the mean level of bioavailable Cd contamination (µg/g dry weight) of the eight study populations sites (Ardillats, Marchampt, Vernay, Rauenthal, Poye, Séran, Cressonnière, Vancelle and Ognon). Red, yellow and green colours correspond respectively to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations..... 127

Supplementary Figure 2 : Acute Cd tolerance of neonates pre-exposed during gametogenesis or embryogenesis. (A) First and (B) second released cohorts of neonates born from genitors of the Séran population, pre-exposed to Cd (0.1 or 1 µg/L) during one reproductive cycle in the laboratory (see Figure II-10). Neonates released during the first cohort after exposure were hence exposed only during embryogenesis (A) and neonates from the second cohort only during gametogenesis (B). The boxplots present the distribution of individual survival times of neonates exposed to 20 µgCd/L one day after their release from maternal marsupium..... 127

Publication n°2 : Modification des traits d'histoire de vie des populations de *Gammarus fossarum* dans les cours d'eaux de tête de bassin versant exposés à la contamination cadmique chronique naturelle

Figure 1 : Location of the thirteen studied *G. fossarum* populations in Central Eastern France. The Cd contamination status of populations (green, yellow and red colours) was established following the active biomonitoring approach (based on *Gammarus* caging) developed to characterise bioavailable contamination water bodies in France (see results in Table 1). The inset on the bottom right shows a focus on the Beaujolais region 135

Figure 2 : Cd-tolerance of thirteen field populations assessed through the distribution of individual survival times of male adults exposed to 80 µg/L of Cd in the laboratory, one day after their collection in the field. Red, yellow and green colours correspond to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see 3.1) 142

Figure 3 : (A) Correlation circle of principal component analysis on physical environmental parameters of the thirteen study sites (DisSo: Distance to source; FW: Full width; Strahler: Strahler rank; Flow: Flow rate; SIDI: substrate diversity index; Slope; Natural: Natural area; Lotic: Lotic facies) and (B) position of populations in relation to the physical environmental parameters. Red, yellow and green colours correspond respectively to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see 3.1)..... 143

Figure 4 : (A) Correlation circle of principal component analysis on physico-chemical parameters of the thirteen study sites (pH; oxygene; Conduc: conductivity) and (B) position of populations in relation to the physico-chemical parameters. Red, yellow and green colours correspond respectively to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see 3.1)..... 144

Figure 5 : Size distribution of breeding females (mm) in the thirteen study. The three dashed segments represent the Q25, Q50 and Q95 of the size distribution of each population. Red, yellow and green colours correspond to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see 3.1).....	145
Figure 6 : Correlation between the maximal size of male adults (estimate by the 95 th percentile of size distribution) and the level of Cd exposure of populations (mean Cd concentration accumulated by 7-day caged gammarids). Red, yellow and green colours correspond to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see 3.1).	146
Figure 7 : Correlation between the conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$) and (A) the maximal size (represented by the Q95) and (B) the size of breeding female (mm) of the thirteen study populations. Red, yellow and green colours correspond to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see 3.1).	147
Supplementary Figure 1 : Characterization of the percentage of lotic (green) and lentic (blue) facies in the thirteen study sites.	156
Supplementary Figure 2 : Spearman-correlation between the conductivity and the status of Cd contamination of each sites.	156

Figures présente dans les différentes notes du Chapitre III

Figure III-1 : Évolution de la tolérance au Cd des populations de terrain au cours de leur maintien dans des conditions sans Cd. Les boxplots présentent la distribution des temps de survie individuels des jeunes (3-4 mm) après échantillonnage sur le terrain (T0) et après leur maintien pendant 2 mois dans une eau exempte de Cd (T2) pour les populations Ardillats (Ardi-T0, Ardi-T2), Vernay (Vern-T0, Vern-T2), Marchampt (March-T0, March-T2), Séran (Ser-T0, Ser-T2) et Cressonnière (Cress-T0, Cress-T2). Les jeunes ont été exposés à 80 $\mu\text{g}/\text{L}$ de Cd. L'expérience a été menée à quatre dates différentes (un graphique par date d'échantillonnage sur le terrain). Les couleurs rouge et verte correspondent respectivement au statut contaminé et non contaminé des populations dans leur habitat d'origine.....	129
Figure III-2 : Consommation alimentaire chez les mâles après prélèvement <i>in situ</i> . Les couleurs rouge et verte correspondent au statut des populations contaminées et non contaminées par le Cd.	157
Figure III-3 : Fécondité des femelles prélevées <i>in situ</i> lors de la campagne d'avril 2022. Les couleurs rouge et verte correspondent au statut des populations contaminées et non contaminées par le Cd. La droite rouge représente la droite de régression des populations contaminées et la verte celle des populations non contaminées.	158
Figure III-4 : Taux de croissance au laboratoire effectué chez des jeunes après le prélèvement des populations Ardillats, Marchampt et Cressonnière de Février 2021. Pour chaque population, le premier point représente la taille moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus à t0, le deuxième point la taille moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus après 1 mois et le troisième point la moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus après 2 mois. Les valeurs correspondent à la moyenne (mm) des croissances individuelles mesurées au cours du test calculées en soustrayant la taille moyenne à t0.	159
Figure III-5 : Taille des femelles (F1) en reproduction (n = 30) après 6 mois de maintien au laboratoire en condition propre (exempte de Cd). Les couleurs rouge et verte correspondent au statut des populations respectivement contaminé et non contaminé par le Cd	161
Figure III-6 : Taux de croissance après 6 mois au laboratoire. Pour chaque population, le premier point représente la taille moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus à t0, le deuxième point la taille moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus après 15 jours et le troisième point la moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus après 30 jours. Les valeurs correspondent à la moyenne (mm) des croissances individuelles mesurées au cours du test calculées en soustrayant la taille moyenne à t0.	161

Figure III-7 : Illustration des paires de branchies n°2, n°3 et n°4 chez <i>G. fossarum</i> (photos : Nicolas Delorme)	163
Figure III-8 : Surface totale des branchies (branchies n°2, 3 et 4) en fonction de la taille des gammarus provenant des populations contaminées (rouge) ou non contaminées (vert). La droite rouge représente la droite de régression des populations contaminées et la verte celle des populations non contaminées.	164

Chapitre IV : Etude de la covariation des niveaux d'expression de la métallothionéine et de la tolérance au cadmium chez des populations naturelles de *G. fossarum*

Publication n°3 : Identification et profil d'expression organisée-spécifique de deux métallothionéines chez l'espèce *Gammarus fossarum*

Figure 1 : Sequence alignment of the two putative <i>Gammarus fossarum</i> metallothioneins (MT-1_ <i>Gfoss</i> and MT-2_ <i>Gfoss</i>) with other crustacean metallothioneins (the amphipod <i>Hyalella atzeca</i> ; the decapods <i>Scylla serrata</i> , <i>Callinectes sapidus</i> and <i>Eriocheir sinensis</i>)	175
Figure 2 : <i>Gammarus fossarum</i> MT-1 and MT-2 predicted 3D structures and ligand predictions. A) MT-1 structure with the predicted Cd binding site. B) MT-2 structure with the predicted Cd binding site. C) MT-2 structure with the predicted Zn binding site.	176
Figure 3 : MT-1 relative expression in <i>G. fossarum</i> males exposed to Cd (0.6 or 5.4 µg/L), Zn (0.066 or 0.6 µg/L) or Ag (6.6 or 60 µg/L). Results are presented (A) in gills and in (B) caeca	178
Figure 4 : MT-2 relative expression in <i>G. fossarum</i> males exposed to Cd (0.6 or 5.4 µg/L), Zn (0.066 or 0.6 µg/L) or Ag (6.6 or 60 µg/L). Results are presented (A) in gills and in (B) caeca	179
Supplementary Figure 1 : MT-1 and MT-2 relative expression in <i>G. fossarum</i> gills (A) and caeca (B)	185

Publication n°4 : Covariation des niveaux d'expression des métallothionéines et de la tolérance au cadmium dans les populations naturelles de *Gammarus fossarum*

Figure 1 : Résumé des expérimentations mises en place dans le cadre de la publication n°4	190
Figure 2 : Tolérance au Cd des douze populations de terrain (Ardillats (A), Marchampt (B), Vernay (C), Strenbach (D), Rauenthal (E), Morcille (F), Séran (G), Doulonne (H), Katlen (I), Reigne (J), Vancelle (K), Rombach (L)) évaluée par la distribution des temps de survie individuels des mâles adultes exposés à 80 µg/L de Cd au laboratoire, un jour après leur collecte sur le terrain (Avril 2022). Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent respectivement au statut contaminé, intermédiaire et non contaminé des populations.	194
Figure 3 : Expression du gène <i>G. fossarum mt1</i> mesurée par RT-qPCR ($\sqrt{2}\Delta Ct$) dans les branchies et les caeca des mâles adultes en sortie de terrain chez douze populations (Ardillats (A), Marchampt (B), Vernay (C), Strenbach (D), Rauenthal (E), Morcille (F), Séran (G), Doulonne (H), Katlen (I), Reigne (J), Vancelle (K), Rombach (L)). Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent respectivement au statut contaminé, intermédiaire et non contaminé des populations.	196
Figure 4 : Evolution de la tolérance au Cd chez les populations de terrain (Ardillats (A), Marchampt (B), Vernay (C), Séran (G), Doulonne (H)) au cours de leur maintien en eau propre au laboratoire (Octobre 2022). Les boxplots représentent la distribution des temps de survie individuels des mâles adultes après prélèvement sur le terrain (T0) et après leur maintien pendant 2 mois en eau propre (T2). Les adultes ont été exposés à 80 µg/L de Cd. Les couleurs rouge et verte correspondent respectivement au statut contaminé et non contaminé des populations.	197

Figure 5 : Expression du gène <i>G. fossarum mt1</i> mesurée par RT-qPCR ($\sqrt{2}\Delta Ct$) dans les branchies et les caeca des mâles adultes après prélèvement sur le terrain (T0) et après maintien dans une eau exempt de Cd pendant 2 mois (T2) au laboratoire chez cinq populations de terrain (Ardillats (A), Marchampt (B), Vernay (C), Séran (G), Doulonne (H)). Les couleurs rouge et verte correspondent respectivement au statut contaminé et non contaminé des populations.....	199
Figure 6 : Expression du gène <i>G. fossarum mt1</i> mesurée par RT-qPCR ($\sqrt{2}\Delta Ct$) dans les branchies et les caeca des mâles adultes déacclimatés (Ardillats (A), Marchampt (B), Vernay (C), Séran (G), Doulonne (H)) en condition contrôle et après une exposition à 3 µgCd/L pendant 5 jours). Les couleurs rouge et verte correspondent respectivement au statut contaminé et non contaminé des populations.	200
Figure 7 : Tolérance au Cd (distribution des temps de survie individuels pendant l'exposition à 20 µg/L de Cd) chez deux cohortes successives de nouveau-nés produits au laboratoire dans des conditions sans Cd par des géniteurs échantillonnés dans la population A (A-Coh1, A-Coh2), B (B-Coh1, B-Coh2), C (C-Coh1, C-Coh2), G (G-Coh1, G-Coh2) et H (H-Coh1, H-Coh2). Les nouveau-nés ont été exposés individuellement au Cd un jour après leur sortie du marsupium maternel. Les couleurs rouge et verte correspondent respectivement au statut contaminé ou non contaminé des populations dans leur habitat d'origine.	201
Figure 8 : Expression du gène <i>G. fossarum mt1</i> mesurée par RT-qPCR ($\sqrt{2}\Delta Ct$) chez (A) les nouveau-nés de la cohorte 1 (Coh1 ; nés au laboratoire à partir de géniteurs récoltés sur le terrain) et chez les nouveau-nés de la cohorte 2 (Coh2 ; nés après un cycle de reproduction au laboratoire) nés dans de l'eau sans Cd et chez (B) les nouveau-nés Coh2 sans exposition au Cd et après une exposition à 3 µgCd/L pendant 3 jours. Les couleurs rouge et verte correspondent respectivement au statut contaminé ou non contaminé des populations dans leur habitat d'origine.	202
Figure 9 : Croisement entre une population sensible et une population tolérante. La figure présente la tolérance au Cd chez les nouveau-nés (distribution des temps de survie individuels lors d'une exposition à 20 µgCd/L) produits par la population tolérante au Cd (A), naïve (G) et à partir des croisements de populations. Pour la légende des différentes conditions, la première lettre majuscule correspond à la première lettre du nom de la population du mâle et la deuxième lettre majuscule correspond à la première lettre du nom de la population de la femelle (notation ♂/♀ : par exemple, la condition AG correspond au croisement entre un mâle de la population A et une femelle de la population G). Les nouveau-nés ont été exposés à 20 µg/L de Cd en laboratoire un jour après leur libération du marsupium maternel.....	203
Figure 10 : Expression du gène <i>G. fossarum mt1</i> mesurée par RT-qPCR ($\sqrt{2}\Delta Ct$) chez les nouveau-nés issus de la population tolérante (A), de la population naïve (G) et des croisements de populations (AG et GA) sans exposition au Cd et après exposition à 3 µgCd/L pendant 3 jours.....	204
Supplementary Figure 1 : Corrélation entre le temps de survie médian (LT50) de chaque population et l'expression médiane de <i>G. fossarum mt1</i> dans les branchies et les caeca. Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent au statut contaminé, intermédiaire et non contaminé de chaque population. La valeur donnée (ρ) correspond au coefficient de corrélation de Spearman.....	215

Figures présente dans la note du Chapitre IV

Figure IV-1 : Expression relative de <i>G. fossarum mt1</i> ($\sqrt{2}\Delta Ct$) dans les branchies, les caeca, les testicules et les ovaires chez la population Séran (vert) et Ardillats (rouge) après prélèvement sur le terrain.....	217
--	-----

Chapitre V : Etude de la modification de la sensibilité et des traits d'histoire de vie de *Gammarus fossarum* lors d'une exposition cadmique multigénérationnelle au laboratoire

Figure V-1 : Influence d'une exposition courte au Cd (21 jours) et à un niveau d'exposition représentatif de l'environnement (0.1 µgCd/L) chez des gammares mâles provenant d'une population naïve. Les boxplots représentent la distribution de survie individuel des adultes exposés à 80 µgCd/L.	221
Figure V-2 : Évolution de la tolérance au Cd (distribution des temps de survie individuels pendant l'exposition à 20 µg/L de Cd) chez les nouveau-nés du lot du 22 février 2022 au cours de l'exposition multigénérationnelle. La sensibilité au Cd a été testée (A) en avril 2022 (F1), (B) en novembre 2022 (F1/F2), (C) en février 2023 (F2/F3) et (D) en mai 2023 (F3).....	224
Figure V-3 : Évolution de la tolérance au Cd (distribution des temps de survie individuels pendant l'exposition à 20 µg/L de Cd) chez les nouveau-nés du lot du 03 octobre 2022 au cours de l'exposition multigénérationnelle. La sensibilité au Cd a été testé (A) en février 2023 (F1) et (B) en mai 2023 (F1/F2).	225
Figure V-4 : Taille des femelles du lot du 22 février 2022 au cours de l'expérimentation multigénérationnelle. La taille a été mesurée chez 30 femelles dans deux aquariums non contaminés et deux aquariums contaminés en (A) février 2023 (femelles F2) et (B) mai 2023 (femelles F2/F3).	226
Figure V-5 : Taille des femelles du lot du 03 octobre 2022 au cours de l'expérimentation multigénérationnelle. La taille a été mesurée chez 30 femelles dans deux aquariums non contaminés et deux aquariums contaminés en (A) février 2023 (femelles F0) et (B) mai 2023 (femelles F1).	227
Figure V-6 : Courbe de croissance chez des jeunes du lot du 22 février 2022 au cours de l'exposition multigénérationnelle. Le suivi de croissance a été réalisé en mai 2023 (génération F3) dans (A) deux aquariums non contaminés et (B) deux aquariums contaminés. Pour chacune des figures, le premier point représente la taille moyenne ± l'écart-type (mm) des individus à J0, suivi du point de la taille moyenne ± l'écart-type à J15, J30 et J45. Les valeurs correspondent à la moyenne (mm) des gains de taille mesurée au cours du test calculé en soustrayant la taille moyenne à J0. Les couleurs rouge et verte correspondent au statut de contamination de l'aquarium (rouge : contaminé ; vert : non contaminé).	228
Figure V-7 : Courbe de croissance chez les jeunes du lot du 03 octobre 2022 au cours de l'exposition multigénérationnelle. Le suivi de croissance a été réalisé en mai 2023 (génération F1) dans (A) deux aquariums non contaminés et (B) deux aquariums contaminés. Pour chacune des figures, le premier point représente la taille moyenne ± l'écart-type (mm) des individus à J0, suivi du point de la taille moyenne ± l'écart-type à J15, J30 et J45. Les valeurs correspondent à la moyenne (mm) des croissances individuelles mesurées au cours du test calculées en soustrayant la taille moyenne à J0. Les couleurs rouge et verte correspondent au statut de contamination de l'aquarium (rouge : contaminé ; vert : non contaminé).	229
Figure V-8 : Consommation alimentaire en mm ² /jour/individu chez les mâles dans deux aquariums non contaminés (vert) et deux aquariums contaminés (rouge) du lot du (A) 22 février 2022 (mâles F2) et (B) 03 octobre 2022 (mâles F0).	230
Figure V-9 : Consommation alimentaire en mm ² /jour/individu chez les mâles des deux lots réunis (lot du 22 février 2022 et lot du 03 octobre 2022).	231

Chapitre VI : Discussion générale

Figure VI-1 : Sensibilité au Cd des adultes des quinze populations de ce manuscrit, évaluée par la distribution des temps de survie individuels après exposition à 80 µg/L de Cd au laboratoire (résultats du printemps 2022), un jour après leur collecte sur le terrain. Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent aux statuts contaminé, intermédiaire et non contaminé en Cd des populations.	237
Figure VI-2 : Corrélation entre les niveaux d'expression médian de <i>G. fossarum mt1</i> dans les branchies et les caeca et (A) la contamination biodisponible en Cd (µg/g poids sec) ou (B) les temps de survie médians (LT50) de douze populations. Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent au statut contaminé, intermédiaire et non contaminé de chaque population.	243
Figure VI-3 : Expression du gène <i>G. fossarum mt1</i> mesurée par RT-qPCR ($\sqrt{2\Delta Ct}$) dans (A) les organismes entiers et (B) les branchies et les caeca des mâles adultes après prélèvement sur le terrain (T0) et après maintien dans une eau exempt de Cd pendant 2 mois (T2) et 6 mois (T6) au laboratoire chez la population Ardillats (A-T0, A-T2, A-T6) et la population Sérans (S-T0, S-T2, S-T6). Les couleurs rouge et verte correspondent au statut contaminé en Cd de la population Ardillats et au statut non contaminé de la population Sérans.	246

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I : Nature et conséquences des processus évolutifs en réponse à des expositions long terme à la contamination chez les populations d'arthropodes aquatiques

Tableau I-1 : Tableau décisionnel et caractéristiques principales des différents processus pouvant être à l'origine d'une tolérance à la contamination à l'échelle populationnelle présentés dans cette synthèse bibliographique. ...	13
Tableau I-2 : Etudes écotoxicologiques sur la modification de la sensibilité toxicologique chez les organismes exposés aux contaminants.	26
Tableau I-3 : Etudes écotoxicologiques sur la modification des traits d'histoire de vie chez les organismes exposés aux contaminants (en relation ou non avec la tolérance toxicologique).	32
Tableau I-4 : Etudes écotoxicologiques sur la modulation des mécanismes de gestion des métaux en fonction de la contamination métallique et/ou de la tolérance toxicologique.	51

Chapitre II : Matériel et méthodes

Tableau II-1 : Localisation et caractéristiques des quinze sites utilisés au cours de cette thèse. Le statut de contamination au Cd a été défini par une approche de biosurveillance active (voir paragraphe 2.2 du Chapitre II). Le statut « contaminé » a été attribué aux sites dont la contamination en Cd biodisponible était supérieure à la valeur seuil BBAC de 0.30 µg/g dw (poids sec) définie par Besse et al. (2013) et Ciliberti et al. (2017).	69
--	----

Chapitre III : Etude de la variabilité de la sensibilité et des traits d’histoire de vie de populations naturellement exposées au Cd

Publication n°1 : L’acclimatation et la plasticité transgénérationnelle expliquent la tolérance au cadmium chez les populations de *Gammarus* exposées à la contamination naturelle par les métaux dans les cours d’eau de tête de bassin versant

Table 1 : Dissolved Cd concentrations and 7-day bioaccumulated Cd concentrations during laboratory exposure of genitors to nominal concentrations of 0.1 µg/L and 1 µg/L of Cd. 112

Publication n°2 : Modification des traits d’histoire de vie des populations de *Gammarus fossarum* dans les cours d’eaux de tête de bassin versant exposés à la contamination cadmique chronique naturelle

Table 1 : Characterization of the bioavailable metal contamination between July 2015 and July 2022 in the sites inhabited by the thirteen populations of the study. For each metal element, bioavailable contamination is assessed by the mean of the accumulated concentrations in µg/g dry weight (number of caging campaigns in brackets) in gammarids caged on the study sites for 7 days (organisms transplanted from the reference population of the laboratory). Detailed protocol and determination of bioavailable background assessment concentrations (BBAC) are reported in Besse et al. (2013) and Alric et al. (2019). Red, yellow and green colours correspond to Cd-contaminated populations, intermediate Cd contamination and uncontaminated, respectively (see section 3.1). 141

Chapitre IV : Etude de la covariation des niveaux d’expression de la métallothionéine et de la tolérance au cadmium chez des populations naturelles de *G. fossarum*

Publication n°3 : Identification et profil d’expression organise-spécifique de deux métallothionéines chez l’espèce *Gammarus fossarum*

Table 1 : Identification of two metallothioneins in the amphipod *G. fossarum* 174

Table 2 : Relative expression of MT-1 and MT-2 in caeca and gills of *G. fossarum* exposed at different level of metal ions. 177

Chapitre V : Etude de la modification de la sensibilité et des traits d’histoire de vie de *Gammarus fossarum* lors d’une exposition cadmique multigénérationnelle au laboratoire

Tableau V-1 : Résultats des tests de bioaccumulation réalisée dans les aquariums de l’exposition multigénérationnelle. La contamination biodisponible en Cd a été évaluée par les concentrations de métaux accumulés en µg/g de poids sec dans les gammars encagés dans les aquariums pendant 7 jours (organismes de la provenant de la population de référence du laboratoire) 223

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Protocole employé pour l'extraction d'ARN dans les organes et les nouveau-nés à partir du Kit Rneasy® Fibrous Tissue MiniKit (Qiagen)	291
Annexe 2 : Protocole employé pour la rétrotranscription inverse à partir du kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems)	292
Annexe 3 : Protocole employé pour la réalisation de la qPCR afin de quantifier l'expression de gène des métallothionéines	293

Annexe F1 : Vue d'ensemble des différentes expérimentations menées dans le cadre de la publication n°1. Les expérimentations (a) et (b) ont été menées pour confirmer le développement d'une tolérance accrue au Cd chez des populations de terrain vivant dans des contextes naturels présentant des niveaux contrastés de biodisponibilité en Cd (objectif 1) et pour documenter la variabilité de la tolérance dans le temps et entre les classes d'âge au sein des populations tolérantes (objectif 2). L'expérience (c) a été menée pour comprendre la nature de la tolérance (objectif 3) et les expérimentations (d) et (e) ont étudié les mécanismes de transmission entre les générations (objectif 4). Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent respectivement au statut contaminé, intermédiaire et non contaminé des populations. 294

Annexe F2 : Détermination des générations en fonction du temps d'exposition pour le lot du 03 octobre 2022 lors de l'exposition multigénérationnelle réalisée au laboratoire à 15.6°C. La correspondance des générations a été estimée grâce à la connaissance du cycle de reproduction (entrée en reproduction à une taille d'environ 5-6 mm) et des taux de croissance (les gammars grandissent d'environ 1 mm par mois) pour cette espèce (Coulaud, 2012; Chaumot et al., 2020). La génération F0 correspond aux jeunes pêchés au Séran (taille d'environ 3.5 mm). 295

Annexe F3 : Détermination des générations en fonction du temps d'exposition pour le lot du 22 février 2022 lors de l'exposition multigénérationnelle réalisée au laboratoire à 15.6°C. La correspondance des générations a été estimée grâce à la connaissance du cycle de reproduction (entrée en reproduction à une taille d'environ 5-6 mm) et des taux de croissance (les gammars grandissent d'environ 1 mm par mois) pour cette espèce (Coulaud, 2012; Chaumot et al., 2020). La génération F0 correspond aux jeunes pêchés au Séran (taille d'environ 3.5 mm). 295

Annexe F4 : Evolution de la tolérance au Cd (distribution des temps de survie individuels pendant l'exposition à 20 µg/L de Cd) chez les nouveau-nés du lot du 22 février 2022 au cours de l'exposition multigénérationnelle. La sensibilité au Cd a été testé (**A**) en février 2023 (F2/F3) et (**B**) en mai 2023 (F3). Les couleurs rouge et verte correspondent au statut de contamination de l'aquarium (rouge : contaminé ; vert : non contaminé). 296

Annexe T1 : Caractérisation de la contamination métallique biodisponible dans les sites habités par les quinze populations étudiés au cours de cette thèse. La contamination biodisponible a été évaluée par les concentrations de métaux accumulés en µg/g dw (poids sec ; dw : dry weight) dans les gammars engagés sur les sites d'études pendant 7 jours (organismes transplantés à partir de la population de référence du laboratoire), entre avril 2013 et juillet 2022. Le protocole détaillé et la détermination des BBAC sont rapportés dans Besse et al. (2013) et Cilliberti et al. (2017). Les concentrations en métaux supérieures à la BBAC sont indiquées en gras. 297

Annexe T2 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les adultes mâles des huit populations en sortie de terrain après exposition à 80 µg/L de Cd en laboratoire (printemps 2017), un jour après leur collecte sur le terrain. Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (voir Chapitre III - 1.1). 298

Annexe T3 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les adultes mâles provenant des populations Ardillats, Marchampt, Séran et Cressonnière après exposition à 80 µg/L de Cd en laboratoire à différentes dates de

prélèvements dans l'année (entre février 2021 et octobre 2022). Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (voir Chapitre III - 1.1).....	298
Annexe T4 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les juvéniles et les nouveau-nés des populations Ardillats, Marchampt, Séran et Cressonnière après qu'ils aient été exposés au laboratoire et à différentes dates de prélèvement dans l'année (entre février 2021 et octobre 2022). Les juvéniles ont été exposés à 80 µg/L de Cd et les nouveau-nés à 20 µg/L au laboratoire un jour après leur collecte sur le terrain ou un jour après leur sortie du marsupium maternel au laboratoire pour les nouveau-nés. Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (voir Chapitre III - 1.1).....	299
Annexe T5 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les adultes mâles provenant des populations Ardillats, Marchampt, Vernay, Séran et Cressonnière après prélèvement sur le terrain (T0) et après leur maintien au laboratoire pendant 2 mois dans de l'eau exempt de Cd (T2). Les adultes ont été exposés à 80 µg/L de Cd. L'expérimentation a été conduite à quatre dates différentes (un tableau par date d'échantillonnage). Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (Chapitre III - 1.1) et de la Publication n°4 (Chapitre IV – 2.1).....	300
Annexe T6 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez trois cohortes successives de nouveau-nés produit au laboratoire en condition propre (exempt de Cd) par des géniteurs prélevés dans les populations Ardillats, Marchampt, Vernay, Séran et Cressonnière. Les nouveau-nés ont été exposés individuellement au Cd (20 µg/L) un jour après leur sortie du marsupium maternel. Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (Chapitre III - 1.1) et de la Publication n°4 (Chapitre IV – 2.1).	301
Annexe T7 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd de la première (exposés durant l'embryogénèse) et de la deuxième ponte (exposés durant la gamétogénèse) de nouveau-nés issus de géniteurs Séran exposés au Cd pendant un cycle de reproduction en laboratoire. Les nouveau-nés ont été exposés individuellement au Cd (20 µg/L) un jour après leur sortie du marsupium maternel. Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (Chapitre III - 1.1).....	301
Annexe T8 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les nouveau-nés issus des populations tolérantes au Cd (AA, MM), de la population de référence (CC) et des croisements de populations (AC, CA, MC, CM). Pour la légende des différentes conditions (notation : ♂/♀), la première lettre majuscule correspond à la première lettre de la population du mâle et la deuxième lettre majuscule correspond à la première de la population de la femelle (par exemple, la condition AC correspond au croisement entre un mâle Ardillats et une femelle Cressonnière). Les nouveau-nés ont été exposés individuellement au Cd (20 µg/L) un jour après leur sortie du marsupium maternel. Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (Chapitre III - 1.1).....	302
Annexe T9 : Caractérisation des paramètres d'habitats des 13 sites d'études de la Publication n°2 (Chapitre III – 2.1).	302
Annexe T10 : Résumé des paramètres physicochimiques mesurés dans les 13 populations d'études de la Publication n°2 (voir Chapitre III – 2.1).	303
Annexe T11 : Synthèse statistique de la distribution de taille des femelles 13 populations d'études de la Publication n°2 (voir Chapitre III – 2.1).	303
Annexe T12 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les adultes mâles des douze populations en sortie de terrain après exposition à 80 µg/L de Cd en laboratoire, un jour après leur collecte sur le terrain. Ce tableau vient en complément de la Publication n°4 (Chapitre IV – 2.1).	304
Annexe T13 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les nouveau-nés issus de l'exposition multigénérationnelle au Cd pour les lots du 22 février 2022 et du 03 octobre 2022 lors de différents tests réalisés au cours du temps (Chapitre V – 2.2). Les nouveau-nés ont été exposés individuellement au Cd (20 µg/L).	304

Liste des articles et des communications

Publications :

Publiée :

Lalouette, A., Degli Esposti, D., Garnero, L., Allibert, M., Dherret, L., Dabrin, A., Delorme, N., Recoura-Massaquant, R., Chaumot, A., 2023. Acclimation and transgenerational plasticity support increased cadmium tolerance in *Gammarus* populations exposed to natural metal contamination in headwater streams. Science of The Total Environment 903. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166216>

Degli Esposti, D., Lalouette, A., Gaget, K., Lepeule, L., Chaabi, Z., Leprêtre, M., Espeyte, A., Delorme, N., Quéau, H., Garnero, L., Calebro, F., Chaumot, A., Geffard., O, 2024. Identification and organ-specific patterns of expression of two metallothioneins in the sentinel species *Gammarus fossarum*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 269:110907. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2023.110907>

Communications orales :

Lalouette A., Delorme N., Garnero L., Chaumot A. (2021) - Voie de transmission parentale de la tolérance cadmique chez *Gammarus fossarum*. GDR écotoxicologie aquatique, Rennes, 22-24 novembre 2021.

Lalouette A., Degli Esposti D., Garnero L., Chaumot A. (2022) - Experimenting the plasticity of sensitivity from field populations of *Gammarus fossarum* in response to chronic cadmium contamination: tolerance acquisition, transfer and reversibility. SETAC Europe 32nd annual meeting, Copenhagen, 16-19 mai 2022.

Lalouette A., Degli Esposti D., Garnero L., Chaumot A. (2022) - Experimenting the plasticity of sensitivity from field populations of *Gammarus fossarum* in response to chronic cadmium contamination: tolerance acquisition, transfer and reversibility. GDR PlasPhen, Montpellier, 17-18 octobre 2022.

Lalouette A., Chaumot A., Lepeule L., Delorme N., Garnero L., Degli Esposti D. (2022) - Rôle de la métallothionéine dans l'acquisition de la tolérance au cadmium au sein des populations naturelles de *Gammarus fossarum*. GDR écotoxicologie aquatique, Nantes, 15-17 novembre 2022.

Lalouette A., Degli Esposti D., Colomb C., Delorme N., Garnero L., Recoura-Massaquant R., Chaumot A. (2023) - Modification des traits d'histoire de vie des populations de *Gammarus fossarum* dans les cours d'eaux de tête de bassin versant exposés à la contamination cadmique chronique naturelle. SEFA, Le Havre, 05-06 juillet 2023.

Posters et posters-corner :

Lalouette A., Chaumot A., Delorme N., Garnero L., Degli Esposti D. (2023) - Variability of metallothionein expression in field populations of *Gammarus fossarum* living in long-term chronic cadmium contamination contexts: basal levels, sensitivity and transgenerational effects. SETAC Europe 33rd annual meeting, Dublin, 01-04 mai 2023.

Lalouette A., Chaumot A., Delorme N., Garnero L., Degli Esposti D. (2023) - Co-variation of metallothionein expression levels and cadmium tolerance in *Gammarus fossarum* field populations. SETAC Europe 33rd annual meeting, Dublin, 01-04 mai 2023.

Introduction générale

La contamination chimique des écosystèmes est un facteur aujourd'hui clairement identifié comme étant une pression majeure qui s'exerce sur les communautés biologiques et qui contribue très significativement à l'érosion de la biodiversité en cours (Brondizio et al., 2019; Sigmund et al., 2023). Malgré ces préoccupations relatives à la contamination de l'environnement, la prise en compte des effets longs termes induits par l'exposition chronique des populations aux micropolluants sur plusieurs générations demeure limitée dans les études écotoxicologiques et dans le domaine de l'évaluation du risque écologique. Il est pourtant largement documenté chez de nombreuses espèces et pour différents contaminants (éléments traces métalliques ou composés organiques), qu'une exposition des populations sur plusieurs générations puisse impacter la fitness des organismes, mais aussi entraîner une modification de la sensibilité toxicologique vis-à-vis de ces contaminants, ou encore une modification des traits d'histoire de vie (*e.g.*, reproduction, croissance, survie...) qui ne soit pas une manifestation directe de la toxicité de ces contaminants sur les organismes exposés. Ces modifications peuvent en effet résulter de processus adaptatifs, relevant de deux grandes catégories : l'adaptation génétique ou l'acclimatation, cette dernière recouvrant des phénomènes allant de l'acclimatation physiologique à court terme jusqu'aux processus de plasticité phénotypique. Dans le cas de l'adaptation génétique, le contaminant agit comme une force sélective sur la structure génétique de la population, favorisant les génotypes qui confèrent une tolérance aux effets toxiques ; cette tolérance est irréversible à l'échelle individuelle et héritée par la descendance, ce qui supporte la propagation de la tolérance sur plusieurs générations (Klerks and Weis, 1987; Medina et al., 2007). Des mécanismes de plasticité correspondant à l'ajustement des traits physiologiques ou morphologiques à la présence de l'action toxique du contaminant peuvent également conduire à une tolérance accrue en cas d'acclimatation. Dans ce cas, l'acquisition de la tolérance peut être réversible au cours de la vie de l'individu lorsque l'exposition à la contamination cesse (cas de la flexibilité phénotypique selon la définition de Piersma and Drent, 2003) ; mais la tolérance peut également être fixée et modifier durablement les caractéristiques individuelles dans le cas de plasticité phénotypique, en particulier lorsque les organismes sont exposés au cours de leur développement. La tolérance toxicologique peut s'accompagner de coûts pouvant expliquer l'observation d'effets indirects sur la fitness et les

traits d'histoire de vie des populations. Cette corrélation négative entre tolérance toxicologique et traits de performance individuelle peut s'expliquer par une réallocation de l'énergie, normalement allouée à la reproduction ou encore à la croissance, aux mécanismes permettant la tolérance (Xie and Klerks, 2004). En l'absence du contaminant, les organismes résistants sont alors moins aptes (par exemple ont une fertilité plus faible) par rapport à des organismes non adaptés de la même espèce (Posthuma and Van Straalen, 1993; Xie and Klerks, 2003). De plus, la tolérance à un contaminant peut augmenter la vulnérabilité populationnelle aux effets négatifs d'autres facteurs environnementaux (Dallinger and Höckner, 2013). Dans le cas de l'évaluation du risque écologique, il est donc important d'évaluer et de quantifier si ces processus adaptatifs sont couramment rencontrés, car ils conditionnent fortement la prédiction des conséquences du changement global en cours (Coutellec and Barata, 2013; Coninck et al., 2014; Straub et al., 2020) où la menace environnementale que constitue l'augmentation de la production et la diversification des produits chimiques de synthèse a rejoint, voire dépassé, celles liées aux autres agents de ce changement (*i.e.* augmentation des concentrations en CO₂, destruction des habitats...) (Bernhardt et al., 2017; Persson et al., 2022).

Dans les études écotoxicologiques réglementaires, l'évaluation au laboratoire sur des espèces modèles ignore encore aujourd'hui les réponses à long terme aux expositions et la possibilité de mise en place de processus physiologiques, développementaux, génétiques, évolutifs, à l'échelle individuelle ou de plusieurs générations qui aboutissent à des modifications possibles de la sensibilité toxicologique ou des traits d'histoire de vie des populations naturelles exposées (Coutellec and Barata, 2011). D'autre part, la majorité des études écotoxicologiques qui s'intéressent aux réponses multigénérationnelles à la contamination se sont limitées à des études réalisées dans des conditions standardisées et faisant intervenir des espèces modèles (par exemple : clones de daphnies, chironomes, poisson-zèbre) (Coutellec and Barata, 2013). Malgré l'intérêt pratique de l'utilisation de telles espèces (facilement élevables, temps entre générations généralement rapide, biologie de l'espèce connue, ressources génomiques et transcriptomiques disponibles...), leur utilisation ne permet pas de refléter totalement la variabilité des réponses des organismes vivant en milieu naturel. De plus, ces études utilisent souvent une exposition à un contaminant unique, à des concentrations plus élevées que celles observées dans l'environnement et par conséquent exposent les organismes d'une manière qui ne reflète que

peu les niveaux et la complexité de l'exposition chronique dans les systèmes naturels. De même, celles-ci ne sont généralement pas réalisées sur plus d'une dizaine de générations.

En milieu naturel, les effets long-terme de l'exposition aux contaminants sont encore très peu documentés et lorsque ces études existent, ce sont généralement des études comparant une population contaminée vs une population non contaminée. Un verrou pour l'interprétation de ces études terrain est que les relations de cause à effet sont extrêmement difficiles à établir, car de nombreux facteurs dits « de confusion » (paramètres physiques d'habitats, contamination multisubstances), en plus du contaminant d'étude, peuvent également être responsables de l'observation de la modification des traits d'histoire de vie ou de niveau de sensibilité toxicologique (Coutellec and Barata, 2013). D'autre part, dans les milieux contaminés, on peut observer une variabilité temporelle de la tolérance des populations induite par ces expositions chroniques long termes, avec des exemples chez les macroinvertébrés aquatiques pour les métaux lourds ou les insecticides (*e.g.* Becker et al., 2020; Groenendijk et al., 2002, 1999; Maltby and Crane, 1994; Shahid et al., 2018; Weston et al., 2013). Ces observations interrogent ainsi la nature fixée ou plastique des traits de tolérance à l'échelle des individus et des populations. Les auteurs de ces études expliquent ces patrons de tolérance fluctuants en évoquant les effets combinés de la variabilité saisonnière de l'exposition dans les cours d'eau, de l'influence antagoniste de coûts de la tolérance en termes de fitness des organismes (qui sont exacerbés dans des contextes de stress multiples), ou encore de l'existence de flux migratoires réguliers entre les zones contaminées et non contaminées au sein des hydrosystèmes. Tous ces processus sont évidemment difficiles à intégrer dans les études au laboratoire. Cela souligne alors l'un des verrous classiques de l'approche écotoxicologique, celui de la représentativité des études de laboratoire vis-à-vis des réponses des organismes vivant en milieu naturel (Chapman, 2002; van Straalen, 2003).

Un certain nombre de mécanismes moléculaires de défense peuvent supporter la réponse adaptative des organismes face à l'exposition aux contaminants et à leur toxicité (Ahearn et al., 2004a; Vijver et al., 2004; Amiard et al., 2006; Morgan et al., 2007; Janssens et al., 2009). On peut alors se questionner sur une potentielle relation entre l'acquisition de tolérance, le caractère plastique ou fixé de celle-ci, et la mise en place de tels mécanismes face aux effets toxiques des

contaminants. Mais encore aujourd'hui, les mécanismes sous-jacents à l'acquisition de la tolérance ne sont pas encore très bien connus. La régulation transcriptionnelle semble jouer un rôle important dans ce cadre de l'adaptation des organismes à leur environnement. En effet, de plus en plus d'exemples décrivant des réponses transcriptionnelles plastiques en réponse à des modifications de l'environnement sont documentés (Morgan et al., 2007; Janssens et al., 2009; Kelly et al., 2012; Rivera et al., 2021a). Pour l'exposition aux contaminants métalliques toxiques, il est par exemple bien documenté que de tels mécanismes permettant la détoxification (*e.g.* métallothionéines, MRG) peuvent être responsables de la tolérance aux métaux au niveau des organismes, mais leur implication reste rarement étudiée au niveau populationnel, notamment leur implication dans le transfert de la tolérance à la descendance.

Dans ce contexte, ces travaux de thèse ont eu pour objectif d'interroger le rôle de la plasticité de la sensibilité et des traits d'histoire de vie chez différentes populations de l'espèce d'amphipode *Gammarus fossarum* dans leur capacité à développer une tolérance et à maintenir des populations face à la contamination des cours d'eau. Notre cas d'étude chez le gammare s'est centré sur la tolérance à un élément trace métallique, le cadmium. Au-delà du fait que *G. fossarum* est une espèce aujourd'hui reconnue comme sentinelle pour la surveillance de la qualité des milieux aquatiques (Kunz et al., 2010; Chaumot et al., 2015) et que le cadmium est un élément problématique en termes de risque environnemental (substance prioritaire DCE) (DCE, 2013/39/EC), ce choix a été guidé par différents résultats antérieurs qui ont souligné la possibilité d'interroger la question des processus évolutifs chez cette espèce pour le cadmium et ceci dans les conditions environnementales. En effet, l'étude d'Alric et al. (2019) menée à l'échelle nationale a pu démontrer un lien entre exposition à la contamination métallique biodisponible et abondance de certains macroinvertébrés dans les cours d'eau nationaux, avec des différences claires de vulnérabilités entre espèces. Certaines espèces telles que les *Epheméridae* disparaissent très vite face au gradient d'exposition métallique en comparaison des *Chironomidae* qui eux, se maintiennent bien en milieu contaminé. Les gammaridés connus comme étant très sensibles toxicologiquement aux métaux dans les tests au laboratoire (von der Ohe and Liess, 2004) voient leur abondance diminuer avec le gradient

d'exposition, mais quelques populations en forte densité persistent dans certains milieux contaminés particuliers. Lors d'une précédente thèse réalisée au laboratoire (Vigneron, 2015), une population de *G. fossarum* habitant un cours d'eau naturellement contaminé par le cadmium du fait du contexte géochimique local a ainsi été identifiée (site des Ardillats, sur l'amont de la rivière Ardières dans le Beaujolais). Chez cette population fortement exposée, une tolérance à ce métal a été caractérisée, cette tolérance étant *a priori* non génétique, mais transmissible à la descendance par de possibles effets parentaux (notamment maternels) et qui documenterait ainsi un cas de plasticité transgénérationnelle induite par l'exposition au contaminant (Vigneron et al., 2015, 2019). De même, une modification des traits d'histoire de vie (diminution des taux de croissance et d'alimentation, taille à la puberté plus faible) a été suspectée. Par ailleurs, afin d'avancer dans la compréhension des mécanismes pouvant être liés à ces phénomènes de tolérance, des études au niveau moléculaire peuvent également être aujourd'hui mises en place chez cette espèce, notamment grâce à la récente détermination du transcriptome du gammare (Cogne et al., 2019).

Ainsi, les travaux de thèse qui font l'objet de ce mémoire ont visé à généraliser ces résultats obtenus dans un contexte réaliste d'un point de vue environnemental (niveau d'exposition, espèce des cours d'eau) quant aux effets longs termes induits par la contamination métallique (plasticité de la sensibilité toxicologique et plasticité des traits d'histoire de vie). S'appuyant sur l'étude sur le terrain d'une quinzaine de populations de *G. fossarum* distribuées entre le Beaujolais, les Alpes du Nord, la Bourgogne jusqu'aux Vosges, ainsi que sur des expositions au laboratoire en conditions contrôlées, ces travaux de thèse ont plus particulièrement visé à :

- 1) Étudier la genericité et le caractère plastique de l'acquisition d'une tolérance toxicologique chez l'espèce *G. fossarum* en cas d'exposition multigénérationnelle au cadmium (mise en place, maintien de la tolérance au cours du cycle de vie des individus et transmission à la descendance).

- 2) Avancer sur les mécanismes moléculaires permettant la tolérance au cadmium par l'identification des métallothionéines chez cette espèce (protéines connues pour leurs fonctions physiologiques dans leur capacité de détoxification des métaux lourds) et l'étude de leur expression chez des populations tolérantes.
- 3) Étudier les effets de l'exposition multigénérationnelle au cadmium sur les traits d'histoire de vie du gammare.

Des expérimentations sur le terrain et au laboratoire ont été employées. Deux types d'approches ont été mises en œuvre : (1) une approche comparative entre populations naturellement exposées ou non du fait du contexte géochimique local, s'appuyant sur des mesures de tolérance et traits d'histoire de vie en sortie de terrain, ou après maintien sur plusieurs mois en eau non contaminée de populations (common garden), en incluant la descendance issue de croisements entre géniteurs de différentes populations, et (2) une approche d'exposition multigénérationnelle au laboratoire.

Ce manuscrit de thèse est composé de cinq chapitres. Le **Chapitre I** est une synthèse bibliographique centrée sur la nature et les conséquences des processus évolutifs mis en place chez les populations d'invertébrés lors d'exposition long terme à la contamination. Cet état de l'art est un corpus bibliographique centré sur les invertébrés aquatiques, particulièrement les arthropodes, mais s'appuie également sur des exemples chez les poissons ou encore les amphibiens. Le **Chapitre II** présente les méthodes expérimentales qui ont permis de mettre en place les approches terrain et laboratoire (common-garden, exposition multigénérationnelle). Par la suite, les chapitres III, IV et V présentent les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse. Plus précisément, le **Chapitre III** est consacré à l'étude de la variabilité de la sensibilité chez différentes populations naturelles de *G. fossarum*. Il se découpe en deux grandes sous-parties : une première centrée sur la variabilité de la sensibilité toxicologique ; et une deuxième centrée sur l'étude des traits d'histoire de vie. Le **Chapitre IV** est consacré à l'étude de l'expression de la métallothionéine chez les populations naturelles de *G. fossarum* et de sa co-variation avec la tolérance au Cd. Le **Chapitre V** quant à lui est consacré à l'exposition multigénérationnelle réalisée au laboratoire afin d'étudier dans des conditions contrôlées et

mimant les niveaux d'exposition rencontrées sur le terrain, la mise en place de la tolérance au Cd et la modification des traits d'histoire de vie. Enfin, le **Chapitre VI** est une discussion générale des résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse. Une conclusion et des perspectives de recherche viennent clôturer ce manuscrit de thèse.

Chapitre I : Nature et conséquences des processus évolutifs en réponse à des expositions long terme à la contamination chez les populations d'invertébrés aquatiques

1. Réponses évolutives des populations lors d'exposition sur plusieurs générations à la contamination chimique environnementale

Les écosystèmes aquatiques sont le réceptacle de nombreux contaminants chimiques (que ce soit les métaux ou les composés organiques) et sont sujets à de nombreuses perturbations induites par la toxicité de ces micropolluants (Schwarzenbach et al., 2006; Vardhan et al., 2019). La contamination par les métaux lourds constitue notamment une préoccupation majeure puisque ceux-ci sont continuellement rejetés dans l'environnement soit par des processus anthropiques, soit par des processus naturels, à savoir l'érosion des roches et l'activité volcanique (Martins et al., 2017). De même, les composés organiques (pesticides, résidus médicamenteux, substances industrielles...) sont de plus en plus retrouvés dans les milieux aquatiques du fait de l'augmentation croissante de la production et de la diversification des produits chimiques synthétiques, de l'utilisation des pesticides et/ou du changement climatique (Bernhardt et al., 2017; Persson et al., 2022). L'exposition chronique des populations sur plusieurs générations à la contamination chimique des milieux, qu'elle soit par les éléments traces métalliques ou les substances organiques de synthèse, peut induire une modification de la sensibilité toxicologique et/ou des traits d'histoire de vie des espèces aquatiques (Medina et al., 2007; Coutellec and Barata, 2013; Brady et al., 2017).

1.1. Modification de la sensibilité toxicologique des populations

1.1.1. Constat de la modification des sensibilités chez les invertébrés

La possibilité de modification de la sensibilité chez des organismes exposés aux contaminants est aujourd'hui largement documentée dans les études écotoxicologiques. Les premières études relatant ces phénomènes remontent aux débuts du XXe siècle (Luoma, 1977; Amiard-Triquet, 2019). Aujourd'hui, ces modifications sont recensées chez de nombreuses espèces aquatiques ou terrestres, animales ou végétales, exposées tant aux contaminants métalliques qu'aux

contaminants organiques (Luoma, 1977) (Tableau I-2). La tolérance peut être définie comme étant la capacité d'un organisme à diminuer sa sensibilité toxicologique vis-à-vis d'un contaminant, par rapport à un organisme naïf de la même espèce n'ayant jamais été exposé (Amiard-Triquet et al., 2011). Le terme résistance est également utilisé dans la littérature écotoxicologique comme un synonyme pour la tolérance, mais s'emploie le plus souvent pour indiquer une base génétique de celle-ci (Morgan et al., 2007). Ce terme de résistance est également connoté par son utilisation dans le cas des pesticides ou des antibiotiques et l'apparition de résistance parmi les populations ciblées par les traitements (pathogènes, ravageurs, etc.). Ici, nous utiliserons le terme de tolérance car nous ne considérons que le contexte des effets indésirés de la contamination chimique des environnements aquatiques sur les espèces « non-cibles » vivant dans ces écosystèmes. Très concrètement, la tolérance toxicologique est mesurée en recourant à des indicateurs très classiques en écotoxicologie : par exemple, dans l'étude d'Agra et al. (2011), une tolérance au cuivre a été mise en évidence chez un clone de *Daphnia longispisna* provenant d'un site contaminé par les métaux car celui-ci présentait une CL₅₀ (concentration létale pour 50 % des individus testés) plus élevée que les deux autres clones provenant de sites non impactés aux métaux (Agra et al., 2011). Stuhlbacher and Maltby (1992) montrent que chez l'amphipode *Gammarus pulex*, les organismes préexposés pendant 24 h au zinc et au cadmium sont plus tolérants à des expositions aiguës ultérieures à ces mêmes métaux que ceux qui n'ont pas été préexposés. On a pu ainsi décrire une tolérance aux métaux chez différentes espèces de crustacés marins (Khan et al., 1988; Gall et al., 2013; Sun et al., 2014; Duarte et al., 2019; Dong et al., 2020) ou d'eau douce (Stuhlbacher and Maltby, 1992; Tsui and Wang, 2005; Guan and Wang, 2006a; Khan et al., 2011; Vigneron et al., 2015; Chen et al., 2016), d'insectes (Postma and Davids, 1995; Groenendijk et al., 2002; Mireji et al., 2010; Rosabal et al., 2012; Kafel et al., 2014; Pedrosa et al., 2017b, 2017a), de bivalves (Weng and Wang, 2014; Potet et al., 2018), de gastéropodes d'eau douce (Plautz and Salice, 2013; Reátegui-Zirena et al., 2017), ou encore d'annélides (Wallace et al., 1998; Rožen, 2006; Fisker et al., 2013), de la même façon que chez les vertébrés aquatiques tels que les poissons (Munkittrick and Dixon, 1988; Lin et al., 2000; Xie and Klerks, 2003; Sellin and Kolok, 2006) ou les amphibiens (Flynn et al., 2019) (Tableau I-2). De même, des tolérances aux insecticides ont ainsi été mises en évidence chez différentes espèces non-cibles (Sun et al.,

2014; Shahid et al., 2018a; Becker et al., 2020; Siddique et al., 2021; Rackliffe and Hoverman, 2022; Gamble et al., 2023) (Tableau I-2). Dans certains cas on retrouve un phénomène de co-tolérance, c'est-à-dire qu'un organisme présentant une tolérance vis-à-vis d'un contaminant auquel lui ou son ascendance ont été exposés est également plus tolérant à un autre contaminant auquel il n'aura cependant pas été exposé. Par exemple, Gamble et al. (2023) ont mis en évidence que deux populations de l'amphipode *Hyalella azteca* exposées dans leur milieu aux deux insecticides fipronil et imidaclopride (néonicotinoïde) sont plus tolérantes à ces deux composés organiques, mais également à d'autres classes d'insecticides neurotoxiques : le bifenthrin, le chlorpyrifos, le DDT et le carbaryl. Ce phénomène de co-tolérance a également été retrouvé après une exposition au cadmium où en plus d'une tolérance vis-à-vis de ce métal, une tolérance au cuivre a été observée chez le poisson *Heterandria formosa* (Xie and Klerks, 2003) ou au plomb chez la daphnie *Daphnia magna* (Ward et Robinson 2005). En résumé, comme on peut le voir dans le Tableau I-2, les phénomènes de tolérance peuvent se retrouver pour l'ensemble des contaminants, métalliques ou organiques, l'ensemble des organismes vivants, et peuvent être aussi bien induits au laboratoire qu'être retrouvés chez des populations naturelles exposées à long terme sur le terrain.

1.1.2. Adaptation génétique ou acclimatation à l'origine de la tolérance toxicologique

La modification de la sensibilité peut résulter d'une adaptation génétique (*via* une sélection de génotypes tolérants) ou de processus d'acclimatation (*via* la capacité d'un génotype à produire des phénotypes plus tolérants en fonction de l'exposition à un contaminant). Ces deux grands mécanismes ne sont pas exclusifs et peuvent survenir simultanément (Posthuma and Van Straalen, 1993).

Dans le cas du premier mécanisme, **l'adaptation génétique**, la tolérance est acquise par sélection où le contaminant agit comme une force sélective au cours des générations en éliminant les génotypes d'une population ayant une fitness dépréciée en condition contaminée (mortalité différentielle, baisse de reproduction, inhibition de croissance). La tolérance acquise par adaptation génétique se transmet aux générations suivantes assurant durablement la survie de l'espèce habitant dans un environnement contaminé (Klerks, 2002; Grenier et al., 2016). À

l'échelle de la population, deux scénarios « extrêmes » sont proposés pour comprendre l'augmentation de la tolérance par adaptation génétique dans un cadre écotoxicologique: (1) l'élimination des génotypes sensibles, ce qui réduit notamment la variabilité génétique et la distribution des sensibilités au sein de la population ; (2) la sélection de variant génétiques potentiellement nouvellement apparus dans les populations exposées, variant exprimant un mécanisme de résistance (Lopes et al., 2006). Dans les deux cas, l'adaptation génétique implique la modification des fréquences alléliques au sein de la population adaptée : la fréquence des allèles favorables augmente sur plusieurs générations alors que celle des allèles défavorables tend à diminuer (Grenier et al., 2016). Il s'agit d'un processus micro-évolutif, c'est-à-dire correspondant à l'évolution de la structure génétique au sein et entre populations (Klerks, 2002; Medina et al., 2007; Grenier et al., 2016) (Tableau I-1).

Le second grand mécanisme, **l'acclimatation**, est défini comme la capacité d'un génotype (individu) à exprimer des phénotypes différents en fonction de son environnement (ici l'exposition à la contamination), n'affectant pas la structure génétique des populations. On associe ainsi ce phénomène d'acclimatation au concept de **plasticité phénotypique** du domaine de la biologie évolutive (Piersma and Drent, 2003; Grenier et al., 2016). Dans ce cas, c'est l'exposition d'un individu au contaminant à des concentrations sublétales pendant *a minima* une période de sa vie, qui induit la tolérance pour cet individu vis-à-vis du contaminant. Aujourd'hui, on recense de nombreuses publications concernant l'étude de l'acquisition de tolérance par de tels phénomènes d'acclimatation chez les espèces exposées au contaminant. Par exemple, il a été montré que le crustacé parthénogénétique *Daphnia magna* est capable d'acquérir une tolérance lorsqu'elle est exposée au nickel (Pane et al., 2004) ou au cadmium (Guan and Wang, 2006b; Chen et al., 2016). Cette capacité d'acclimatation peut également être retrouvée chez l'amphipode *Gammarus pulex* (Maltby and Crane, 1994), le diptère *Chironomus riparius* (Postma and Davids, 1995), le gastéropode *Lymnae stagnalis* (Reátegui-Zirena et al., 2017) ou encore l'annélide *Dendrobaena octaedra* (Rozen, 2006) en réponse à la contamination métallique. Plus précisément, on peut distinguer deux types de mécanismes d'acclimatation: la flexibilité phénotypique (le phénotype varie de façon dynamique en réponse aux variations environnementales rencontrées par l'individu) et la plasticité développementale (le phénotype varie et est fixé par les conditions environnementales au cours du développement) (Pfennig,

2021). Dans ces deux cas d'acclimatation, la tolérance acquise n'est le plus généralement pas transmise à la descendance (Piersma and Drent, 2003; Burggren, 2020). La *flexibilité phénotypique* (Tableau I-1) correspond donc aux ajustements physiologiques ou de certains traits (modifications des caractères morphologiques, des traits reliés à la fitness, de la tolérance au stress) aux conditions environnementales environnantes, ici la présence d'une action toxique d'un contaminant (Piersma and Drent, 2003). Dans ce cas, l'acquisition de la tolérance est réversible pour l'individu lorsque la contamination disparaît. La *plasticité développementale* (ou plasticité phénotypique *s.s.*) (Tableau I-1) recouvre la mise en place de processus au cours du développement pendant lequel l'individu est exposé au contaminant, ; dans ce cas, l'acquisition de tolérance est alors irréversible à l'échelle de la vie de l'individu. Grâce à la plasticité phénotypique, les traits plastiques des individus sont modifiés sans modifier en premier lieu la diversité génétique de la population. Mais la plasticité phénotypique qui influence alors la fitness des individus peut être à son tour la cible de la sélection (Grenier et al., 2016).

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

		Adaptation génétique	Acclimatation		
			Plasticité développementale	Flexibilité phénotypique	Effets parentaux
Terminologie de la tolérance		Résistance	Tolérance		
Réversible en condition contaminée	Individus	Non	Non	Oui	Possible
	Génération	Oui, à long terme	Oui	Oui	Oui, durée variable
Héritable		Oui	Non	Non	Oui
Mise en place		Sur plusieurs générations	Pendant le développement d'un individu lors d'une exposition	Du fait de l'exposition durant une période de la vie de l'individu	Dû à l'exposition parentale des individus testés
Modification des fréquences alléliques		Oui	Non	Non	Non

1.1.3. Une transmission non génétique possible de la tolérance à la descendance : la plasticité transgénérationnelle

Un cas particulier d'acclimatation est de plus en plus mis en avant dans le domaine de la biologie évolutive pour la compréhension des processus d'adaptabilité aux stress environnementaux. Celui-ci vient brouiller la distinction classique faite entre adaptation génétique et acclimatation, synonyme le plus souvent de « tolérance héréditaire » vs « tolérance non transmissible à la descendance ». La transmission de tolérance à la descendance par des **effets dits parentaux** (Tableau I-1) de l'exposition au contaminant traduit une capacité plastique des géniteurs à s'acclimater aux conditions de contamination et à modifier la tolérance de la descendance, et relève ainsi des mécanismes non génétiques d'hérédité (Uller, 2008; Badyaev and Uller, 2009). Dans la littérature, on retrouve également ce mécanisme sous le nom « d'hérédité non génétique » ou « plasticité transgénérationnelle » (Bonduriansky et al., 2012). Les effets parentaux peuvent être définis, de manière générale, comme une modification de la sensibilité de la descendance uniquement due à l'influence du phénotype parental (maternel et/ou paternel), sans modification de la séquence d'ADN de la progéniture (Ho and Burggren, 2010; Rivera et al., 2021b). Les effets parentaux constituent alors une forme de plasticité traversant les générations (Uller, 2008). Dans le cas de l'exposition à un contaminant, la sensibilité des descendants peut ainsi être influencée indépendamment de leur propre exposition par le fait que les parents ou l'ascendance ont été exposés. On parle d'un transfert transgénérationnel de caractères phénotypiques sans modification des séquences génétiques d'ADN (Ho and Burggren, 2010). Cette transmission peut, par exemple, se faire au travers de modifications de la chromatine (par exemple : (dé)méthylation de l'ADN, modification des histones), de transferts d'ARN non codants, ou encore de transferts de différents facteurs de régulation, de défense ou de réserve via les œufs (Ho and Burggren, 2010; Bonduriansky et al., 2012). Grâce à ce mécanisme, des individus n'ayant pas été exposés à la contamination peuvent ainsi être tolérants au contaminant alors qu'ils partagent le même génotype que des individus sensibles. Plusieurs études ont été menées sur de possibles effets parentaux en écotoxicologie. Par exemple, une étude menée par Plautz and Salice (2013) chez la physe (gastéropode d'eau douce) a permis de mettre en évidence un potentiel rôle des effets parentaux. Les résultats de cette étude ont montré que l'exposition parentale au cadmium induit la tolérance au cadmium

de la progéniture. Ce même constat a été retrouvé après une exposition parentale au mercure chez *Daphnia magna* (Tsui and Wang, 2005), mais cette dernière étude ne définit pas s'il s'agit bien d'une tolérance acquise via un transfert parental, ou d'une acquisition de la tolérance au cours du développement embryonnaire. Au contraire, Plautz and Salice (2013) démontrent que l'exposition parentale au Cd (2 et 20 µg/L) affecte différemment la tolérance de la progéniture en fonction du fait que celle-ci se poursuit ou pas au cours du développement embryonnaire.

Bien que les effets parentaux dans la détermination du phénotype d'un individu soient de plus en plus étudiés, ils sont le plus souvent abordés sous l'angle des effets maternels, ne tenant que peu compte de possibles effets paternels. Néanmoins, ces effets peuvent bel et bien affecter le phénotype de la descendance (Ho and Burggren, 2010). Dans le cas d'un effet paternel, la transmission de la tolérance peut passer par un mécanisme d'épigénétique et notamment par des phénomènes de méthylation de l'ADN ou de modification des histones (Ho and Burggren, 2010). Par exemple, la possibilité d'une transmission intergénérationnelle de marques épigénétiques a été mise en évidence chez *Daphnia magna* après une exposition parentale à un médicament ou au zinc (Feiner et al., 2022) ou après une exposition multigénérationnelle au cuivre (Jeremias et al., 2022). Des liens entre les modifications épigénétiques et la tolérance n'ont que rarement été établis dans la littérature écotoxicologique. Kille et al. (2013) ont par exemple établi une corrélation entre les variations des profils de méthylation et l'adaptation à l'arsenic chez les populations de *Lumbricus rubellus* vivant dans des sols miniers contaminés. Chez *Gammarus fossarum*, il est intéressant de noter que les expositions au cadmium modulent les niveaux de méthylation de la cytosine génomique globale en laboratoire (Cribiu et al., 2018) et que des niveaux plus élevés de méthylation globale de l'ADN par rapport à des populations de référence ont été mis en évidence chez la population tolérante au cadmium des Ardillats, naturellement exposée au cadmium (Cribiu, 2020).

1.1.4. Difficulté de l'étude expérimentale des acquisitions de tolérance induites par l'exposition long-terme à la contamination environnementale

Le plus souvent, l'étude des réponses évolutives en réponse à la contamination s'est limitée à des études expérimentales réalisées en laboratoire, dans des conditions standardisées, faisant intervenir des espèces modèles (exemple : clones de daphnies, diptères, nématodes, poisson-zèbre) et pour des durées d'exposition généralement courtes (Coutellec and Barata, 2013; Oziolor et al., 2016). Bien que ces études présentent un réel intérêt pour décrypter les mécanismes évolutifs induits par les contaminants, l'évaluation au laboratoire sur des espèces modèles n'intègre que peu les réponses aux expositions historiques à la contamination de l'environnement et la possibilité de mise en place de processus physiologiques, développementaux, génétiques, évolutifs, à l'échelle individuelle ou de plusieurs générations (Morgan et al., 2007; Coutellec and Barata, 2011; Oziolor et al., 2016). Ces études utilisent souvent une exposition au contaminant à des concentrations plus élevées que celles observées dans l'environnement et, par conséquent, exposent les organismes d'une manière qui ne reflète que peu l'exposition dans les contextes environnementaux à risque. Par exemple, la norme de qualité environnementale exprimée en valeur moyenne annuelle (NQE-MA) définie pour les eaux de surface (rivières, lacs) est de 0.08 µg/L dans les eaux douces (<40 mg CaCO₃/L) et 0.25 µg/L dans les eaux dures (> 200 mg CaCO₃/L) pour le cadmium, de 1 µg/L pour le cuivre ou encore de 7.8 µg/L pour le zinc (Directive 2008/105/CE). Pour une grande partie des études écotoxicologiques mentionnées dans le Tableau I-2, on peut voir que les concentrations utilisées sont à un facteur 5, 10 voir plus de 100 par rapport à ces valeurs de risque de toxicité environnementale, qui n'intègrent aujourd'hui même pas de données d'effets obtenues lors d'expositions multigénérationnelles. Par ailleurs, ces expériences excluent par construction toute la variabilité des conditions environnementales, en n'examinant souvent que quelques facteurs à la fois et en négligeant ainsi les interactions potentielles entre facteurs tels que la température ou la variabilité saisonnière (Rackliffe and Hoverman, 2022; Romero-Blanco and Alonso, 2022). De même, malgré la popularité croissante des études sur les effets parentaux et les effets transgénérationnels, de nombreuses études ne testent des organismes n'appartenant qu'à une seule cohorte ou génération de descendants. On ignore par-là l'existence d'effets différés, c'est-à-dire n'apparaissant qu'à partir de la deuxième, voire la troisième génération.

Pour les organismes itéropares (*i.e.*, ayant plusieurs cycles de reproduction au cours de leur vie), il est pourtant important de tester également la persistance de ces modifications de sensibilité au cours des périodes de reproduction suivantes (Massamba-N'Siala et al., 2014; Reátegui-Zirena et al., 2017). Par exemple, certaines études recensent des effets de plus en plus importants au fur et à mesure que l'exposition maternelle se maintient (Mireji et al., 2010), ou qu'il faut un certain temps avant de voir apparaître les effets chez la descendance (Postma and Davids, 1995), ou encore qu'il peut exister une certaine variabilité si l'exposition est irrégulière (Tsui and Wang, 2005; Sun et al., 2014). Malgré ces difficultés, on dispose tout de même aujourd'hui d'un corpus important d'études multigénérationnelles menées en laboratoire et notamment chez les invertébrés (70% des études laboratoires présentées dans le Tableau I-2). Par rapport aux études traditionnelles sur une seule génération, ces études multigénérationnelles peuvent permettre de mieux comprendre les effets chroniques causés par les contaminants au niveau de la population. Ces études sur plusieurs générations peuvent aider à mettre en lumière les mécanismes par lesquels les traits de sensibilité sont hérités par les générations suivantes au sein de population soumise à un stress (Dallinger and Höckner, 2013). Cependant, la durée de l'exposition en laboratoire dépasse rarement trois générations (représentant un peu moins de la moitié des études laboratoires recensées dans le Tableau I-2). Par ailleurs, ces études révèlent le plus souvent une toxicité chronique avec des effets cumulatifs qui s'aggravent au cours des générations plutôt que de fournir des arguments sur une éventuelle adaptation ou phénomène de plasticité ou encore l'implication de réponses microévolutives dans les effets néfastes observés (Tarnawska et al., 2019).

Les progrès actuels de la technologie moléculaire devraient permettre de tracer les effets évolutifs des contaminants dans des conditions plus réalistes, impliquant des écosystèmes naturels, la présence de multiples stress sur le terrain et l'utilisation d'espèces particulièrement pertinentes sur le plan écologique (y compris les espèces à durée de vie plus longue) (Coutellec and Barata, 2013). Pourtant, les effets long-terme d'une exposition à un contaminant chez des populations restent très peu documentés en milieu naturel et lorsque ces études existent, ce sont généralement des études comparant une population contaminée vs une population non contaminée (Feckler et al., 2012; Romero-Blanco and Alonso, 2022). Ainsi, les relations de cause à effet sont extrêmement difficiles à déterminer dans les études terrain car de nombreux

facteurs de confusion, en plus du contaminant, peuvent être responsables de l'observation de différences de sensibilité entre populations d'étude. D'autres facteurs tels que l'utilisation des habitats, la disponibilité et la qualité de la nourriture, les caractéristiques physiologiques des organismes influencés par les interactions interspécifiques ou les paramètres physico-chimiques (tels que la dureté de l'eau) ne peuvent être exclus comme facteurs déterminants pouvant expliquer des différences de sensibilité (Morgan et al., 2007; Feckler et al., 2012). Par exemple, chez l'amphipode *Leptocheirus plumulosus* il a été suggéré que la variation de la sensibilité au Cd observée chez les populations de terrain était due aux changements saisonniers de la disponibilité en nourriture et de la densité de population (McGee et al., 1998). D'autres études ont également montré qu'un régime alimentaire pauvre réduit la tolérance à la salinité chez la daphnie (Ruiz et al., 2022) ou encore chez le copépode (Hammock et al., 2016). De même chez le gastéropode *Potamopyrgus antipodarum*, Alonso (2023) a montré que les individus ayant préalablement subi une forte conductivité sont moins tolérants au cadmium que ceux n'ayant pas été stressés. D'autre part, dans le cas de l'exposition des populations naturelles à des éléments traces métalliques, la situation est complexe, du fait de la multiplicité des sources de contamination anthropiques (agricoles, industrielles, urbaines) ou géochimiques naturelles, ainsi que de la modulation de la biodisponibilité de ces éléments en fonction de la typologie physico-chimique des cours d'eau. Ces exemples documentent l'importance de pouvoir disposer d'indicateurs comparables de l'exposition des populations entre différents sites et/ou entre différentes dates. Ainsi, la description fine des paramètres d'habitats (physiques et physico-chimiques) ne peut qu'améliorer les études écotoxicologiques sur les effets long-terme de l'exposition à la contamination se basant sur des populations naturelles.

1.2. Modification des traits d'histoire de vie des populations

Les traits d'histoire de vie regroupent l'ensemble des caractéristiques phénotypiques observables chez un organisme. Parmi les principaux traits d'histoire de vie d'une espèce on retrouve le patron de croissance, l'âge et la taille à la maturité sexuelle, la reproduction (nombre et taille des portées), la taille ou encore la longévité (Stearns, 1992). Dans l'environnement, les traits d'histoire de vie des populations peuvent être influencés par la présence chronique de

contaminants. Faisant face aux changements de l'environnement, les espèces développent différentes stratégies évolutives correspondant à des modifications de leurs traits d'histoire de vie (supportées par des processus génétiques ou plastiques) permettant une optimisation de la fitness des individus. L'exposition des populations sur le long terme à un contaminant peut par exemple entraîner via ces processus adaptatifs une diminution de l'âge et de la taille à la première reproduction (Donker et al., 1993; Martins et al., 2017), une augmentation (Guan and Wang, 2006b) ou une diminution de l'investissement dans la reproduction (Kenig et al., 2013; Kimberly and Salice, 2015; Kadiene et al., 2019; Osborne et al., 2020; Mažuran et al., 2022), une diminution du taux de croissance (Guan and Wang, 2006b; Kenig et al., 2013; Martins et al., 2017; Kadiene et al., 2019; Mažuran et al., 2022), des taux d'alimentation (Yu et al., 2016; Martins et al., 2017) ou encore de la survie (Martins et al., 2017; Yang et al., 2020) (Tableau I-3). Par ailleurs, les paramètres abiotiques d'habitat tels que la température, la salinité ou encore la dureté de l'eau peuvent être ici aussi à l'origine de la variabilité des traits d'histoire de vie des organismes, du fait d'ajustements physiologiques ou d'adaptation génétique également. La température et la dureté de l'eau sont citées parmi les principaux facteurs abiotiques à l'origine de la variabilité des taux de croissance ou de reproduction pour les organismes aquatiques (Nylin and Gotthard, 1998).

Comme discuté précédemment pour l'implication des effets parentaux dans la survenue de modification de la sensibilité toxicologique de la descendance, les effets de l'exposition à l'échelle de l'individu peuvent se révéler en termes de modification des traits d'histoire de vie de la descendance. En effet, de nombreuses études sur ces effets différés de l'exposition aux stress environnementaux montrent que les conditions environnementales subies par un parent peuvent influencer les traits d'histoire de vie de sa descendance (Bonduriansky et al., 2012). Différents travaux de ce type sont documentés notamment dans le cas de la dégradation de la qualité chimique de l'environnement aquatique. Par exemple chez le poisson *Gambusia affinis*, l'exposition maternelle au cuivre entraîne une taille réduite des individus à la naissance (Cazan and Klerks, 2015). De même, une réduction des taux de croissance et une reproduction plus tardive ont été observées chez la descendance issue de parents exposés à des solutions hyperosmotiques de calcium chez le gastéropode *Planorbis corneus* (Mažuran et al., 2022). Chez *Daphnia magna*, une réduction du poids des descendants a été rapportée après une

exposition parentale au nickel (Pane et al., 2004). Symétriquement, différentes études ne montrent pas d'effets de l'exposition parentale sur la descendance. Par exemple, Tsui and Wang, (2005) n'observe aucun impact sur la croissance et les performances de reproduction chez la descendance après une exposition parentale au mercure chez une population de *Daphnia magna*. Chez certaines espèces, la modification des traits d'histoire de vie transmise ou non sur plusieurs générations lors d'exposition à un contaminant peut être réversible après un retour dans des conditions non exposées. Dans ce cas, les individus qui ont été précédemment exposés retrouvent des traits d'histoire de vie similaires à des individus naïfs de la même espèce. Cela a par exemple été mis en évidence chez deux espèces de daphnies. Les taux de croissance et la reproduction qui avaient été altérés par une exposition au cadmium chez *Daphnia magna* (Guan and Wang, 2006b) et *Daphnia pulex* (Chen et al., 2016) sont revenus aux mêmes niveaux que ceux des individus contrôles de la même espèce après un retour en eau propre. Des résultats similaires ont également été rapportés chez le copépode *Tigriopus japonicus* (H. Li et al., 2015) et le gastéropode *Planorbarius corneus* (Mažuran et al., 2022).

Prolongeant les impacts populationnels qu'une exposition à la contamination peut entraîner sur les traits d'histoire de vie, des impacts écosystémiques indirects peuvent également se produire. En effet, les traits d'histoire de vie déterminent la dynamique de population. Ainsi, un changement dans les traits d'histoire de vie chez une population peut modifier la manière dont les espèces exploitent leurs niches écologiques (modification des relations prédateurs-proies, des relations de compétition ou encore de l'abondance relative des espèces) et participent au fonctionnement global de l'écosystème affectant alors les fonctions clés de l'écosystème (Jørgensen et al., 2007; Medina et al., 2007). Par exemple, une baisse de la reproduction des femelles d'une espèce peut entraîner un renouvellement insuffisant de la population et conduire à son extinction, représentant une baisse significative de la ressource alimentaire pour les prédateurs. Ainsi, la tolérance peut avoir des conséquences écologiques à long terme susceptibles de toucher des niveaux d'organisation biologiques élevés. Cette question des effets long terme de la contamination chimique sur les traits d'histoire de vie des populations exposées au sein de la variabilité environnementale est donc importante dans le cadre de l'évaluation des risques écologiques (Medina et al., 2007; Coninck et al., 2014; Straub et al., 2020). Pourtant en milieu naturel, l'étude des effets liés à l'exposition chronique à un contaminant est peu

documentée. En effet, les rares études abordant ce sujet sont réalisées au laboratoire, avec des organismes modèles, et les hypothèses sous-jacentes aux modifications des traits d'histoire de vie en lien avec les réponses adaptatives qui se mettent en place lors de l'exposition multigénérationnelle des populations ne sont pas encore très bien décryptées. La plus évoquée d'entre elles avance que les modifications des traits d'histoire de vie observées sont potentiellement liées à l'acquisition de tolérance (toxicologique) et parlent alors de « coût de tolérance » (van Straalen and Hoffmann, 2000; Tanaka and Tatsuta, 2013) (Figure I-1). Pourtant, la modification des traits d'histoire peut également être liée aux effets toxiques directs du contaminant, ou encore avoir une valeur adaptative si elles correspondent à une sélection des histoires de vie des populations exposées à la pression toxique (Figure I-1). Ces trois hypothèses sont détaillées ici.

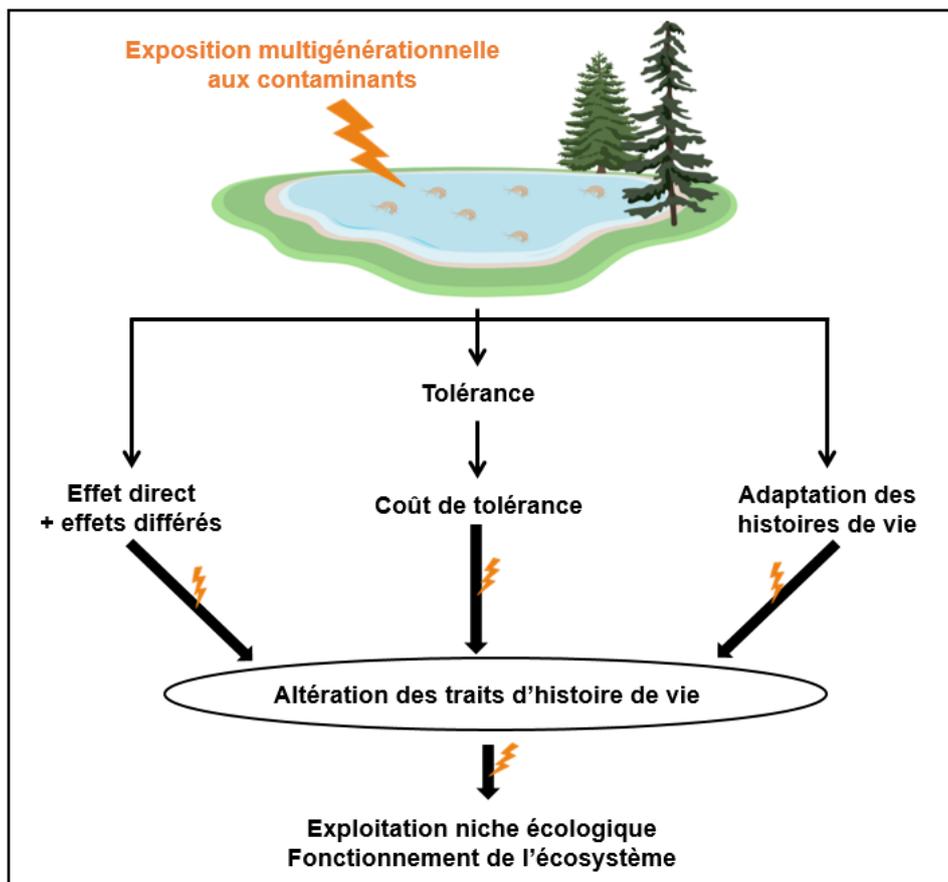


Figure I-1 : Mécanismes entraînant une altération des traits d'histoire de vie en cas d'exposition multigénérationnelle d'une population

1.2.1. Aggravation des effets toxiques directs

La modification des traits d'histoire de vie peut être causée par un effet toxique direct du contaminant (métaux lourds ou composés organiques) qui se révèle et s'aggrave au fil des générations exposées. Le développement, la reproduction ou la survie d'un organisme peuvent être modifiés dû aux effets toxiques aigus et/ou chroniques du contaminant. Par exemple, chez *Heterandria formosa*, l'hypothèse d'un effet toxique du cadmium a été proposée pour expliquer la plus petite taille observée à la naissance (Xie and Klerks, 2004). Dans ce cas, l'exposition au cadmium inhiberait la production de vitellogénine qui est une protéine majeure du jaune d'œuf utilisée comme source de nourriture pendant l'embryogenèse. De même, dans l'étude de Cazan and Klerks (2015), des anomalies ont été observées chez les descendants après une exposition parentale au cuivre ou au cadmium chez l'espèce *Gambusia affinis*.

Ces effets toxiques peuvent augmenter avec le temps chez les populations naturelles exposées. Par exemple, une exposition à l'uranium durant trois générations chez *Daphnia magna* entraîne une diminution importante pour la croissance et la reproduction, qui s'accroît au fur et à mesure des générations (Massarin et al., 2010). De même, Prud'homme et al. (2017) ont montré qu'une exposition à des concentrations environnementales de benzo[a]pyrène chez *Aedes aegypti* induisaient des changements des traits d'histoire de vie, s'aggravant au cours de six générations successives. Les effets toxiques peuvent également survenir après une exposition parentale et se révéler dans leur descendance. On parle alors d'effets différés sur les traits d'histoire de vie. Ce décalage entre l'exposition à l'environnement et les effets biologiques remet notamment en question l'évaluation actuelle des risques écologiques basés sur des tests sur une seule génération (Coutellec and Barata, 2013), car les effets différés peuvent profondément affecter la capacité future des populations à persister dans leur environnement (Beckerman et al., 2002; O'Connor and Cooke, 2015). En effet, de nombreuses études écotoxicologiques ont montré des altérations des traits d'histoire de vie après une exposition parentale aux contaminants dans les générations F1, notamment chez les arthropodes (Guo et al., 2013; Piironen et al., 2014; Pakyari and Enkegaard, 2015). Par exemple, chez *Chironomus riparius*, l'exposition long terme au tributylétain a montré des altérations claires des traits d'histoire de vie dans les dernières générations (retard dans l'émergence, modification de la

reproduction) alors qu'il n'y avait pas de différence dans les premières générations (Vogt et al., 2007). De même, Yu et al. (2016) ont montré un retard dans la modification des traits d'histoire de vie de *Caenorhabditis elegans* après une exposition multigénérationnelle aux métaux lourds avec une inhibition de la croissance dans la deuxième génération et une alimentation et une reproduction plus faibles seulement à partir de la troisième génération. Parfois, les effets toxiques peuvent être différés et s'aggraver au cours du temps. Par exemple, l'exposition au plomb durant plusieurs générations chez le copépode *Moina dubia* n'affecte pas la taille et la fécondité des générations F1 et F2, mais a des effets importants sur les générations F3 à F9 (Pham et al., 2021), avec une aggravation de ces effets au cours des générations. De même, les travaux de thèse de Cribiu (2020) ont permis de mettre en évidence l'existence d'effets en cascade sur les traits d'histoire de vie de *Gammarus fossarum* jusqu'à la troisième génération de descendants après des expositions parentales de 3 semaines au cadmium et à la 3,4-dichloroaniline (Cribiu et al., 2020). Ces travaux suggèrent un rôle prépondérant des compromis entre les traits d'histoire de vie et entre les générations dans l'émergence des effets différés. Ces résultats soulignent l'intérêt d'aller au-delà d'une étude monogénérationnelle même pour des temps courts d'exposition et soulignent l'intérêt de mener des études multigénérationnelles sur des espèces environnementales non modèles afin d'améliorer la compréhension des réponses populationnelles à la contamination et la pertinence écologique de l'évaluation actuelle des risques.

1.2.2. Coûts de la tolérance

Comme évoquée plus haut, une autre hypothèse évoquée pour expliquer les modifications d'histoire de vie observées dans le cas d'exposition multigénérationnelle est en lien avec les processus adaptatifs et avance que l'acquisition de tolérance à la contamination peut s'accompagner de coûts en termes de traits de fitness des individus toxicologiquement tolérants (Xie and Klerks, 2004). Par exemple, Chen et al. (2016), ont montré qu'en parallèle d'une acquisition de tolérance après exposition durant plusieurs générations au cadmium, les taux de reproduction et les tailles des daphnies (*Daphnia pulex*) sont plus faibles. D'autres études ont également montré des résultats similaires avec par exemple une baisse du taux d'alimentation

(Vigneron et al., 2015; Yu et al., 2016; Dong et al., 2020), une diminution du taux de croissance (Pane et al., 2004; Guan and Wang, 2006b; Vigneron, 2015; Yu et al., 2016), une taille à la puberté plus faible (Fisker et al., 2011; Martins et al., 2017) ou encore une fertilité (nombre d'embryons par femelle) dépréciée (Guan and Wang, 2006b; Yu et al., 2016; Martins et al., 2017). Théoriquement, les coûts de tolérance peuvent se rencontrer peu importe que la tolérance soit liée à une adaptation génétique ou à de l'acclimatation. Cette corrélation négative entre tolérance toxicologique et traits de performance individuelle peut s'expliquer alors par une réallocation de l'énergie vers les mécanismes permettant la tolérance, au détriment de l'énergie normalement allouée à la reproduction ou encore à la croissance (Xie and Klerks, 2004). En l'absence du contaminant, les organismes résistants sont alors moins aptes (par exemple ont une fertilité plus faible) par rapport à des organismes non adaptés de la même espèce (Posthuma and Van Straalen, 1993; Xie and Klerks, 2003).

La tolérance à un contaminant peut ainsi augmenter la vulnérabilité populationnelle aux effets négatifs d'autres facteurs environnementaux (Dallinger and Höckner, 2013). Par exemple, des lignées de l'espèce de poisson *Heterandria formosa* tolérantes au cadmium se montrent plus sensibles à des hausses de température que le groupe contrôle non tolérant au cadmium (Xie and Klerks, 2003). De même, une augmentation de la sensibilité au stress thermique a été rapportée chez l'espèce *Gammarus pulex* tolérante au pesticide clothianidin (Siddique et al., 2021) ou encore chez l'espèce *Daphnia magna* tolérante au cadmium (Kimberly and Salice, 2015). D'autre part, on observe parfois une augmentation de la vulnérabilité aux stress chimiques. Vogt et al. (2010) ont par exemple montré qu'après une préexposition au tributylétain (TBT) chez l'espèce *Chironomus riparius*, les organismes étaient plus sensibles à un stress cadmique.

1.2.3. Adaptation des histoires de vie des populations

Des modifications des traits d'histoire de vie non liées à l'acquisition de tolérance et non liées aux effets toxiques directs des contaminants peuvent également se produire au sein de populations exposées à la contamination. Des modifications qui ont une valeur adaptative peuvent en effet survenir par des processus évolutifs de sélection des histoires de vie en milieu

toxique (Posthuma and Van Straalen, 1993; Cameron et al., 2013). Ces modifications peuvent concerner l'âge ou la taille à la première reproduction, la fertilité, la croissance, la taille des juvéniles ou encore la taille maximum atteint à l'âge adulte et peuvent aller dans le sens d'une augmentation ou d'une diminution. Alors que la sélection des histoires de vie est un cadre de réflexion incontournable de la biologie des populations et de la compréhension de l'adaptation des espèces aux contraintes environnementales en écologie (Stearns, 1992), ces effets sont encore peu considérés comme potentiellement adaptatifs en écotoxicologie. Ces processus évolutifs aujourd'hui sont pourtant reconnus comme pouvant se mettre en place sur des temps courts (par exemple, adaptation au changement climatique (Bradshaw and Holzapfel, 2006), à la pression de pêche (Jørgensen et al., 2007), à la prédation (Darimont et al., 2009)). Par défaut, en écotoxicologie, ces modifications sont la plupart du temps interprétées comme étant la manifestation de coûts associés à l'acquisition d'une tolérance toxicologique au contaminant. Pourtant, des auteurs ont suggéré que ces modifications peuvent constituer un mécanisme de tolérance par lui-même chez les populations contrebalançant les effets négatifs d'une exposition à la contamination toxique. Ce type de modifications en réponse au stress chimique par l'adaptation de l'histoire de vie à l'environnement toxique a par exemple été proposé pour l'isopode terrestre *Porcellio scaber* par Donker et al. (1993). Chez cette espèce, les auteurs ont montré que les populations exposées et adaptées au stress chimique présentent une reproduction précoce et une allocation reproductive accrue par rapport aux individus naïfs. De même, chez *Daphnia longispina* exposés au cuivre, il a été observé que les lignées tolérantes à ce métal présentant un taux de survie deux fois supérieur, se reproduisent 3 jours plus tôt, grandissent 20 % plus vite et produisent 3 descendants de plus par jour par rapport aux individus non tolérants de la même espèce (Agra et al., 2011). Une adaptation des histoires de vie a également été proposée chez l'isopode aquatique *Asellus aquaticus* par Maltby (1991) en milieu contaminé par les métaux. Ainsi, grâce à l'acquisition d'une nouvelle stratégie, les populations sont capables de maintenir en milieu contaminé des taux de croissance démographique permettant leur persistance.

Tableau I-2 : Etudes écotoxicologiques sur la modification de la sensibilité toxicologique chez les organismes exposés aux contaminants.

Espèce	Milieu de vie	Type de contamination ou stress	Source d'exposition	Concentration, fenêtre et durée d'exposition au laboratoire	Nombre de générations suivies	Type de réponse évolutive (adaptation/acclimatation)	Référence
Espèces animales							
Crustacé							
Individus naifs exposés au laboratoire							
<i>Gammarus pulex</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Cd : 20 et 50 µg/L Zn : 200 et 300 µg/L 24h – Adultes	-	Acclimatation physiologique	Stuhlbacher and Maltby, 1992
<i>Palaeomonetes pugio</i>	Aquatique Milieu marin	Métaux	Labo	Cd : 50 µg/L Hg : 20 µg/L 7 jours - Adultes	-	Acclimatation	Khan et al., 1988
<i>Tigriopus californicus</i>	Aquatique Milieu marin	Métaux	Labo	Cu : 13.74 µg/L TBTO : 0.15 µg/L Continue – F0 à F12	12	Acclimatation (Cu) Adaptation (TBTO)	Sun et al., 2014
<i>Daphnia pulex</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Cd : 10 µg/L Continue – F0 à F25	25	Acclimatation physiologique	Chen et al., 2016
<i>Daphnia pulex</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Cd : 1 µg/L Continue – F0 à F50	50	Acclimatation	Shaw et al., 2019
<i>Daphnia magna</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Cd : 1 – 5 µg/L 21 jours – F0 à F2	2	Acclimatation	Bodar et al., 1990
<i>Daphnia magna</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Cd : 3 µg/L Continue – F0 à F6	6	Acclimatation	Guan and Wang, 2006b
<i>Daphnia magna</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Cd : 40 – 100 µg/L Pulse 6h – F0 et F1	1	NA, possible acclimatation	Li et al., 2016
<i>Daphnia magna</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Zn : 3 – 800 µg/L Continue – F0 à F10	10	NA, possible acclimatation	Muyssen and Janssen, 2001
<i>Daphnia magna</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Hg : 2.5 – 25 nM 4 jours – Adultes (F0) 28 jours – F1 et F2	2	Plasticité développementale et/ou effets parentaux	Tsui and Wang, 2005
<i>Daphnia magna</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Parents pré-exposés (F0) Cu : 21 µg/L Continue – F1 et F2	3	Effets parentaux	Jeremias et al., 2022
<i>Daphnia magna</i>	Aquatique Eau douce	Métaux, stress thermique et organique	Labo	Concentration inconnue Exposition continue sur F0	4	Effets parentaux	Feiner et al., 2022

Espèce	Milieu de vie	Type de contamination ou stress	Source d'exposition	Concentration, fenêtre et durée d'exposition au laboratoire	Nombre de générations suivies	Type de réponse évolutive (adaptation/acclimatation)	Référence
Espèces animales							
<i>Physa pomilla</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Cd : 2 ou 20 µg/L 7 jours – Adultes (F0) Stade œuf – F1 (2 µg/L)	1	Plasticité développementale et/ou effets parentaux	Plautz and Salice, 2013
	Aquatique Eau douce	Stress prédation Métaux + organique	Labo	Stress : prédation 12 semaines – Jeunes (F0)	1	Effets parentaux	Plautz et al., 2013
	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Cd : 25 – 400 µg/L 8 semaines – Adultes (F0) 6 semaines – F1 (25 – 100 µg/L)	1	Sélection des parents (génétique) ou effets parentaux (plastiques)	Reátegui-Zirena et al., 2017
<i>Gambusia affinis</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Cu : 9.53 µg/L Cd : 16.86 µg/L 10 jours – Adultes (F0)	1	Effets parentaux (maternel)	Cazan and Klerks, 2015
	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Cd : 500 µg/kg 1 injection sous-cutanée – Adultes (F0)	1	Effets parentaux (maternel)	Lin et al., 2000
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Cd : 1000 mg/kg 1 injection sous-cutanée – Adultes (F0)	1	Effets parentaux (maternel)	Wu et al., 2008
	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Cu : 150 µg/L 8 jours – Adultes (F0)	1	Effets parentaux (maternel)	Sellin and Kolok, 2006
<i>Heterandria formosa</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Labo	Cd : 6 mg/L NA – F0 à F6	6	Adaptation génétique	Xie and Klerks, 2003
<i>Anopheles gambiae</i>	Aquatique (larve) Eau douce	Métaux	Labo	Sélection des individus vivants après une exposition aigue au Cd	5	Adaptation génétique	Mireji et al., 2010
<i>Chironomus riparius</i>	Aquatique (larve) Eau douce	Métaux	Labo	Cd : 0.04 – 18 µg/L Continue – F0 à F9	9	NA	Postma and Davids, 1995
<i>Spodoptera exigua</i>	Aquatique, Terrestre	Métaux	Labo	Nourriture, Zn : 200 µg dw / Cd : 44 mg dw Continue – F0 à F11	F11	NA	Kafel et al., 2014
Individus naïfs exposés au laboratoire							

Espèce	Milieu de vie	Type de contamination ou stress	Source d'exposition	Concentration, fenêtre et durée d'exposition au laboratoire	Nombre de générations suivies	Type de réponse évolutive (adaptation/acclimatation)	Référence
Espèces animales							
Crustacé							
Individus exposés dans leur environnement							
<i>Daphnia longispina</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Naturel (géochimique)	-	-	Adaptation génétique	Agra et al., 2011
<i>Daphnia longispina</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Naturel (géochimique)	-	5	Adaptation génétique	Lopes et al., 2004, 2006
<i>Daphnia longispina</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Naturel (géochimique)	-	-	Adaptation génétique	Martins et al., 2005
<i>Acartia clausi</i>	Aquatique Milieu marin	Métaux	NA	-	-	Acclimatation	Luoma et al., 1983
<i>Allochrestes compressa</i>	Aquatique Milieu marin	Métaux	Industriel, urbain	Cu : 50 – 250 µg/L 10 jours - Adultes	-	NA	Dong et al., 2020
<i>Ucides cordatus</i>	Aquatique Milieu marin	Métaux	Industriel	Cd : 2.2 µg/L 28 jours - Adultes	-	NA	Duarte et al., 2019
<i>Amphibalanus variegatus</i>	Aquatique Milieu marin	Métaux	Industriel	-	-	NA	Gall et al., 2013
<i>Hyalella azteca</i>	Aquatique Eau douce	Organique	Agriculture	-	-	Adaptation génétique	Heim et al., 2018
<i>Hyalella azteca</i>	Aquatique Eau douce	Organique	Agriculture	-	-	Adaptation génétique	Major et al., 2020
<i>Hyalella azteca</i>	Aquatique Eau douce	Organique	Agriculture	-	-	Adaptation et acclimatation	Fung et al., 2021
<i>Hyalella azteca</i>	Aquatique Eau douce	Organique	Agriculture, urbain	-	-	Adaptation génétique	Gamble et al., 2023
<i>Gammarus pulex</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Industriel	-	-	Acclimatation	Maltby and Crane, 1994

Espèce	Milieu de vie	Type de contamination ou stress	Source d'exposition	Concentration, fenêtre et durée d'exposition au laboratoire	Nombre de générations suivies	Type de réponse évolutive (adaptation/acclimatation)	Référence
Espèces animales							
Individus exposés dans leur environnement							
<i>Gammarus pulex</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Naturel (géochimique)	-	-	Adaptation génétique	Khan et al., 2011
<i>Gammarus pulex</i>	Aquatique Eau douce	Organique	Agriculture	-	-	Adaptation génétique	Shahid et al., 2018a
<i>Gammarus pulex</i>	Aquatique Eau douce	Organique	Agriculture	-	-	NA	Becker et al., 2020
<i>Gammarus pulex</i>	Aquatique Eau douce	Organique	Agriculture	-	-	Acclimatation	Siddique et al., 2021
<i>Gammarus fossarum</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Naturel (géochimique)	-	3 cohortes	Effets parentaux (maternel)	Vigieron et al., 2019, 2016, 2015
Macrobenthos	Aquatique Milieu marin	Métaux	Industriel	-	-	NA	Oguma and Klerks, 2017
<i>Dreissena polymorpha</i> <i>Dreissena rostriformis</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Industriel	-	-	NA	Potet et al., 2018
<i>Macoma balthica</i>	Aquatique Milieu marin	Métaux	NA	-	-	Acclimatation	Luoma et al., 1983
<i>Crassostrea sikamea</i>	Aquatique Milieu marin	Métaux	Industriel	-	-	Effets parentaux (maternel)	Weng and Wang, 2014
<i>Catostomus commersoni</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	NA	-	-	Effets parentaux (maternel)	Munkittrick and Dixon, 1988
<i>Gambusia affinis</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Industriel	-	-	Acclimatation	Klerks and Lentz, 1998
<i>Chironomus riparius</i>	Aquatique (larve) Eau douce	Métaux	Naturel	-	1	Adaptation génétique	Groenendijk et al., 2002

Espèce	Milieu de vie	Type de contamination ou stress	Source d'exposition	Concentration, fenêtre et durée d'exposition au laboratoire	Nombre de générations suivies	Type de réponse évolutive (adaptation/acclimatation)	Référence
Espèces animales							
<i>Chironomus riparius</i>	Aquatique (larve) Eau douce	Métaux	Industriel	Cd : 12 - 400 µg/L 28 jours – œufs, larves	6	NA	Pedrosa et al., 2017a
	Aquatique (larve) Eau douce	Métaux	Industriel, urbain	-	-	Plasticité	Pedrosa et al., 2017b
<i>Orchesella cincta</i>	Terrestre	Métaux	Miniers	-	-	Adaptation (sélection)	Timmermans et al., 2005
<i>Stenacron interpunctatum</i>	Terrestre	Organique	Agriculture	-	-	NA	Rackliffe and Hoverman, 2022
<i>Lumbricus rubellus</i>	Terrestre	Métaux	Miniers	-	-	Adaptation et acclimatation	Kille et al., 2013
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	Industriel	-	-	Adaptation génétique	Wallace et al., 1998
<i>Dendrobaena octaedra</i>	Terrestre	Métaux	Industriel	-	-	Adaptation génétique	Fisker et al., 2013
<i>Dendrobaena octaedra</i>	Terrestre	Métaux	Industriel, naturel	-	-	Acclimatation	Rozen, 2006
<i>Nematostella vectensis</i>	Aquatique Milieu marin	Stress thermique	NA	-	-	Effets parentaux (maternel)	Rivera et al., 2021
<i>Anaxyrus terrestris</i>	Aquatique / Terrestre	Métaux	Industriel	-	-	NA	Flynn et al., 2019
Espèces végétales							
<i>Agrostis capillaris</i>	Terrestre	Métaux	Miniers	-	-	Adaptation	Wilson, 1988

Individus exposés dans leur environnement

Espèce	Milieu de vie	Type de contamination ou stress	Source d'exposition	Concentration, fenêtre et durée d'exposition au laboratoire	Nombre de générations suivies	Type de réponse évolutive (adaptation/acclimatation)	Référence
Espèces végétales							
<i>Juncus acutus</i>	Terrestre	Métaux	Naturel	-	1	Acclimatation Effets maternels	Alam et al., 2023
<i>Erigeron canadensis</i>	Terrestre	Métaux	Labo	Cd : 0.27 mg/kg	-	Adaptation	Gan et al., 2022

Tableau I-3 : Etudes écotoxicologiques sur la modification des traits d'histoire de vie chez les organismes exposés aux contaminants (en relation ou non avec la tolérance toxicologique).

Espèce	Milieu de vie	Type et source de contamination	Nombre de générations suivies	Apparition des effets	Traits impactés	Tolérance ?	Type de réponse	Référence
<i>Daphnia magna</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	14	Dès la F0	↗ Age à la 1 ^{ère} reproduction ↘ Croissance ↘ Reproduction	N	Effets toxiques	Kimberly and Salice, 2015
<i>Daphnia magna</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	2	Dès la F0 + effets différés (F1)	↘ Croissance ↘ Reproduction ↘ Poids (F1)	NA	Effets toxiques	Pane et al., 2004
<i>Daphnia magna</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	3	Dès la F0, aggravation avec le temps	↘ Croissance ↘ Reproduction ↘ Taille maximale	N	Effets toxiques	Massarin et al., 2010
<i>Daphnia magna</i>	Aquatique Eau douce	Température Labo	1	F1	↘ Taille à la 1 ^{ère} reproduction ↘ Reproduction	NA	Effets toxiques	Betini et al., 2020
<i>Daphnia pulex</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	25	F1	↘ Taille ↘ Reproduction	O	Coût de tolérance	Chen et al., 2016
<i>Daphnia pulex</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	50	-	↘ Taux de natalité ↘ Age à la 1 ^{ère} reproduction	O	Coût de tolérance	Shaw et al., 2019
<i>Daphnia magna</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	10	-	↘ Taille	O	Coût de tolérance	Muyssen and Janssen, 2001
<i>Daphnia magna</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	6	-	↘ Croissance ↘ Reproduction	O	Coût de tolérance	Guan and Wang, 2006b
<i>Tigriopus californicus</i>	Aquatique Milieu marin	Métaux Labo	5	Dès la F0	↘ Reproduction	NA	Effets toxiques	H. Li et al., 2015
<i>Pseudodiaptomus annandalei</i>	Aquatique Milieu marin	Métaux Labo	1	Dès la F0	↘ Temps de croissance ↘ Survie ↘ Reproduction	NA	Effets toxiques	Kadiene et al., 2019
<i>Pseudodiaptomus annandalei</i>	Aquatique Milieu marin	Métaux, température Labo	7	F1, aggravation avec le temps	↘ Reproduction ↘ Taille ↘ Alimentation	NA	Effets toxiques	Dinh et al., 2021
<i>Pseudodiaptomus annandalei</i>	Aquatique Milieu marin	Métaux Labo	10	Dès la F0 + effets différés (F9)	↗ Reproduction ↘ Taille (F9)	NA	Effets toxiques	Kadiene et al., 2022
Crustacé								
Individus naïfs exposés au laboratoire								

Espèce	Milieu de vie	Type et source de contamination	Nombre de générations suivies	Apparition des effets	Traits impactés	Tolérance ?	Type de réponse	Référence
<i>Moina dubia</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	9	F3 Effets différés et aggravation	↘ Taille (F3 – F9) ↘ Reproduction (F3 – F9)	NA	Effets toxiques	Pham et al., 2021
<i>Chironomus riparius</i>	Aquatique (larve) Eau douce	Métaux Labo	8	Dès la F0	↗ Temps émergence ↘ Taille à la naissance	NA	Sélection	Beaudouin et al., 2012
<i>Chironomus riparius</i>	Aquatique (larve) Eau douce	Métaux	9	F1	↘ Croissance ↘ Survie ↘ Reproduction puis ↗ (F9)	O	Coût tolérance + adaptation histoire de vie	Postma and Davids, 1995
<i>Chironomus riparius</i>	Aquatique (larve) Eau douce	Organique Labo	11	F1	↗ Temps émergence ↘ Reproduction puis ↗	NA	Effets toxiques + adaptation histoire de vie ?	Vogt et al., 2007
<i>Paronychiurus kimi</i>	Terrestre	Organique Labo	-	-	↘ Reproduction	NA	Effets toxiques	Choi et al., 2008
<i>Sinella curviseta</i>	Terrestre	Métaux Labo	-	-	↗ Nombre jeunes produits ↘ Reproduction ↘ Croissance	NA	Effets toxiques	Xu et al., 2009
<i>Aedes aegypti</i>	Terrestre	Organique Labo	6	F1 Aggravation des effets	↘ Survie ↘ Temps émergence ↘ Reproduction	NA	Effets toxiques	Prud'homme et al., 2017
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Terrestre	Organique Labo	1	F1	↘ Poids	NA	Effets toxiques	Piironen et al., 2014
<i>Plutella xylostella</i>	Terrestre	Organique Labo	1	Dès la F0	↘ Temps développement ↘ Reproduction ↘ Poids	NA	Effets toxiques	Guo et al., 2013
<i>Scolothrips longicornis</i>	Terrestre	Organique Labo	1	Dès la F0	↘ Reproduction ↘ Survie	NA	Effets toxiques	Pakyari and Enkegaard, 2015
<i>Drosophila melanogaster</i>	Terrestre	Métaux Labo	5	F1	↘ Reproduction ↘ Survie	NA	Effets toxiques	Yang et al., 2020
Crustacé		Hexapode						
Individus naîfs exposés au laboratoire								

Chapitre I : Nature et conséquences des processus évolutifs en réponse à des expositions long terme à la contamination chez les populations d'invertébrés aquatiques

Espèce	Milieu de vie	Type et source de contamination	Nombre de générations suivies	Apparition des effets	Traits impactés	Tolérance ?	Type de réponse	Référence			
<i>Theodoxus fluviatilis</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	-	-	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Croissance ↳ Fécondité ↳ Mortalité 	NA	Effets toxiques	Bighiu et al., 2017			
<i>Planorbis cornuus</i>	Aquatique Eau douce	Composé inorganique Labo	1	Dès la F0	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Croissance (F0, F1) ↳ Age à la 1^{ère} reproduction (F1) ↳ Production œuf (F0), ↗ (F1) 	O	Effets toxiques ? Coût de tolérance ?	Mazūran et al., 2022			
<i>Planorbis pilsbryi</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	2	Dès la F0	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Reproduction 	N	Effets toxiques	Osborne et al., 2020			
<i>Biomphalaria glabrata</i>	Aquatique Eau douce	Stress prédation Labo	1	Dès la F0	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Reproduction ↳ Taille 	O	Coût de tolérance	Plautz et al., 2013			
<i>Lymnaea stagnalis</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	1	Dès la F0	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Reproduction ↳ Croissance 	O	Coût de tolérance (lié à la détoxification)	Reátegui-Zirena et al., 2017			
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Terrestre	Métaux Labo	4	F2	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Croissance (F2, F3) ↳ Reproduction (F3) ↳ Alimentation (F3) 	O	Effets toxiques	Yu et al., 2016			
<i>Gambusia affinis</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	1	F1	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Taille à la naissance (F1) 	O	Effets toxiques	Cazan and Klerks, 2015			
<i>Heterandria formosa</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	6	-	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Age à la 1^{ère} reproduction ↳ Fécondité ↳ Taille à la naissance ↳ Survie 	O	Coût de tolérance + effets toxiques	Xie and Klerks, 2003, 2004			
<i>Ictalurus punctatus</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Labo	-	Au cours du développement	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Croissance ↳ Poids 	NA	Effet toxique	Paul and Small, 2021			
<i>Daphnia longispina</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Naturel	-	-	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Reproduction ↳ Croissance 	O	Coût de tolérance	Agra et al., 2011			
<i>Daphnia longispina</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Naturel	-	-	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Taille à la 1^{ère} reproduction ↳ Croissance ↳ Reproduction 	N	Effet toxique	Martins et al., 2017			
Individus naifs exposés au laboratoire											
Gastéropode			Annéli de			Poisson			Crustacé		

Espèce	Milieu de vie	Type et source de contamination	Nombre de générations suivies	Apparition des effets	Traits impactés	Tolérance ?	Type de réponse	Référence
<i>Allochestes compressa</i>	Aquatique Milieu marin	Métaux Naturel	-	-	↳ Alimentation	O	Coût de tolérance	Dong et al., 2020
<i>Gammarus fossarum</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Naturel	-	-	↳ Alimentation	O	Coût de tolérance	Vigneron et al., 2015
<i>Asellus aquaticus</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Industriel	-	-	↗ Taille à la naissance ↗ Investissement reproductif	NA	Adaptation histoire de vie	Maltby, 1991
<i>Porcellio scaber</i>	Terrestre	Métaux Naturel	2	-	↳ Age à la 1ère reproduction ↳ Reproduction	NA	Adaptation histoire de vie	Donker et al., 1993
<i>Porcellio scaber</i>	Terrestre	Métaux Industriel	-	-	↳ Survie ↳ Taille	NA	Réallocation énergie	Jones and Hopkin, 1998
<i>Porcellio laevis</i>	Terrestre	Métaux Industriel	-	-	↳ Reproduction ↳ Taille	NA	Effets toxiques	Ghemari et al., 2019
<i>Chironomus riparius</i>	Aquatique (larve) Eau douce	Métaux Industriel	1	-	↳ Croissance	O	Effets toxiques	Groenendijk et al., 2002
<i>Chironomus riparius</i>	Aquatique (larve) Eau douce	Métaux Industriel	-	-	↗ Temps développement	O	Coût de tolérance	Postma et al., 1995
<i>Orchesella cincta</i>	Terrestre	Métaux Industriel	-	-	↳ Age à la 1ère reproduction ↗ Fertilité	O	Coût de tolérance ?	Posthuma et al., 1993
<i>Orchesella cincta</i>	Terrestre	Métaux Industriel	-	-	↳ Croissance	O	Coût de tolérance ? Effets toxiques ?	Roelofs et al., 2009
<i>Drosophila subobscura</i>	Terrestre	Métaux Industriel, urbain	8	-	↳ Reproduction ↗ Temps développement	NA	Effets toxiques ? Coût de tolérance ?	Kenig et al., 2013
<i>Pardosa saltans</i>	Terrestre	Métaux	-	-	↳ Taille ↳ Fertilité Retard de la période de reproduction	NA	Réallocation énergie à la reproduction	Eraly et al., 2011
		Crustacé						
		Hexapode						
Individus exposés dans leur environnement								

Espèce	Milieu de vie	Type et source de contamination	Nombre de générations suivies	Apparition des effets	Traits impactés	Tolérance ?	Type de réponse	Référence
<i>Dendrobaena octaedra</i>	Terrestre	Métaux Industriel	1	-	<ul style="list-style-type: none"> ↗ Croissance ↗ Reproduction ↘ Survie ↘ Age à la 1^{ère} reproduction 	NA	Adaptation histoire de vie	Fisker et al., 2011
<i>Dendrobaena octaedra</i>	Terrestre	Métaux Industriel, naturel	1	-	<ul style="list-style-type: none"> ↗ Reproduction ↗ Survie 	O	Adaptation histoire de vie	Rozen, 2006
<i>Anaxyrus terrestris</i>	Aquatique Eau douce	Métaux Industriel	-	-	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Taille à la naissance 	O	Coût de tolérance ?	Flynn et al., 2019
<i>Catostomus commersoni</i>	Aquatique Eau douce	Métaux	-	-	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Croissance ↘ Survie sans nourriture ↗ Temps de développement 	O	-	Munkittrick and Dixon, 1988
Annélide		Amphibien		Poisson				
Individus exposés dans leur environnement								

2. Tolérance et gestion du contaminant chez les arthropodes : le cas particulier des éléments traces métalliques

2.1. Mécanismes de gestion des métaux

La contamination de l'environnement par les métaux est devenue une préoccupation majeure. En effet, l'exposition aux ions métalliques, notamment au cadmium, au plomb, au mercure ou au nickel (considérés comme métaux « non essentiels ») peut entraîner une toxicité élevée chez les organismes dû à leur bioaccumulation dans les tissus, potentiellement transmissible à d'autres espèces via la chaîne trophique. D'autres ions métalliques tels que ceux du fer, du zinc ou du cuivre, sont des métaux essentiels car ils sont nécessaires en tant que cofacteurs dans un certain nombre de protéines et d'enzymes. Toutefois, ces derniers peuvent exercer des effets toxiques lorsqu'ils sont présents à des concentrations élevées. Ainsi, un certain nombre de mécanismes de défense moléculaire contribuent à la réponse des organismes face à l'exposition aux métaux et à leur toxicité. Lors d'une exposition, les éléments métalliques sont internalisés dans l'organisme et forment rapidement des complexes avec des ligands cytosoliques, grâce notamment à leur affinité pour les groupements thiols. Le métal internalisé est alors soit, (1) métaboliquement disponible et exerce une toxicité en se fixant sur des molécules essentielles au fonctionnement cellulaire (enzymes, acides nucléiques), soit (2) est détoxifié sous forme inerte, puis stocké ou excrété (Ahearn et al., 2004a). Tous les organismes possèdent des mécanismes de détoxification qui agissent à travers des processus de séquestration/complexation afin de limiter la disponibilité intracellulaire des métaux, et ainsi, limiter leur potentiel toxique. À l'échelle de l'organisme, ils sont accumulés différenciellement entre les divers tissus. Par exemple, les travaux de Gestin (2022) ont permis de mettre en évidence la cinétique de bioaccumulation des métaux (notamment cadmium et zinc) dans les organes de l'espèce *Gammarus fossarum*. Chez cette espèce, il a été montré que l'intestin jouait un rôle central dans l'accumulation, la distribution et l'élimination des métaux, que les caeca sont des organes hyper-accumulateurs jouant une fonction principale de stockage et que les branchies ont un rôle important dans l'accumulation et le stockage des métaux. À la suite de l'accumulation des métaux dans les organes, une compartimentation interne du métal se produit au niveau cellulaire, les métaux peuvent être retrouvés (1) dans *la fraction cellulaire cytosolique* (fraction dite « soluble ») et potentiellement associés à des oligomères de glutathion

tels que des **phytochelatines (PC)** ou des protéines telles que des **métalloprotéines (MT)** ou (2) dans *la fraction insoluble* et associés à des organelles cellulaires comme les **lysosomes**, les **mitochondries**, le **réticulum endoplasmique** ou encore associés à **des granules insolubles (MRG, metal rich granules)** (Wallace et al., 2003; Otero-Fariña et al., 2022). Dans cette partie, nous nous focaliserons principalement sur les mécanismes de gestion des métaux documentés chez les arthropodes.

2.1.1. Les métallothionéines (MTs)

Les métallothionéines sont considérées comme les principaux agents de défense des invertébrés pour séquestrer les métaux, en particulier chez les crustacés (Duarte et al., 2019). Historiquement, les métallothionéines ont été découvertes dans le tissu du cortex rénal du cheval en 1957 par Margoshes et Vallee (Janssens et al., 2009). Depuis, les métallothionéines ont largement été étudiées et il a été montré que ces protéines sont présentes dans de nombreuses branches de l'arbre phylogénétique, des microorganismes à l'homme. Elles sont par conséquent considérées comme un élément central du métabolisme des métaux (Ziller and Fraissinet-Tachet, 2018). Les métallothionéines sont des protéines non-enzymatiques très conservées de faible poids moléculaire, à forte teneur en cystéine (> 30%), dépourvues d'acides aminés aromatiques et présentant une bonne stabilité thermique. En fonction de leur séquence primaire en acides aminés, les métallothionéines sont des protéines très hétérogènes. La plupart de ces protéines ont une longueur comprise entre 24 et 85 acides aminés, mais celles-ci peuvent atteindre des longueurs de plus de 300 acides aminés chez certaines espèces (Ziller and Fraissinet-Tachet, 2018). La principale caractéristique des métallothionéines est qu'elles possèdent un pourcentage élevé de cystéine (15 à 33% de résidus cystéines par protéine) alors que l'on retrouve en moyenne des pourcentages d'environ 2% dans la majorité des protéines. C'est grâce aux résidus cystéines que les métallothionéines peuvent lier les ions métalliques. En général, il y a deux domaines de liaisons aux métaux par protéine (Janssens et al., 2009; Aly et al., 2014; Ziller and Fraissinet-Tachet, 2018). En l'absence de métaux, la protéine ne forme pas une véritable structure secondaire mais adopte une conformation compacte avec quelques cystéines sur la surface extérieure. La structure tertiaire est acquise lorsque les

métallothionéines sont liés à des métaux, celle-ci dépend de la nature de l'ion métallique (les métaux divalents comme le zinc et le cadmium vont lier quatre cystéines alors que les métaux monovalents comme le cuivre ou l'argent vont lier deux à trois cystéines) et dépend également du nombre de métaux liés (Ziller and Fraissinet-Tachet, 2018).

Les métallothionéines ont trois principales fonctions. Elles jouent un rôle majeur dans (1) l'homéostasie des métaux essentiels en constituant un réservoir non toxique de zinc et de cuivre disponible pour la synthèse de métallo-enzymes, (2) la détoxification des métaux lourds non essentiels en limitant leur potentiel effet toxique de façon direct par chélation et (3) la défense antioxydante en limitant les effets des radicaux hydroxyle (OH) et superoxyde (O_2^-) via la capacité réductrice des groupes thiol des cystéines (Amiard et al., 2006; Mao et al., 2012). Ces protéines ont une expression spécifique dans les différents tissus, déterminée par la présence de métaux ou de facteurs de transcription spécifiques aux tissus (Janssens et al., 2009). Les métallothionéines sont principalement retrouvés dans les caeca et les branchies des invertébrés mais également dans l'hépatopancreas (également appelé glande digestive) des vertébrés (Roesijadi, 1992). Mais elles peuvent également être retrouvées dans d'autres organes ou tissus tels que les intestins (Roesijadi, 1992; Amiard et al., 2006).

L'expression des métallothionéines est induite par l'exposition aux métaux chez de nombreuses espèces d'arthropodes, comme documenté chez les amphipodes *Gammarus locusta* (Correia et al., 2002b) et *Allorchestes compressa* (Dong et al., 2020) après une exposition au cuivre, chez *Daphnia magna* (Guan and Wang, 2006b), *Echinogammarus echinosetosus* (Martinez et al., 1996) et le collembole *Orchesella cincta* (Timmermans et al., 2005; Roelofs et al., 2009) après une exposition au cadmium, ou encore chez *Daphnia magna* (Tsui and Wang, 2005) après une exposition au mercure. On retrouve également une surexpression des métallothionéines chez d'autres espèces d'invertébrés (autres que les arthropodes), par exemple, après une exposition au cadmium chez le bivalve *Anodonta woodiana* (Y. Li et al., 2015) ou chez le gastéropode *Helix aspersa* (Hispard et al., 2008; Baurand et al., 2015) ou suite à une exposition au zinc chez les bivalves *Macoma balthica* et *Potamocorbula amurensis* (Wallace et al., 2003).

Le mécanisme le plus décrit chez les espèces animales dans la régulation des gènes des métallothionéines par les métaux lourds est médié par un facteur de transcription sensible au zinc, le MTF-1 ou MRE-binding transcription factor-1 (Grzywacz et al., 2015). Ce facteur de transcription est une protéine à doigt de zinc qui a été conservée au cours de l'évolution, des insectes aux mammifères. Les régions promotrices des gènes de métallothionéines contiennent un ensemble de sites de liaison spécifiques aux facteurs de transcription régulant la transcription basale et la transcription induite par les métaux.

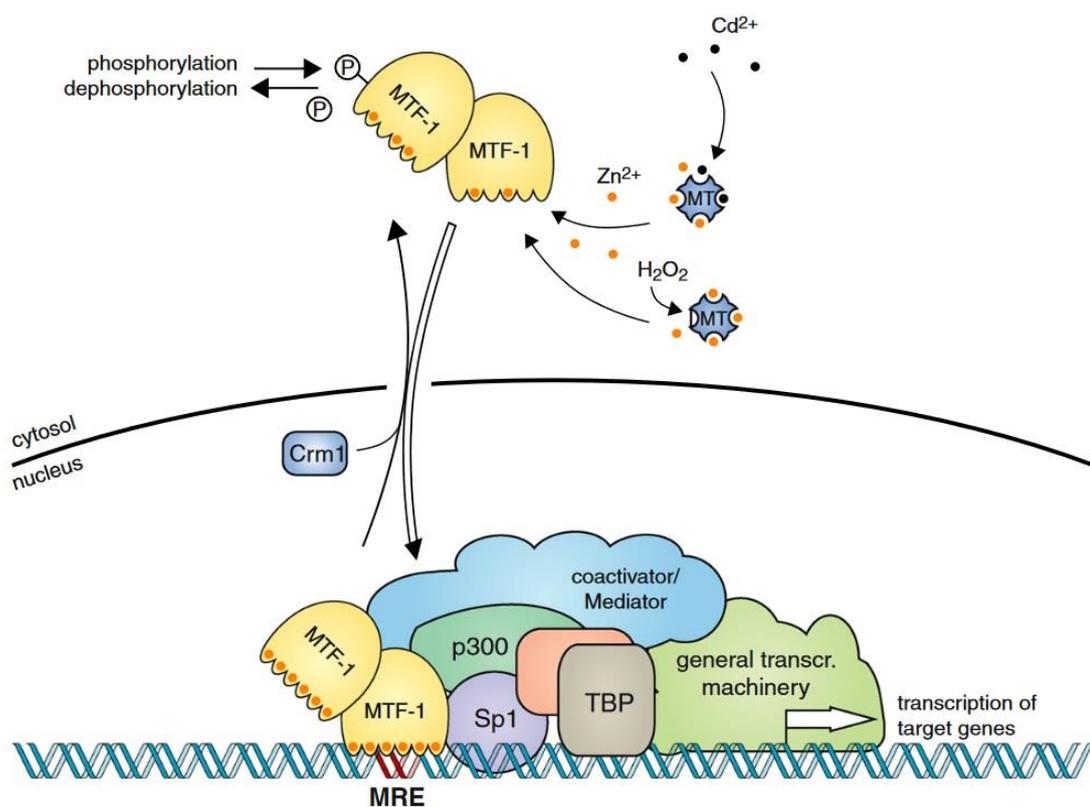


Figure I-2 : Vue d'ensemble de la régulation de MTF-1 (Extraits de Günther et al., 2012).

Au niveau des régions promotrices, le motif MRE (Metal Responsive Element) est la séquence consensus reconnue par MTF-1. Une fois activé, MTF-1 induit la synthèse des métallothionéines en allant se lier au niveau des motifs MRE (Mao et al., 2012). L'activation de MTF-1 peut se faire (1) directement par le zinc présent dans le cytoplasme, (2) par libération indirecte de zinc par les métallothionéines constitutives ou d'autres protéines (Janssens et al.,

2009; Grzywacz et al., 2015) ou (3) indirectement par la phosphorylation/déphosphorylation du facteur de transcription (Günther et al., 2012). Lors d'un stress aux métaux lourds, le zinc constitutivement lié par les métallothionéines peut être libéré soit par les protéines elles-mêmes (l'affinité de la protéine pour les métaux diminue dans la séquence hiérarchique suivante : mercure > cuivre > argent > cadmium > plomb > zinc), soit par le stress oxydatif induit par les métaux toxiques. Ainsi, MTF-1 augmente la transcription des gènes des métallothionéines par la stimulation du zinc présent en excès dans la cellule (Amiard et al., 2006; Günther et al., 2012; Grzywacz et al., 2015). Une synthèse de la régulation de MTF-1 et de la transcription des métallothionéines est présentée dans la Figure I-2. Ainsi, après séquestration des métaux par les métallothionéines, celles-ci sont éliminées à travers le système endomembranaire lysosomal.

De multiples copies de gènes et isoformes sont souvent présentes chez les organismes et diffèrent généralement dans leur affinité de liaison avec les métaux. En effet, dans certains cas, un seul gène peut coder deux isoformes ou plus par épissage alternatif. Dans d'autres cas, deux ou plusieurs gènes étroitement liés sont responsables des isoformes (Gunning and Hardeman, 2018). En ce qui concerne les métallothionéines, on retrouve plusieurs gènes codants pour différentes isoformes chez une grande variété d'espèces. Certaines isoformes sont spécifiquement induites par un seul métal et d'autres peuvent être induites par des métaux différents (Amiard et al., 2006; Janssens et al., 2009). Parmi les différentes classifications des métallothionéines proposées, celle du groupe de Silvia Atrian (Capdevila and Atrian, 2011; Palacios et al., 2011; Atrian and Capdevila, 2013) prend en considération un critère de fonction moléculaire, c'est-à-dire la préférence de chaque métallothionéine de donner lieu à des complexes homo-métalliques bien repliés lorsqu'elles lient soit des ions divalents [Zn(II) ou Cu(II)] soit des ions monovalents [Cu(I)]. Cette classification propose deux catégories de métallothionéines : les zinc-thionéines (pouvant lier des ions divalents) et les cuivre-thionéines (pouvant lier des ions monovalents) (Bofill et al., 2009; Capdevila and Atrian, 2011; Palacios et al., 2011). Pour chacune de ces catégories, plusieurs isoformes sont retrouvées avec pour chacune d'entre elles une spécificité de liaison aux métaux. Mais encore aujourd'hui, à notre

connaissance, aucune étude n'a fait la lumière sur le mécanisme permettant l'induction transcriptionnelle d'une isoforme plutôt qu'une autre en réponse à une exposition à différents métaux. Pourtant ces différences de spécificité d'induction et de liaison sont maintenant bien documentées dans les études écotoxicologiques ou en biologie moléculaire (Amiard et al., 2006; Janssens et al., 2009). La drosophile (*Drosophila melanogaster*) a par exemple fait l'objet d'une étude poussée sur la génétique des métallothionéines (Yiwen et al., 2022). Au total, six isoformes de métallothionéines ont été identifiées, notées de MTnA à MTnF. Les isoformes MTnA à MTnE sont toutes des cuivre-thionéines. Seule la MTnF est une zinc-thionéine, présentant alors une très forte affinité pour ce métal (Yiwen et al., 2022). De même, chez le crabe *Callinectes sapidus*, différentes isoformes de métallothionéines ont été décrites pour jouer des rôles physiologiques différents : deux isoformes auraient un rôle de détoxification tandis que deux autres seraient impliqués dans des fonctions de régulation (Brouwer et al., 1992). On retrouve également des études identifiant l'expression de métallothionéines spécifiques après exposition à différents métaux. Par exemple, Asselman et al. (2013) ont mis en évidence une régulation spécifique des métallothionéines en fonction de l'exposition au cuivre ou au cadmium chez *Daphnia pulex* avec l'hypothèse d'une différence de régulation liée à la configuration des éléments régulateurs sur la région du promoteur. Deux groupes de métallothionéines ont ainsi pu être identifiés. Le premier groupe qui se compose de deux isoformes appelées *mt1* et *mt3* réagissant au stress cadmique et un deuxième groupe se composant de deux autres isoformes appelées *mt2* et *mt4* et réagissant au cuivre (Asselman et al., 2013).

Dans la littérature on retrouve plusieurs hypothèses pouvant expliquer l'affinité d'une isoforme de métallothionéine pour un métal plutôt qu'un autre. Tout d'abord, cela pourrait s'expliquer par des mutations survenues au cours des duplications de la métallothionéine ayant pu influencer l'affinité de chacune des protéines pour différents types de métaux (Dallinger and Höckner, 2013). Ce qui implique que la séquence d'acides aminés d'une métallothionéine contient des déterminants qui établissent la préférence pour un type d'ion métallique donné (distribution des cystéines, nombre et type de résidus intercalant, longueurs totales des peptides) (Capdevila and Atrian, 2011; Palacios et al., 2011). Un autre mécanisme possible serait la

présence de cofacteurs différents ou l'utilisation de différentes régions du promoteur en fonction du type de métal (Egli et al., 2006; Palacios et al., 2011; Wright and Black, 2023).

Grâce à leurs caractéristiques, les métallothionéines sont des protéines jouant un rôle important dans le maintien de l'homéostasie des métaux essentiels, la détoxification des métaux non essentiels et la protection contre le stress oxydatif et les radicaux libres.

Il existe principalement deux grandes méthodes pour quantifier les métallothionéines : les méthodes directes et les méthodes indirectes. Parmi les méthodes directes on retrouve la mesure de l'expression de gènes lorsque les séquences des métallothionéines sont connues (par exemple, Wu et al., 2008, 2012; Roelofs et al., 2009; Baurand et al., 2015; Chen et al., 2016) ou la mesure par spectrométrie de masse, mais celle-ci n'étant aujourd'hui disponible que chez l'espèce humaine (Mehus et al., 2014; Gunn et al., 2021). Les méthodes indirectes (par exemple, A. Geffard et al., 2001, 2010 ; Wallace et al., 2003 ; Hispard et al., 2008 ; Dong et al., 2020) font principalement appel à des approches bioanalytique (typiquement fractionnement cellulaire suivi par chromatographie liquide à exclusion stérique) qui mesure une fraction enrichie en métallothionéine. Ces méthodes sont le plus utilisées dans les études écotoxicologiques (65% des études sur les métallothionéines recensées dans le Tableau I-4). Ces études se focalisent notamment sur la détection des métallothionéines en tant que biomarqueur. L'intérêt des méthodes indirectes consiste en leur capacité à détecter l'ensemble des formes protéique de métallothionéines qui ont une demi-vie plus longue que l'ARNm mesuré dans les méthodes directes *via* l'expression des gènes (Amiard et al., 2006). Les méthodes directes principalement par la mesure de l'expression de gène de la métallothionéine permettent une détection spécifique des différentes isoformes et une évaluation de la réponse précoce suite aux changements soudains de l'environnement (Asselman et al., 2012). En effet, comme vue précédemment, l'expression des métallothionéines est principalement contrôlé au niveau de la régulation transcriptionnelle et dépend de facteur de transcription induits par des facteurs environnementaux.

2.1.2. Les granules riches en métaux (MRG)

Les granules sont principalement retrouvés dans les cellules de l'épithélium d'organes tel que l'hépatopancréas des crustacés, où elles se présentent sous forme de vésicules ou de vacuoles liées à la membrane (Ahearn et al., 2004a). L'analyse de la composition de ces granules par microsonde à rayons X suggère qu'ils contiennent du calcium ou des cations de métaux lourds (zinc, cuivre, fer) complexés avec du soufre ou du phosphore. Ainsi, grâce à la complexation du métal potentiellement toxique avec des anions, celui-ci est retiré du cytoplasme des cellules et est séquestré dans la membrane vacuolaire sous une forme insoluble et détoxifiée. Enfin, le métal peut être rejeté dans l'environnement par des mécanismes d'excrétion (Ahearn et al., 2004a). Les métaux peuvent être détoxifiés par différents types de granules dont la composition et la localisation dépend du contaminant métallique et de l'organisme affecté (Khan et al., 2010).

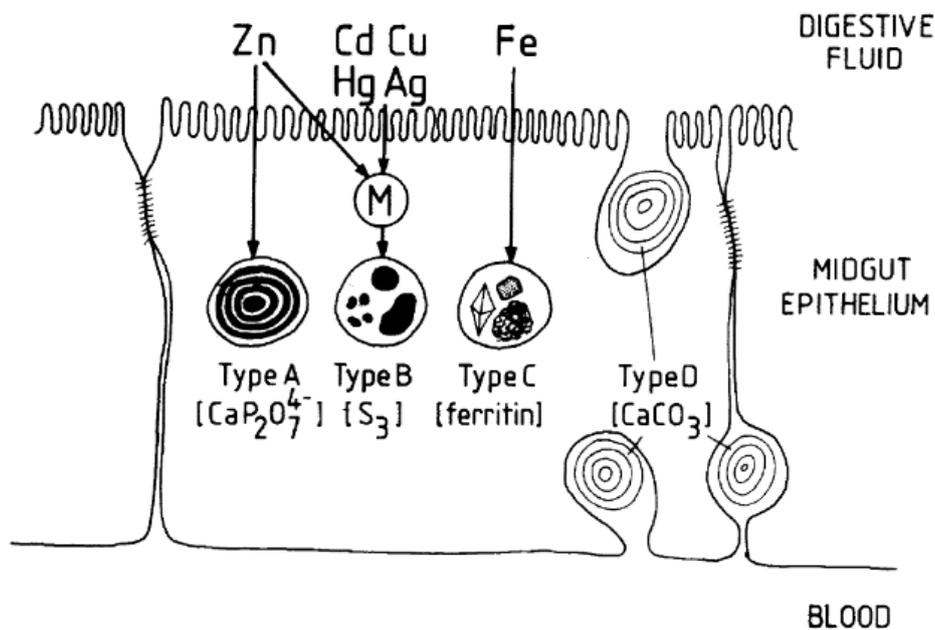


Figure I-3 : Les différents types de granules (Extraits de Ahearn et al., 2004a)

Dans la littérature trois types de granules intracellulaires sont décrites (voir Figure I-3) : les granules de type A qui sont constitués de couches concentriques de phosphates de calcium et de magnésium pouvant contenir du zinc, du manganèse ainsi que du phosphore ; les granules de type B qui sont constitués de soufre, qui ont une forme plus hétérogène et dont l'origine

viendrait de la dégradation lysosomale des métallothionéines (Ahearn et al., 2004; Nassiri et al., 2000; Rainbow, 2007) peuvent être associés à des métaux tels que le cadmium, le cuivre, le mercure et l'argent ; et les granules de type C, souvent polyédrique avec une forme cristalline, contenant principalement du fer. Enfin, un autre type de granules ont été décrites (granules de type D), ceux-ci étant extracellulaires et se formant entre le calcium et le carbonate (Ahearn et al., 2004a; Rainbow, 2007). Chez les crustacés, les granules de type A et B sont les plus fréquemment documentés (Rainbow, 2007). Par exemple, des granules de type B ont été mises en évidence après une exposition au cuivre chez *Gammarus locusta* (Correia et al., 2002a). De même chez *Orchestia gammarellus* après une exposition au zinc et au cadmium (Nassiri et al., 2000) ou chez une population naturelle de balanes *Tetraclita squamosa* exposés *in situ* (Masala et al., 2004).

2.1.3. Les phytochélatines (PCs)

Les phytochélatines, sont des oligomères de dipeptide acide glutamique-cystéine suivi par une glycine terminale de faible poids moléculaire et riches en cystéine synthétisées par voie enzymatique. Contrairement aux métallothionéines, elles ne sont pas codées génétiquement, mais sont des peptides non ribosomiques produits à partir du glutathion par l'enzyme phytochélatine-synthase (Bundy et al., 2014). Comme les métallothionéines, les phytochélatines chélatent les métaux par l'intermédiaire des groupements thiols libres présents sur les résidus cystéine et se lient donc aux ions métalliques, en particulier le cadmium, mais aussi à l'arsenic, au mercure, à l'argent, au zinc et au cuivre. Toutefois, les phytochélatines ont les mêmes affinités de liaison avec différents métaux (Bundy and Kille, 2014). À l'origine, ces peptides étaient considérés comme spécifiques aux plantes jusqu'à l'isolement récent d'un gène de phytochélatine synthase et d'un gène permettant le transport des phytochélatines chez *Caenorhabditis elegans*. Aucun gène de phytochélatine synthase n'a encore été décrit chez les arthropodes. Toutefois, une possible existence d'un gène de phytochélatine-synthase a été identifié chez le chironome *Chironomus oppositus* (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Les phytochélatines pourraient donc jouer un rôle plus important dans la gestion métallique chez les invertébrés qu'on ne le pensait jusqu'à présent.

2.1.4. Autres mécanismes existants dans la gestion des métaux

En plus des mécanismes de séquestrations des métaux décrits précédemment, certaines organelles (principalement retrouvées dans l'hépatopancréas chez les décapodes) telles que les **mitochondries**, le **réticulum endoplasmique** et les **lysosomes** permettent aussi de séquestrer les métaux lourds *via* des protéines de transport membranaire et des canaux (Sterling et al., 2007). Ainsi, lorsque les métaux lourds traversent la membrane de l'épithélium hépatopancréatique et pénètrent dans le cytoplasme des cellules de l'hépatopancréas, ils peuvent être : (1) complexés avec les métallothionéines cytoplasmiques (voir 2.1.1), (2) absorbés et séquestrés dans les mitochondries, (3) le réticulum endoplasmique, (4) les lysosomes, ou (5) exportés hors de la cellule *via* des transporteurs membranaires de l'hépatopancréas (Chavez-Crooker et al., 2003; Ahearn et al., 2004b; Sterling et al., 2007; Gerencser, 2010). Par exemple, Chavez-Crooker et al. (2003) ont mis en évidence l'existence d'un système de transport ATPase du cuivre dans les lysosomes hépatopancréatiques du homard américain (*Homarus americanus*) permettant de séquestrer les métaux dans ces organites et détoxifier la cellule.

La présence en excès de métaux lourds provoque une augmentation des espèces réactives à l'oxygène (ROS) au niveau cellulaire, incluant les anions superoxydes (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles (OH), entraînant une série de dommages oxydatifs et l'activation du système anti-oxydatif (Stohs, 1995; Quintaneiro et al., 2015; Liu et al., 2022). La **superoxyde dismutase**, la **catalase** et la **glutathion S-transférase** jouent un rôle clé dans la protection des organismes contre les espèces réactives de l'oxygène, dont les activités sont exacerbées lors d'une exposition aux métaux (Quintaneiro et al., 2015; Liu et al., 2022). Les *superoxydes dismutases* (SOD) sont d'importantes enzymes antioxydantes qui peuvent piéger les radicaux libres de l'oxygène en excès et protéger l'organisme contre les dommages oxydatifs. On retrouve principalement quatre types de SOD : la Cu/Zn-SOD, la Mn-SOD, la Fe-SOD et la Ni-SOD. Parmi ces types, la Cu/Zn-SOD est l'une des plus importantes piègeuses de radicaux libres et se trouvent principalement dans le cytoplasme et les tissus intercellulaires. Lorsque les organismes sont exposés aux métaux lourds, l'expression de la SOD est régulée à la hausse afin de maintenir les fonctions physiologiques normales et d'éliminer les radicaux

libres (Liu et al., 2022). Les *catalases* (*CAT*) sont des enzymes intracellulaires anti-oxydantes notamment impliquées dans la dégradation de l' H_2O_2 en eau (H_2O) et en oxygène (O_2) (Quintaneiro et al., 2015). Les *glutathion-S-transférases* (*GST*) sont des enzymes responsables du maintien de l'homéostasie lors de la phase II de la détoxification (la détoxification se passe en trois phases : la phase I étant la biotransformation des métaux, la phase II étant la conjugaison des métaux et la phase III étant l'élimination). En réponse au stress métallique, c'est grâce à leur groupe sulfhydryle présent sur les cystéines que les GST peuvent chélater les métaux et participer au cycle d'oxydoréduction (Jozefczak et al., 2012). Ainsi, les GST jouent un rôle contre les ROS et le stress oxydatif et sont des enzymes cruciales dans certaine voie conduisant à l'élimination des composés toxiques (Park et al., 2020).

2.2. Tolérance des populations et modulation des mécanismes de gestion des métaux

Comme vue précédemment, la détoxification des métaux peut se faire par le biais de différents mécanismes chez les arthropodes dont les principaux sont la liaison aux métallothionéines ou la précipitation des métaux dans des concrétions insolubles (MRG). Lors d'une exposition chronique aux métaux, les organismes peuvent devenir tolérants (décrit dans la partie 1.1). Cependant, les mécanismes sous-jacents à l'acquisition de cette tolérance ne sont pas encore très bien connus. La régulation de l'activité transcriptionnelle semble jouer un rôle important dans l'adaptation des organismes à l'environnement. De plus en plus d'exemples décrivant des réponses transcriptionnelles plastiques en réponse à des modifications de l'environnement (par exemple, aux variations de température, de pH ou d'oxygène) sont documentés (Janssens et al., 2009; Kelly et al., 2012). Dans cette partie, on s'intéresse à voir si les mécanismes connus de détoxification des métaux varient dans leurs niveaux d'expression (constitutivement ou en termes d'inductibilité) chez des populations tolérantes au contaminant. De nombreuses études suggèrent que le stockage interne et la détoxification des métaux par les métallothionéines et les granules riches en métaux sont associés à la tolérance accrue aux métaux et même à une résistance génétique (Wallace et al., 2003) (voir Tableau I-4).

Un exemple, peut être l'un des mieux étudiés, du rôle des métallothionéines dans la tolérance au cadmium a été décrit chez le collembole *Orchesella cincta*. Chez cette espèce, la tolérance au cadmium est en grande partie liée à la surexpression d'un gène de métallothionéine, dont la régulation transcriptionnelle dépend largement de facteurs cis-régulateurs (séquence d'ADN capable de moduler l'expression d'un gène présent sur le même chromosome) (Sterenborg and Roelofs, 2003). Les individus des populations provenant de sites contaminés par les métaux (sols miniers) présentent une expression accrue du gène de la métallothionéine par rapport aux populations de référence (Sterenborg and Roelofs, 2003; Timmermans et al., 2005; Roelofs et al., 2009). Il a notamment été montré que les individus tolérants chez cette espèce doivent leur tolérance accrue au cadmium à une expression basale plus élevée du gène de la métallothionéine plutôt qu'à une augmentation de la transcription induite par le cadmium (Timmermans et al., 2005). De même, l'implication des métallothionéines dans la tolérance aux métaux a été suggérée chez de nombreuses autres espèces d'arthropodes aquatiques. C'est le cas par exemple chez les crustacés *Allorchestes compressa* (Dong et al., 2020), *Daphnia magna* (Tsui and Wang, 2005), *Daphnia pulex* (Chen et al., 2016) et *Gammarus pulex* (Stuhlbacher and Maltby, 1992) ou encore chez les insectes *Anopheles gambiae* (Mireji et al., 2010), *Chaoborus* (Rosabal et al., 2012) et *Chironomus riparius* (Pedrosa et al., 2017b). Du fait que les métallothionéines peuvent être sensibles à différents métaux, les gènes de métallothionéines qui confèrent une tolérance à un métal sont également susceptibles de conférer une co-tolérance vis-à-vis d'autres métaux (Xie and Klerks, 2003). D'autre part, en plus de la surexpression des métallothionéines, un niveau basal de GST plus élevé peut être retrouvé chez ces populations tolérantes tel qu'observé chez l'espèce *Chironomus riparius* (Pedrosa et al., 2017b) ou *Allorchestes compressa* (Dong et al., 2020).

Cependant, la tolérance aux métaux n'est pas nécessairement uniquement associée à l'induction des métallothionéines car certaines espèces peuvent utiliser d'autres formes de détoxification pour séquestrer les métaux telles que les MRG (voir 2.1.2), le stockage des métaux dans les MRG pouvant se faire indépendamment ou en parallèle des métallothionéines. Par exemple, Brown (1977, 1978) a mis en évidence une accumulation du cuivre dans des granules chez des populations du crustacé isopode aquatique *Asellus meridanus* tolérantes à ce métal alors que ces granules n'étaient pas retrouvés chez des populations non exposées de la même espèce.

Chez l'amphipode *Orchestia gammarellus*, il a été suggéré que la tolérance au cuivre chez cette espèce marine pouvait être partiellement attribuée à la formation de granules intracellulaires dans les cellules du caeca (Weeks, 1992). De même, chez des populations naturelles du crustacé décapode *Palaemon argentinus* tolérantes au cadmium, la voie principale de détoxification se fait par complexation du cadmium dans des granules (Cd-MRG) à la différence des populations non tolérantes qui détoxifient principalement le cadmium par liaisons aux métallothionéines (Chiodi Boudet et al., 2019). La séquestration dans les granules riches en métaux serait dans ce cas plus efficace que les métallothionéines pour détoxifier le cadmium, permettant aux organismes vivants dans des milieux contaminés de mieux tolérer des niveaux élevés en cadmium. De même, dans la review de Vijver et al. (2004), différents exemples suggèrent que les granules seraient responsables de la tolérance lors d'une exposition long terme au cadmium tandis que les métallothionéines agiraient principalement lors d'exposition à court terme. Chez d'autres espèces, les mécanismes de détoxifications ne semblent pas être impliqués dans la tolérance des populations. Par exemple, Khan et al. (2011) n'ont montré aucune différence en lien avec des tolérances différentielles lors d'exposition dans un milieu contaminé en cuivre et zinc, dans les niveaux de compartimentation subcellulaire de ces métaux (fractions contenant métallothionéines ou MRG) entre deux populations de l'amphipode *Gammarus pulex*, une naïve et une *a priori* historiquement exposée à ces métaux dans son milieu d'origine.

Malgré le fait que les mécanismes de détoxification puissent être responsables de la tolérance aux métaux chez les organismes, le rôle potentiel de ces mécanismes (*e.g.* métallothionéines, MRG) dans le transfert de la tolérance à la descendance reste rarement étudié. Au-delà des arthropodes, on recense tout de même quelques travaux étudiant si la tolérance observée au cours de différentes générations est bien liée à la transmission de tels mécanismes, notamment chez les bivalves ou les poissons. Weng and Wang (2014) ont étudié la tolérance au zinc et au cuivre des descendants produits par quatre populations naturelles d'huîtres de l'espèce *Crassostrea sikamea* exposées à différents gradients de contamination. Dans cette étude, les auteurs ont observé une élévation de la synthèse des métallothionéines dans les œufs probablement due aux métaux transférés par la mère. Ce serait l'un des mécanismes possibles

responsables de la tolérance accrue aux métaux observée chez les embryons et les larves d'huîtres nés de parents provenant de sites fortement contaminés. Une hypothèse similaire a également été proposée chez deux espèces de poissons, *Oreochromis mossambicus* et *Danio rerio*, où le transfert d'ions métalliques maternels induirait l'expression des métallothionéines chez la descendance et serait alors responsables de l'augmentation de la tolérance au cadmium observée chez la descendance (Wu et al., 2008, 2012).

Chez les arthropodes, seules deux études étudiant les mécanismes de détoxification au cours du transfert de la tolérance à la descendance ont pu être recensées. Tsui and Wang (2005) chez *Daphnia magna* montrent que la tolérance au mercure héritée chez les nouveau-nés de première génération (F1) n'est pas due au transfert de métallothionéines puisque les niveaux de métallothionéines à la naissance étaient identiques entre les conditions (témoin et exposés). Les auteurs n'excluent pas le rôle des métallothionéines dans la tolérance au mercure puisqu'ils suggèrent que l'ARNm des métallothionéines pourrait être transféré par le biais de la reproduction (*via* les ovocytes). En effet, les auteurs montrent que les concentrations de métallothionéines dans les daphnies F1 sont significativement plus élevées chez les individus tolérants après une nouvelle exposition au mercure de 28 jours. Une autre étude réalisée chez la même espèce de daphnie (une lignée clonale) montre qu'une exposition multigénérationnelle au Cd entraîne une augmentation de la tolérance à ce métal et une induction significative de la métallothionéine chez les daphnies exposées dans toutes les générations, avec une synthèse maximale dans les générations tardives (Guan and Wang, 2006b). Dans cette étude, les auteurs ont suggéré que la capacité des daphnies nées de mères exposées à synthétiser davantage de métallothionéines serait liée à l'augmentation de la concentration de cadmium dans les organismes de la descendance (*via* le transfert transgénérationnel du cadmium) (Guan and Wang, 2006b).

Dans ce cas, trois hypothèses pourraient être en fait suggérées pour expliquer la tolérance observée dans la descendance : (1) un transfert des métallothionéines maternelles ou, (2) un transfert des ARNm maternels de ces mêmes métallothionéines *via* les œufs, et (3) un transfert des métaux induisant des niveaux d'expressions des métallothionéines élevés dans les œufs.

Tableau I-4 : Etudes écotoxicologiques sur la modulation des mécanismes de gestion des métaux en fonction de la contamination métallique et/ou de la tolérance toxicologique.

Espèce	Milieu de vie	Contaminant	Type de mécanisme moléculaire	Tolérance et mécanisme associé	Références
<i>Allorchestres compressa</i>	Milieu marin	Cu	Métallothionéine, GST	Oui	Dong et al., 2020
<i>Echinogammarus echinosetosus</i>	Milieu marin	Cd	Métallothionéine	NA	Martinez et al., 1996
<i>Orchestia gammarellus</i>	Milieu marin	Zn, Cd	MRG	NA	Nassiri et al., 2000
<i>Orchestia gammarellus</i>	Milieu marin	Cu	MRG	Oui	Weeks, 1992
<i>Gammarus locusta</i>	Milieu marin	Cu	Métallothionéine	NA	Correia et al., 2002b
<i>Gammarus locusta</i>	Milieu marin	Cu	MRG	NA	Correia et al., 2002a
<i>Gammarus pulex</i>	Eau douce	Cd, Zn	Métallothionéine	Oui Acclimatation	Stuhlbacher and Maltby, 1992
<i>Gammarus fossarum</i>	Eau douce	Cd, Ni, Pb	Métallothionéine, MRG	NA	A. Geffard et al., 2010
<i>Asellus meridanus</i>	Eau douce	Cu	MRG	Oui	Brown, 1977, 1978
<i>Daphnia magna</i>	Eau douce	Cd	Métallothionéine	Oui Acclimatation	Guan and Wang, 2006b
<i>Daphnia magna</i>	Eau douce	Hg	Métallothionéine	Oui Plasticité ou effets parentaux	Tsui and Wang, 2005
<i>Daphnia pulex</i>	Eau douce	Cu, Cd	Métallothionéine	NA	Asselman et al., 2013
<i>Daphnia pulex</i>	Eau douce	Cd	Métallothionéine	Oui Acclimatation	Chen et al., 2016
<i>Daphnia pulex</i>	Eau douce	Cd, Cu	GST, SOD	NA	Barata et al., 2005
<i>Callinectes sapidus</i>	Milieu marin	Cd, Cu	Métallothionéine	NA	Brouwer et al., 1992
<i>Homarus americanus</i>	Milieu marin	Cu	Lysosome	NA	Chavez-Crooker et al., 2003
		Amphipode			
		Isopode			
		Diplostraca			
Crustacé					
		Décapode			

Espèce	Milieu de vie	Contaminant	Type de mécanisme moléculaire	Tolérance et mécanisme associé	Références
<i>Homarus americanus</i>	Milieu marin	Ca, Zn	Lysosome, Réticulum endoplasmique	NA	Ahearn et al., 2004b
<i>Palaemon argentinus</i>	Milieu marin	Cd	MRG (population tolérante), Métallothionéine (population naïve)	Oui	Chiodi Boudet et al., 2019
<i>Tetraclita squamosa</i>	Milieu marin	Fe, Zn	Métallothionéine	NA	Masala et al., 2004
<i>Anodonta woodiana</i>	Eau douce	Cd	Métallothionéine	NA	Y. Li et al., 2015
<i>Macoma balthica</i>	Milieu marin	Zn	Métallothionéine, MRG	NA	Wallace et al., 2003
<i>Potamocorbula amurensis</i>	Milieu marin	Zn	Métallothionéine, organelles	NA	Wallace et al., 2003
<i>Crassostrea sikamea</i>	Milieu marin	Cu, Zn	Métallothionéine	Oui Effets parentaux	Weng and Wang, 2014
<i>Crassostrea gigas</i>	Milieu marin	Cd, Cu, Zn	Métallothionéine	NA	Geffard et al., 2001
<i>Helix aspersa</i>	Eau douce	Cd, Cu	Métallothionéine	NA	Hispard et al., 2008
<i>Helix aspersa</i>	Eau douce	Cd	Métallothionéine	NA	Baurand et al., 2015
<i>Anopheles gambia</i>	Terrestre	Cd	Métallothionéine	Oui Adaptation	Mireji et al., 2010
<i>Chaoborus</i>	Terrestre	Cd, Ni	Métallothionéine, mitochondrie	Oui	Rosabal et al., 2012
<i>Chironomus riparius</i>	Terrestre	Cd	Métallothionéine, GST	Oui Plasticité	Pedrosa et al., 2017b

Décapode

Balane

Unionoïda

Veneroïda

Myïdia

Ostreïda

Helicina

Diptères

Crustacé

Bivalve

Gastropode

Hexapode

		Espèce	Milieu de vie	Contaminant	Type de mécanisme moléculaire	Tolérance et mécanisme associé	Références
Hexapode	Collembole	<i>Orchesella cincta</i>	Terrestre	Cd	Métallothionéine	Oui Adaptation	Sterenberg and Roelofs, 2003
		<i>Orchesella cincta</i>	Terrestre	Cd	Métallothionéine	Oui Adaptation	Timmermans et al., 2005
		<i>Orchesella cincta</i>	Terrestre	Cd	Métallothionéine	Oui Adaptation	Roelofs et al., 2009
Annélide	Sipuncula	<i>Phascolosoma esculenta</i>	Terrestre	Cd	SOD, CAT, GSH	NA	Liu et al., 2022
		<i>Libyodrilus violaceus</i>	Terrestre	Cd, Zn	Métallothionéine	Oui	Ogunlaja et al., 2020
Vertébré	Poisson	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Eau douce	Cd	Métallothionéine	Oui Effets parentaux	Wu et al., 2008
		<i>Danio rerio</i>	Eau douce	Cd	Métallothionéine	Oui Effets parentaux	Wu et al., 2012

3. Les amphipodes comme modèle d'intérêt pour l'étude des réponses évolutives induites par la contamination des milieux aquatiques

3.1. Les amphipodes

3.1.1. Généralités

Les amphipodes (*Amphipoda*) forment un ordre de crustacés marins et d'eau douce (voir terrestres) comprenant plus de 7000 espèces décrites. Parmi les espèces les plus étudiées en écologie et écotoxicologie, on peut citer par exemple celles du genre *Gammarus* tel que *G. fossarum*, *G. pulex*, *G. duebeni*, *G. roeselii* ou encore *G. locusta*, on retrouve également d'autres espèces telles que *Allorchestres compressa*, *Echinogammarus marinus*, *Hyallega azteca*, *Parhyale hawaiiensis*, *Paramoera walkeri* ou *Talitrus saltator*. Les amphipodes colonisent la quasi-totalité des milieux aquatiques, et d'eaux douces, les espèces benthiques sont retrouvées sur la plupart des substrats tels que les pierres, les galets, les racines, la végétation ou la litière aquatiques (Väinölä et al., 2008; Piscart and Bollache, 2012). Par leur comportement déchetteur, ils jouent un rôle clef dans la dégradation de la matière organique terrestre fixée dans les réseaux trophiques aquatiques et contribuent ainsi au cycle du carbone et des nutriments ainsi qu'à la redistribution de la matière et de l'énergie dans les écosystèmes aquatiques. Ils jouent également un rôle critique dans les réseaux alimentaires aquatiques, assurant ainsi le flux de nutriments et d'énergie vers des niveaux trophiques plus élevés (Väinölä et al., 2008). Les amphipodes sont également sensibles à une large gamme de contaminants (métaux, composés organiques). Ces organismes sont des modèles de choix pour les études écotoxicologiques (Kunz et al., 2010; Chaumot et al., 2015) car ils sont représentatifs des milieux grâce à leur caractère ubiquiste, ils sont facilement prélevables, manipulables et leur maintien au laboratoire est possible, permettant ainsi la réalisation d'études par des expérimentations au laboratoire et/ou directement sur le terrain (Piscart and Bollache, 2012).

3.1.2. Morphologie générale

Les amphipodes ont une taille de l'ordre (généralement) du centimètre mais celle-ci est très variable selon les espèces et entre les populations d'une même espèce. Elle varie généralement entre 6 et 25 mm pour les adultes mais peut dépasser les 30 cm chez le genre *Dikerogammarus*

ou pour les espèces *Phronima sedentaria* ou *Alicella gigantea*. Ces tailles étant mesurées entre la partie antérieure de la tête et l'extrémité du telson.

Les amphipodes présentent une cuticule calcifiée, un corps à symétrie bilatérale aplati latéralement (à l'exception de la famille des Corophiidae), et ont tous un corps constitué de 4 parties (Figure I-4) (Piscart and Bollache, 2012) :

- La tête : celle-ci est constituée d'une capsule céphalique et comprend une paire d'yeux, deux paires d'antennes (antennes 1 et 2) et des pièces buccales. Les antennes 1 et 2 (antenne supérieure et antenne inférieure) se composent de plusieurs éléments (notamment d'un pédoncule et d'un flagelle multiarticulé). Les pièces buccales sont fixées sur la partie inférieure de la capsule céphalique et sont plus ou moins cachées par la première paire de plaques coxale.
- Le mésosome : il est composé de sept segments, à chacun desquels est soudée une paire de plaques coxales. Sur chacun de ces segments se trouve une paire de pattes se composant de 7 articles (les plaques coxales étant considéré comme le premier article). Les branchies sont fixées aux plaques coxales ainsi que les oostégites chez les femelles. Les oostégites constituent les contours de la chambre incubatrice appelée marsupium (ou poche marsupiale), dans laquelle les œufs fécondés se développent et éclosent. Les deux premières paires de pattes, appelées gnathopodes, sont des pattes modifiées pour la nutrition et la reproduction alors que les autres paires de pattes, les péreiopodes, servent à la locomotion.
- Le métasome : il comprend trois segments dont les faces latérales sont appelées plaques épimérales. Leur forme (et notamment celle des plaques épimérales 3) constitue un caractère taxonomique important. Chacun des trois segments porte une paire d'appendice souple appelé pléopodes. Leur battement permet la formation d'un courant d'eau alimentant les branchies et le marsupium (chez les femelles) en oxygène.

L'urosome : il se compose de trois segments portant chacune une paire d'uropodes. Les caractéristiques du troisième uropode sont très utilisées pour l'identification des espèces. En effet, celui-ci varie en taille et en forme, peut être garni de très nombreuses soies longues ou

courtes et présenter une très forte asymétrie de longueur avec les deux premiers uropodes. L'urosome des amphipodes se termine par un petit appendice appelé telson formé de 2 lobes.

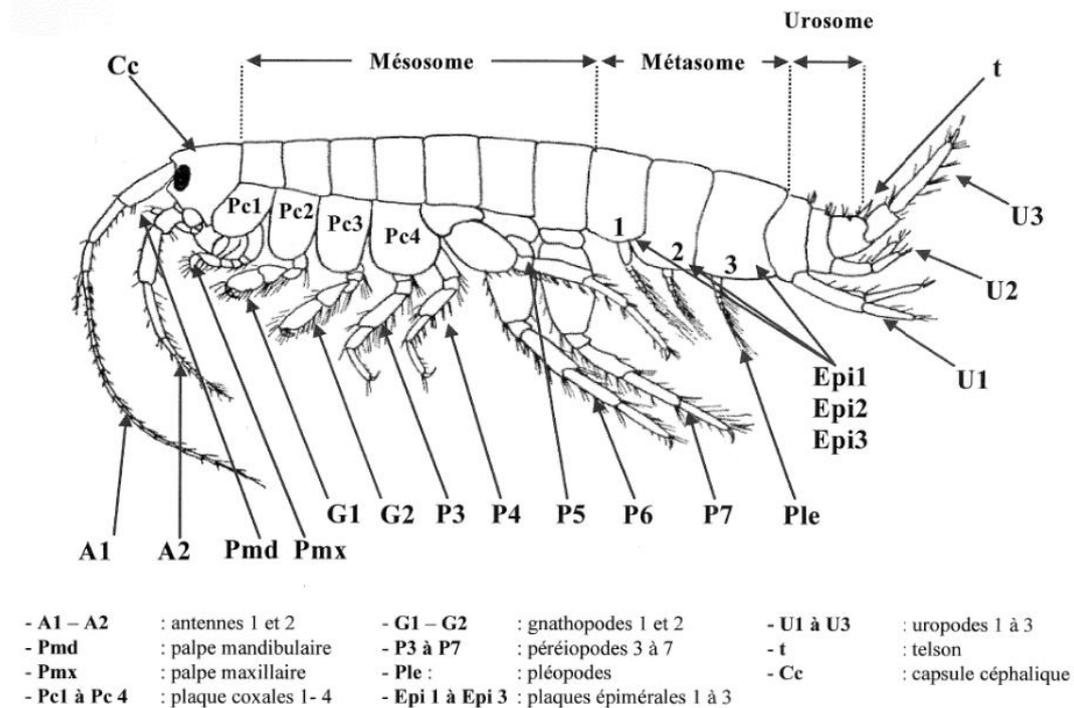


Figure I-4 : Morphologie générale externe d'un amphipode (Extraits de Piscart and Bollache, 2012)

Il existe un dimorphisme sexuel chez tous les amphipodes. La distinction mâle/femelle peut se faire à l'œil nu chez certaines espèces comme *G. fossarum* car chez les femelles en reproduction, on peut aisément observer la présence d'œufs dans le marsupium et la présence d'ovocytes dans le dos par transparence cuticulaire. À la loupe binoculaire, il est possible de sexer les adultes en observant la présence d'oostégites entre les préiopodes 2 et 5 des femelles et la présence de papilles péniennes entre la dernière paire de péréiopodes des mâles.

3.1.3. Cycle de vie et de reproduction

La durée de vie d'un amphipode comme *G. fossarum* est de l'ordre de deux ans, celle-ci étant rythmée par des mues successives. La cuticule calcifiée étant inextensible, la croissance des amphipodes ne peut se faire que par un rejet périodique de l'exosquelette, appelée exuvie et liée

au cycle de mue. Le cycle de mue correspond à l'intervalle qui sépare deux exuviations et sa durée varie en fonction de la taille de l'animal et de la température. Par exemple, à 12°C, le cycle de mue ne dure que 4 jours après l'éclosion mais dure à peu près 30 jours chez les adultes femelles de l'espèce *G. fossarum* (O. Geffard et al., 2010). En général, le cycle de mue est divisé en différentes périodes basées sur les phénomènes de cuticulogénèse et de morphogénèse observés à l'extrémité d'un périopode. Ainsi, le cycle de mue est divisé en trois phases principales que sont la pré-mue, l'inter-mue et la post-mue.

Le cycle de reproduction des amphipodes est étroitement lié au cycle de mue et a largement été décrit chez plusieurs espèces d'amphipodes (Hyne, 2011). Le cycle de reproduction de l'espèce *G. fossarum* est par exemple décrit dans la partie 3.2.1 ci-après. La connaissance du cycle de reproduction et de vie des amphipodes permet ainsi de pouvoir réaliser des études multigénérationnelles. Une étude long-terme sur plusieurs générations a par exemple été mis en place dans la thèse de Crihiu (2020) chez *G. fossarum*.

3.2. Un amphipode d'eau douce bien connu en écotoxicologie : l'espèce *Gammarus fossarum*

3.2.1. Cycle de reproduction

Comme la plupart des amphipodes, l'accouplement des gammares est caractérisé par la formation d'un amplexus précopulatoire (ou précopulat) (Figure I-5). À la fin du cycle de développement ovarien de la femelle, le mâle s'accroche à elle par l'intermédiaire des gnathopodes antérieurs formant alors un amplexus précopulatoire pendant quelques jours, voire quelques semaines (Piscart and Bollache, 2012). Le mâle monopolise ainsi la femelle jusqu'à la fécondation en se plaçant en travers de manière à pouvoir féconder les ovocytes dès leur sortie des ovaires (Piscart and Bollache, 2012). La fécondation est donc externe et se produit dans la poche marsupiale des femelles et n'est possible que 2 à 3 heures après la ponte des ovocytes.

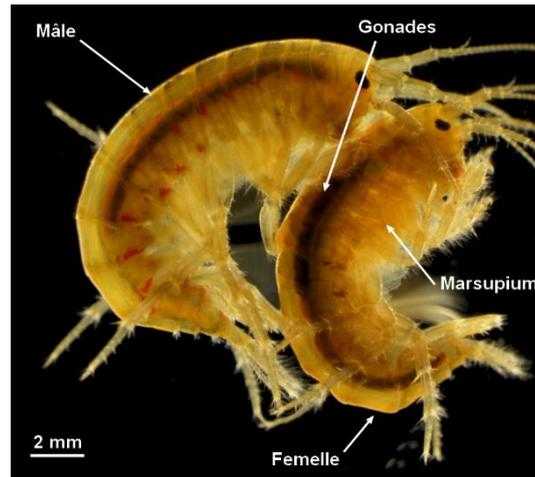


Figure I-5 : Couple de *G. fossarum* en précopulat (adapté de Vigneron, 2015).

Chez les femelles de l'espèce *G. fossarum*, le cycle de mue et le cycle de reproduction (maturation des gamètes et développement embryonnaire) sont synchronisés. Grâce aux travaux réalisés au laboratoire notamment retranscrit dans les publications de O. Geffard et al. (2010) et de Chaumot et al. (2020), ces cycles sont bien connus. Le cycle de mue se décompose en 6 stades (A, B, C1, C2, D1, D2) pouvant être déterminés au microscope en fonction du développement d'une nouvelle cuticule et du décollement de l'ancienne au niveau de la griffe des péréiopodes 3 et 4 (O. Geffard et al., 2010). Les stades A et B correspondent au stade de post-mue, les stades C1 et C2 à l'inter-mue et les stades D1 et D2 à la pré-mue (Figure I-6). Le cycle de reproduction se déroule chez la femelle entre deux mues, la mue précédant la ponte dans le marsupium (Figure I-6). Ce cycle correspond à un cycle de maturation des ovocytes au niveau des ovaires situés dans le dos des femelles (Figure I-6), ainsi qu'à un cycle de développement d'embryons dans le marsupium qui aboutit à la naissance de nouveau-nés quelques jours avant la mue de la femelle qui permet la ponte. Ainsi, juste après la mue, un lot d'ovocytes matures sont pondus par la femelle dans son marsupium, ils sont alors fécondés par les spermatozoïdes et rentrent en embryogenèse. En parallèle, un nouveau lot d'ovocytes entre en début de maturation dans les ovaires (nouveau cycle d'ovogenèse). Les ovocytes développés au cours du cycle n correspondent donc aux nouveau-nés qui se développeront au cycle n+1, et les nouveau-nés qui se sont développés au cours du cycle n proviennent de la fécondation des ovocytes développés au cycle n-1 (Figure I-6).

D'autre part, la durée du cycle de mue et de reproduction dépend de la température. Le cycle dure environ 35 jours à 12°C, et 25 jours à 16°C (Chaumot et al., 2020).

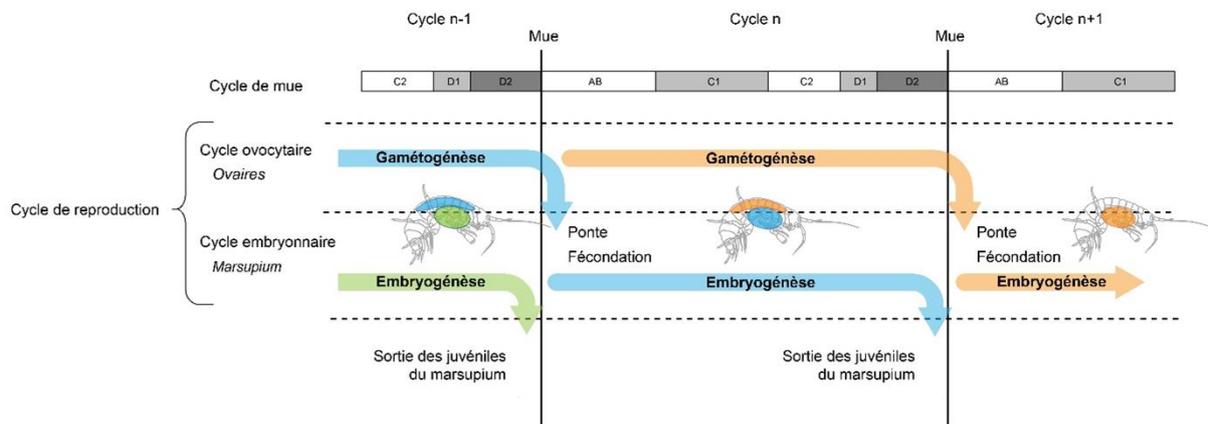


Figure I-6 : Synchronisme du cycle de mue et du cycle de reproduction chez *G. fossarum* (adapté de Criui, 2020).

3.2.2. Cinétique de bioaccumulation du cadmium dans les organes de *G. fossarum*

Les travaux de thèse de Gestin (2022) ont permis de mettre en évidence la cinétique de bioaccumulation et d'élimination des métaux (et notamment du cadmium) dans les organes (branchies, caeca, intestin, céphalon et autres tissus) chez l'espèce *G. fossarum*.

Notamment, les résultats de l'étude de Gestin et al. (2022) ont montré lors de tests d'exposition suivie de dépuración, que pendant la phase d'accumulation, les valeurs maximales de Cd sont atteintes au bout de 7 jours dans chaque organe. La plus forte concentration de Cd a été retrouvée dans les branchies, suivi des intestins, des caeca, des céphalons et des autres tissus. À la fin de la phase de dépuración (au 28^{ème} jour de l'expérience), les concentrations de Cd ont diminué de 88% dans les intestins et de 66% dans les caeca. Toutefois dans les branchies, les concentrations de Cd n'ont pas diminué (résultats pour les branchies et les caeca présentés dans la Figure I-7). Ces résultats ont permis de mettre en évidence que les intestins jouaient un rôle central dans l'accumulation, la distribution et l'élimination des métaux, que les caeca sont des organes hyper-accumulateurs jouant une fonction principale de stockage et d'élimination et que les branchies ont un rôle important dans l'accumulation et le stockage des métaux.

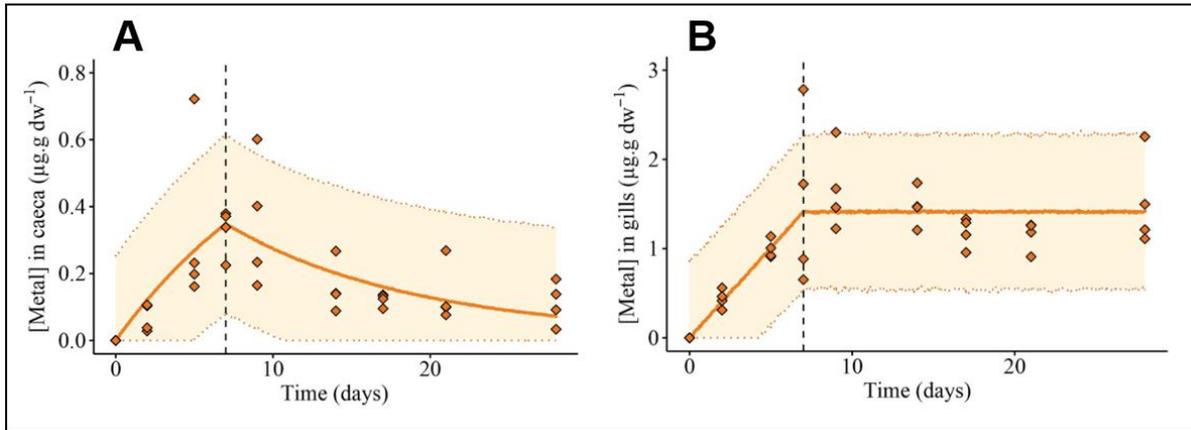


Figure I-7 : Concentration de métaux mesurées et prédites (ligne continue pour la médiane et lignes en pointillé pour l'intervalle de confiance à 95%) avec un modèle TKTD à un compartiment pour les caeca (A) et les branchies (B) exposées à 52.1 ng/L de Cd pendant la phase d'absorption (0 à 7 jours) suivie d'une phase de dépuraction (7 à 28 jours). Ces deux phases sont séparées par la ligne verticale en pointillés noirs. Cette figure est adaptée de Gestin et al. (2022).

Grâce à ces travaux, et dans l'objectif d'étudier si les métallothionéines jouaient un rôle dans l'acquisition et la transmission de la tolérance au cadmium chez *G. fossarum*, nous avons choisi de mesurer l'expression de cette protéine dans les branchies et les caeca des gammarus.

3.3. Les amphipodes en écotoxicologie évolutive

Le verrou de la représentativité des études écotoxicologiques étudiant les effets à long-terme en réponse à une contamination chronique a été pointé dans la partie 1.1 de ce manuscrit (études laboratoire avec des organismes modèles, à des durées d'expositions généralement courtes sur une dizaine de générations tout au plus). Ces études ne reflètent pas complètement la complexité des processus sous-jacents aux effets des expositions multigénérationnelles sur la tolérance des populations aux contaminants et sur les histoires de vie au sein des écosystèmes naturels (Coutellec and Barata, 2013; Oziolor et al., 2016). Dans ce contexte, l'examen de littérature montre que les amphipodes ont été des espèces modèles pertinentes pour faire la lumière sur l'acquisition de la tolérance des populations induite par les contaminants sur le terrain. Par exemple, plusieurs séries d'études d'écotoxicologie évolutive se sont concentrées sur des populations de terrain appartenant au genre *Gammarus* en Europe (en particulier *G. pulex* et *G.*

fossarum) et à l'espèce *Hyalella azteca* en Amérique du Nord. Chez *H. azteca*, un grand nombre d'études a documenté l'émergence d'une tolérance élevée aux insecticides neurotoxiques de la famille des pyréthrinoïdes et des organophosphorés dans les milieux aquatiques contaminés par ces molécules en lien avec des usages urbains ou agricoles (par exemple, Gamble et al., 2023; Major et al., 2020; Sever et al., 2020; Weston et al., 2013). Ces tolérances relèvent principalement de résistance génétique due à des mutations ponctuelles dans les protéines cibles des insecticides même si elles impliquent aussi des phénomènes d'acclimatation liés à l'activation de systèmes enzymatiques de détoxification (Fung et al., 2021). Des expérimentations avec maintien des populations à long-terme en condition non contaminées au laboratoire et des croisements entre populations sensibles et tolérantes ont en effet conclu à une forte composante génétique des tolérances développées par *H. azteca* dans les systèmes aquatiques contaminés par ces insecticides (Heim et al., 2018; Sever et al., 2020; Gamble et al., 2023). Chez *Gammarus pulex*, la tolérance aux insecticides neurotoxiques néonicotinoïdes a été documentée dans différentes populations de cours d'eau dans des contextes agricoles allemands, mais avec une ampleur beaucoup plus faible que les tolérances aux insecticides documentées chez la hyalelle (Shahid et al., 2018a; Siddique et al., 2020). Ces niveaux de tolérance modérés présentent également une certaine variabilité spatiale et saisonnière (Becker et al., 2020), ce qui dans ce cas, a amené les auteurs à discuter de la nature génétique ou de l'acclimatation de ces phénomènes de tolérance (Siddique et al., 2021). Au contraire, Švara et al. (2021) ont montré qu'une population de *G. pulex* peut devenir plus sensible aux néonicotinoïdes dans une rivière contaminée par des micropolluants urbains, dont des insecticides néonicotinoïdes. Toujours chez *G. pulex*, des tolérances ont également été documentées *in situ* pour des contaminants métalliques avec là encore une variabilité des niveaux de tolérance constatés au fil du temps (Maltby and Crane, 1994; Khan et al., 2011). Mais l'une des critiques majeures de ces études qui ont examiné la divergence de sensibilité chez des populations de terrain est qu'elles se sont, pour la plupart d'entre elles, appuyées sur des comparaisons par paire de populations (une population contaminée vs une population naïve), excluant ainsi difficilement la problématique de facteurs de confusion pouvant expliquer une divergence des sensibilités indépendantes de la contamination mise en avant dans ces études.



Figure I-8 : Site naturel des Ardillats

Des travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire d'écotoxicologie INRAE, basés sur l'étude de cas d'une population de *G. fossarum* (population des Ardillats), ont également révélé la possibilité d'une tolérance accrue au cadmium, transmissible à la descendance (Vigneron et al., 2015, 2019). Cette population habite un ruisseau de tête de bassin versant influencé par un fond géochimique naturel de cadmium présent dans la région du Beaujolais en France (voir Figure I-8). Les résultats de tests d'exposition à des concentrations aiguës pratiqués au laboratoire sur des adultes fraîchement prélevés sur ce site ont montré que les gammares sont tolérants à ce contaminant par rapport à d'autres populations régionales issues de rivières non contaminées – observé par le doublement des temps de survie ou des LC50 (Vigneron et al., 2015). Cette même tendance a été retrouvée pour la première cohorte de nouveau-nés produite au laboratoire à partir de géniteurs prélevés sur le terrain. Ces résultats suggèrent donc la possibilité d'une transmission de la tolérance aux descendants même en milieu non contaminé, soulevant l'hypothèse d'une adaptation génétique. Cette conclusion est venue en contradiction d'autres travaux du laboratoire (Chaumot et al., 2009; Vigneron et al., 2016) qui par des approches de génétique quantitative (croisements de géniteurs et comparaison de la sensibilité cadmique entre fratries et demi-fratries) ont conclu à l'impossibilité d'une adaptation génétique au Cd du fait d'une héritabilité *s.s.* (Falconer and Mackay, 1996) très faible de la sensibilité cadmique au sein des populations naturelles de *G. fossarum* (avec toutefois une influence

maternelle significative sur le niveau de sensibilité des portées). Par la suite, une étude complémentaire a montré que lorsque l'on continue à faire pondre au laboratoire et en milieu propre les gammares provenant de cette population des Ardillats, on observe une perte de la tolérance chez la descendance à partir de la troisième cohorte (Vigneron et al., 2019). Ces résultats ont conduit à la conclusion que l'observation de la transmission à la descendance de la tolérance au cadmium dans cette population ne démontre pas une adaptation génétique. Elle résulterait plutôt d'un effet de l'exposition parentale induisant une plasticité transgénérationnelle qui influence la sensibilité des classes d'âge nouvellement produites au sein de la population. Enfin, des changements de traits d'histoire de vie ont été constatés *in situ* chez cette même population. Il a été suggéré que cette population présente une taille à la puberté plus faible et un taux de croissance ralenti par rapport aux populations vivant en milieu non contaminé (Vigneron, 2015). Bien que ces résultats soient pertinents d'un point de vue environnemental et qu'ils reflètent bien des effets long-terme d'une contamination chronique de population, leur portée générique reste limitée vu qu'ils n'ont été documentés que sur une unique population.

4. Objectif et projet expérimental

Face au manque de connaissances sur les réponses évolutives induites par l'exposition multigénérationnelle des espèces au sein des milieux aquatiques, cette thèse a eu pour objectif général d'interroger le rôle possible de la plasticité de la sensibilité toxicologique et des traits d'histoire de vie dans l'adaptation des populations au stress chimique, en considérant le cas d'étude des populations de *G. fossarum* exposées historiquement et naturellement à la contamination cadmique dans les cours d'eau de tête de bassins versants. Afin de répondre à cet objectif, ces travaux de thèse ont été répartis en trois volets.

* Un premier axe de recherche sur la « **plasticité toxicologique** » a eu pour objectif de confirmer et généraliser les résultats obtenus lors des travaux antérieurs de l'équipe (Vigneron, 2015) quant à l'existence de populations tolérantes au Cd chez *G. fossarum*. Deux types d'approches ont été conduits : (1) une approche comparative entre une douzaine de populations naturellement exposées ou non du fait du leur contexte géochimique local (exposition évaluée par des mesures de bioaccumulation lors d'encagements in situ), suivie d'expérimentations de dé-acclimatation au laboratoire en eau propre de ces populations (common-garden) ; (2) des expérimentations d'exposition multigénérationnelle au laboratoire où des lots de gammares issus d'une population non-contaminée ont été exposés pendant 18 mois au laboratoire à une concentration cadmique représentative de la contamination des milieux naturels (0.5 µg/L). Au cours de ces deux types d'expérimentation, différents tests de sensibilité (à différents stades de développement, fenêtres critiques d'exposition) ont été réalisés afin de décrire le caractère plastique ou génétique de la tolérance et la transmission de celle-ci au sein des populations.

* Un deuxième axe « **mécanismes moléculaires sous-jacents à la tolérance cadmique** » a voulu étudier si les métallothionéines jouaient un rôle dans l'acquisition et la transmission de la tolérance au cadmium chez *G. fossarum*. Pour cela, cette étude s'est déroulée en deux temps : tout d'abord, l'identification de deux gènes de métallothionéines à partir du transcriptome de cette espèce puis la mesure de l'expression de ces métallothionéines dans deux organes impliqués dans la gestion des métaux chez le gammare (branchies, caeca) dans différents cas d'exposition au laboratoire, et *in situ* chez des populations tolérantes et sensibles au cadmium identifiées dans le premier axe.

* Enfin, un troisième axe « **modification des traits d'histoire de vie en lien avec la contamination cadmique** » a eu pour objectif spécifique d'étudier si les niveaux d'exposition des populations au cadmium et/ou l'acquisition de tolérance sont corrélés à des modifications des traits d'histoire de vie chez *G. fossarum*, et de mieux comprendre la valeur adaptative ou non de ces modifications (coût de tolérance *vs* sélection d'histoire de vie). Pour cela, les mêmes deux approches que pour le volet toxicologique ont été suivies : des mesures de traits d'histoire de vie accompagnant l'approche expérimentale d'exposition multigénérationnelle en conditions contrôlées, ainsi qu'une approche comparative « terrain » sur différentes populations de *G. fossarum* de rivières non-contaminées et contaminées par le cadmium.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Le Chapitre II détaille les méthodes mises en place au cours de ces travaux de thèse pour la sélection et la caractérisation des sites d'études, pour le prélèvement et le maintien des gammars, pour la réalisation des différentes expérimentations et présente les protocoles de mesure pour les différents paramètres biologiques suivis.

Dans la première partie, le choix des différents sites d'études est présenté, ainsi que les méthodes utilisées pour caractériser la contamination métallique biodisponible et les conditions d'habitat des populations.

Dans la deuxième partie, le détail du prélèvement des populations sur le terrain et leur condition de maintien au laboratoire est présenté.

Enfin, les parties suivantes sont consacrées aux détails des protocoles mis en place au cours de cette thèse. Dans la partie trois, les différents protocoles des expérimentations multigénérationnelles sont présentés. La quatrième partie présente comment la sensibilité au Cd a été estimée. Par la suite, la cinquième partie décrit comment les différents traits d'histoire de vie ont été mesurés (notamment taux de croissance et taux d'alimentation) et présente le protocole établi pour mesurer la structure de tailles des populations à partir de relevés démographiques standardisés. Enfin, le protocole de mesure de l'expression des métallothionéines est brièvement détaillé dans la dernière partie de ce chapitre. Le protocole précis est présenté dans la publication n°3 présentée dans le Chapitre IV.

1. Sélection et caractérisation de l'habitat des populations d'étude de *Gammarus fossarum*

1.1. Choix des populations d'étude

L'identification d'une population exposée et tolérante au cadmium (Cd) sur le site des Ardillats (Beaujolais) lors des travaux de thèse de Vigneron (2015) a structuré le choix des autres populations d'études utilisées dans cette thèse.

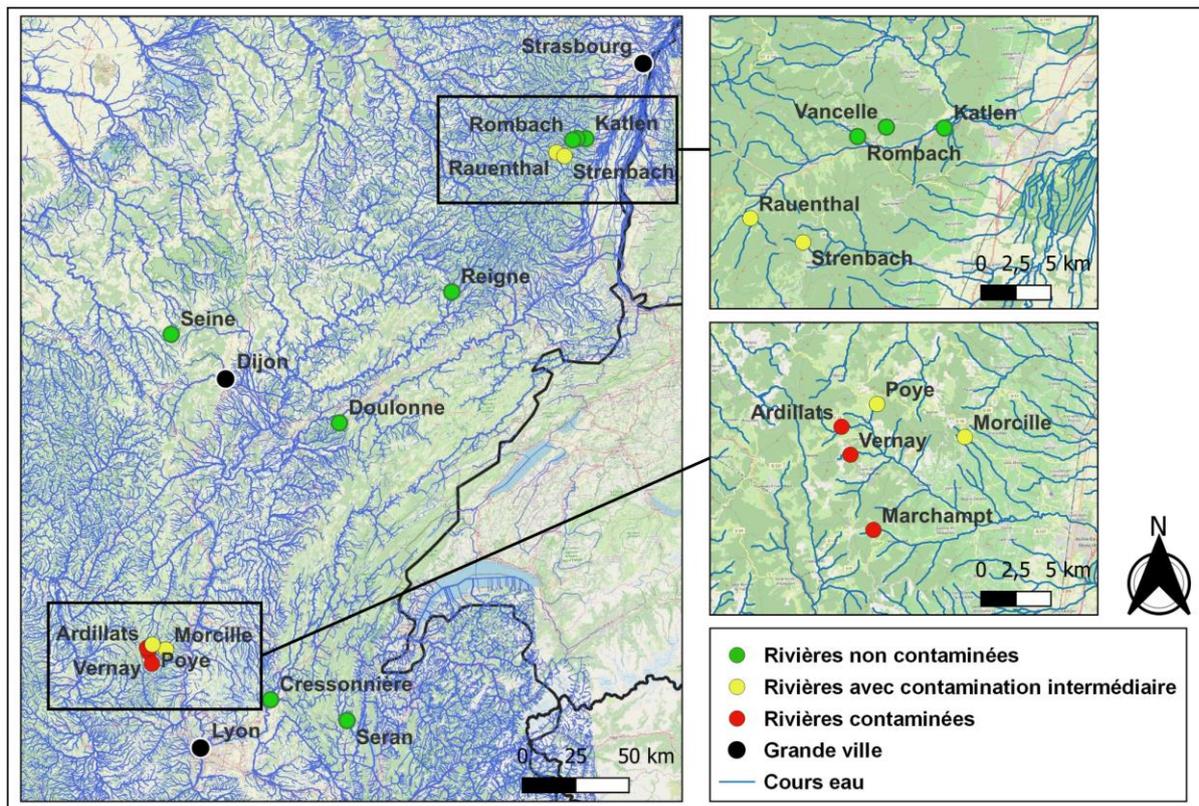


Figure II-1 : Localisation des quinze populations de *G. fossarum* utilisées au cours de cette thèse. Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent au statut « contaminé », « intermédiaire » et « non contaminé » par du Cd biodisponible de chacun des sites. Ce statut a été défini grâce à un protocole de bioaccumulation active (voir paragraphe 2.2 du Chapitre II).

Le site des Ardillats abrite une population de *G. fossarum* tolérante au Cd en lien avec le contexte chimique local (fond géochimique naturellement riche en Cd, substrat cristallin, eau douce très faiblement calcique maximisant l'exposition des organismes). En prenant comme modèle ce site, nous avons sélectionné pour ces travaux de thèse cinq populations habitant des cours d'eau de tête de bassin versant dans des substrats cristallins dans la région du Beaujolais

(populations Ardillats, Marchampt, Vernay, Morcille et Poye), complétées par six populations dans le même type de paysage mais géographiquement éloignées dans les Vosges (populations Vancelle, Katlen, Rauenthal, Strenbach, Katlen et Rombach), également situées sur des substrats cristallins, ainsi que quatre autres populations de cours d'eau (populations Seine, Séran, Doulonne et Reigne) qui sont situées sur un substrat sédimentaire (Figure II-1). Les détails de l'emplacement et les caractéristiques principales des quinze sites d'études sont donnés dans le Tableau II-1.

Tableau II-1 : Localisation et caractéristiques des quinze sites utilisés au cours de cette thèse. Le statut de contamination au Cd a été défini par une approche de biosurveillance active (voir paragraphe 2.2 du Chapitre II). Le statut « contaminé » a été attribué aux sites dont la contamination en Cd biodisponible était supérieure à la valeur seuil BBAC de 0.30 µg/g dw (poids sec) définie par Besse et al. (2013) et Ciliberti et al. (2017).

Site	Nom de la rivière	Localisation (ville, région)	Coordonnées GPS	Statut de contamination par le Cd	Distance à la source (km)	Largeur de la rivière (m)	Conductivité de l'eau au printemps 2022 (µs/cm)
Ardillats	L'Ardières	Les Ardillats, Rhône	46°11'12.0"N 4°31'16.0"E	Contaminé	3.1	4.8	101
Marchampt	Marchampt	Marchampt, Rhône	46°07'09.0"N 4°32'52.0"E	Contaminé	1.4	4.7	44
Vernay	Vernay	Vernay, Rhône	46°10'07.0"N 4°31'44.0"E	Contaminé	1.2	4	67
Rauenthal	Rauenthal	Sainte-Marie-aux-Mines, Bas-Rhin	48°13'40.4"N 7°09'57.2"E	Intermédiaire	3.9	6.7	82
Poye	La Poye	Les Fariats, Saône-et-Loire	46°12'02.0"N 4°33'13.0"E	Intermédiaire	0.4	1	69
Morcille	La Morcille	Villié-Morgnon, Haut-Rhin	46°10'42.24"N 4°38'6.72"E	Intermédiaire	0.84	4.7	104
Strenbach	Strenbach	Aubure, Haut-Rhin	48°13'40.44"N 7°9'57.239"E	Intermédiaire	1.32	3.7	31
Séran	Le Séran	Béon, Ain, France	45°51'21.2"N 5°43'14.5"E	Non contaminé	32.9	23.6	373
Vancelle	Vancelle	Vancelle, Bas-Rhin, France	48°16'52.0"N 7°18'04.7"E	Non contaminé	1.3	2.1	149
Katlen	Katlen	Lièpvre, Haut-Rhin	48°16'20.64"N 7°20'20.76"E	Non contaminé	2.4	4.7	101
Rombach	La Liepvrette	Lièpvre, Haut-Rhin	48°17'9.24"N 7°17'4.2"E	Non contaminé	NA	7.1	71
Seine	La Seine	Billy-lès-Chanceaux, Côte-d'Or	47°31'50.52"N 4°41'44.88"E	Non contaminé	5.67	6.5	290
Doulonne	La Doulonne	Plumont, Jura	47°7'13.8"N 5°44'7.8"E	Non contaminé	4.69	3.8	175
Reigne	La Reigne	Magny-Vernois, Haute-Saône	47°39'23.04"N 6°28'0.12"E	Non contaminé	15.22	10.6	167
Cressonnière	Le Pollon	Saint-Maurice de Reymens, Ain, France	45°57'28.0"N 5°15'45.0"E	Non contaminé	0	NA	NA

Tous ces sites sont situés dans un contexte naturel ou semi-naturel (garantissant de faibles niveaux de contamination par des sources anthropiques ou d'altération d'habitat) et présentant a priori des caractéristiques hydro-morphologiques proches (Figure II-2). À partir des informations de cartographie géologique et des données antérieures sur la contamination biodisponible de l'environnement, nous avons fait le pari qu'il existerait des différences de biodisponibilité en Cd entre les sites en raison de possibles sources géochimiques naturelles de Cd dans le Beaujolais et la région des Vosges, et de l'existence de contrastes à l'intérieur et entre les bassins versants en termes de dureté de l'eau, dont on sait qu'elle influence fortement la biodisponibilité du Cd pour les crustacés et en particulier pour le gammare (Pellet et al., 2009; Urien et al., 2016). De plus, ces quatorze sites ont été sélectionnés car ils abritent de fortes densités de populations de l'espèce *G. fossarum*, appartenant toutes à la même lignée cryptique (*G. fossarum* B, BIN-ACG7784) (Wattier et al., 2020).

La population Cressonnière, qui est la population source d'organismes utilisée pour toutes les expérimentations menées au laboratoire INRAE depuis dix ans complète l'ensemble des populations étudiées. Cette population habite une zone préservée d'une ancienne cressonnière près de la rivière Pollon (Figures II-1 et II-2, Tableau II-1).



Figure II-2 : Photos des quinze sites utilisés au cours de la thèse avec (A) Ardillats, (B) Poye, (C) Strenbach, (D) Doulonne, (E) Raenthal, (F) Vancelle, (G) Katlen, (H) Reigne, (I) Vernay, (J) Marchampt, (K) Seine, (L) Rombach, (M) Morcille, (N) Séran et (O) Cressonnière.

1.2. Caractérisation de la contamination métallique biodisponible

Pour chaque site, la contamination métallique biodisponible a été mesurée selon un protocole de biomonitoring actif développé au laboratoire d'écotoxicologie INRAE (Figure II-3). Cette méthode normalisée (NFT90-721, norme AFNOR) consiste à transplanter des gammares d'une même population de référence sur tous les sites d'étude pendant une durée d'exposition déterminée. Pour cela, des gammares mâles (d'une taille d'environ 11 mm) de la population Cressonnière, après stabulation pendant 15 jours au laboratoire, sont répartis dans des dispositifs d'encagement cylindriques de 180 mL (5.5 cm de diamètre, 10 cm de hauteur) (Figure II-3). Ces systèmes sont fermés aux deux extrémités et sont dotés de perforations permettant à l'eau de circuler. Les gammares encagés sont ensuite transplantés pendant sept jours dans chaque site d'intérêt (au cours de cette thèse, des encagements ont été réalisés à différentes dates entre Janvier 2020 et Juillet 2022) (Figure II-3). Après l'exposition *in situ*, la concentration de métaux bioaccumulés dans les gammares encagés a été analysée par le laboratoire d'analyse des milieux aquatiques (LAMA) de INRAE à Lyon par spectrométrie de masse à plasma inductif triple quadripôle (iCAPTM TQ ICP-MS, Thermo Electron) après digestion des échantillons à l'acide assisté par micro-ondes (HNO₃ 14M). La limite de quantification (LQ) pour les différents métaux a été déterminée selon la norme AFNOR NFT90-210. La population de la Cressonnière étant la population de référence du laboratoire, les données de bioaccumulation utilisées pour ce site correspondent à la mesure directe dans les gammares après échantillonnage de la population.



Figure II-3 : Illustration de la méthodologie d'encagement.

De précédentes études réalisées au laboratoire d'écotoxicologie INRAE basée sur 150 sites représentatifs de la diversité des milieux en France (Besse et al., 2013; Ciliberti et al., 2017) ont permis de définir pour chaque contaminant des valeurs seuils de contamination biodisponible ou BBAC (Bioavailable Background Assessment Concentration). Une concentration supérieure à la valeur seuil BBAC signifie la présence d'une contamination biodisponible significativement supérieure à la moyenne pour le site étudié. Ainsi, à partir des concentrations en Cd obtenus dans les gammars encagés et exprimées en $\mu\text{g/g}$ de poids sec, le statut de contamination en Cd pour chacun des sites (présenté dans le Tableau II-1) a été défini selon la BBAC défini pour le cadmium par Besse et al. (2013) et Ciliberti et al. (2017) ($\text{BBAC}_{\text{Cd}} = 0.30 \mu\text{g/g}$ poids sec).

1.3. Caractérisation des conditions d'habitat des populations

Pour chacun des sites sélectionnés au cours de cette thèse, une caractérisation fine des paramètres hydromorphologiques et des paramètres physico-chimiques a été réalisée au cours du stage de Master 1 « Sciences de l'eau » (Université Lumière Lyon 2) de Clément Colomb. Pour cela, différents paramètres environnementaux liés aux conditions d'habitat ont été mesurés soit au préalable à l'aide de données cartographiques géographiques (distance à la source, rang de Strahler, pente et occupation des sols), soit directement sur site lors des campagnes de prélèvement réalisées entre Avril et Juin 2022 (débit, largeur plein bord, faciès d'écoulement, substrat, pH, conductivité, oxygène dissous, température, conductivité).

La mesure de la distance à la source s'est faite à l'aide du logiciel QGIS (<https://www.qgis.org/fr/site/>) sur lequel ont été implémentés la localisation des sites et leur réseau hydrographique. Ainsi, pour chaque site d'étude, la distance à la source a pu être mesurée en kilomètres après l'isolement du cours d'eau principal de chaque tête de bassin versant. À l'aide de ce même logiciel, le rang de Strahler a été déterminé manuellement à partir de la localisation et du réseau hydrographique de chaque site. Par la suite, l'occupation du sol de chaque tête de bassin versant a été obtenue en partitionnant la couche d'occupation du sol de Corine par le bassin versant redimensionné. Un pourcentage de recouvrement a ensuite été obtenu pour chaque libellé de classe d'occupation du sol et celle-ci a été classée en trois

groupes : « naturel », « urbanisé » et « agricole ». Enfin, la pente moyenne de chaque site a été mesurée sur le site Internet Geoportail (<https://www.geoportail.gouv.fr/>) à partir du rapport entre la différence d'altitude prise entre les points amont et aval d'un tronçon représentatif du site d'étude et la distance parcourue par le cours d'eau entre ces deux points.

Au cours de la campagne de prélèvement réalisée durant le printemps 2022, une section a été déterminée pour chaque site selon un protocole IBGN (norme AFNOR NFT90-350) afin de délimiter la zone de description et d'échantillonnage. La taille de la station a été déterminée en utilisant la moyenne de la largeur plein bord et la taille du cours d'eau. La taille du cours d'eau a été multipliée par 18 s'il était « très petit », par 12 s'il était « petit et moyen » et par 6 s'il était « grand ». De plus, la station a été positionnée à un endroit représentatif du cours d'eau, c'est-à-dire au sommet d'un radier, afin d'obtenir une succession de faciès radier-mouille. Différentes variables ont été mesurées : débit, largeur plein bord, faciès d'écoulement, diversité du substrat, pH, conductivité, concentration d'oxygène dans l'eau et température de l'eau.

Le débit a été mesuré à l'aide d'une jauge à perche transparente (Pike et al., 2016). Pour cela, la mesure a été réalisée en privilégiant les zones de vitesse à fort courant. Plusieurs verticales ont été placées le long d'un transect rectiligne. Pour chaque transect, la profondeur, la charge dynamique et la distance au rivage ont été mesurées à l'aide d'un décimètre. Ensuite, une seule valeur de débit instantané a été obtenue et servira de marqueur informatif de l'ordre de grandeur des classes de cours d'eau.

La largeur plein bord a été mesurée à l'aide d'un télémètre. Pour chaque site, 10 mesures de largeur ont été effectuées (largeur correspondant à la distance entre deux rives d'un cours d'eau ayant atteint la hauteur d'eau juste avant que celui-ci ne déborde du lit mineur). La valeur finale obtenue est la moyenne des 10 largeurs mesurées.

Les faciès d'écoulement ont été schématisés et proportionnés à l'aide d'un télémètre. Les différents pourcentages de faciès obtenus ont été regroupés en deux groupes correspondant aux faciès lotiques et lentiques.

Afin de définir le substrat de la rivière, cinq transects ont été définis aléatoirement sur la station et pour chacun d'entre eux, le substrat a été caractérisé à l'aide d'un quadra de 0.25 m². Un indice de diversité a ensuite été défini à l'aide de l'indice de diversité de Simpson (SIDI).

De plus amples informations méthodologiques peuvent être retrouvées dans le rapport de stage de Clément Colomb (2022) ainsi que les données brutes des relevés terrain pour chacun des sites.

2. Prélèvement et maintien des populations au laboratoire

2.1. Prélèvement des populations

Le prélèvement des gammares se fait par la méthode du « kick sampling ». Cette méthode consiste à remuer le substrat avec le pied afin de déloger les gammares, puis de les récupérer à l'aide d'un troubleau (aire rectangulaire : 25x18 cm, maille 630 µm) placé en aval (Figure II-4A). Le contenu du troubleau est vidé sur une colonne constituée de tamis de 10 mm, 5 mm, 2.5 mm, 2 mm, 1.25 mm et 0.5 mm, les organismes descendent d'un tamis à l'autre par lessivage à l'aide de seaux contenant l'eau du site (Figure II-4B et C). Les tamis de 10 et 5 mm sont utilisés comme dégrilleur. Le tamis de 2.5 mm permet d'écarter les plus gros gammares. Puis, les gammares présents sur les tamis de 2 mm et 1.25 mm sont récupérés et sont placés dans des seaux de 10 L remplis de l'eau du site, ces seaux représentent les individus adultes des populations. De même, les gammares présents sur les tamis de 0.5 mm sont récupérés et mis dans d'autres seaux de 10 L remplis d'eau du site, ce sont les individus « jeunes » des populations.

Le nombre d'organismes par seau est limité afin d'éviter l'anoxie au cours du transport. Pour cela, l'utilisation d'une jauge approximative (système d'encagement de 180 mL) permet de mettre la même quantité de gammares dans chaque seau (Figure II-4D). Pour les adultes, le contenu d'1 système a été considéré et pour les jeunes, le contenu d'1.5 système.



Figure II-4 : Illustration pour le prélèvement des populations de gammares par la méthode du kick sampling.

2.2. Conditions générales de stabulation au laboratoire et maintien des populations au laboratoire en milieu propre (common-garden)

Au laboratoire et avant toutes les expérimentations, les organismes fraîchement pêchés sont maintenus dans l'eau de leur propre site, dans des bains-marie thermorégulés à 12°C pendant au moins 24h avant d'être répartis dans des aquariums de stabulation alimentés en continu en eau de forage.

Pour chacune des expérimentations présentées ci-après (sauf exception explicitée), les populations de gammares ont été maintenues au laboratoire dans des aquariums en plastique de 2 L ou de 11 L placés dans des bains-marie thermorégulés entre 15 et 16°C et avec une photopériode contrôlée (16/8 nuit/jour). La température a été choisie pour que le cycle de reproduction des femelles (durée inter-ponte) soit de 25 jours (Chaumot et al., 2020). Les aquariums sont équipés d'un système de renouvellement d'eau de forage (conductivité entre 350 et 400 $\mu\text{s}/\text{cm}$) avec un débit de 4L/h et d'un système d'oxygénation pour assurer un taux d'oxygène optimum. Enfin, les gammares ont été nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulnes conditionnées (grâce à des paniers présents dans les aquariums) et avec un apport hebdomadaire de larves de Tubifex.

Afin d'étudier l'évolution de la sensibilité au Cd et des traits d'histoire de vie chez l'espèce *G. fossarum*, les populations Ardillats, Marchampt, Vernay, Séran, Cressonnière et Doulonne ont été maintenues au laboratoire dans de l'eau exempte de Cd jusqu'à 6 mois. Ces

expérimentations de dé-acclimations ont été répétées à différentes périodes (Avril 2021, Juin 2021, Décembre 2021 et Octobre 2022). Pour chaque population, les adultes et les jeunes (organismes ayant une taille ≤ 4 mm) ont été placés dans des aquariums en plastique séparés de 11 L (Figure II-5). Dans chaque aquarium, environ 1000 jeunes ou adultes ont été placés. Ce même procédé a été répété pour les différentes dates testées.

En sortie de terrain et après 2 mois au laboratoire, des adultes mâles et des jeunes de chaque population ont été prélevés pour les tests de sensibilité au Cd (voir II-4). De même, des mesures de traits d'histoires ont été réalisées (voir II-5).

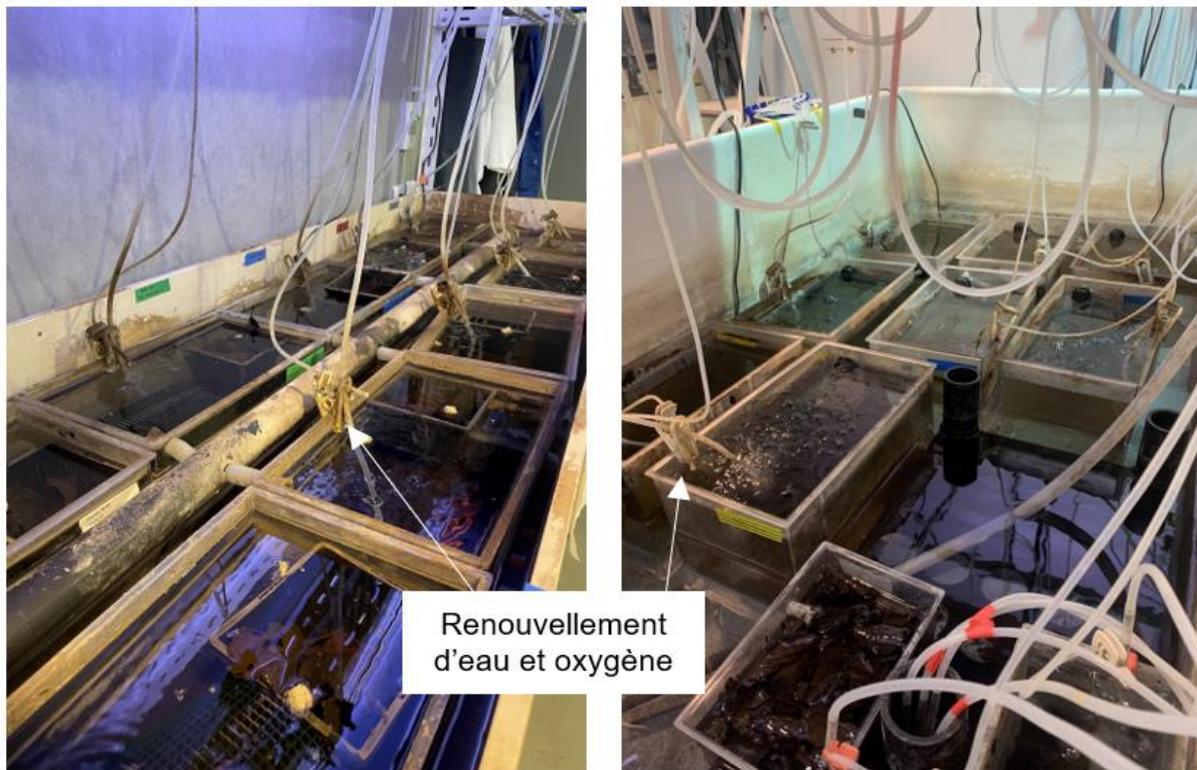


Figure II-5 : Maintien des populations durant les expérimentations de déacclimation

3. Expérimentations multigénérationnelles

3.1. Isolement de cohortes de descendants

En parallèle du suivi des sensibilités effectuées chez les adultes et les jeunes des expérimentations de déacclimation, nous avons voulu suivre l'évolution de la tolérance au Cd

chez trois cohortes successives de nouveau-nés produits au laboratoire par les géniteurs depuis leur prélèvement sur le terrain (Figure II-6).

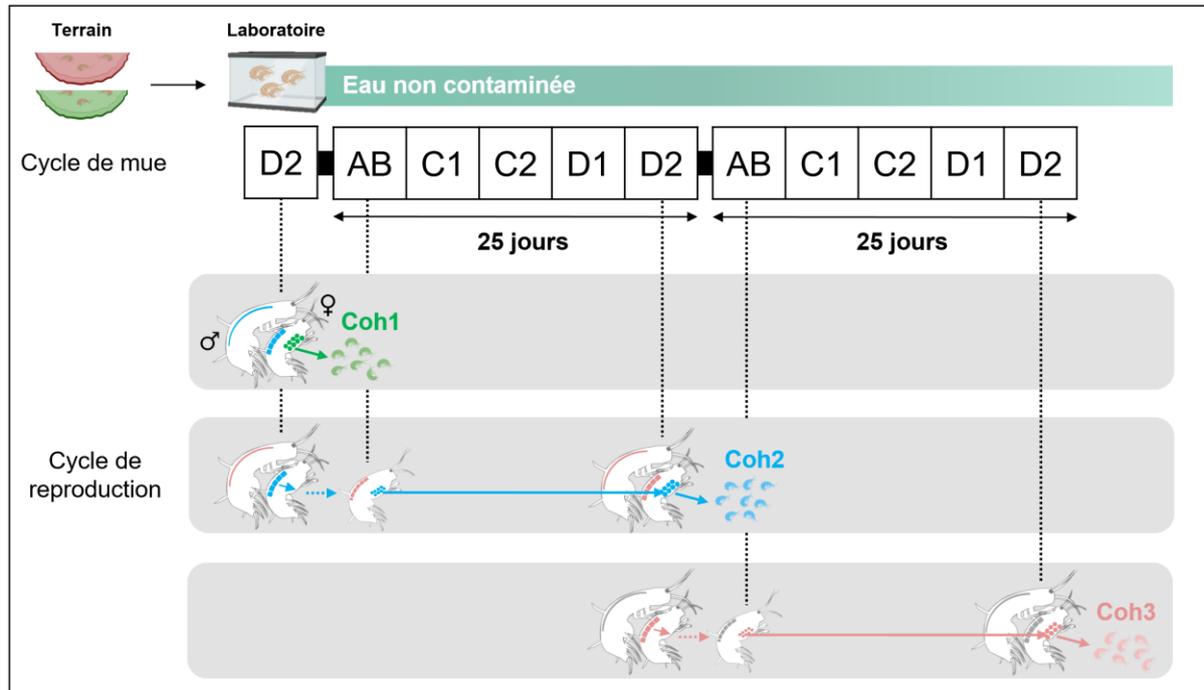


Figure II-6 : Design expérimental pour la production de trois cohortes successives de nouveau-nés (Coh1, Coh2, Coh3) relâchés en milieu propre au laboratoire par les populations de terrain.

Pour cela, 100 couples de gammarus avec des femelles au dernier stade de leur cycle de reproduction (stade D2 avec des nouveau-nés présents dans le marsupium) ont été triés visuellement pour chaque population d'étude. Pour chaque population et en condition sans Cd, deux aquariums en plastique de 2 L contenant 50 couples de gammarus chacun ont été mis en place. Les couples ont été suivis durant deux cycles de reproduction, c'est-à-dire pendant trois événements successifs de libération de nouveau-nés (approximativement 2 mois) (Figure II-6). La première cohorte de nouveau-nés (Coh1) obtenue moins d'une semaine après le tri des couples correspond aux embryons qui se sont développés dans le marsupium sur le terrain. La deuxième cohorte de nouveau-nés (Coh2), libérée un mois plus tard, sont eux aussi le produit de la fécondation de gamètes formés sur le terrain mais correspondent à des embryons qui se sont développés au laboratoire dans des conditions exemptes de Cd. Enfin, la troisième cohorte de nouveau-nés (Coh3) n'a jamais été exposée sur le terrain (ni pendant la gamétogenèse, ni

pendant l'embryogenèse). Les nouveau-nés de chaque cohorte et de chaque population ont été prélevés pour tester leur sensibilité au Cd (voir II-4).

3.2. Croisement entre populations

Afin de tester l'hypothèse de l'influence des effets maternels dans l'hérédité de la tolérance au Cd, l'influence à la fois des effets paternels et maternels ont été évalués en effectuant des croisements entre des géniteurs prélevés dans des populations contaminées et non contaminées (a priori tolérantes et sensibles).

Différents croisements ont été réalisés à partir des populations Ardillats, Marchampt, Cressonnière et Séran. Pour cela, après avoir été triés visuellement, les couples fraîchement collectés avec des femelles en stade D2 ont été séparés. Les femelles ont été remises en couple entre les conditions de statut contaminé et non contaminé donnant les conditions nommées AA, CC, MM, SS, AS, SA, AC, CA, MC et CM. La première lettre correspond à l'initiale du nom de la population du mâle et la deuxième lettre correspond à l'initiale du nom de la population de la femelle. Par exemple, les mâles de la population Séran ont été placés dans des aquariums de 2 L avec des femelles de la population Ardillats, formant la condition SA (Figure II-7).

Comme précédemment, à la fin du premier cycle de reproduction réalisé au laboratoire (Coh2 sur la Figure II-6), les nouveau-nés des différentes conditions ont été prélevés pour les tests de sensibilité au Cd (voir II-4).

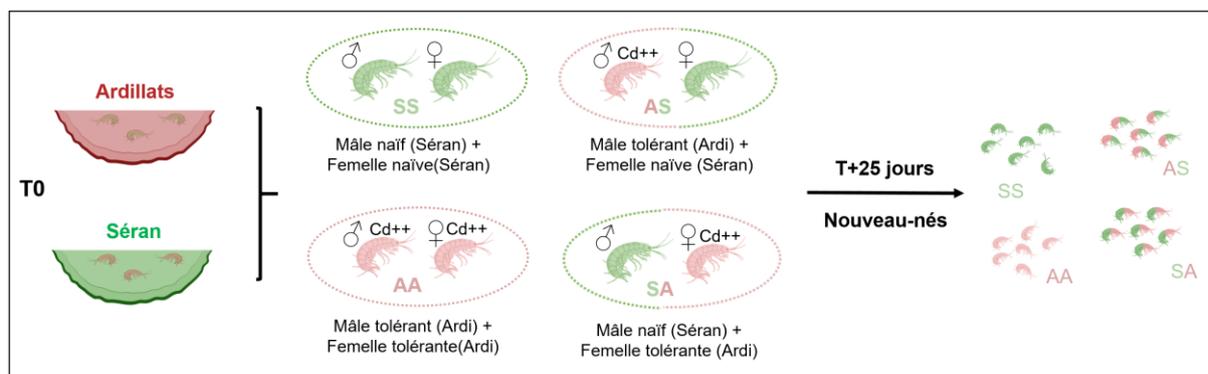


Figure II-7 : Exemple d'un croisement de populations réalisé entre la population tolérante Ardillats et la population sensible Séran.

3.3. Exposition d'une population naïve à des concentrations représentatives de l'environnement

3.3.1. Exposition durant un cycle de reproduction

La possibilité de modifier la sensibilité au Cd de la descendance via l'exposition parentale a été évaluée expérimentalement lors de tests au laboratoire *via* une exposition de géniteurs au Cd durant la gamétogenèse et/ou l'embryogenèse (Figure II-8). Pour cela, des couples de gammares fraîchement prélevés dans la population Sérán (non contaminée) ont été triés visuellement avec des femelles en stade D2. Avant de commencer l'exposition, les couples ont été maintenus dans l'eau de leur site jusqu'à ce que les femelles atteignent le stade A (24h après la ponte). Par la suite, les gammares ont été exposés dans des aquariums en plastique de 2 L. Pour cette expérimentation, une condition témoin et deux concentrations nominales de Cd de 0.1 µg/L et 1 µg/L ont été considérées avec deux aquariums répliqués contenant chacun 50 paires de gammares pour chaque condition d'exposition. Les aquariums témoins ont été remplis avec 1.5 L d'eau de forage (eau non contaminée) préalablement oxygénée pendant 24h et ayant une conductivité d'environ 300 µs/cm. Les aquariums contaminés contenaient 1.5 L de la même eau de forage avec l'ajout d'une solution mère de Cd à 1 mg/L pour atteindre la concentration d'exposition choisie. L'eau des aquariums (témoins et contaminés) a été renouvelée quotidiennement afin d'assurer une oxygénation suffisante de l'eau et afin de maintenir une concentration constante de Cd dans les aquariums contaminés.

L'exposition a été contrôlée en mesurant à la fois les concentrations de Cd dissous dans l'eau et les concentrations de Cd bioaccumulées. Pour ce faire, des organismes mâles de la population Cressonnière ont été mis en cage dans les aquariums d'exposition, en suivant la même procédure de mise en cage que la biosurveillance active réalisée lors du déploiement sur le terrain (voir II-1.2). Ces données de bioaccumulation nous ont permis d'évaluer la pertinence environnementale des concentrations d'exposition choisies par rapport au niveau d'exposition au Cd sur le terrain, indépendamment des différences de caractéristiques de l'eau entre les rivières et le laboratoire. L'exposition des géniteurs de Sérán a été conduite pendant 21 jours, permettant aux femelles d'atteindre le stade de mue D2 (Chaumot et al., 2020). L'exposition a ensuite été arrêtée et le premier cycle de reproduction s'est achevé pendant quelques jours dans des conditions exemptes de Cd. Une première cohorte de nouveau-nés libérés (ayant donc

accompli leur développement embryonnaire dans le marsupium des femelles exposées) a ensuite été collectée. Les géniteurs ont été maintenus pour un second cycle de reproduction dans des conditions exemptes de Cd. À la fin de ce deuxième cycle, les nouveau-nés (issus de la fécondation des gamètes produits pendant l'exposition au Cd) ont été collectés pour les tests de sensibilité au Cd (voir II-4).

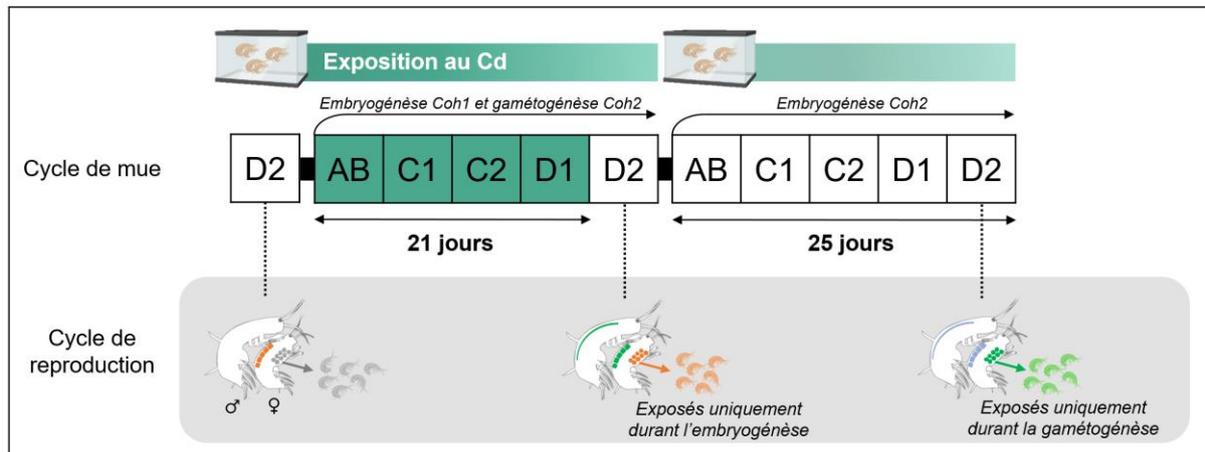


Figure II-8 : Design expérimental de l'exposition de géniteurs naïfs au Cd (concentrations nominales de 0.1 µg/L ou 1 µg/L) pendant un cycle de reproduction.

3.3.2. Exposition multigénérationnelle

Des expositions multigénérationnelles ont été conduites au laboratoire dans le but d'induire expérimentalement l'évolution possible de la tolérance au Cd observée chez les populations naturelles. Pour cela, des populations démarrées à partir de lots de jeunes gammares provenant de la population naïve Séran ont été exposés à des concentrations de Cd représentatives de l'environnement (0.5 µg/L) pendant plusieurs générations (Figure II-9). Dans ce manuscrit de thèse, les résultats pour deux lots prélevés à deux dates de pêche sont présentés : le lot du 22 février 2022 et le lot du 03 octobre 2022. Des essais préliminaires ont eu lieu en 2021 et ont permis d'établir les protocoles de maintien de ces populations en exposition.

Les mêmes protocoles ont été utilisés pour les deux lots. Ainsi, lors du prélèvement de la population Séran, seuls les seaux contenant les jeunes ont été considérés (gammares récupérés sur les tamis de 0.5 mm, voir section II-2.1), ils constituent la génération F0. Une fois arrivés au laboratoire, ces organismes (juvéniles donc) ont été répartis dans des aquariums de 11 L (un

seau = un aquarium). Pour le lot du 22 février 2022, 6 aquariums contaminés (appelés 2C, 6C, 7C, 8C, 9C et 10C) et 6 aquariums non contaminés (appelés 2T, 6T, 7T, 8T, 9T et 10T) ont été considérés. Pour le lot du 03 octobre 2022, 2 aquariums contaminés (appelés 4C et 5C) et 2 aquariums non contaminés (appelés 4T et 5T) ont été considérés.

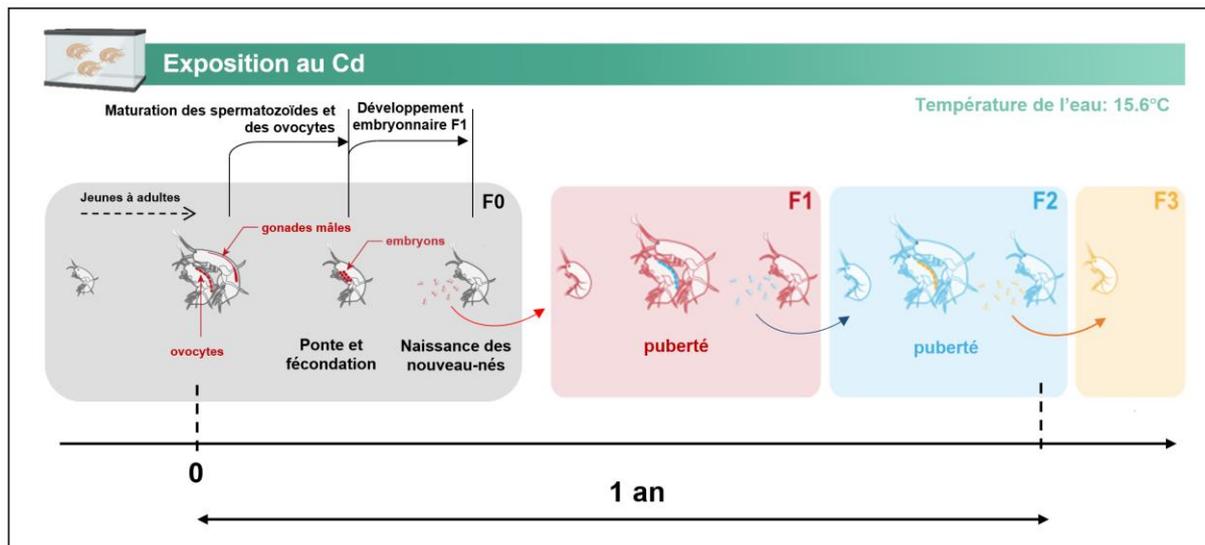


Figure II-9 : Design expérimental de l'exposition multigénérationnelle à une concentration de 0.5 µg/L de Cd.

Le dispositif expérimental mis en place pour cette expérimentation est présenté dans la Figure II-10. L'eau des aquariums non contaminés est renouvelée par goutte à goutte à partir d'une réserve d'eau alimentée en continu par un mélange d'eau de forage et d'eau osmosée à une conductivité d'environ 300 µs/cm. L'eau des aquariums contaminés est renouvelée par goutte-à-goutte à partir d'une cuve remplie trois fois par semaine avec de l'eau contaminée à une concentration nominale de Cd à 0.5 µg/L. Pour cela, des bidons sont remplis avec 10L du même mélange d'eau que pour les aquariums non contaminés avec ajout de 150 µL d'une solution de Cd à 50 mg/L. Puis les bidons sont vidés dans la cuve alimentant les aquariums contaminés. Tous les aquariums sont dotés d'un système d'oxygénation. Enfin, les gammars ont été nourris de la même manière que décrite dans la section 2.2 de ce chapitre.

Les bidons utilisés pour remplir la cuve et les tuyaux des arrivées d'eau ont été changés tous les 1 à 2 mois et la cuve de Cd étaient intégralement nettoyés avec de l'acide nitrique à 10% pour limiter une interaction entre le Cd et d'éventuels dépôts calcaires. Afin de contrôler les

niveaux d'exposition, les concentrations de Cd dissous dans l'eau et les concentrations de Cd bioaccumulés ont été mesurés à plusieurs dates avec le même protocole décrit dans la section précédente (voir II-3.3.1).

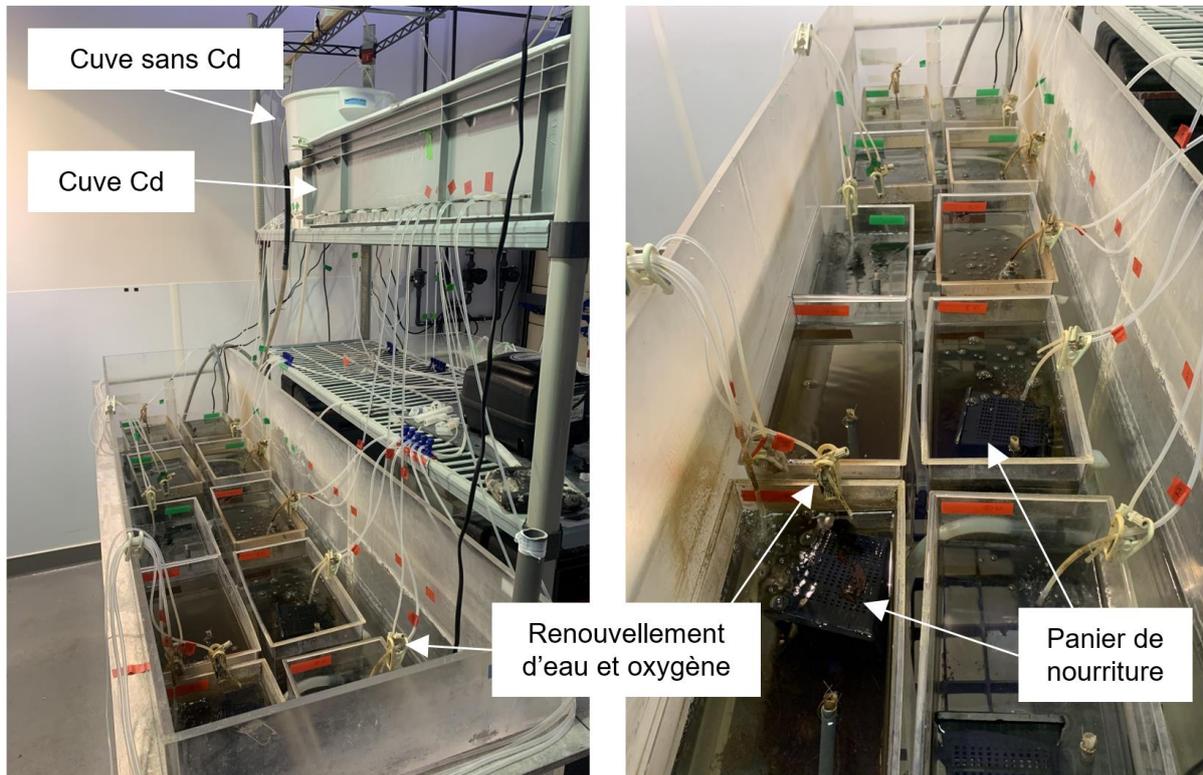


Figure II-10 : Dispositif expérimental mis en place pour l'exposition multigénérationnelle.

Lors de ces expositions multigénérationnelles, des tests de sensibilité aiguë au Cd (voir II-4) ont été réalisés, notamment au cours du stage d'IUT de Lison Geay (2023), sur des nouveaux nés prélevés dans les populations des deux lots à différents temps d'exposition. De plus, des mesures de traits d'histoire de vie ont été réalisées (voir section II-5) : mesure de la taille des femelles, des taux de croissance et des taux d'alimentation.

La correspondance entre durée d'exposition et générations présentes dans les populations suivies a été estimée grâce à la connaissance du cycle de reproduction (entrée en reproduction à une taille d'environ 5-6 mm) et des taux de croissance (les gammares grandissent d'environ 1 mm par mois) pour cette espèce (Coulaud, 2012; Chaumot et al., 2020).

4. Mesure de la sensibilité au cadmium

La sensibilité au Cd des gammares a été évaluée par des tests de toxicité aiguë en utilisant les mêmes protocoles que ceux définis par Vigneron et al. (2015, 2016, 2019), c'est-à-dire en utilisant la distribution des temps de survie individuels lors de l'exposition à une concentration létale afin d'estimer la tolérance au Cd de la population.

Le même protocole a été utilisé pour les jeunes (sélectionnés pour avoir une taille d'environ 3.5 mm) et les mâles adultes (avec une taille d'environ 100 mm). Pour chaque condition (population source, date d'échantillonnage, durée d'exposition ou de déacclimatation au laboratoire), trois répliques de 15 individus jeunes ou mâles adultes ont été exposées à une concentration nominale de 80 µg/L de Cd dans des bécchers en plastique de 500 mL (Figure II-11A). Pour l'évaluation de la tolérance de la descendance, les nouveau-nés ont été prélevés un jour après leur libération du marsupium maternel. Les tests de toxicité aiguë ont ensuite été réalisés en contrôlant individuellement chaque jour la survie des nouveau-nés exposés à une concentration en Cd de 20 µg/L. Un minimum de dix nouveau-nés exposés individuellement dans des falcons® de 50 mL a été considéré par condition (Figure II-11B). Les concentrations d'expositions ont été choisies selon Vigneron (2015) de façon à ce qu'elles soient suffisamment aiguës pour induire des effets létaux assez rapidement et pour que la mortalité observée soit spécifiquement attribuée au Cd, mais ces concentrations ont également été choisies pour qu'elles ne soient pas trop élevées afin de disperser les mortalités sur plusieurs jours, permettant ainsi de visualiser des variabilités de sensibilité entre les populations par conditions.

Les milieux d'exposition ont été préparés à partir de solutions mères de Cd à 0.1 g/L, régulièrement contrôlées par analyse chimique (analyse ICP-MS au laboratoire analytique de l'INRAE à Lyon). Pour l'exposition dans les bécchers, la solution de Cd à 80 µg/L a été préparée dans une fiole jaugée de 1 L avec de l'eau de forage (oxygénée et conductivité à 300 µs/cm) en ajoutant 800 µL de la solution mère. Les falcons® contaminés ont été remplis d'une solution de Cd à 20 µg/L selon le même protocole avec un mélange d'eau minérale d'Evian® et d'eau déminéralisée (50/50) avec une conductivité à 300 µs/cm. Les falcons® et les bécchers ont été maintenus dans un bain-marie thermorégulé à 12°C et la mortalité a été suivie quotidiennement pendant les tests d'exposition (Figure II-11).

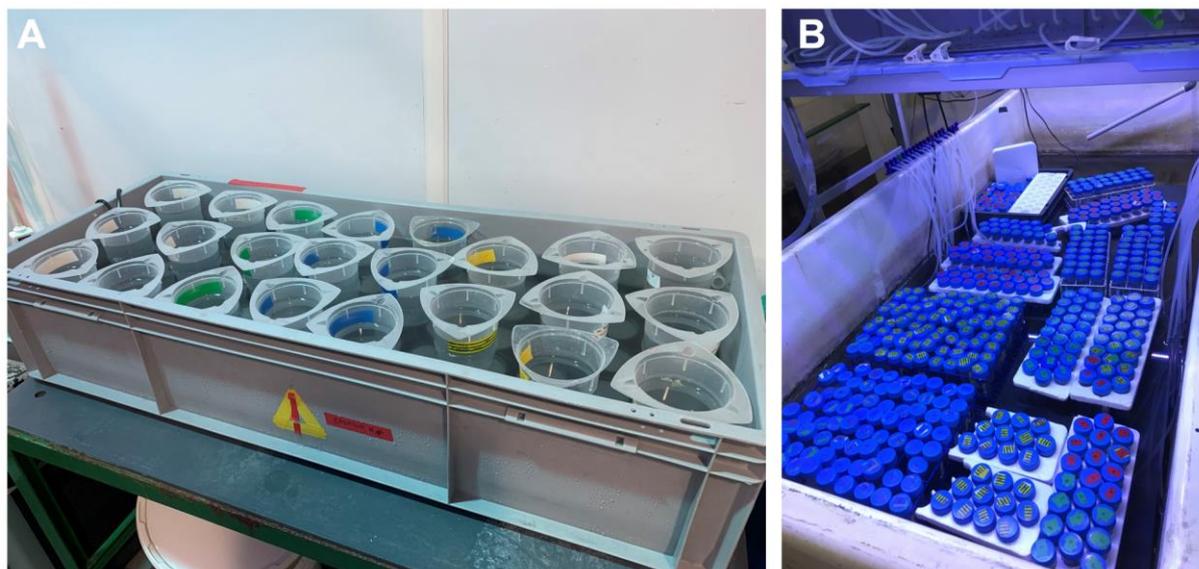


Figure II-11 : Exemple de test de toxicité aiguë (A) chez les adultes et les jeunes à une concentration de 80 $\mu\text{g/L}$ et (B) chez les nouveau-nés à une concentration de 20 $\mu\text{g/L}$.

5. Mesure des traits d’histoire de vie

5.1. Taux de croissance

Une évaluation des capacités de croissance a été réalisée sur des jeunes organismes (taille de départ visée de 3.5 mm). Le taux de croissance a ainsi été mesuré en sortie de terrain chez les populations naturelles utilisée au cours de cette thèse et après 6 mois au laboratoire et en eau propre chez ces mêmes populations. Il a également été mesuré chez les jeunes des deux lots de l’exposition multigénérationnelle. Pour chacune de ces expérimentations, 30 organismes triés en taille ont été placés dans des aquariums de 2 L. Pour les populations de terrain (en sortie et après 6 mois), les organismes ont été placés dans des aquariums contenant 1.5 L d’un mélange d’eau de forage et d’eau osmosée (à une conductivité d’environ 300 à 350 $\mu\text{s/cm}$). Pour les individus de l’exposition multigénérationnelle, les individus provenant des aquariums témoins ont été placés dans les mêmes conditions précédemment décrites et les individus provenant des aquariums contaminés ont été placés dans des aquariums contenant 1.5 L d’eau contaminée à une concentration nominale de 0.5 $\mu\text{g/L}$ de Cd. Chaque aquarium était renouvelé en continu (témoin et exposé), possédait un système d’oxygénation et était placé dans un bain-marie thermorégulé à 15.6°C. En complément du nourrissage avec des feuilles d’aulnes, les jeunes étaient nourris par un apport de fèces de gammarès.

Le suivi de taille a été effectué soit tous les mois, soit tous les 15 jours, par des prises de photos sous loupe binoculaire (Leica Application Suite v405) de tous les organismes de chaque aquarium. Les mesures de taille ont été effectuées telles que décrites dans la section II-5.3.

5.2. Taux d'alimentation

Le taux d'alimentation des gammares a été mesuré en condition contrôlée au laboratoire en sortie de terrain pour les populations de terrain, mais également chez les individus des deux lots de l'exposition multigénérationnelle. La mesure du taux d'alimentation chez les gammares se fait chez les mâles adultes calibrés en taille (environ 10 mm), cette mesure développée par le laboratoire INRAE fait l'objet d'une norme AFNOR (XP T90-722-3).

Pour les populations naturelles en sortie de terrain, 20 mâles de taille calibrés ont été triés pour chaque population et placés dans des béchers de 900 mL contenant des disques de feuille d'aulne de 22 mm de diamètre (préalablement réalisés à l'emporte-pièce). Pour chaque population, 3 réplica ont été considérés. Les béchers ont ensuite été placés dans un bain-marie thermorégulée à 12°C. Pour l'exposition multigénérationnelle, 10 gammares mâles homogènes en taille de chaque aquarium ont été placés dans un système avec 10 disques de feuilles calibrés en taille. Chaque cage a été remplacée dans l'aquarium correspondant au prélèvement des mâles expérimentés.

Au bout de 7 jours, pour chaque expérimentation, la taille des organismes a été mesurée selon la même méthode que décrit dans le paragraphe II-5.3. De même, les disques de feuille restants ont été récupérés et scannés afin de mesurer leur surface à l'aide du logiciel imageJ. Ainsi, les taux d'alimentation des gammares ont été obtenus en calculant la surface de feuille consommée par jour et par gammare ($\text{mm}^2/\text{jour/gammaré}$) comme décrit par Coulaud et al. (2011).

5.3. Mesures démographiques (structure de taille des populations *in situ*)

Au cours du stage de Clément Colomb (Master 1 « Science de l'eau », Université Lyon 2) et dans l'objectif d'établir les structures de taille des populations et grâce à la caractérisation de la mosaïque de substrats de chaque rivière réalisée pour la caractérisation de l'habitat des

différentes populations d'étude (voir II-1.3), des relevés démographiques standardisés des populations de *G. fossarum* entre rivières ont pu être établis. L'effort d'échantillonnage a été déterminé pour récolter environ 2000 gammares adultes (prélèvement au surber) pour caractériser la structure de population adulte de chacun des sites. Les densités de gammares variant d'une population à l'autre, des efforts d'échantillonnage différents ont été menés pour chaque site. L'échantillonnage de ces 2000 individus s'est voulu représentatif de la population sur l'ensemble du tronçon de rivière d'étude. Pour cela, nous avons tenu compte du pourcentage obtenu pour chaque type de substrat. Par exemple, pour le site Doulonne présentaient 48% de cailloux grossiers, 13% de cailloux fins, 15% de racines et 24% de litière. Ainsi, cinq prélèvements surber ont été effectués dans les cailloux grossiers, deux dans la litière et un dans les cailloux fins et dans les racines.

La collecte des populations de *G. fossarum* a été réalisée par perturbation manuelle du substrat à l'aide d'un surber avec une maille de 215 μm et un cadre de 0.0625 m². Ensuite, les organismes collectés ont été tamisés sur une colonne de tamisage composée d'un tamis de 10 mm et d'un tamis de 1.25 mm (ce choix a été fait d'après Coulaud et al. (2014) afin d'obtenir tous les organismes adultes, sans trop de juvéniles) et répartis dans des seaux de transport.

À la suite du prélèvement (pour plus de détails, voir Chapitre III-2.1), les organismes ont été triés dans les 24h (voir Figure II-12). L'objectif de l'échantillonnage était d'isoler toutes les femelles adultes, facilement distinguables du fait qu'à la période de prélèvement (printemps) la quasi-totalité des femelles sont en reproduction (porteuses d'ovocytes et/ou d'embryons) au sein des populations de *G. fossarum* (Coulaud et al 2014). Ainsi on peut établir une distribution en taille de la population adulte femelle. À partir de cette distribution, nous avons pu comparer entre les populations la taille d'entrée en puberté (en considérant par exemple comme proxy le 5^{ème} percentile de cette distribution), la taille médiane des femelles adultes ou encore les tailles maximales atteintes (en considérant comme proxy le 95^{ème} percentile de la distribution). L'incertitude de ces estimations a été évaluée par bootstrap (retirage aléatoire avec remise de 100 échantillons). Pour les mâles, le sexage des individus prépubères et pubères sous binoculaire aurait été obligatoire pour avoir la même démarche, ce qui aurait été très chronophage. Nous avons tout de même pu estimer le 95^{ème} percentile de la distribution de taille chez les mâles adultes car ce sexage n'est pas nécessaire pour les individus de grandes

tailles. Pour cela nous avons isolé les 10% de mâles les plus grands présents dans les prélèvements. Aussi, pour chaque population, le nombre exact total de gammares échantillonnés a tout d'abord été compté. Ensuite, un minimum de 50 femelles en reproduction a été prélevé au hasard à l'aide d'une méthode de sous-échantillonnage (Figure II-12). Ces femelles ont été identifiées visuellement par la présence d'ovocytes et/ou par la présence d'embryons dans le marsupium. Les petits individus n'ayant pas pu être identifiés à l'œil nu dans le sous-échantillon ont été déterminés à la loupe binoculaire. Le nombre de mâles collectés par population a été ajusté aux densités collectées en tenant compte d'un sex-ratio de 1:1 (Coulaud et al., 2014) pour viser un nombre final de mâles mesurés correspondant aux 10% des mâles les plus grands de la population. La médiane des tailles de mâles de ces échantillons a été calculée ensuite pour estimer le 95^{ième} percentile de la distribution des mâles adultes dans chaque population.

Les gammares mâles et femelles sélectionnés ont ensuite été photographiés à la loupe binoculaire (Leica Application Suite v405) à un grossissement de 6.3 et mesurés manuellement à l'aide du logiciel imageJ. Les mesures de taille ont été prises de la base de l'antenne 1 à l'extrémité du métasome.

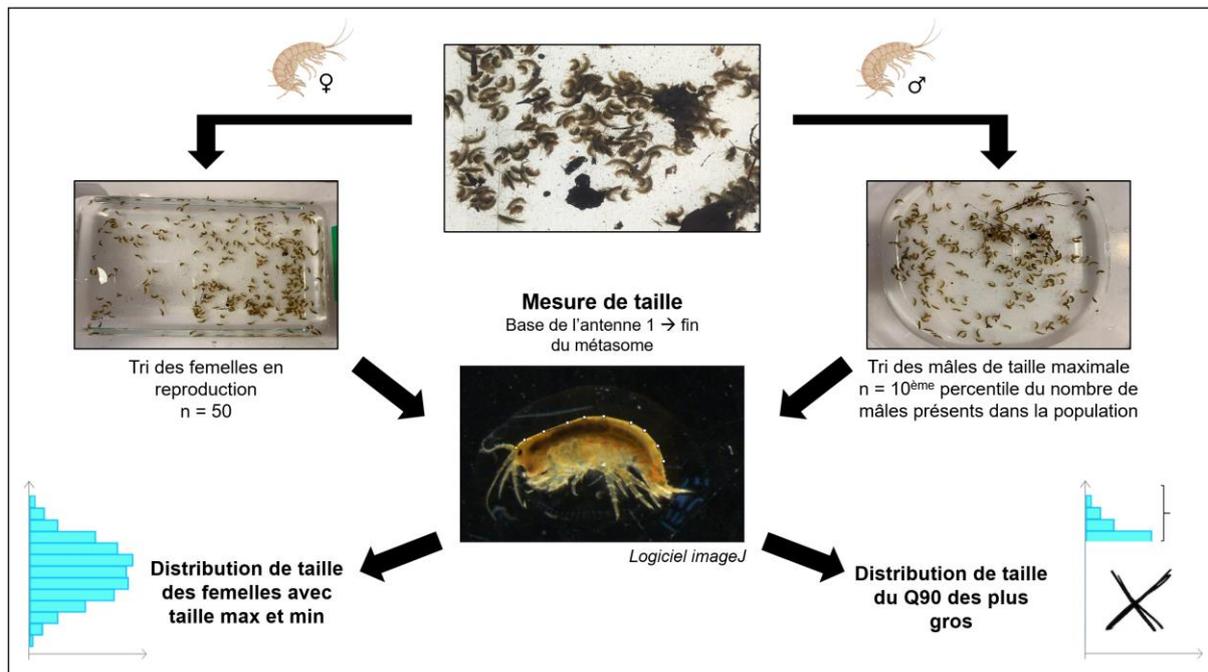


Figure II-12 : Design expérimental de l'échantillonnage pour les femelles et les mâles réalisé dans l'objectif d'établir les structures de taille des populations.

6. Mesure de l'expression de gène des métallothionéines

L'expression de gène des métallothionéines chez les gammars a été mesurée via un protocole de RT-qPCR effectué en trois grandes étapes : extraction de l'ARN, rétrotranscription inverse (RT) et PCR quantitative (qPCR). Le protocole détaillé est présenté dans la publication n°3 (Chapitre IV-1.1). La mesure de l'expression de gène des métallothionéines a été réalisée chez des adultes et des nouveau-nés en sortie de terrain et après 2 mois passés en eau propre au laboratoire. Ces mesures ont notamment été réalisées dans le cadre du stage de Master 2 « Écotoxicologie et Chimie de l'Environnement » (Université de Bordeaux) de Louveline Lépeule et dans le cadre du stage de BTS de Maxence Ruby (Université Lyon 1).

L'extraction de l'ARN s'est faite à partir d'échantillons d'organes (caeca et branchies) ou de pool de nouveau-nés grâce au kit RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit de chez Qiagen selon le protocole en Annexe 1. Une fois l'extraction réalisée, la quantité et la qualité des ARNs extraits est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop™ One (Thermo Fisher). Les ARNs (environ 100 ng pour les organes et les nouveau-nés) sont ensuite rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) grâce au kit High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) en suivant le protocole en Annexe 2. À la suite de la RT, l'ADNc est dilué au 1:5 puis additionné au tampon ONEGreen® (Ozyme) contenant un ADN polymérase et du colorant fluorescent ainsi qu'à des amorces spécifiques au transcrit (Annexe 3). Pour chaque échantillon, trois répliques techniques sont réalisés. La PCR quantitative (qPCR) a été réalisée sur une machine Biorad CFX96. Pour chaque gène dans chaque échantillon, son niveau d'expression est identifié par un cycle threshold (Ct), le nombre de cycles nécessaire pour que la machine puisse détecter la fluorescence. Les métallothionéines sont quantifiées par la méthode de quantification relative (ΔCt) en utilisant la transcription du facteur d'élongation (EF) (gène de référence) pour normaliser l'expression des gènes entre les échantillons.

Chapitre III : Etude de la variabilité de la sensibilité et des traits d'histoire de vie de populations naturellement exposées au cadmium

Ce chapitre regroupe un ensemble de travaux mis en place pour identifier la variabilité populationnelle chez *G. fossarum* dans la sensibilité toxicologique et les traits d'histoire de vie.

La première partie se compose de la publication n°1 (Lalouette et al., 2023, *Stoten*) dont l'objectif était d'étudier si la tolérance au Cd est un phénomène fréquemment retrouvée dans les populations naturelles habitant des cours d'eau de tête de bassin versant, et de préciser la nature de la tolérance et de sa transmission intergénérationnelle. Pour cela, la sensibilité toxicologique a été testée chez des populations issues de cours d'eau présentant un gradient de contamination biodisponible en Cd, à différents temps (sortie de terrain, après maintien en condition propre au laboratoire) et à différents stades de vie (adultes, jeunes, nouveau-nés). Nous avons notamment mobilisé pour cette publication les résultats de tests (sensibilité, bioaccumulation) du master de Maxime Alibert qui avait précédé les travaux de cette thèse en 2017. L'ensemble a été complété par les suivis terrain et expérimentations au laboratoire réalisés au cours de la thèse. En complément de cette première partie, la note n°1 vient compléter les résultats obtenus et non présentés dans la publication n°1.

Dans la deuxième partie on retrouve la publication n°2 (*en préparation*) dont l'objectif était d'étudier au sein de la variabilité environnementale si une exposition long terme au Cd entraîne une modification de la taille des individus (taille médiane, taille à la puberté, taille maximale atteinte). Pour cela, la distribution en taille des femelles adultes et la taille maximale des mâles atteinte au sein d'une douzaine de populations a été estimée grâce à des relevés démographiques détaillés de la structure des populations (structure de taille, sexage) dans des cours d'eau présentant eux aussi un gradient de contamination biodisponible en Cd et des caractéristiques d'habitats homogènes (hors contamination). Des résultats complémentaires à cette deuxième publication sont présentés dans trois notes. La note n°2 présente des résultats obtenus d'autres traits, à savoir la consommation alimentaire, la fécondité des femelles et les taux de croissance chez quelques-unes des populations étudiées. La note n°3 se consacre à l'étude de la variabilité de ces traits d'histoire de vie après un retour en eau propre au laboratoire pour quatre populations. Enfin la note n°4 examine la variabilité de la taille des branchies entre des populations naturelles tolérantes et sensibles au Cd.

1. Modification de la sensibilité toxicologique

1.1. Publication n°1 : L'acclimatation et la plasticité transgénérationnelle expliquent la tolérance au cadmium chez les populations de *Gammarus* exposées à la contamination naturelle par les métaux dans les cours d'eau de tête de bassin versant

Acclimatation and transgenerational plasticity support increased cadmium tolerance in *Gammarus* populations exposed to natural metal contamination in headwater streams

Auréline Lalouette, Davide Degli Esposti, Laura Garnero, Maxime Allibert, Lysiane Dherret, Aymeric Dabrin, Nicolas Delorme, Rémi Recoura-Massaquant, Arnaud Chaumot

DOI : 10.1016/j.scitotenv.2023.166216

Résumé

La prise en compte des effets longs termes induits par des expositions chroniques au contaminant chez les populations demeure limitée dans le domaine de l'évaluation du risque écologique. Dans les milieux naturels, les preuves que l'exposition multigénérationnelle influence la sensibilité des organismes sont encore rares, et les mécanismes doivent encore être élucidés. Cette étude se concentre sur le crustacé *Gammarus fossarum*, pour lequel une tolérance accrue au cadmium (Cd) a précédemment été rapportée dans un cours d'eau de tête de bassin versant naturellement peu contaminé. Les objectifs de cette étude étaient d'étudier si la tolérance au Cd est un phénomène fréquemment retrouvé dans les populations de tête de bassin versant, et de préciser la nature de la tolérance et de sa transmission intergénérationnelle. Pour cela, nous avons procédé à une caractérisation *in situ* de l'exposition au Cd (par l'encagement de gammares) et des niveaux de tolérance dans neuf populations à l'échelle régionale. De plus, quelques populations ont été maintenues au laboratoire et des croisements entre populations contaminées et non contaminées ont été réalisés. Les résultats montrent que l'on retrouve une corrélation positive entre les niveaux de tolérance obtenus lors d'une exposition aiguë au laboratoire et les niveaux de contamination de Cd biodisponible dans les cours d'eau. Les populations contaminées et non contaminées diffèrent d'un ordre de grandeur de deux en termes

de sensibilité au Cd (ratio de LT50). La tolérance a été retrouvée dans toutes les classes d'âge des populations contaminées, peut être perdue transitoirement au cours de l'année, et est transmissible à la descendance produite en laboratoire. D'autre part, les niveaux de tolérance des individus issus des populations contaminées chutent de manière significative lorsqu'ils sont transférés dans un environnement sans Cd au laboratoire pendant deux mois. Ces organismes cessent également de produire des descendants tolérants, ce qui indique une transmission non génétique de la tolérance au Cd entre les générations. Ces résultats confirment que la tolérance au Cd correspond à une acclimatation non génétique combinée à une plasticité transgénérationnelle. De plus, les croisements ont révélé que la transmission de la tolérance à la descendance ne se limite pas à l'effet maternel. L'épigénétique semble ainsi être un mécanisme plausible expliquant la plasticité de la sensibilité au Cd observée sur le terrain. Nos résultats soulignent donc le rôle négligé de la plasticité et de la transmission non génétique de sensibilités lors de l'exposition à long terme de populations naturelles à la contamination environnementale.

Abstract

Considering long-term population effects of chronic exposure to contaminants remains limited in ecological risk assessment. Field evidence that multigenerational exposure influences organisms' sensitivity is still scarce, and mechanisms have yet to be elucidated in the environmental context. This study focuses on the crustacean *Gammarus fossarum*, for which an increased tolerance to cadmium (Cd) has previously been reported in a naturally low-contaminated headwater stream. Our objectives were to investigate whether Cd tolerance is a common phenomenon in headwater populations, and to elucidate the nature of the tolerance and its intergenerational transmission. For this, we carried out an in-depth *in situ* characterization of Cd exposure (gammarids' caging) and levels of tolerance in nine populations on a regional scale, as well as laboratory maintenance and cross-breeding of contaminated and uncontaminated populations. Acute tolerance levels correlate positively with bioavailable Cd contamination levels among streams. The contaminated and non-contaminated populations differ about two-fold in sensitivity to Cd. Tolerance was found in all age classes of

contaminated populations, it can be transiently lost during the year, and it was transmissible to offspring. In addition, tolerance levels dropped significantly when organisms were transferred to a Cd-free environment for two months. These organisms also ceased producing tolerant offspring, confirming a non-genetic transmission of Cd tolerance between generations. These findings support that Cd tolerance corresponds to non-genetic acclimation combined with transgenerational plasticity. Moreover, cross-breeding revealed that tolerance transmission to offspring is not limited to maternal effect. We suggest epigenetics as a plausible mechanism for the plasticity of Cd sensitivity observed in the field. Our results therefore highlight the neglected role of plasticity and non-genetic transmission of modified sensitivities during the long-term exposure of natural populations to environmental contamination.

1- Introduction

Consideration of the long-term population effects of chronic exposure to chemical contaminants remains limited in ecotoxicological studies and ecological risk assessment (Straub et al., 2020). However, the fact that evolutionary processes related to chemical exposure can induce long-term changes in contaminant sensitivity and life history traits of wild populations is now well-documented (Medina et al., 2007; Coutellec and Barata, 2013; Brady et al., 2017), especially in aquatic populations (Klerks and Weis, 1987; Johnston, 2011). But the majority of aquatic ecotoxicological studies considering multi-generation exposure to contaminants is confined to laboratory studies on model species (*e.g.*, daphnid clones, dipterans, nematodes, tropical fish) under standardized conditions and for a few dozen generations at most. Although these studies are of real interest for deciphering contaminant-induced evolutionary mechanisms, they do not fully reflect the complexity of processes underlying the effects of multigenerational exposures on population tolerance to contamination and life histories within natural ecosystems (Coutellec and Barata, 2013; Oziolor et al., 2016). Indeed, field studies revealing increased tolerance by comparing populations living in more or less contaminated stream habitats show in many cases spatial variations and especially temporal fluctuations in tolerance levels, as reported for example for heavy metals or insecticides in non-target aquatic arthropods (*e.g.*, Maltby and Crane, 1994; Groenendijk et al., 1999, 2002; Weston et al., 2013; Shahid et al., 2018a; Becker

et al., 2020). The authors of these studies explain such fluctuating tolerance patterns by evocating the combined effects of the seasonal variability of exposure in streams (Groenendijk et al., 1999, 2002; Shahid et al., 2018a; Becker et al., 2020), the existence of regular migratory flows between contaminated and non-contaminated areas within hydrosystems (Groenendijk et al., 2002; Weston et al., 2013), or the antagonist influence of fitness costs of tolerance (Maltby and Crane, 1994; Groenendijk et al., 1999, 2002), which are exacerbated in multi-stress contexts. All these processes are difficult to address in laboratory studies.

A central question that needs to be addressed in order to understand the magnitude and stability over time of changes in contaminant susceptibility in historically exposed populations is the genetic or non-genetic nature of the observed tolerance. Returning organisms from contaminated habitats to the laboratory under uncontaminated conditions and monitoring maintenance of tolerance in progeny is often carried out to tackle this question (*e.g.*, Gamble et al., 2023; Groenendijk et al., 2002; Vigneron et al., 2019). Increased tolerance may indeed result from two main categories of adaptive processes: genetic adaptation or acclimation, the latter covering phenomena ranging from short-term physiological acclimation up to processes of phenotypic plasticity. In the case of genetic adaptation, the contaminant acts as a selective force on the population genetic structure, favouring genotypes that confer tolerance to the toxic effects. This tolerance is irreversible at the individual scale and inherited by offspring, which supports the propagation of the tolerance over several generations (Klerks and Weis, 1987; Medina et al., 2007). Plasticity mechanisms leading to the adjustment of physiological or morphological traits to the presence of the toxic action of a contaminant may also lead to increased tolerance in case of acclimation. In this case, the acquisition of tolerance may be reversible during the individual's lifetime when the contamination is removed (case of phenotypic flexibility following the definition of Piersma and Drent, 2003); but tolerance may also be fixed in some case of phenotypic plasticity, especially when organisms are exposed during development. In ecotoxicology, such developmental plasticity has been documented, for example, in the aquatic snail *Physa*, which exhibits a drop in acute Cd sensitivity when exposed to 2 µg/L of Cd during embryonic development (Plautz and Salice, 2013).

Freshwater amphipods have been suitable model species to shed light on the acquisition of contaminant-induced population tolerance in the field. Several series of evolutionary ecotoxicology studies have indeed focused on field populations belonging to the genus *Gammarus* in Europe (in particular in *G. pulex*, *G. fossarum*) and to the species *Hyalella azteca* in North America. In *H. azteca*, a large body of studies has documented the emergence of high tolerance to pyrethroid and organophosphate insecticides (e.g., Gamble et al., 2023; Major et al., 2020; Sever et al., 2020; Weston et al., 2013). Tolerance implies both genetic resistance driven by point mutations in protein targets of insecticides, and acclimation phenomena related to the activation of detoxification enzymatic systems (Fung et al., 2021). Long-term rearing experiments in uncontaminated conditions in the laboratory and crossbreeding between sensitive and tolerant populations have notably concluded to a strong genetic component of the tolerances developed by *H. azteca* in aquatic systems contaminated by these insecticides (Heim et al., 2018; Sever et al., 2020; Gamble et al., 2023). In *G. pulex*, tolerance to neonicotinoids has also been documented in different stream populations in German agricultural contexts, but of much lower magnitude (Shahid et al., 2018a; Siddique et al., 2020). These moderate tolerance levels present some spatial and seasonal variability (Becker et al., 2020), which have led to discuss about the genetic or acclimation nature of tolerance (Siddique et al., 2021). Švara et al. (2021) showed that a *G. pulex* population may instead become more sensitive to neonicotinoids in a river contaminated by urban micropollutants, including neonicotinoid insecticides. Schneeweiss et al. (2023) also reported an increased sensitivity to neonicotinoids of *G. fossarum* populations living in agricultural sites compared to natural areas. In *G. pulex*, increased tolerances have been documented *in situ* for metallic contaminants as well, with here again variability in tolerance levels recorded over time (Maltby and Crane, 1994; Khan et al., 2011).

Our previous works in a case study of a *G. fossarum* population (population Ardillats) also revealed the possibility of increased tolerance to Cd, transmissible to offspring (Vigneron et al., 2015, 2019). This population inhabits a headwater stream influenced by a natural geochemical background of Cd occurring in the Beaujolais region of France. More specifically, we assumed the existence of non-genetic parental effects (especially maternal effects) from the observation that the tolerance is transmitted only to offspring from the first clutches produced in Cd-free

conditions by genitors of the Ardillats population returned to the laboratory (Vigneron et al., 2019). This led us to the conclusion that the observation of the transmission to the progeny of Cd tolerance in this population does not demonstrate a genetic adaptation. Rather, it would result from an effect of parental exposure inducing transgenerational plasticity that influences the sensitivity of offspring within the population. This process of transgenerational acclimation is increasingly emphasized in evolutionary biology for the understanding of population adaptability to environmental stressors involving non-genetic mechanisms of inheritance, especially, the acquisition of stress tolerance through parental effects (Mousseau and Fox, 1998; Uller, 2008). The transfer of stress tolerance to progeny could hence occur without modification of the genetic DNA sequences by means of epigenetic modifications, transfers of non-coding RNA, or other cytoplasmic elements in eggs (Ho and Burggren, 2010). Already documented in laboratory ecotoxicological studies (*e.g.*, Plautz and Salice, 2013; Tsui and Wang, 2005), but also in the field in one fish population (Munkittrick and Dixon, 1988), this phenomenon of transgenerational acclimation renews the possible debate about the genetic or plastic nature of the tolerance documented in contaminated aquatic environments.

The objectives of the present study are to extend the initial results we obtained with the Ardillats population case study regarding the effect of long-term exposure to environmental metal contamination on Cd sensitivity of *G. fossarum* populations. More specifically, we aimed: i) to confirm the development of increased Cd tolerance in the field by comparing the sensitivity of nine *G. fossarum* populations selected from headwaters streams of different watersheds in natural contexts presenting contrasting levels of Cd bioavailability conditions; ii) to document the variability of tolerance over time and between age classes within tolerant populations; iii) to advance our understanding of the nature of tolerance acquisition (transient physiological acclimation *vs* permanent acquisition of tolerance over organism's lifetime) by maintaining organisms from these populations under Cd-free laboratory conditions; and iv) to investigate the mechanisms of transmission between generations (maternal and paternal effects) by exposing genitors from an uncontaminated population to Cd before evaluating a possible modification of the sensitivity of the progeny, and by crossing genitors from sensitive and tolerance field populations. Our results lead us to discuss the possibly neglected role of

plasticity and non-genetic transmission of altered sensitivities during long-term acclimation of populations to environmental contamination.

2- Material and Methods

2.1- Selection of the nine *G. fossarum* populations of the study

The primary objective of the study was to extend our previous observation of Cd tolerance in the *G. fossarum* population Ardillats, which is historically exposed to a natural geochemical metal background in soft water conditions in the context of the crystalline bedrock of the Beaujolais region (Besse et al., 2013; Vigneron et al., 2015). Hence, we selected populations inhabiting upstream areas of headwater streams in the same Beaujolais region (Poye, Vernay, Marchampt populations), completed by two distant populations in the Vosges region (Rauenthal and Vancelle), also situated on a crystalline bedrock, and two other stream populations (Ognon, Séran) situated on sedimentary substratum (Figure 1). All these sites are located in natural or semi-natural context, as the Ardillats population. Based on geological mapping information and previous environmental contamination data, we assumed that inter-site differences in Cd bioavailability would exist due to possible natural geochemical Cd sources in Beaujolais and Vosges region, and the existence of contrasts in water hardness within and between watersheds, which is known to deeply influence Cd bioavailability for *Gammarus* (Pellet et al., 2009; Urien et al., 2016). In addition, we selected these sites because they shelter *G. fossarum* populations at high densities, and previous sampling of organisms carried out in these sites for a European-scale genetic COI barcoding study (Wattier et al., 2020) led us to assign these *Gammarus* populations to the same cryptic lineage as the organisms from the population Ardillats (*G. fossarum* B, BIN-ACG7784). The Cressonnière population, which is the source of organisms for all experiments conducted in the INRAE laboratory of Lyon-Villeurbanne since ten years, completed the set of studied populations. This population inhabits the preserved area of a former watercress farm near the Pollon River. In a previous biology molecular study, we assigned the *G. fossarum* organisms from this population to the two cryptic lineages *G. fossarum* B and C (Cogne et al., 2019). Tableau II-1 supplies the location details of the nine study sites. Cd-exposure experiments were conducted with gammarids from the nine

populations, after they were collected by kick sampling using a hand net, and quickly transported to the laboratory in plastic buckets containing ambient freshwater. Until experiments, they were maintained in the water of their own site at 12°C and they were fed *ad libitum* with conditioned alder leaves (*Alnus glutinosa*).

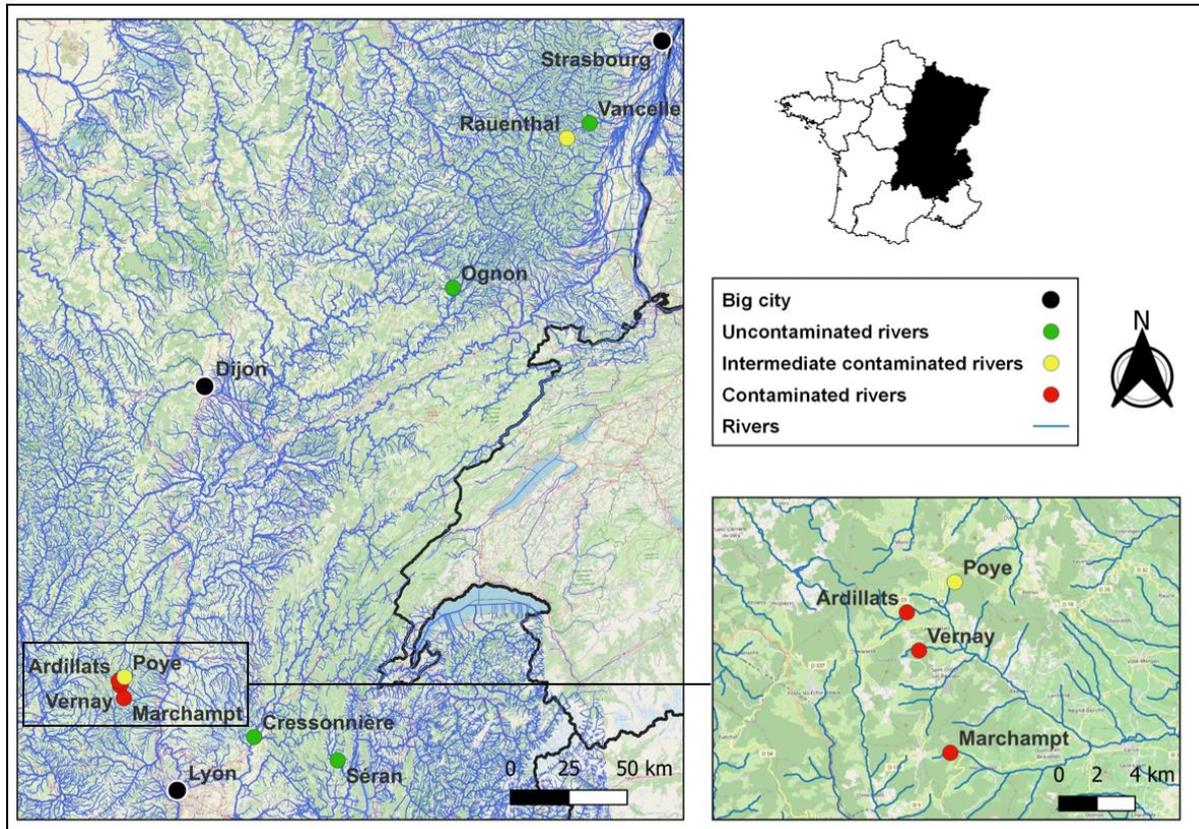


Figure 1 : Location of the nine studied *G. fossarum* populations in Eastern France. The stream Cd contamination status (green, yellow, red colours) was established following the active biomonitoring approach (based on *Gammarus* caging) developed to characterise bioavailable contamination water bodies in France (see results in Figure 2). The inset on the bottom right shows a focus on the Beaujolais region encompassing the Ardillats population form Vignerón et al. (2015, 2019).

As in previous studies (Vignerón et al., 2015; Alric et al., 2019), we assessed population field exposure to Cd based on bioaccumulation data obtained following an active biomonitoring approach, which involves transplanting gammarids from the same reference population to all study sites for a fixed exposure duration (Annexe F1-a). This methodology allowed us to address the caveats of comparative field studies generally based on measurements of water or sediment contamination, for which environmental complexity may obscure the bioavailability

and inter-site gradient in exposure of organisms to the contaminants (Oziolor et al., 2016). This standardized procedure (NFT90-721 standard AFNOR) developed in our laboratory (Besse et al., 2013; Ciliberti et al., 2017) is now applied for regulatory monitoring of French water bodies contamination (Alric et al., 2019; Sarkis et al., 2020). Briefly, male gammarids (with a body size of about 11 mm) from the population Cressonnière, stabling for 15 days in the laboratory, were transplanted by caging during seven days in each site of interest at different dates in 2015, 2020, 2022. Data in 2013 and 2014 were already available for the Ardillats population (Vigneron et al., 2015). After the *in situ* exposure, the concentration of bioaccumulated Cd in caged gammarids was analysed by the INRAE analytical laboratory in Lyon by inductively coupled plasma triple quadrupole mass spectrometry (iCAPTM TQ ICP-MS, Thermo Electron) after microwave assisted acid digestion (HNO₃ 14M) of the samples. The limit of quantification (LQ) was determined according to the NFT90-210 standard AFNOR for Cd and is 0.015 µg/g dry weight. Because the Cressonnière population is the laboratory's reference population of gammarids used for conducting caging biotests, the bioaccumulation data used for this site correspond to the direct measure in gammarids after sampling of the source population before transplantation to the other sites.

2.2- Acute toxicity tests for Cd tolerance assessment

In order to assess Cd sensitivity of gammarids, we performed acute toxicity tests according to Vigneron et al. (2015, 2016, 2019), using the distribution of individual survival times during exposure to a lethal concentration in order to estimate population Cd tolerance. We used the same protocol for juveniles (selected to have a size of about 35 mm in all assays) and male adults (with a size of about 10 mm). For each condition (source population, date of sampling, laboratory maintenance duration), three replicates of 15 juvenile or male adult organisms were exposed to 80 µg/L of Cd in 500 mL plastic beakers. For progeny tolerance assessment, neonates were collected one day after their release from maternal marsupium. The acute toxicity tests were then carried out by individually monitoring the survival of neonates exposed to a Cd concentration of 20 µg/L (this concentration was determined from Vigneron et al. (2016), which is not too high in order to scatter individual mortalities in time, and not too low in order to

attribute mortalities specifically to Cd). We considered a minimum of ten neonates individually exposed in 50 mL falcons® per condition. Exposure media were prepared from stock solutions of Cd at 0.1 g/L, which were regularly checked by chemical analysis (ICP-MS analysis in INRAE analytical laboratory in Lyon). For exposure in beakers, the Cd solution at 80 µg/L was prepared in a 1 L volumetric flask using drilling water (oxygenated and conductivity at 300 µs/cm) with the addition of 800 µL of stock solution. Contaminated falcons® were filled with a solution of Cd at 20 µg/L following the same protocol with a mixture of Evian® mineral water and demineralized water (50/50) with a conductivity at 300 µs/cm. Falcons® and beakers were kept in a thermo-regulated water bath at 12°C and mortality was monitoring daily during exposure tests.

2.3- Isolation of populations in Cd-free water in the laboratory

We maintained gammarid organisms from Ardillats, Marchampt, Vernay, Cressonnière and Séran populations in Cd-free water conditions in the laboratory during 2 months in experiments replicated at different periods (April 2021, June 2021, December 2021 and October 2022) (Annexe F1-c). The different batches of gammarids (about 1000 juveniles and adult individuals) were kept in separate 11 L plastic aquarium. After field sampling and 2 months of maintenance, male adults from each population were collected for Cd sensitivity tests (see section 2.2). In parallel, we monitored the evolution of tolerance of progeny for three successive cohorts of neonates released in the laboratory by genitors since their collection in the field (see Figure II-6), which presents the experimental design based on the synchronization of moulting and reproductive cycles in female gammarids). More precisely, we sorted 100 gammarids in mating-pairs with females in the last stage of their reproductive cycle (stage D2 with hatched neonates in brood pouch) for the five populations. We considered two replicated 2L plastic aquariums containing 50 synchronized mating-pairs in Cd-free environment. These pairs were monitored until three successive neonate release events (approximately 2 months). The first cohort of neonates (Ardi-Coh1, March-Coh1, Vern-Coh1, Ser-Coh1 and Cress-Coh1) obtained within one week after the selection of mating pairs corresponded to embryos that developed in maternal marsupia in the field. The second cohort of neonates (Ardi-Coh2, March-Coh2, Vern-

Coh2, Ser-Coh2 and Cress-Coh2), released one month later, resulted from the fertilization of gametes that had formed in the field, but they developed as embryos in the maternal marsupia in Cd-free laboratory conditions. Finally, the third cohort of neonates (Ardi-Coh3, March-Coh3, Vern-Coh3, Ser-Coh3 and Cress-Coh3) never experienced field exposure, neither during the gametogenesis nor the embryogenesis (see Figure II-6). Neonates from each cohort and populations were collected to test their sensitivity to Cd (see 2.2)

2.4- Exposure of naïve genitors to environmentally relevant Cd concentrations during one reproductive cycle

We experimentally evaluated in the laboratory the possible modification of progeny Cd-sensitivity following Cd exposure during gametogenesis or embryogenesis (see Annexe F1-d and see the experimental design of Figure II-8). For this, mating pairs of gammarids freshly collected from the uncontaminated population Séran were sorted visually in molting stage D2 as described previously (see 2.3-). They were maintained in the water of their own site until females reached the moulting stage A (24 h post-spawned) before starting the exposure. Gammarids were then exposed in 2 L plastic aquariums. We considered a control condition and two nominal Cd concentrations of 0.1 µg/L and 1 µg/L with two replicated aquariums containing 50 pairs of gammarids for each exposure condition. The control aquariums were filled with 1.5 L of drilling water (uncontaminated water) previously oxygenated during 24 h and having a conductivity around 300 µS/cm. The contaminated aquariums contained 1.5 L of the same drilling water with the addition of a Cd stock solution at 1 mg/L of Cd to reach the chosen exposure concentration. Aquarium water (control and contaminated) was renewed daily to ensure sufficient oxygenation of the water and to maintain constant Cd concentration in the contaminated aquariums. Exposure was monitored by measuring both the concentrations of dissolved Cd in water and the Cd concentrations bioaccumulated by male organisms from the Cressonnière population (Table 1). For this, male organisms were caged in exposure aquariums, following the same caging procedure as the active biomonitoring carried out in the field deployment (see section 2.1-). These bioaccumulation data allowed us assessing the environmental relevance of the chosen exposure concentrations towards the level of Cd

exposure recorded in the field, being independent of the differences in water characteristics between rivers and laboratory. Exposure of Séran genitors was conducted for 21 days, allowing the females to reach the moulting stage D2 (Chaumot et al., 2020). Exposure was then stopped and the first reproductive cycle ended for few days in Cd-free conditions. A first cohort of released neonates (which thus had accomplished their embryonic development in the marsupia of exposed females) was then collected. Genitors were maintained for a second reproductive cycle in Cd-free conditions. At the end of this second cycle, neonates (resulting from the fertilization of gametes produced during Cd exposure) were then collected for Cd sensitivity tests (Figure II-8).

2.5- Cross-breeding of tolerant and sensitive populations

In order to test our previous assumption of a major influence of maternal effects in the inheritance of Cd tolerance (Vigneron et al., 2019), we evaluated both paternal and maternal influences by carrying out crossing between genitors collected from contaminated and uncontaminated populations (Annexe F1-e). After being sorted visually, freshly harvested mating-pairs with females in stage D2 from the Cressonnière, Ardillats and Marchampt populations were separated and re-mated between contaminated status conditions, resulting in seven conditions named AA, CC, MM, AC, CA, MC, CM, where the first (second respectively) letters correspond to the initial of the population name of the male (female respectively). For example, males from Cressonnière population were placed in aquariums with females from Ardillats population, forming condition CA. These aquariums were filled with 1.5 L of uncontaminated drilling water with a continuous drip water renewal system. As previously, at the end of the moulting-cycle, neonates from the different conditions were collected for Cd sensitivity tests.

2.6- Maintenance of gammarids in the lab

Maintenance in the laboratory was carried on in 2 L or 11 L plastic aquariums, placed in water baths with a controlled photoperiod (16/8 night/day) and temperature at 16°C, for which the

reproductive cycle (inter laying duration) is 25 days (Chaumot et al., 2020). Gammarids were fed *ad libitum* with conditioned alder leaves and a weekly supply of *Tubifex* larvae.

2.7- Statistical analysis

We analysed data with the R software (R Core Team, 2018) by Kaplan-Meier type survival analyses (log-rank test) with a statistical significance level of 5%. No correction for multiple testing was applied as no automatic multiple pairwise comparisons was considered.

3- Results

3.1- Characterization of field Cd bioavailable contamination

The results of bioaccumulation data from 7-days *in situ* caging biotests validate that Ardillats, Marchampt and Vernay populations are exposed to bioavailable Cd in the field (Figure 2, Annexe T1). Indeed, bioavailable Cd contamination is detected in transplanted organisms at different seasons and for different years for these three sites, with a mean level of Cd accumulated by caged gammarids at 0.68 µg/g, 0.39 µg/g and 0.52 µg/g for Ardillats, Marchampt and Vernay, respectively. Recorded values are thus above the National Bioavailable Background Assessment Concentration (BBAC) for Cd (0.30 µg/g dw), established from the studies of Besse et al. (2013) and Ciliberti et al. (2017). BBAC is defined as the 95% percentile of the national background distribution of concentrations recorded in uncontaminated French rivers. We can also note that the bioavailable Cd contamination in the Ardillats, Marchampt and Vernay sites varies over time while still remaining above the BBAC, except one time for Marchampt (in June 2022). The Rauenthal and Poye sites presented intermediate levels of bioavailable contamination among the nine study sites, with a mean level of Cd accumulated by caged gammarids just below the BBAC (0.24 µg/g for the two sites). For Séran, Cressonnière, Vancelle and Ognon populations, results confirm the absence of bioavailable Cd contamination at different dates with levels of accumulated Cd far below the BBAC.

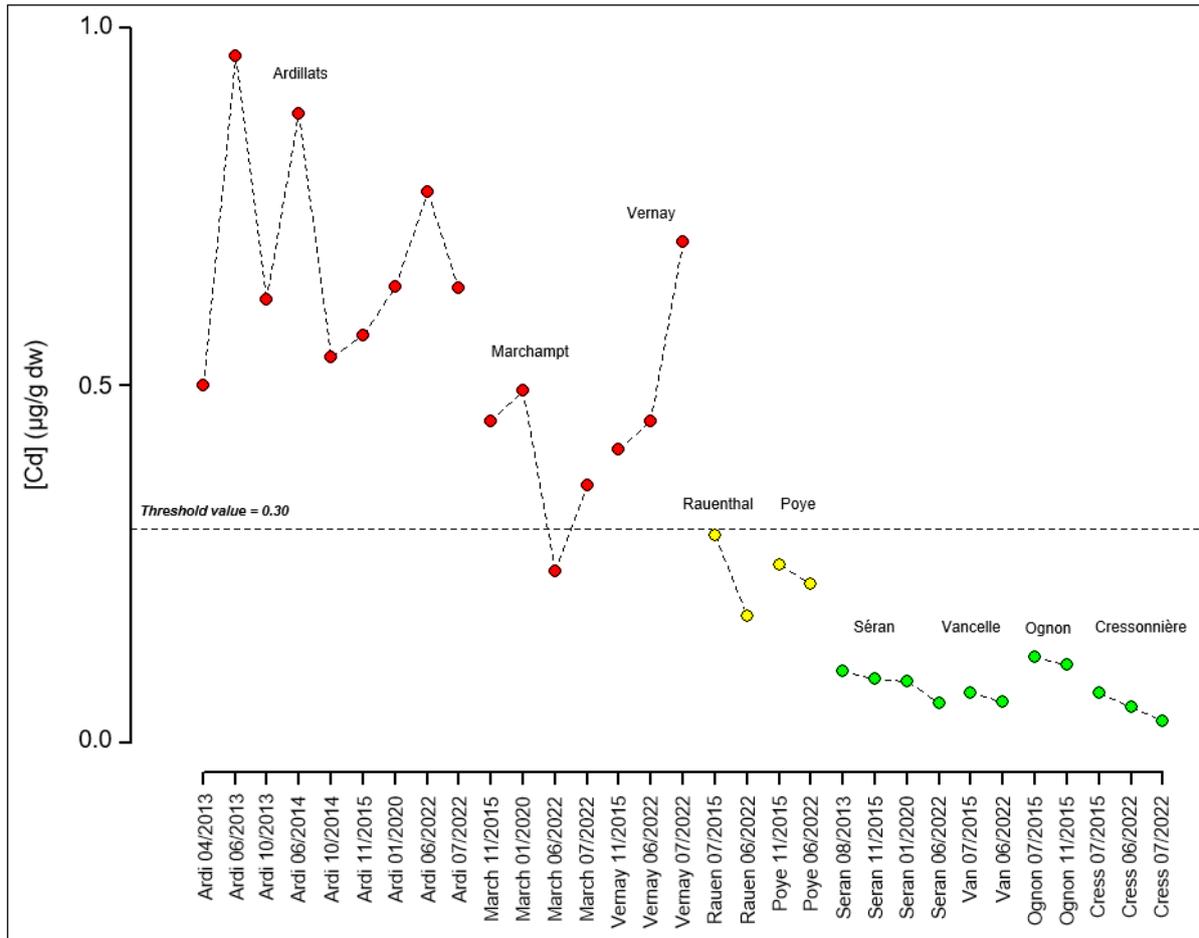


Figure 2 : Bioavailable Cd contamination in the sites inhabited by the nine populations of the study (Ardillats, Marchampt, Vernay, Rauenthal, Poye, Séran, Vancelle, Ognon and Cressonnière). Contamination is assessed by accumulated Cd concentrations in µg/g dw (dry weight) in gammarids caged on the study sites for 7 days (organisms transplanted from the reference population of the laboratory). Data are presented for campaigns on different dates. Dashed segments link values between campaigns for each study site. The horizontal dashed line indicates the threshold value of significant contamination defined by Besse et al. (2013), Ciliberti et al. (2017) and Alric et al. (2019), which corresponds to the 95% percentile of the distribution of the background concentrations recorded in French rivers (0.30 µg/g dw for Cd) using the same active biomonitoring protocol.

3.2- Cd tolerance in field populations

Contaminated populations Ardillats, Marchampt and Vernay presented a statistically significant higher tolerance to Cd compared to the uncontaminated populations Séran, Vancelle and Ognon (log-rank test: p-values < 0.04) (Figure 3). In accordance to this shift in the distributions of survival times, the proportion of sensitive adult gammarids in Ardillats, Marchampt and Vernay populations was small compared to the three uncontaminated populations. For example, only 29% of organisms from Ardillats and Marchampt populations had a survival time inferior or

equal to 6 days, while this proportion was equal to 58%, 67% and 71% for Séran, Vancelle and Ognon populations, respectively (Annexe T2).

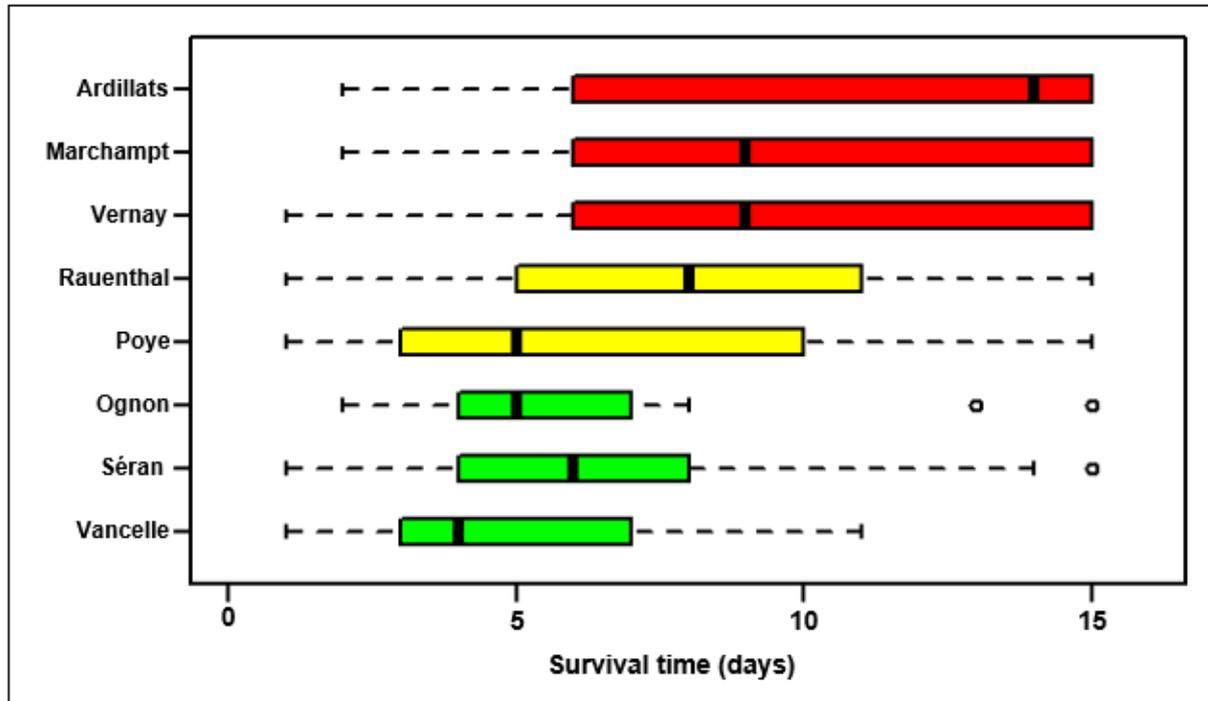


Figure 3 : Cd tolerance of eight field populations assessed through the distribution of individual survival times of male adults exposed to 80 µg/L of Cd in the laboratory (Spring 2017), one day after their collection in the field. Red, yellow and green colours correspond respectively to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see Figure 2).

Conversely, the proportion of highest Cd tolerant organisms increased in contaminated populations as illustrated by a third quartile of survival times (LT75) of 15 days for the three contaminated populations compared to 7 days for Ognon and Vancelle and 8 days for Séran (Figure 3). Rauenthal and Poye populations, which experienced intermediate levels of Cd exposure (Figure 2) presented intermediate levels of Cd tolerance with more tolerant adult gammarids than the three uncontaminated populations Séran, Vancelle and Ognon (Figure 3). The distribution of survival times of organisms from Rauenthal population was significantly different compared to the Ardillats population (log-rank test: p-value = 0.03) but no significant difference is observed when compared with Marchampt, Vernay and Séran populations (log-rank test: p-value > 0.1). For Poye population, the distribution of survival times is also not statistically different from the distribution of the Vernay population (log-rank test: p-value =

0.06) but also with two of the uncontaminated populations, Ognon (log-rank test: p-value = 0.4) and Séran populations (log-rank test: p-value = 0.8) and at the limit of significance with the Vancelle population (log-rank test: p-value = 0.05). These results reveal an overall positive correlation between the level of bioavailable Cd contamination in the different sites and Cd tolerance of populations, either in terms of LT25, LT50 or LT75 (Pearson-correlation test: p-value < 0.01; Supplementary Figure 1).

3.3- Evidence of Cd tolerance at different life stages and throughout the year

Figure 4 shows the results of the sensitivity tests performed with gammarids from two contaminated populations (Ardillats and Marchampt) and two uncontaminated populations (Séran and Cressonnière) at different life stages (adults, juveniles, neonates) and at six different dates between February 2021 and October 2022. Adult gammarids from the Ardillats population have a statistically significant higher tolerance to Cd than the two uncontaminated populations throughout the two years of monitoring (log-rank test: p-values < 6.10^{-3}) except in June 2021 when compared with Séran population (log-rank test: p-value = 0.06). Similarly, higher tolerance to Cd is found in juveniles (log-rank test: p-values < 4.10^{-3}) and neonates (log-rank test: p-values < 10^{-2}) from Ardillats population, except juveniles in December 2021 (log-rank test: p-value = 0.08) and neonates in February 2021 (log-rank test: p-value = 0.09). The Marchampt population was also tested at three dates. We recovered only once (February 2021) the higher tolerance of adults to Cd previously observed in 2017 (log-rank test: p-value = 2.10^{-3}). Similarly, we found significant increased Cd-tolerance two times out of three in juveniles and neonates, and in particular at the same date as for adults (log-rank test: p-values < 5.10^{-3}).

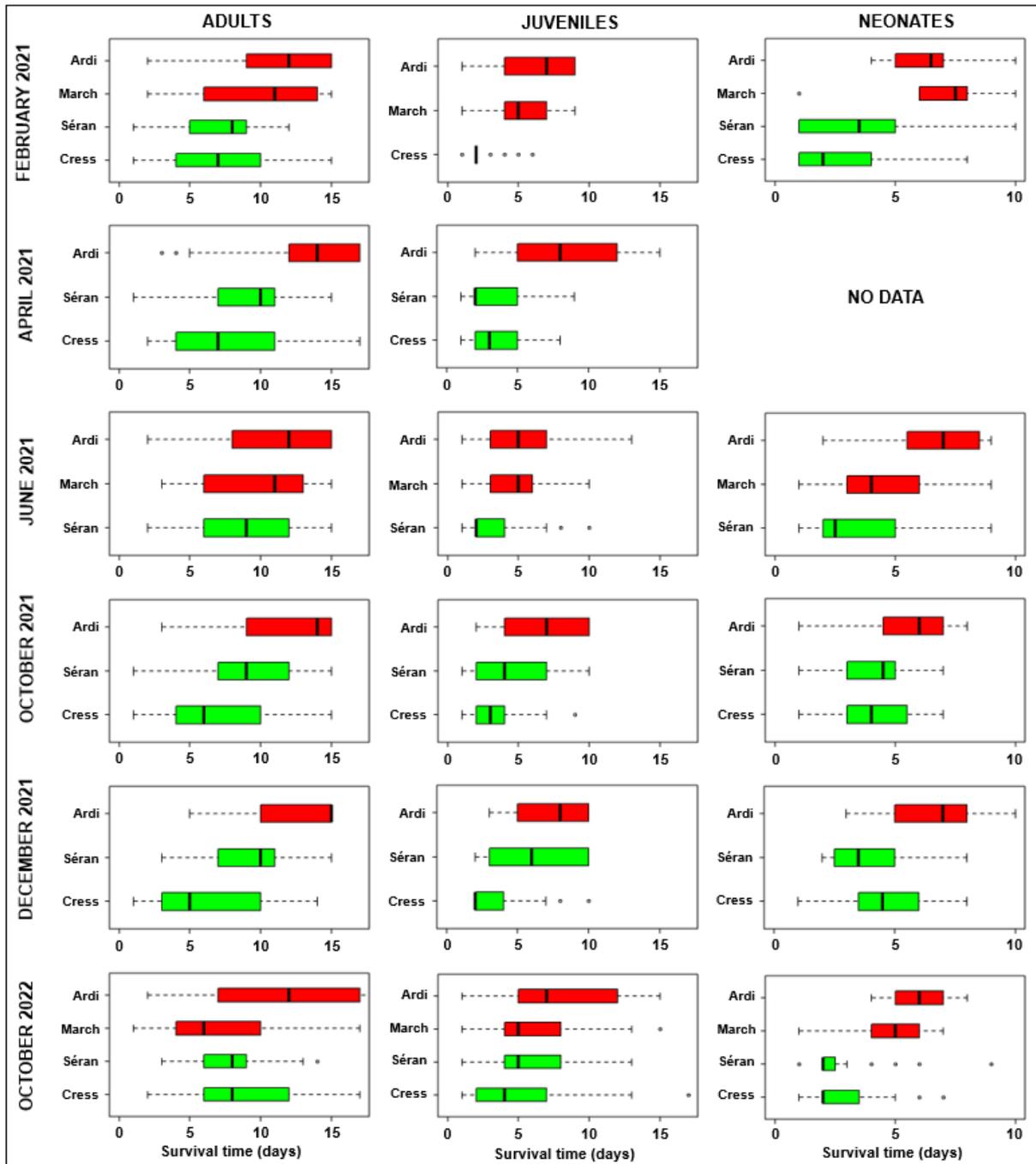


Figure 4 : Cd tolerance of four field populations assessed for different life stages and different dates of sampling in the year. The boxplots present the distribution of individual survival times of male adults, juveniles and neonates from Ardillats (Ardi), Marchampt (March), Séran and Cressonnière (Cress) populations. Adults and juveniles were exposed to 80 µg/L of Cd and neonates to 20 µg/L in the laboratory one day after their collection in the field or release from female marsupium in the laboratory for neonates. Red and green colours correspond to Cd contaminated vs uncontaminated status of populations (see Figure 2).

3.4- Diminution of adult Cd tolerance after 2 months in Cd-free water

Comparing the results before and after the maintenance in Cd-free water, we observed a drop in survival times (log-rank test: p-values < 0.02) in the Ardillats and Vernay populations at the four dates (Figure 5). This drop corresponds to a loss of the highest levels of individual tolerance, as well as a decrease of the lowest levels down to the range of survival times observed in uncontaminated populations. For example, in December 2021, only 7% of Ardi-T0 and 13% of Vern-T0 (*i.e.*, just after field sampling) had a mean survival time inferior or equal to 6 days compared to 67% of Ardi-T2 and 53% of Vern-T2 (*i.e.*, after 2 months of laboratory maintenance) (Annexe T5).

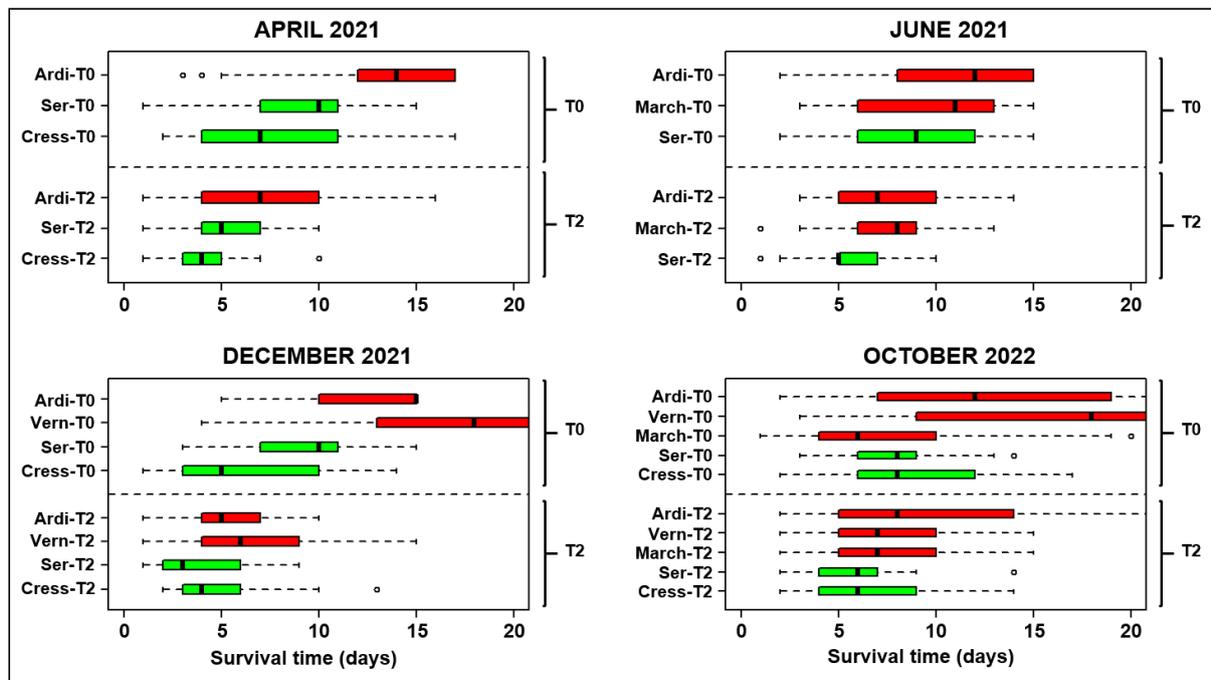


Figure 5 : Evolution of Cd tolerance of field populations during maintenance in Cd-free conditions. The boxplots present the distribution of individual survival times of male adults after sampling in the field (T0) and after their maintenance during 2 months in Cd-free water (T2) for Ardillats (Ardi-T0, Ardi-T2), Vernay (Vern-T0, Vern-T2), Marchampt (March-T0, March-T2), Séran (Ser-T0, Ser-T2) and Cressonnière (Cress-T0, Cress-T2) populations. Adults were exposed to 80 µg/L of Cd. The experiment was conducted at four different dates (one panel per date of field sampling date). Red and green colours correspond respectively to Cd contaminated and uncontaminated status of populations in their habitat of origin (see Figure 2).

Two months in Cd-free water decreased the median survival time (LT50) from 15 to 5 days, and from 18 to 6 days for Ardillats and Vernay, respectively. Similarly, the LT75 decreased

from 15 to 7 days for Ardillats and from 25 to 9 days for Vernay after 2 months in Cd-free water (Annexe T5). We confirmed these results for the four experiments repeated at different dates. For Marchampt population, no tolerance to Cd was observed on the two dates tested after sampled in the field. No difference in sensitivity to Cd was therefore observed between March-T0 and March-T2.

3.5- Appearance of sensitive neonates when parental Cd exposure is stopped

We assessed the maintenance of Cd tolerance in the progeny of contaminated populations when genitors sampled in the field are maintained in Cd-free water in the laboratory. We therefore monitored the Cd-sensitivity of three successive cohorts of neonates (inter-clutch interval of 3 weeks) produced in the laboratory by synchronized genitors from Ardillats, Vernay, Marchampt, Séran and Cressonnière populations (experimental design presented in Figure II-6). As expected, the first cohorts of neonates born in the laboratory from genitors harvested in contaminated populations (Ardi-Coh1, Vern-Coh1 and March-Coh1) present statistically significant higher Cd tolerance compared to the first cohorts from the uncontaminated population genitors (Ser-Coh1 and Cress-Coh1) (log-rank test: p -value $< 10^{-3}$) (Figure 6). Neonates from Ardi-Coh1, Vern-Coh1 and March-Coh1, respectively, present a LT50 equal to 6, 6 and 5 days, respectively, against 2 days for both Ser-Coh1 and Cress-Coh1. In particular, the percentage of neonates with survival time inferior or equal to 3 days reinforces these observations of increased Cd tolerance transmitted to progeny, with a proportion of 0% for Ardillats, 4% for Vernay and 21% for Marchampt, compared to 79% and 75% for Séran and Cressonnière (Annexe T6). Increased Cd tolerance is still found in the second cohort for Ardillats, Vernay and Marchampt (log-rank test: p -values $< 10^{-4}$), but with a higher percentage of neonates with survival time inferior or equal to 3 days for Vern-Coh2 (from 4% to 25%), and March-Coh2 (from 21% to 67%). For the third cohort of neonates, even if a significant difference in survival times still remains between the three contaminated populations and the two uncontaminated populations (log-rank test: p -values $< 2.10^{-3}$), we observed an increased proportion of sensitive neonates in Ardillats, Vernay and Marchampt populations. Indeed, the LT50 decreased from 6 days (Ardi-Coh1) to 4 days (Ardi-Coh3) and similarly the LT25

decreased from 5 days (Ardi-Coh1) to 2 days (Ardi-Coh3) (Annexe T6). Same results were observed in Vernay and Marchampt populations (Figure 6), with decreased LT50 from 6 days in Vern-Coh1, and 5 days for March-Coh1, to 4 days in Vern-Coh3 and March-Coh3.

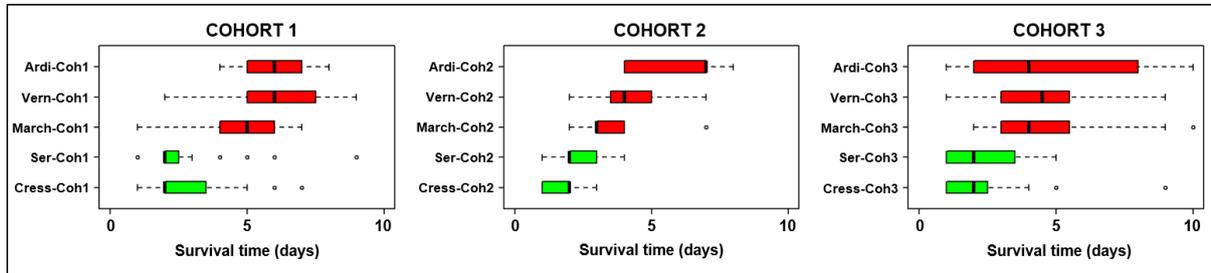


Figure 6 : Cd tolerance (distribution of individual survival times during exposure to 20 µg/L of Cd) of three successive cohorts of neonates produced in Cd-free laboratory conditions by genitors sampled in Ardillats (Ardi-Coh1, Ardi-Coh2, Ardi-Coh3), Vernay (Vern-Coh1, Vern-Coh2, Vern-Coh3), Marchampt (March-Coh1, March-Coh2, March-Coh3), Séran (Ser-Coh1, Ser-Coh2, Ser-Coh3) and Cressonnière populations (Cress-Coh1, Cress-Coh2, Cress-Coh3). Neonates were exposed to Cd individually one day after their release from maternal marsupium. Red and green colours correspond respectively to Cd contaminated vs uncontaminated status of populations in their habitat of origin (see Figure 2).

3.6- No induction of tolerance in neonates when Cd parental exposure only occurs during gametogenesis or embryogenesis

We conducted an exposure of genitors native from the uncontaminated population Séran to sublethal levels of Cd in the laboratory during one reproductive cycle (see Figure II-8). By this mean, we sought to test whether the tolerance recorded in the first cohorts of neonates from field-sampled genitors in contaminated populations (Figure 6) may be explained by exposure to Cd during embryonic development or gametogenesis that occurred prior to field sampling of organisms. The results of Cd bioaccumulation by caged gammarids exposed in parallel to genitors showed that laboratory exposure to nominal Cd concentrations in water of 0.1 µg/L and 1 µg/L yielded to a mean bioaccumulation value of 0.61 µg/g and 7.46 µg/g, respectively (Table 1). Hence gammarids exposed to 0.1 µg/L of Cd in the laboratory present a similar bioaccumulation level to that found in caged gammarids in the Ardillats site (0.68 µg/g dw) and Vernay site (0.52 µg/g dw) (see section 3.1- ; Annexe T1).

Second, no significant difference was found in survival times between the three conditions (log-rank test: p-values > 0.07) in the first released of neonates (i.e., neonates exposed only during embryogenesis in female marsupia) and between control and 0.1 µg/L conditions (log-rank test: p-value = 0.1) for neonates exposed only during gametogenesis (second cohort) (Supplementary Figure 2). These results invalidate the hypothesis that exposure to Cd contamination only during the early stages (gametes, embryos) explains the higher tolerance in the offspring of genitors from contaminated populations.

Table 1 : Dissolved Cd concentrations and 7-day bioaccumulated Cd concentrations during laboratory exposure of genitors to nominal concentrations of 0.1 µg/L and 1 µg/L of Cd.

Exposure condition	Dissolved Cd concentration (µg/L)	Accumulated Cd concentration (µg/g dw)
Control aquarium 1	<LQ	0.07
Control aquarium 2	0.02	0.05
0.1 µg/L in aquarium 1	0.11	0.52
0.1 µg/L in aquarium 2	0.10	0.70
1 µg/L in aquarium 1	1.01	7.54
1 µg/L in aquarium 2	0.98	7.38

3.7- Cd tolerance is transmitted by both parents

In both experiments (i.e., considering either Ardillats or Marchampt as contaminated population), neonates from the contaminated population were more tolerant compared to those from the reference population Cressonnière (log-rank test: p-value < 6.10⁻⁶) (Figure 7), as previously described (3.3- and 3.5-). We found 20% and 35% of neonates with a mean survival time inferior or equal to 3 days for the AA and MM conditions, respectively, compared to 90% for the CC condition (Annexe T8). The LT75 further support these observations, with 6 days for AA, 5 days for MM but only 2.25 days for CC (Annexe T8). Results obtained from population crossing between Ardillats and Cressonnière (Fig. 7A) reveal that neonates born from a tolerant father (condition AC) and from a tolerant mother (condition CA) present a distribution of survival times intermediate between the distributions from the two parental population conditions (AA and CC). Indeed, the survival time distribution of CA neonates is not significantly different from AA condition (log-rank test: p-value = 0.2) while the AC condition differs significantly to both AA and CC conditions (log-rank test: p-values < 0.04).

We found the same pattern with neonates from the second crossing between Marchampt and Cressonnière populations (Fig. 7B). The distribution of survival times of neonates born from a tolerant father (MC) or a tolerant mother (CM) is not significantly different from that of tolerant MM neonates (log-rank test: p-values > 0.3), while the CM and MC conditions differ from the CC condition (log-rank test: p-values < 10⁻⁴).

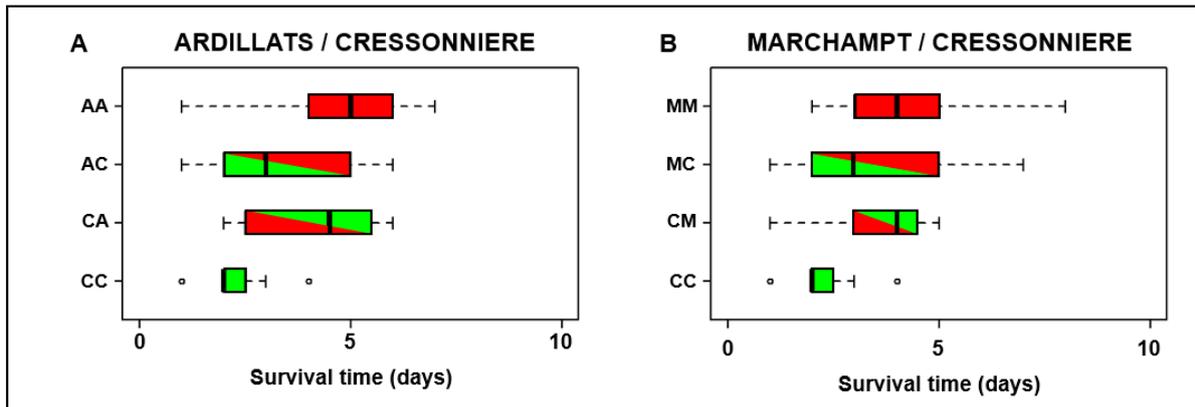


Figure 7 : Cross-breeding between sensitive and tolerant populations. The figure presents the Cd tolerance of neonates (distribution of individual survival times when exposed to 20 µgCd/L) produced by Cd tolerant populations (Ardillats or Marchampt), uncontaminated population (Cressonnière) and from population cross breeding. For the legend of the different conditions, the first capital letter corresponds to the first letter of the male's population name and the second capital letter correspond to the first letter of the female's population name (notation ♂/♀ : e.g, the condition AC corresponds to the crossing between a male from Ardillats population and a female from Cressonnière population). Neonates were exposed to 20 µg/L of Cd in the laboratory one day after they were released. Panel (A) represents crossing between Ardillats and Cressonnière populations and panel (B) represents crossing between Marchampt and Cressonnière populations. Red and green colours correspond to Cd contaminated vs uncontaminated status of populations (see Figure 2).

4. Discussion

4.1- Moderate Cd tolerance occurs in gammarid populations exposed to natural bioavailable Cd contamination in the aquatic environment

The assessment of bioavailable metallic contamination confirmed the persistent Cd contamination in the site inhabited by the Ardillats population previously studied by Vigneron et al. (2015). It also permits to consider Vernay and Marchampt populations as two new case studies of *G. fossarum* populations historically exposed to Cd. While the source of Cd exposure in these streams is of natural origin due to the geochemical context, these three sites are among

the top 10% of bioavailable contamination data recorded in French rivers, based on the national monitoring dataset of contamination measurements reported in Alric et al. (2019). This contrasts with the four uncontaminated populations Séran, Cressonnière, Vancelle, Ognon, which have bioavailable Cd contamination measurements lower than the national median value estimated at 0.14 µg/g dw in Alric et al. (2019). Poye and Rauenthal populations experience intermediate levels of Cd exposure, with bioaccumulation records at the edge of the BBAC value of 0.30 µg/g dw defined as the upper limit of the French national bioavailable contamination background. Overall, the three Cd contaminated populations, which are located in semi-natural contexts with low levels of anthropogenic contamination, are quite unique study cases for investigating the ecotoxicological processes acting in case of multi-generational Cd exposure within environmental variability. Nevertheless, caution must be taken before any direct transfer of our results to multi-contamination situations encountered in anthropized contexts. Several studies have already documented that tolerance of freshwater amphipod populations to insecticides are not systematically found in complex urban or agricultural contamination contexts (Major et al., 2020; Švara et al., 2021; Grethlein et al., 2022; Schneeweiss et al., 2023), whereas a strong potential for tolerance development towards neonicotinoid, pyrethroid or organophosphate insecticides was clearly demonstrated in multiple field populations from this same taxon (Weston et al., 2013; Shahid et al., 2018a; Gamble et al., 2023).

The comparison of adult Cd sensitivity between the different study populations unambiguously showed the development of increased Cd tolerance in relation to their exposure (Figure 3) which extend the results of Vigneron et al. (2015). This generalisation is demonstrated for two additional populations in the Beaujolais region, at multiple dates, but also to the distant Vosges region with the contrasting case of Rauenthal and Vancelle populations. The quantitative relationship drawn between bioaccumulation data in transplanted gammarids and population Cd tolerance (Supplementary Figure 1) confirms the pattern found for the tolerance to neonicotinoid insecticides in agricultural *G. pulex* populations (Shahid et al., 2018b). It enforces the conclusion that contaminant body burden in *Gammarus* may be a suitable measure of toxic pressure in streams and predictive of ecological impacts in invertebrate populations (Shahid et

al., 2018b; Alric et al., 2019). Despite the high levels of exposure in Ardillats and Vernay in respect to national bioavailable Cd contamination gradient, Cd tolerance appears to be only moderate with an approximately two-fold tolerance factor regarding LT50s, as in Vigneron et al. (2015). This agrees with Cd tolerance factors previously reported in field populations of aquatic invertebrates exposed to metallic pollution, such as decapods (Chiodi Boudet et al., 2013), chironomids (Groenendijk et al., 2002; Pedrosa et al., 2017a) or annelids (Levinton et al., 2003). This contrasts with resistance factors higher than 500 reported for pyrethroid and organophosphate insecticides in the amphipod *H. azteca* for which a genetic basis was clearly demonstrated by molecular studies (Weston et al., 2013; Major et al., 2020). Conversely, it falls within the range of tolerance factors reported in *G. pulex* populations exposed to neonicotinoids in agricultural streams in Germany (Shahid et al., 2018a; Siddique et al., 2020), tolerance which was assumed to be the combination of acclimation, epigenetic effect and genetic evolution (Siddique et al., 2021).

Temporal monitoring of tolerance levels in the Ardillats and Marchampt populations showed that tolerance is found in both adult and juvenile organisms (Figure 4). It can also be found in newborns of both populations (first cohort spawned in the laboratory), confirming the transmissibility of tolerance to offspring already identified by Vigneron et al. (2019, 2015). In contrast with the Ardillats and Vernay populations, Cd tolerance was never found for Marchampt including adults, juveniles and neonates organisms at all dates of sampling (Figure 3, Figure 4, Figure 5). Temporal variations in tolerance to metals have already been documented in field *G. pulex* populations by Maltby and Crane (1994), who suggested an adjustment of tolerance to varying levels of environmental exposure under the hypothesis of physiological acclimation. In our case, this hypothesis is conceivable in view of the variability in the level of bioavailable contamination in the Marchampt site, which for a given date is below the BBAC threshold in contrast to the Ardillats and Vernay sites (Figure 2). An alternative hypothesis put forward in the literature to explain temporal fluctuations of Cd tolerance levels in aquatic invertebrate populations in Cd contaminated areas is that of episodic genetic dilution linked to migratory flows from populations living in non-contaminated areas (Groenendijk et al., 2002; Mackie et al., 2010). This hypothesis must certainly be discarded in our case because we

selected sites located in the upstream zone of headwater streams (less than 3 km from the source for the three contaminated populations ; Tableau II-1) and the geochemical impregnation by Cd must affect all of these upstream zones. In the case of the neonicotinoid tolerance reported in *G. pulex* agricultural populations, a seasonal variability in the level of tolerance has also been suggested, but with a negative correlation with the level of exposure over time (Becker et al., 2020). The hypothesis advanced by the authors is that the possibility of detecting differences in individual sensitivities fades when the toxic stress becomes strong, while the selection of surviving tolerant individuals within the population is still visible outside the agricultural treatment period. The situation in our study is quite different, as contaminant exposure levels in the field do not lead to short-term mortality in gammarids. This was confirmed by the numerous caging biotests carried out during the study and the very low levels of Cd concentrations in water at the site Ardillats reported in Vigneron et al. (2015) (average Cd concentration of 0.045 µg/L). It is also evidenced by the accumulated levels of Cd far below to those recorded in laboratory toxicity studies (Lebrun et al., 2017). Consequently, the hypothesis of a positive covariation of exposure and population tolerance levels remains to be preferred to explain the temporal variability of tolerance notably observed in Marchampt. To test the time scale at which the adjustment between exposure and tolerance levels could take place in these populations, specific experiments that would simultaneously combine serial *in situ* accumulation biotests and tolerance assessment all along the year could be undertaken.

4.2- Cd tolerance is not fixed at the individual level and supported by intergenerational plasticity

When organisms collected in Cd tolerant Ardillats and Vernay populations are no longer exposed to this metal for two months, a loss of Cd tolerance is observed in adult organisms (Figure 5). Although a slight effect of the maintenance in the laboratory occurred even in uncontaminated populations with a general decreasing tendency of Cd survival times, contaminated populations have clearly lost their tolerance differential, with survival time distributions becoming similar to those of uncontaminated populations. Rapid loss of tolerance is not expected in the case of genetically determined tolerance. For example, Gamble et al.

(2023) showed that insecticide tolerance in *Hyallela* could still be found nine years after rearing tolerant populations in uncontaminated conditions. Some authors, however, discuss the possibility of such rapid losses even in the case of genetic tolerance, through differential survival of resistant organisms during the laboratory culture due to tolerance-related fitness costs, for example in chironomids (Groenendijk et al., 2002). But chironomids have very rapid development cycles compared with *Gammarus*, which has a longevity of approximately two years and time-to-maturity of approximately six months in our rearing conditions (Coulaud et al., 2014). Given the fact that tolerance loss was observed in less than two months, and that no notable mortality was observed during rearing in the laboratory, it is unlikely that any sorting or differential fitness of tolerant organisms in Cd-free conditions could explain the loss of tolerance. The hypothesis of a plastic acclimation to contamination therefore seems to be the preferred explanation for the tolerance recorded in the Ardillats, Vernay and Marchampt populations. It also corroborates our previous quantitative genetics studies that concluded that heritability of Cd sensitivity is negligible in natural populations of *G. fossarum*, making genetic selection of resistant genotypes unlikely in this species (Chaumot et al., 2009; Vigneron et al., 2016). In addition, physiological acclimation to metal exposure is a tolerance mechanism that has been described for various field populations, as in the studies by Klerks and Lentz (1998) on the fish *Gambusia affinis*, or by Maltby and Crane (1994) in *G. pulex*. It has also been mentioned in interaction with genetic selection for gains in tolerance to neonicotinoid insecticides in this same species (Siddique et al., 2021). Cd tolerance due to acclimation has also long been demonstrated in the laboratory for crustacean daphnids (Bodar et al., 1990), decapods (Khan et al., 1988; Klerks, 1999) or gammarids (Stuhlbacher and Maltby, 1992). The present field study therefore corroborates some of their findings.

Also supporting the hypothesis of a non-genetic determinism of Cd tolerance of the contaminated populations, the loss of tolerance in the laboratory was also observed in the offspring of tolerant populations (3rd cohort in Figure 6). This highlights that the Cd tolerance observed in neonates of contaminated populations depends on the parental exposure. Indeed, in accordance to the results obtained in Vigneron et al. (2019), which suggested the occurrence of intergenerational plasticity of Cd tolerance in the Ardillats population, we observed an absence

of sensitive neonates in Ardi-Coh1 and Ardi-Coh2 whereas they are present in Ardi-Coh3. The same results were observed in the Vernay population. Several previous studies have exemplified that parental conditions affect offspring phenotype. For example, non-genetic tolerance to contaminants revealed by the loss of tolerance sensitivity in offspring has already been reported in *Daphnia pulex* in Cd-free environment (Chen et al., 2016). It was also illustrated in the crustacean *Tigriopus japonicus* with the loss of Cu tolerance in only one generation after a return to clean-water (Kwok et al., 2009). Intergenerational plasticity was also found for different environmental factors such as food availability (Bonduriansky and Head, 2007), predation risk (Tariel et al., 2020), temperature (Walsh et al., 2014) and ultraviolet radiation (Sha and Hansson, 2022).

Overall, the results of the laboratory maintenance experiment, along with the observation of variable tolerance levels in the field, support the hypothesis that a non-genetic phenotypic acclimation sustains the transmissible Cd tolerance, which developed in the contaminated *G. fossarum* populations of the study.

4.3- Parental effects and non-genetic mechanisms in the transmission of Cd tolerance?

The results of our study reveal that offspring tolerance co-varies with parental exposure to contamination in field populations (Figure 4, Figure 6). However, the neonates of the first cohorts produced in the laboratory by genitors collected in contaminated populations were potentially influenced by direct exposure during their embryonic development in the field. For example, Plautz and Salice (2013) has shown in the freshwater snail *Physa pomilia* that exposure during embryonic development (which takes place in the maternal marsupium in gammarids) can have a major influence on offspring Cd sensitivity in case of developmental plasticity. Thus, the tolerance observed in neonates in our study, which fades over the course of the cohorts produced in the laboratory, could be partly a consequence of direct exposure during embryonic development in the field and not the result of a true parental transmission of tolerance. However, this hypothesis cannot be accepted as the sole explanation for the studied tolerant populations, given the still high proportion of tolerant neonates in the third cohorts

spawned in the laboratory (Figure 6). These cohorts are in fact the result of the fertilization of gametes produced during a reproductive cycle and embryonic development carried out solely under Cd-free laboratory conditions (Figure II-6). Furthermore, in order to question the possible involvement of such developmental plasticity processes, the laboratory exposure experiment also enabled us to control the exposure history of neonate gammarids, with organisms either exposed during embryogenesis only, or resulting from parental exposure during gametogenesis only (Figure II-8). The results of the biomonitoring of bioavailable metallic contamination during the laboratory exposure indicated that the exposure concentration of 0.1 µg Cd/L (water concentration) was representative of field exposure encountered by tolerant field populations of the study. The use of such low exposure levels in the laboratory to study adaptation phenomenon in organisms and long-term effects of contamination is rare in the literature (Coninck et al., 2014). The results of Cd sensitivity tests performed on neonates produced from the exposed genitors led to the conclusion that Cd exposure during the embryonic phase is not involved in the acquisition of neonate Cd tolerance, ruling out the hypothesis of embryonic selection in marsupium or developmental plasticity phenomenon. In addition, we also have shown that exposure during one gametogenesis cycle is not sufficient to induce increased Cd tolerance in *G. fossarum* progeny in the uncontaminated field population Séran. Hence, long-term field exposure of genitors to Cd seems necessary to set up the parental effects supporting the recorded non-genetic transmission of tolerance to progeny.

Based on the findings of Vigneron et al. (2019), we then tested the hypothesis of a maternal effect that would account for this intergenerational acclimation of Cd sensitivity. In fact, maternal effect is often discussed to explain inter-generational plasticity of sensitivity to contaminants (Groenendijk et al., 2002), as it has been supported by mechanistic knowledge of the transfer of tolerance factors via eggs, particularly for metals (*e.g.*, Munkittrick and Dixon, 1988). We therefore carried out crosses between susceptible and tolerant populations. Our results show that both parents, tolerant mothers and tolerant fathers, transmit tolerance to their offspring. This invalidates the preliminary hypotheses of Vigneron et al. (2019) on strictly maternal effects to explain the non-genetic inheritance of Cd tolerance observed in the Ardillats population. This symmetrical pattern of transmission between fathers and mothers has led some

authors to conclude that Cd tolerance is genetically determined in contaminated populations (Groenendijk et al., 2002). However, combined with the transient nature of tolerance observed here during the cessation of Cd exposure, it opens up the hypothesis of the existence of epigenetic mechanisms determining the variability in Cd sensitivity among populations, as discussed in the review by Dallinger and Höckner (2013). Paternal effects are generally not considered as a major factor in epigenetic inheritance phenomena, indeed, they have been much less studied than maternal effects (Ho and Burggren, 2010). Furthermore, the ecotoxicology literature, particularly in the crustacean model, is increasingly highlighting the possibility of intergenerational transmission of epigenetic marks (mainly DNA methylation) generated in response to contamination during parental exposure (e.g., Feiner et al., 2022) or multigenerational exposure (e.g., Jeremias et al., 2022). However, the link between epigenetics and tolerance has only rarely been established. Kille et al. (2013) correlated for instance variations in DNA methylation patterns with adaptation to arsenic in *Lumbricus rubellus* populations inhabiting contaminated mining soils. In *G. fossarum*, interestingly, Cd exposures modulated global genomic cytosine methylation levels in the laboratory (Cribiu et al., 2018). Moreover, preliminary results suggest a peculiar pattern in the Ardillats population with higher levels of global DNA methylation compared to reference populations (Cribiu, 2020). All these observations lead us to assume that epigenetic variations, transmitted symmetrically through paternal and maternal pathways, support the non-genetic inheritance of Cd tolerance within *G. fossarum* field populations exposed to Cd contamination of their environment. This hypothesis is in line with ecological studies, notably in amphipods (Baldanzi et al., 2017), that have highlighted the importance of epigenetic variation in adaptation to environmental variability.

4- Conclusion

Results of this study provide novel field evidence that multigenerational exposure to chronic levels of Cd induces moderate transmissible tolerance to this metal in headwater stream populations of the key species *G. fossarum*. Tolerance is found in all age classes in populations exposed to persistent natural contamination. We conclude that tolerance corresponds to a non-genetic acclimation relying on phenotypic plasticity since it can be transiently lost in field

populations and by individuals when they are isolated in Cd-free water. We confirmed the non-genetic transmission of Cd tolerance between generations previously described. However, the parental effect supporting this intergenerational acclimation is not limited to maternal effects, and transmission by both sexes depends on long-term parental exposure. We suggest epigenetics, likely DNA methylation changes, as a plausible mechanism for the plasticity of Cd sensitivity observed in the field. DNA methylation could offer a level of phenotypic flexibility within populations that would lead to rapid responses to environmental contamination. Specific molecular studies are now needed to explore the epigenetic processes operating in these field populations. Our results therefore highlight the neglected role of plasticity and non-genetic transmission of modified sensitivities during the long-term exposure of natural populations to environmental contamination. Next step in our work will focus on the potential existence of fitness costs of tolerance and alteration of life-history traits in Cd tolerant populations of *G. fossarum*.

5- Bibliography

Alric, B., Geffard, O., Chandesris, A., Ferréol, M., François, A., Perceval, O., Piffady, J., Villeneuve, B., Chaumot, A., 2019. Multisubstance Indicators Based on Caged *Gammarus* Bioaccumulation Reveal the Influence of Chemical Contamination on Stream Macroinvertebrate Abundances across France. *Environ. Sci. Technol.* 53, 5906–5915. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01271>

Baldanzi, S., Watson, R., McQuaid, C.D., Gouws, G., Porri, F., 2017. Epigenetic variation among natural populations of the South African sandhopper *Talorchestia capensis*. *Evol Ecol* 31, 77–91. <https://doi.org/10.1007/s10682-016-9877-9>

Becker, J.M., Russo, R., Shahid, N., Liess, M., 2020. Drivers of pesticide resistance in freshwater amphipods. *Science of The Total Environment* 735, 139264. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139264>

Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Research* 47, 650–660. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.024>

Bodar, C.W.M., van der Sluis, I., van Montfort, J.C.P., Voogt, P.A., Zandee, D.I., 1990. Cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 16, 33–39. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(90\)90075-Z](https://doi.org/10.1016/0166-445X(90)90075-Z)

Bonduriansky, R., Head, M., 2007. Maternal and paternal condition effects on offspring phenotype in *Telostylinus angusticollis* (Diptera: Neriidae). *J Evolution Biol* 20, 2379–2388. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01419.x>

Brady, S.P., Monosson, E., Matson, C.W., Bickham, J.W., 2017. Evolutionary toxicology: Toward a unified understanding of life’s response to toxic chemicals. *Evolutionary Applications* 10, 745–751. <https://doi.org/10.1111/eva.12519>

Chaumot, A., Coulaud, R., Adam, O., Quéau, H., Lopes, C., Geffard, O., 2020. In Situ Reproductive Bioassay with Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 1—Gauging the Confounding Influence of Temperature and Water Hardness. *Enviro Toxic and Chemistry* 39, 667–677. <https://doi.org/10.1002/etc.4655>

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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.015>

Chen, S., Nichols, K.M., Poynton, H.C., Sepúlveda, M.S., 2016. MicroRNAs are involved in cadmium tolerance in *Daphnia pulex*. *Aquatic Toxicology* 175, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.023>

Chiodi Boudet, L., Polizzi, P., Romero, M.B., Robles, A., Gerpe, M., 2013. Lethal and sublethal effects of cadmium in the white shrimp *Palaemonetes argentinus*: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Ecotoxicol Environ Saf* 89, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.008>

Ciliberti, A., Chaumot, A., Recoura-Massaquant, R., Chandesris, A., François, A., Coquery, M., Ferréol, M., Geffard, O., 2017. Caged *Gammarus* as biomonitors identifying thresholds of toxic metal bioavailability that affect gammarid densities at the French national scale. *Water Research* 118, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.031>

Cogne, Y., Degli-Esposti, D., Pible, O., Gouveia, D., François, A., Bouchez, O., Eché, C., Ford, A., Geffard, O., Armengaud, J., Chaumot, A., Almunia, C., 2019. *De novo* transcriptomes of 14 gammarid individuals for proteogenomic analysis of seven taxonomic groups. *Sci Data* 6, 184. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0192-5>

Coninck, D.I.M.D., Janssen, C.R., Schamphelaere, K.A.C.D., 2014. An approach to assess the regulatory relevance of microevolutionary effects in ecological risk assessment of chemicals: A case study with cadmium: Assessing regulatory relevance of microevolutionary effects. *Environ Toxicol Chem* 33, 453–457. <https://doi.org/10.1002/etc.2434>

Coulaud, R., Geffard, O., Coquillat, A., Quéau, H., Charles, S., Chaumot, A., 2014. Ecological modeling for the extrapolation of ecotoxicological effects measured during in situ assays in *Gammarus*. *Environ Sci Technol* 48, 6428–6436. <https://doi.org/10.1021/es501126g>

Coutellec, M.-A., Barata, C., 2013. Special issue on long-term ecotoxicological effects: an introduction. *Ecotoxicology* 22, 763–766. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1092-7>

Cribiu, P., 2020. Étude des effets inter et transgénérationnels de l’exposition parentale au stress chimique chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*. PhD thesis, Université de Lyon, Lyon. <https://theses.hal.science/tel-02918500>

Cribiu, P., Chaumot, A., Geffard, O., Ravanat, J.-L., Bastide, T., Delorme, N., Quéau, H., Caillat, S., Devaux, A., Bony, S., 2018. Natural variability and modulation by environmental stressors of global genomic cytosine methylation levels in a freshwater crustacean, *Gammarus fossarum*. *Aquatic Toxicology* 205, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.09.015>

Dallinger, R., Höckner, M., 2013. Evolutionary concepts in ecotoxicology: tracing the genetic background of differential cadmium sensitivities in invertebrate lineages. *Ecotoxicology* 22, 767–778. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1071-z>

Feiner, N., Radersma, R., Vasquez, L., Ringnér, M., Nystedt, B., Raine, A., Tobi, E.W., Heijmans, B.T., Uller, T., 2022. Environmentally induced DNA methylation is inherited across generations in an aquatic keystone species. *iScience* 25, 104303. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104303>

Fung, C.Y., Zhu, K.Y., Major, K., Poynton, H.C., Huff Hartz, K.E., Wellborn, G., Lydy, M.J., 2021. The contribution of detoxification pathways to pyrethroid resistance in *Hyaella azteca*. *Environ Pollut* 284, 117158. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117158>

Gamble, N.E., Huff Hartz, K.E., Figuero, A.E., Poynton, H.C., Lydy, M.J., 2023. Development of insecticide resistance in *Hyaella azteca*. *Environmental Pollution* 322, 121165. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121165>

Grethlein, M., Pelikan, L., Dombrowski, A., Kabus, J., Oehlmann, J., Weigand, A., Jourdan, J., 2022. Small-scale population structuring results in differential susceptibility to pesticide exposure. *Environmental Sciences Europe* 34, 113. <https://doi.org/10.1186/s12302-022-00690-4>

Groenendijk, D., Lücker, S.M.G., Plans, M., Kraak, M.H.S., Admiraal, W., 2002. Dynamics of metal adaptation in riverine chironomids. *Environmental Pollution* 117, 101–109. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00154-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00154-3)

Groenendijk, D., Opzeeland, B.V., Pires, L.M.D., Postma, J.F., 1999. Fluctuating Life-History Parameters Indicating Temporal Variability in Metal Adaptation in Riverine Chironomids. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 175–181. <https://doi.org/10.1007/s002449900503>

Heim, J.R., Weston, D.P., Major, K., Poynton, H., Huff Hartz, K.E., Lydy, M.J., 2018. Are there fitness costs of adaptive pyrethroid resistance in the amphipod, *Hyaella azteca*? *Environ Pollut* 235, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.043>

Ho, D.H., Burggren, W.W., 2010. Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective. *Journal of Experimental Biology* 213, 3–16. <https://doi.org/10.1242/jeb.019752>

Jeremias, G., Veloso, T., Gonçalves, F.J.M., Van Nieuwerburgh, F., Pereira, J.L., Asselman, J., 2022. Multigenerational DNA methylation responses to copper exposure in *Daphnia*: Potential targets for epigenetic biomarkers? *Chemosphere* 308, 136231. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136231>

Johnston, E., 2011. Tolerance to contaminants: evidence from chronically-exposed populations of aquatic organisms, in: *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, pp. 25–46.

Khan, A.T., Weis, J.S., D’Andrea, L., 1988. Studies of cadmium tolerance in two populations of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Bull Environ Contam Toxicol* 40, 30–34. <https://doi.org/10.1007/BF01689382>

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, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.001>

Kille, P., Andre, J., Anderson, C., Ang, H.N., Bruford, M.W., Bundy, J.G., Donnelly, R., Hodson, M.E., Juma, G., Lahive, E., Morgan, A.J., Stürzenbaum, S.R., Spurgeon, D.J., 2013. DNA sequence variation and methylation in an arsenic tolerant earthworm population. *Soil Biology and Biochemistry* 57, 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.10.014>

Klerks, P.L., 1999. Acclimation to Contaminants by the Grass Shrimp *Palaemonetes pugio*: Individual Contaminants vs. Mixtures. *Ecotoxicology* 8, 277–286. <https://doi.org/10.1023/A:1008929215781>

Klerks, P.L., Lentz, S.A., 1998. Resistance to lead and zinc in the western mosquitofish *Gambusia affinis* inhabiting contaminated Bayou Trepagnier. *Ecotoxicology* 7, 11–17. <https://doi.org/10.1023/A:1008851516544>

- Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review. *Environmental Pollution* 45, 173–205. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(87\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0269-7491(87)90057-1)
- Kwok, K.W.H., Grist, E.P.M., Leung, K.M.Y., 2009. Acclimation effect and fitness cost of copper resistance in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.03.014>
- Lebrun, J.D., Uher, E., Fechner, L.C., 2017. Behavioural and biochemical responses to metals tested alone or in mixture (Cd-Cu-Ni-Pb-Zn) in *Gammarus fossarum*: From a multi-biomarker approach to modelling metal mixture toxicity. *Aquat Toxicol* 193, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.018>
- Levinton, J.S., Suatoni, E., Wallace, W., Junkins, R., Kelaher, B., Allen, B.J., 2003. Rapid loss of genetically based resistance to metals after the cleanup of a Superfund site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9889–9891. <https://doi.org/10.1073/pnas.1731446100>
- Mackie, J.A., Levinton, J.S., Przeslawski, R., Delambert, D., Wallace, W., 2010. Loss of evolutionary resistance by the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* to a toxic substance--cost or gene flow? *Evolution* 64, 152–165. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00806.x>
- Major, K.M., Weston, D.P., Lydy, M.J., Huff Hartz, K.E., Wellborn, G.A., Manny, A.R., Poynton, H.C., 2020. The G119S ace-1 mutation confers adaptive organophosphate resistance in a nontarget amphipod. *Evol Appl* 13, 620–635. <https://doi.org/10.1111/eva.12888>
- Maltby, L., Crane, M., 1994. Responses of *Gammarus pulex* (amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution* 84, 45–52. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(94\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0269-7491(94)90069-8)
- Medina, M.H., Correa, J.A., Barata, C., 2007. Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 67, 2105–2114. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.024>
- Mousseau, T., Fox, C.W., 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution* 13, 403–407. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01472-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01472-4)
- Munkittrick, K.R., Dixon, D.G., 1988. Evidence for a maternal yolk factor associated with increased tolerance and resistance of feral white sucker (*Catostomus commersoni*) to waterborne copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 15, 7–20. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(88\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0147-6513(88)90038-3)
- Oziolor, E.M., De Schamphelaere, K., Matson, C.W., 2016. Evolutionary toxicology: Meta-analysis of evolutionary events in response to chemical stressors. *Ecotoxicology* 25, 1858–1866. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1735-6>
- Pedrosa, J., Campos, D., Cocchiararo, B., Nowak, C., Soares, A.M.V.M., Barata, C., L. T. Pestana, J., 2017. Evolutionary consequences of historical metal contamination for natural populations of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Ecotoxicology* 26, 534–546. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1784-5>
- Pellet, B., Geffard, O., Lacour, C., Kermaol, 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. *Environ Toxicol Chem* 28, 2434. <https://doi.org/10.1897/09-042.1>
- Piersma, T., Drent, J., 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 228–233. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00036-3)
- Plautz, S.C., Salice, C.J., 2013. Plasticity in offspring contaminant tolerance traits: developmental cadmium exposure trumps parental effects. *Ecotoxicology* 22, 847–853. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1076-7>

Sarkis, N., Geffard, O., Souchon, Y., Chandesris, A., Ferréol, M., Valette, L., Alric, B., François, A., Piffady, J., Chaumot, A., Villeneuve, B., 2020. How to quantify the links between bioavailable contamination in watercourses and pressures of anthropogenic land cover, contamination sources and hydromorphology at multiple scales? *Science of The Total Environment* 735, 139492. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139492>

Schneeweiss, A., Schreiner, V.C., Liess, M., Röder, N., Schwenk, K., Schäfer, R.B., 2023. Population structure and insecticide response of *Gammarus* spp. in agricultural and upstream forested sites of small streams. *Environ Sci Eur* 35, 41. <https://doi.org/10.1186/s12302-023-00747-y>

Sever, H.C., Heim, J.R., Lydy, V.R., Fung, C.Y., Huff Hartz, K.E., Giroux, M.S., Andrzejczyk, N., Major, K.M., Poynton, H.C., Lydy, M.J., 2020. Recessivity of pyrethroid resistance and limited interspecies hybridization across *Hyalella* clades supports rapid and independent origins of resistance. *Environ Pollut* 266, 115074. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115074>

Sha, Y., Hansson, L., 2022. Ancestral environment determines the current reaction to ultraviolet radiation in *Daphnia magna*. *Evolution* 76, 1821–1835. <https://doi.org/10.1111/evo.14555>

Shahid, N., Becker, J.M., Krauss, M., Brack, W., Liess, M., 2018a. Adaptation of *Gammarus pulex* to agricultural insecticide contamination in streams. *Science of The Total Environment* 621, 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.220>

Shahid, N., Becker, J.M., Krauss, M., Brack, W., Liess, M., 2018b. Pesticide Body Burden of the Crustacean *Gammarus pulex* as a Measure of Toxic Pressure in Agricultural Streams. *Environ. Sci. Technol.* 52, 7823–7832. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01751>

Siddique, A., Liess, M., Shahid, N., Becker, J.M., 2020. Insecticides in agricultural streams exert pressure for adaptation but impair performance in *Gammarus pulex* at regulatory acceptable concentrations. *Science of The Total Environment* 722, 137750. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137750>

Siddique, A., Shahid, N., Liess, M., 2021. Multiple Stress Reduces the Advantage of Pesticide Adaptation. *Environ. Sci. Technol.* 55, 15100–15109. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02669>

Straub, L., Strobl, V., Neumann, P., 2020. The need for an evolutionary approach to ecotoxicology. *Nat Ecol Evol* 4, 895. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1194-6>

Stuhlbacher, A., Maltby, L., 1992. Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22. <https://doi.org/10.1007/BF00212093>

Švara, V., Krauss, M., Michalski, S.G., Altenburger, R., Brack, W., Luckenbach, T., 2021. Chemical Pollution Levels in a River Explain Site-Specific Sensitivities to Micropollutants within a Genetically Homogeneous Population of Freshwater Amphipods. *Environ. Sci. Technol.* 55, 6087–6096. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07839>

Tariel, J., Plénet, S., Luquet, É., 2020. Transgenerational plasticity of inducible defences: Combined effects of grand-parental, parental and current environments. *Ecol Evol* 10, 2367–2376. <https://doi.org/10.1002/ece3.6046>

Tsui, M.T.K., Wang, W.-X., 2005. Influences of maternal exposure on the tolerance and physiological performance of *Daphnia magna* under mercury stress. *Environ Toxicol Chem* 24, 1228. <https://doi.org/10.1897/04-190R.1>

Uller, T., 2008. Developmental plasticity and the evolution of parental effects. *Trends in Ecology & Evolution* 23, 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.04.005>

Urien, N., Lebrun, J.D., Fechner, L.C., Uher, E., François, A., Quéau, H., Coquery, M., Chaumot, A., Geffard, O., 2016. Environmental relevance of laboratory-derived kinetic models to predict trace metal

bioaccumulation in gammarids: Field experimentation at a large spatial scale (France). *Water Research* 95, 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.023>

Vigeneron, A., Geffard, O., Coquery, M., François, A., Quéau, H., Chaumot, A., 2015. Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a *Gammarus fossarum* population inhabiting a low-level contaminated stream. *Ecotoxicology* 24, 1239–1249. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1491-z>

Vigeneron, A., Geffard, O., Quéau, H., Chaumot, A., 2016. Mothers and not genes determine inherited differences in cadmium sensitivities within unexposed populations of the freshwater crustacean *Gammarus fossarum*. *Evol Appl* 9, 355–366. <https://doi.org/10.1111/eva.12327>

Vigeneron, A., Geffard, O., Quéau, H., François, A., Chaumot, A., 2019. Nongenetic inheritance of increased Cd tolerance in a field *Gammarus fossarum* population: Parental exposure steers offspring sensitivity. *Aquatic Toxicology* 209, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.001>

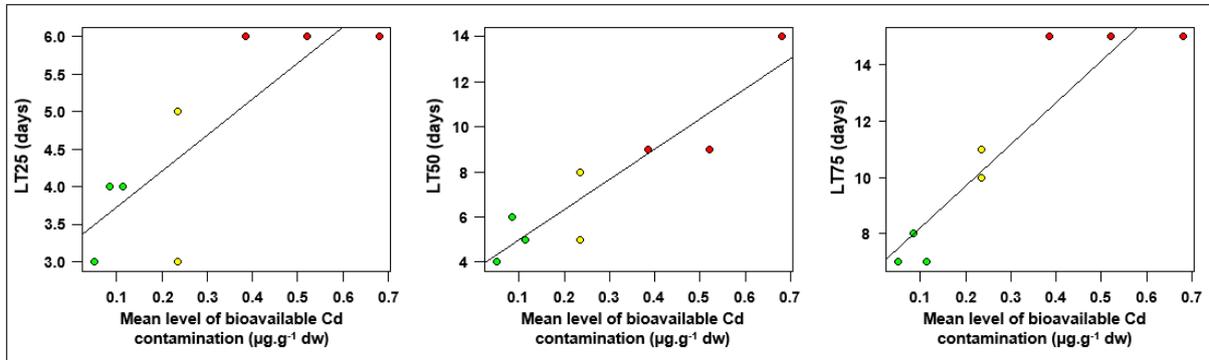
Walsh, M.R., Whittington, D., Funkhouser, C., 2014. Thermal Transgenerational Plasticity in Natural Populations of *Daphnia*. *Integrative and Comparative Biology* 54, 822–829. <https://doi.org/10.1093/icb/icu078>

Wattier, R., Mamos, T., Copilaş-Ciocianu, D., Jelić, M., Ollivier, A., Chaumot, A., Danger, M., Felten, V., Piscart, C., Žganec, K., Rewicz, T., Wysocka, A., Rigaud, T., Grabowski, M., 2020. Continental-scale patterns of hyper-cryptic diversity within the freshwater model taxon *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Sci Rep* 10, 16536. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73739-0>

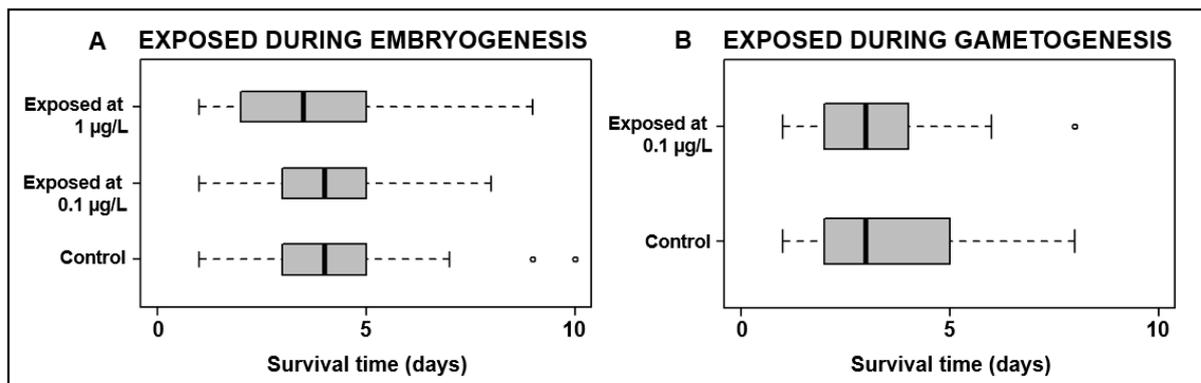
Weston, D.P., Poynton, H.C., Wellborn, G.A., Lydy, M.J., Blalock, B.J., Sepulveda, M.S., Colbourne, J.K., 2013. Multiple origins of pyrethroid insecticide resistance across the species complex of a nontarget aquatic crustacean, *Hyaella azteca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 16532–16537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302023110>

Supplementary materials:

Figure



Supplementary Figure 1 : Regression between the 25th percentile (LT25), the median (LT50) and the 75th percentile (LT75) of adults survival time (days) and the mean level of bioavailable Cd contamination ($\mu\text{g}/\text{g}$ dry weight) of the eight study populations sites (Ardillats, Marchampt, Vernay, Rauenthal, Poye, Séran, Cressonnière, Vancelle and Ognon). Red, yellow and green colours correspond respectively to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations



Supplementary Figure 2 : Acute Cd tolerance of neonates pre-exposed during gametogenesis or embryogenesis. (A) First and (B) second released cohorts of neonates born from genitors of the Séran population, pre-exposed to Cd (0.1 or 1 $\mu\text{g}/\text{L}$) during one reproductive cycle in the laboratory (see Figure II-10). Neonates released during the first cohort after exposure were hence exposed only during embryogenesis (A) and neonates from the second cohort only during gametogenesis (B). The boxplots present the distribution of individual survival times of neonates exposed to 20 $\mu\text{gCd}/\text{L}$ one day after their release from maternal marsupium.

1.2. Note n°1 : Complément à la publication n°1

Tout d'abord, seuls les résultats des niveaux de Cd bioaccumulés lors des encagements réalisés dans les différents sites ont été présentés. Dans l'**Annexe T1**, les résultats des données de bioaccumulation obtenus dans les différents sites de l'étude pour l'argent (Ag), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn) sont présentés. Les résultats montrent que sur les neuf sites étudiés, les concentrations bioaccumulées en Ag, Cr, Cu, Ni et Zn sont inférieures ou très proches des valeurs seuils de contamination BBAC définies par Alric et al. (2019) pour ces éléments. Les résultats montrent qu'il existe une contamination biodisponible en Pb à certaines dates sur les cinq sites classés comme « intermédiaires » ou « contaminés » pour le Cd. Cependant, le contraste de contamination en Pb entre les sites contaminés et non contaminés est beaucoup plus faible que pour le Cd en ce qui concerne les concentrations moyennes obtenues dans les différents sites au fil du temps. Comme pour le Cd, la contamination par le Pb peut être liée au fond géochimique local sur les roches cristallines dans les régions du Beaujolais et des Vosges.

Les expérimentations de dé-acclimatation ont également été réalisées, en plus des adultes, chez les jeunes et les résultats de l'évolution de la tolérance au Cd chez ces derniers sont présentés dans la **Figure III-1**. Lorsque l'on compare les résultats avant et après le maintien en eau propre au laboratoire, on observe une baisse des temps de survie (log-rank test : p-values < 0.01) chez les populations Ardillats et Vernay aux dates testées sauf en Juin 2021 pour Ardillats (log-rank test : p-value = 0.7). Tout comme les adultes, cette baisse des temps de survie correspond à une perte des niveaux les plus élevés de tolérance individuelle, ainsi qu'à une diminution des niveaux les plus bas jusqu'à la gamme des temps de survie observés dans les populations non contaminées. Par exemple, en Décembre 2021, seuls 18% des Ardi-T0 (après prélèvement sur le terrain) avaient un temps de survie moyen inférieur ou égal à 6 jours, contre 87% des Ardi-T2 (après 2 mois au laboratoire). Après deux mois dans de l'eau sans Cd, le temps de survie médian (LT50) a réduit de 7 à 4 jours pour Ardillats et Vernay. De même, le LT75 a diminué de 12 à 5 jours pour les Ardillats et de 9 à 7 jours pour Vernay après 2 mois dans de l'eau sans

Cd. Ces résultats viennent corroborer le caractère non fixé de la tolérance au sein des populations, précédemment vue chez les adultes (voir publication n°1).

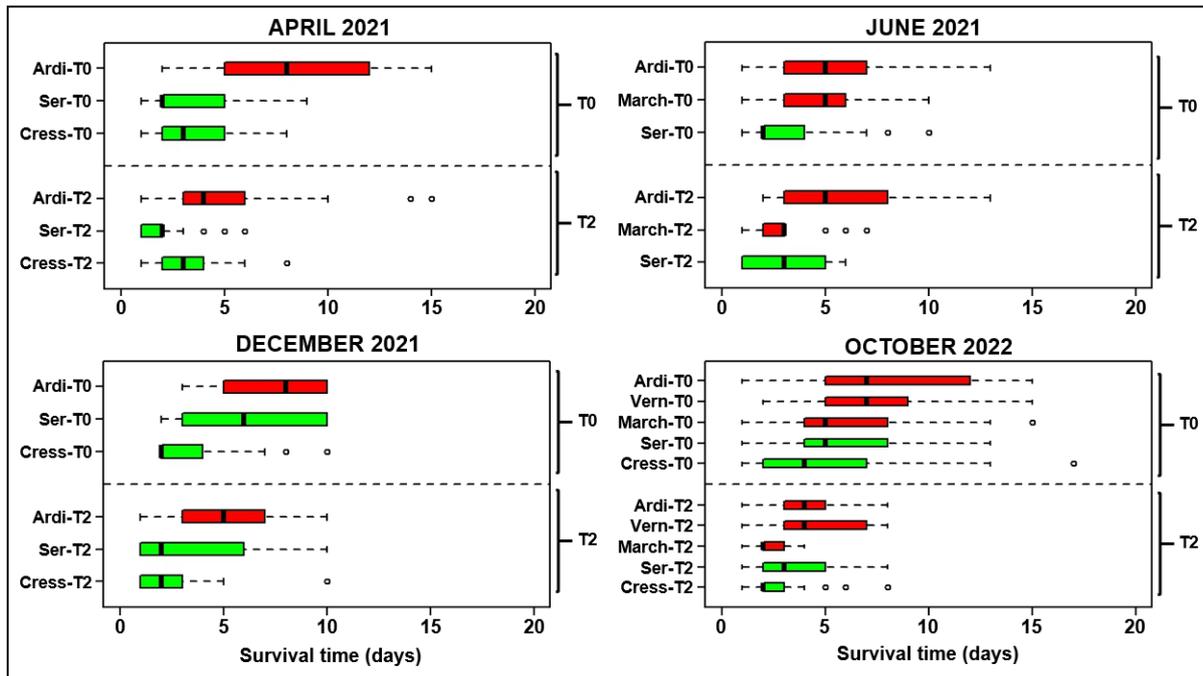


Figure III-1 : Évolution de la tolérance au Cd des populations de terrain au cours de leur maintien dans des conditions sans Cd. Les boxplots présentent la distribution des temps de survie individuels des jeunes (3-4 mm) après échantillonnage sur le terrain (T0) et après leur maintien pendant 2 mois dans une eau exempte de Cd (T2) pour les populations Ardillats (Ardi-T0, Ardi-T2), Vernay (Vern-T0, Vern-T2), Marchampt (March-T0, March-T2), Séran (Ser-T0, Ser-T2) et Cressonnière (Cress-T0, Cress-T2). Les jeunes ont été exposés à 80 µg/L de Cd. L'expérience a été menée à quatre dates différentes (un graphique par date d'échantillonnage sur le terrain). Les couleurs rouge et verte correspondent respectivement au statut contaminé et non contaminé des populations dans leur habitat d'origine.

2. Modification des traits d'histoire de vie

Dans les travaux de Vigneron (2015) réalisés chez la population Ardillats, des résultats préliminaires ont pointé une réduction des taux de croissance, de la taille à la puberté et de la taille maximale atteinte par les organismes. Ainsi, poursuivant la démarche de généralisation, cette deuxième partie de travaux a voulu étudier dans un contexte environnemental si des modifications des traits d'histoire de vie sont observées chez des populations de *G. fossarum* naturellement exposées au Cd dans des cours d'eau de tête de bassin versant. Cette partie de travaux a notamment été réalisée au cours du stage de Master 1 « Sciences de l'eau » (Université Lumière Lyon 2) de Clément Colomb.

2.1. Publication n°2 : Modification des traits d'histoire de vie des populations de *G. fossarum* dans les cours d'eaux de tête de bassin versant exposés à la contamination cadmique chronique naturelle

Modification of life history traits of *Gammarus fossarum* populations living in headwater streams and exposed to natural chronic metal contamination

Auréline Lalouette, Davide Degli Esposti, Clément Colomb, Laura Garnero, Hervé Quéau, Rémi Recourant, Arnaud Chaumot

Article en cours de préparation

Résumé

La modification des traits d'histoire de vie, qui déterminent la dynamique de population (*i.e.* reproduction, croissance, survie), peut altérer la manière dont les espèces exploitent leurs niches écologiques et participent au fonctionnement global de l'écosystème. Dans les écosystèmes aquatiques, les traits d'histoire de vie des populations peuvent être influencés par les variations des paramètres abiotiques d'habitats (température, dureté notamment) et/ou par la présence chronique de contaminants. Cette question des effets long terme de la contamination chimique sur les histoires de vie au sein de la variabilité environnementale est alors importante dans le

cadre de l'évaluation des risques écologiques. Pourtant en milieu naturel, l'étude des effets liés à l'exposition chronique à un contaminant et/ou à l'influence de paramètres abiotiques de l'environnement est peu documentée. En effet, les rares études abordant ce sujet sont réalisées au laboratoire, avec des organismes modèles, avec des durées d'expérimentation courte en termes de nombre de générations exposées. Ainsi, l'objectif de cette étude est d'étudier au sein de la variabilité environnementale si une exposition long terme au cadmium (Cd) entraîne une modification des traits d'histoire de vie chez l'espèce *Gammarus fossarum*. Pour cela, nous avons étudié un jeu de 13 populations de *G. fossarum* (lignée cryptique B), vivant dans des petits cours d'eau de tête de bassin versant, dispersé depuis le Beaujolais, les Alpes du Nord, la Bourgogne jusqu'aux Vosges, présentant un contraste en termes de contamination cadmique biodisponible du fait de l'existence de fonds géochimiques et de variation de la dureté de l'eau (contraste revalidé lors de biotests de bioaccumulation in situ au cours de l'étude). Bien qu'un soin important ait été porté pour sélectionner *a priori* des cours d'eau aux caractéristiques hydro-morphologiques proches, une caractérisation fine des caractéristiques physiques d'habitat (pente, débit, diversité de substrats, distribution des faciès lotique...) et physico-chimiques (conductivité, pH, température et taux d'oxygène dans l'eau) a été réalisée pour décrire cette variabilité des facteurs d'habitat autres que liés à la contamination. Pour chacune des populations sélectionnées, la distribution de taille des femelles adultes et la taille maximale des mâles ont été estimées grâce à des relevés démographiques détaillés de la structure des populations (structure de taille, sexage). En parallèle, la tolérance au Cd a été évaluée sur des organismes ramenés au laboratoire. Nos résultats montrent que la contamination chronique par le Cd influence significativement les traits d'histoire de vie chez l'espèce *G. fossarum* entraînant une diminution de la taille des femelles à la puberté et de la taille médiane des femelles adultes ainsi que la taille maximale atteinte par les individus mâles ou femelles. Par ailleurs, une tolérance au Cd a été mise en évidence chez les populations contaminées confirmant l'exposition chronique au Cd. Ces résultats nous amènent à discuter les mécanismes sous-tendant cette modification des traits d'histoire de vie. Diverses hypothèses peuvent être émises, une modification des traits d'histoire de vie liée à 1- un effet toxique direct du Cd, 2- un coût de la tolérance ou 3- une sélection des histoires de vie des populations exposées à la pression toxique.

Abstract

The question of the long-term effects of chemical contamination on life histories within environmental variability is therefore important in the context of ecological risk assessment. However, there is limited research in natural environment on the effects of chronic exposure to contaminants in regard to the confounding influence of abiotic environmental parameters. Hence, the few studies that have addressed this issue have been carried out in the laboratory, using model organisms, with short experimental times in terms of the number of generations exposed. The aim of this study is therefore to investigate whether long-term exposure to cadmium (Cd) causes changes in life-history traits in the species *Gammarus fossarum*, within the context of environmental variability. For that, we studied 13 populations of *G. fossarum* (cryptic lineage B), living in small headwaters rivers, presenting a contrast in terms of bioavailable cadmium contamination due to the existence of differential geochemical backgrounds and variations in water hardness. A detailed characterization of the physical habitat (slope, flow rate, diversity of substrates, distribution of lotic facies, etc.) and physico-chemical conditions (conductivity, pH, temperature and oxygen levels in the water) was considered to describe the between-river variability in habitat factors other than contamination. For each of the selected populations, the size at puberty, the median size and the maximum size of females, and the maximum size of males was estimated using detailed demographic surveys of the population structure (size structure, sexing). Our results show that chronic Cd contamination significantly influences life history traits in the *G. fossarum* species, leading to a reduction in all size traits. In addition, tolerance to Cd was detected in contaminated populations, confirming chronic exposure to Cd. Various hypotheses can be put forward to explain this modification of life-history traits, including a direct toxic effect of Cd, a cost of Cd tolerance or an adaptive mechanism (selection of life history) exposed to toxic pressure.

1- Introduction

In ecosystems, the adaptation of animal populations to environmental conditions translates into the covariation of life history traits with the variability of abiotic factors of their habitats (Stearns, 1992). Hence, the continuous and increasing natural and anthropogenic impregnation of environments by chemical contamination (Bernhardt et al., 2017) is one of the factors that can cause changes in life-history traits of populations, and therefore their functioning with ecosystemic outcomes (Hoffmann and Hercus, 2000; van Straalen and Timmermans, 2002; Straub et al., 2020). The question of the long-term effects of chemical contamination on species life histories within environmental variability is therefore important in the context of ecological risk assessment (Medina et al., 2007; Brady et al., 2017; Straub et al., 2020) and in the ongoing erosion of biodiversity (Sigmund et al., 2023), particularly in aquatic environments (IPBES, 2019). Multigenerational exposure of populations to toxic micropollutants has been documented to lead to reduced age and size at first reproduction (Donker et al., 1993), to a decrease in reproduction (Pane et al., 2004; Kenig et al., 2013; Kimberly and Salice, 2015; Osborne et al., 2020; Mažuran et al., 2022), reduced growth rate (Kenig et al., 2013; Mažuran et al., 2022), feeding rates (Yu et al., 2016) or survival rates (Pane et al., 2004; Yang et al., 2020). But one issue in studying life history trait modifications in the field based on a comparative approach between natural populations is that habitat conditions other than contamination can act as confounding factors. Indeed, some studies report for instance an influence of temperature (Pöckl, 1992; Neuparth et al., 2001; Coulaud et al., 2013; Betini et al., 2020), conductivity (Rukke, 2002; Kestrup and Ricciardi, 2010), pH (Hargeby and Petersen Jr, 1988) or salinity (Prato et al., 2008) on individual growth rates, feeding, development times or adult size. This explains why there is limited research on the effects of chronic exposure to contaminant integrating the influence of abiotic environmental parameters on populations in the natural environment. Indeed, most of studies have been carried out in the laboratory, using model organisms, with short experimental times, and often a small number of exposed generations. In these laboratory studies, aggravated or delayed effects on life history traits have yet been documented (*e.g.* Vogt et al., 2007; Yu et al., 2016; Prud'homme et al., 2017; Pham et al., 2021), as well as changes linked to the cost of a tolerance acquisition to the contaminant

(e.g. Guan and Wang, 2006; Fisker et al., 2011; Vigneron et al., 2015) or adaptive changes in life history traits (e.g. Maltby, 1991; Donker et al., 1993; Agra et al., 2011).

The species *Gammarus fossarum* is relevant in ecotoxicological studies because it is a sentinel species used both in the laboratory and in the field to assess the toxicity of environments (Kunz et al., 2010; Chaumot et al., 2015). This species is sensitive to a wide range of contaminants and has a central place in the trophic chain since it is both detritivore and a source of food for many species of fish, amphibians and even some birds (Macneil et al., 2007). Gammarids are key species in aquatic ecosystems, playing a key role in the decomposition of organic matter (Baird et al., 2007). Then, a disruption in the population dynamics of these species can be correlated with impacts on ecosystem function. For example, studies have shown that feeding inhibition of this species correlates with a reduction in litter decomposition rate at the river ecosystem scale (Forrow and Maltby, 2000).

Our previous works in a case study previously revealed an increased tolerance to cadmium (Cd) in *G. fossarum* populations living in rivers naturally contaminated by geochemical sources of this metal (Vigneron et al., 2015; Lalouette et al., 2023). Moreover, in one of these Cd-tolerant populations (population Ardillats), preliminary results have identified potential changes in growth rates, size at puberty and in the maximum size reached by organisms (Vigneron, 2015). This study aims to confirm these results by considering at a large spatial scale other populations contaminated by Cd in natural contexts, living in rivers presenting similar hydromorphological characteristics to study the covariation of life history traits with the level of chronic Cd exposure. For that, we studied a set of 13 populations of *G. fossarum* (cryptic lineage B), living in small headwaters rivers, scattered from the Beaujolais, the Northern Alps, the Burgundy to the Vosges, presenting a contrast in terms of bioavailable Cd contamination due to the existence of differential geochemical backgrounds and variations in water hardness (a contrast revalidated during *in situ* bioaccumulation biotests during the study). More specifically, we aimed: i) to finely characterise the environmental variables (in particularly physical habitats) to gauge the similarity of habitat characteristics between headwater rivers selected and ii) to document by detailed demographic surveys of population structure the variability in size at puberty, and in

mean and maximum size reached by adults in populations exposed or not to Cd-chronic contamination.

2- Material and Methods

2.1- Selection of the thirteen *G. fossarum* populations of the study

The study considered a dozen populations of *G. fossarum* living in rivers naturally contaminated by Cd and presenting similar hydromorphological habitat characteristics. Hence, we selected populations inhabiting upstream areas of small headwater streams, in natural or semi-natural contexts, ensuring low levels of anthropic sources of contamination or habitat alteration. Based on a previous study (Wattier et al., 2020), these sites were selected because they shelter *G. fossarum* populations at high densities belonging to the same cryptic lineage (*G. fossarum* B, BIN-ACG7784).

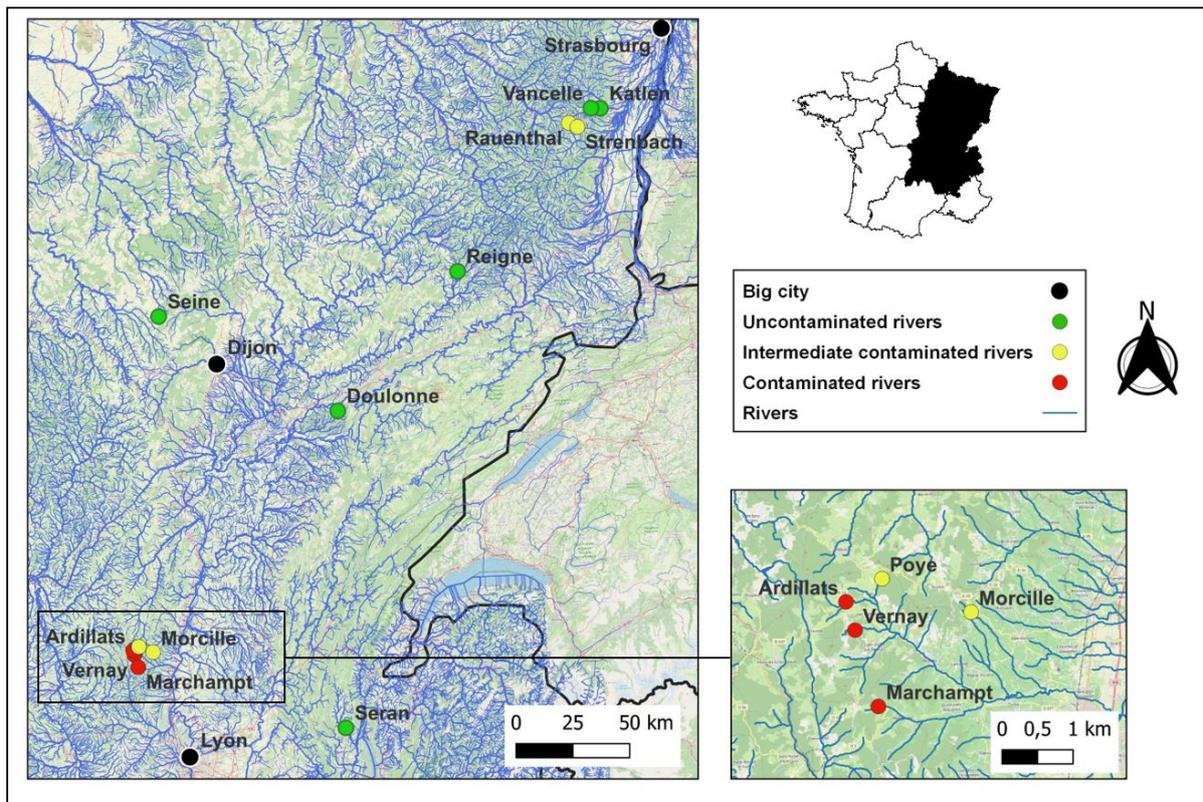


Figure 1 : Location of the thirteen studied *G. fossarum* populations in Central Eastern France. The Cd contamination status of populations (green, yellow and red colours) was established following the active biomonitoring approach (based on *Gammarus* caging) developed to characterise bioavailable contamination water bodies in France (see results in Table 1). The inset on the bottom right shows a focus on the Beaujolais region.

Tableau II-1 supplies the location details of the thirteen study sites. To consider contamination gradients, we based ourselves on previous study (Alric et al., 2019) for selecting five populations inhabiting streams on crystalline bedrock in the Beaujolais region (Ardillats, Vernay, Marchampt, Poye and Morcille populations), completed by four distant populations in the Vosges region (Vancelle, Katlen, Rauenthal and Strenbach populations), also situated on a crystalline bedrock, and four other stream populations (Seine, Séran, Doulonne and Reigne populations) situated on sedimentary substratum (Figure 1). Moreover, due to the negative influence of water hardness on the bioavailability of dissolved Cd for gammarids (Besse et al., 2013; Urien et al., 2015), exposed populations were expected likely to be located on crystalline bedrock.

As in previous studies (Vigneron et al., 2015; Ciliberti et al., 2017; Alric et al., 2019), we used an active biomonitoring approach to assess populations' field exposure to Cd. Briefly, it consists in transplanting male gammarids (with a body size of about 11 mm) from a single source population (Cressonnière population) after an acclimatization period of 15 days in the laboratory (NFT90-721 standard AFNOR). After 7 days of caging exposure in the study sites, bioaccumulated concentrations of metals were measured by the INRAE analytical laboratory in Lyon by inductively coupled plasma triple quadrupole mass spectrometry (iCAP™ TQ ICP-MS, Thermo Electron) after microwave assisted acid digestion (HNO₃ 14M) of the samples. The limit of quantification (LQ) was determined according to the NFT90-210 standard AFNOR for each metals. Data were already available in Lalouette et al. (2023) for the subset of populations (Ardillats, Marchampt, Vernay, Rauenthal, Poye, Séran and Vancelle populations). Here, we presented the average of the different tests conducted over the years.

2.2- Measurement of hydromorphological characteristics and physico-chemical conditions of habitats

We described hydromorphological characteristics and physico-chemical water parameters of the selected sites. For that, different parameters related to habitat were measured using geographical map data (distance to the source, Strahler rank, slope and land use) or directly on

site during the campaign of population sampling in April 2022 (flow, river width, flow facies, mosaic of substrates, pH, conductivity, dissolved oxygen, temperature, conductivity).

The **distance to the source** was measured using QGIS software (<https://www.qgis.org/fr/site/>). For each study site (one per river), the distance to the source was measured in kilometres after the isolation of the main watercourse of each catchment head. Using the same software, the **Strahler rank** was determined manually from the location and hydrographic network of each site. The **land use** of each catchment head was obtained by partitioning the Corine land cover layer by the catchment resized from the sampling site. Percentages of coverage was then obtained for land use categories and we clustered into three groups: “natural”, “urbanised” and “agricultural”. Finally, the **average slope** of each site was measured on the Geoportail website (<https://www.geoportail.gouv.fr/>).

A river section was determined on site according to an IBGN protocol (NFT90-350 standard AFNOR) in order to delimit the habitat description and sampling area for each population. The size of the section was thus determined using the average of the full river width and the size class of the watercourse. The full width of the watercourse was multiplied by 18 if it is “very small”, 12 if it is “small and medium” and 6 if it is “large”. Moreover, the section was positioned at the top of a riffle to obtain a succession of riffle-wet facies. Various variables were measured: flow rate, full width, flow facies, the diversity of substrates, pH, conductivity, oxygen concentration, and water temperature. The **flow** was measured using transparent pole gauging (Pike et al., 2016). The measurement was carried out by favouring velocity zones with strong currents. Several verticals were placed along a straight transect. For each transect, depth, dynamic load and distance to shore were measured using the transparent pole and a decameter. Then, a single value of instantaneous flow was obtained and will serve as an informative marker of the order of magnitude of the stream classes. The **full width** (FW) was measured with a telemeter. For each site, 10 width measurements were performed (width corresponding to the distance between two edges of a stream that have reached the water level just before it overflows the minor bed). The final value obtained is the average of the 10 measured widths. The **flow facies** were schematised along the section. The different percentages of facies obtained were grouped into two groups corresponding to lotic and lentic facies. In order to define the **substrate**

of the river, 5 transects were randomly defined on the station and for each of them, the substrate was characterised using a quadra of 0.25 m². A diversity index was then defined using Simpson's diversity index (SIDI). Finally, the **physicochemical parameters of the water** were measured (pH, conductivity, oxygen concentration, temperature).

2.3- Demographic census of *G. fossarum* populations

The objective was to collect around 2,000 adult gammarids per site (~1000 males and 1000 females under a first approximation of 1:1 for the sex ratio), representative of the population sheltered by the river section, to establish the size structure of adults in each population and to derivate estimations of size at puberty, mean adult size and maximal size. Because gammarid densities vary between populations, different sampling efforts were conducted for each site. The collection of *G. fossarum* populations was carried out by manual disruption of the substrate using a surber with a 315 µm mesh size and a 0.0625 m² frame. The number of samples from each substrate was defined according to the percentage obtained for each type of substrate got from the characterisation previously established (see 2.2). For example, the Doulonne river showed 48% of coarse stones, 13% of fine stones, 15% of roots and 24% of litter. Thus, five samples were taken in the coarse stones, two in litter and one in fine stones and roots. Then, collected organisms were sieved on a sieve column consisting of a 10 mm screen and a 1.25 mm sieve (according to Coulaud et al. (2014), this choice was made in order to obtain all the adult organisms, without too many juveniles). Finally, the organisms were distributed in buckets filled with river water and transported to the laboratory in coolers and with oxygen. In the laboratory, buckets were placed in water baths thermoregulated at 12°C and with oxygen.

In order to estimate the size distribution of adults in the different populations, sampled organisms were sorted within 24 hours after there were collected. The aim of this sampling was to isolate all the breeding females in order to obtain a distribution by population size class, and to isolate the males of maximum size in order to obtain the tail of the distribution by population size class. We have chosen to consider only males with maximum size because sexing prepubescent and pubescent individuals would have been too time-consuming. On the contrary,

females are easily identified by the presence of oocytes and/or the presence of embryos in the marsupium (Geffard et al., 2010).

For each population, the total number of sampled gammarids was manually counted. Subsequently, a minimum of 50 breeding females were randomly collected using a sub-sampling method. These females were identified visually by the presence of developed ovaries in the dorsal side and/or embryos in the marsupium. The distribution of female sizes was used to estimate the 25%, 50% and 95% percentile of the size of females of each river site. A sorting was also carried out in order to collect the largest males present in the population samples. The number of males collected per population sample was adjusted to collected densities to target a final number of measured male corresponding to the 10% largest males of the population. The median size of the selected males was used as estimate of the 95% percentile of the sizes of males within each river. Verification under binocular loupe were carried out to ensure the sex of the males collected by the presence of genital papillae located ventrally at the level of the 5th segment of the mesosoma.

Selected male and female gammarids were then photographed under binocular loupe (Leica Application Suite v405) at 6.3 magnification and measured manually using imageJ software. Size measurements were taken from the base of antenna 1 to the end of the metasome.

2.4- Acute toxicity tests for Cd tolerance assessment

We also assessed the Cd sensitivity of male adults from the thirteen populations. We used the same protocol as described in Lalouette et al. (2023). For each population, three replicates of 15 male adult organisms (with a size of about 10 mm) were exposed to 80 µg/L of Cd in 500 mL plastic beakers. The Cd solution at 80 µg/L was prepared in a 1 L volumetric flask using drilling water (oxygenated and conductivity at 300 µs/cm) with the addition of 800 µL of stock solution. Then, beakers were kept in a thermo-regulated water bath at 12°C and mortality was monitoring daily during exposure tests.

2.5- Statistical analysis

The data were processed with the R software (R Core Team, 2018). Two centred and reduced principal component analysis (PCA) were carried out to describe between-river habitat variation based on the environmental physical parameters and the physico-chemical parameters. For each PCA, two axes were chosen according to the criteria of the Elbow and Kasier. We analysed data obtained during acute toxicity tests (sensitivity to Cd) by Kaplan-Meier type survival analyses (log-rank test). The robustness of the size indicators (median, Q25 and Q75 for females and the Q95 for males) to the sampling effort realized for each population was assessed using a bootstrapping procedure. For each population sample, 100 theoretical samples were created by a random sampling with replacement of the same size as the sample of observed individual sizes, on which a median and the various percentiles were then recalculated. All the statistical analyses were performed with a statistical significance level of 5%.

3- Results

3.1- Characterisation of field Cd chronic exposure

The results of bioaccumulation data from 7-days *in situ* caging biotests show a gradient of Cd bioavailable contamination among the different selected sites. According to Lalouette et al. (2023), we defined a status of population exposure based on the French national reference values called bioavailable background assessment concentrations (BBAC), defined for Cd by Alric et al. (2019): contaminated (coloured in red) if accumulated concentration is higher than 0.3 µg/g, intermediate (coloured in yellow) if the level is between 0.2 and 0.3 µg/g and uncontaminated (coloured in green) if the level is less than 0.2 µg/g. Then, we considered the Ardillats, Marchampt and Vernay populations as exposed to Cd, regarding concentration accumulated by caged gammarids at 0.66 µg/g, 0.37 µg/g and 0.52 µg/g respectively (Table 1). For Doulonne, Katlen, Reigne, Seine and Seran populations, we observed an absence of bioavailable Cd contamination with levels of accumulated Cd far under 0.20 µg/g (Table 1). An intermediate level of contamination is found in Morcille, Poye, Rauenthal and Strenbach populations with accumulated concentrations ranging between 0.22 and 0.29 µg/g (Table 1).

Table 1 : Characterization of the bioavailable metal contamination between July 2015 and July 2022 in the sites inhabited by the thirteen populations of the study. For each metal element, bioavailable contamination is assessed by the mean of the accumulated concentrations in µg/g dry weight (number of caging campaigns in brackets) in gammarids caged on the study sites for 7 days (organisms transplanted from the reference population of the laboratory). Detailed protocol and determination of bioavailable background assessment concentrations (BBAC) are reported in Besse et al. (2013) and Alric et al. (2019). Red, yellow and green colours correspond to Cd-contaminated populations, intermediate Cd contamination and uncontaminated, respectively (see section 3.1).

Site	Ag	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
	BBAC = 0.21	BBAC = 0.30	BBAC = 1.08	BBAC = 84.0	BBAC = 1.18	BBAC = 0.69	BBAC = 78.9
Ardillats (<i>n</i> = 4)	0.07	0.66	0.70	59.23	0.43	0.98	58.38
Doulonne (<i>n</i> = 1)	0.04	0.16	0.58	74.3	0.63	<LQ	64.8
Katlen (<i>n</i> = 1)	0.07	0.09	0.36	69.2	0.79	<LQ	55.8
Marchampt (<i>n</i> = 4)	0.07	0.39	0.59	65.28	0.47	0.87	56.80
Morcille (<i>n</i> = 2)	0.07	0.22	1.85	78.70	1.34	1.66	65.10
Poye (<i>n</i> = 2)	0.05	0.24	0.79	63.00	0.43	0.94	55.10
Raenthal (<i>n</i> = 2)	0.13	0.24	0.45	60.70	1.66	1.27	51.50
Reigne (<i>n</i> = 1)	0.09	0.15	0.49	74.5	0.66	1.19	70.9
Seine (<i>n</i> = 1)	0.04	0.08	0.36	64	0.41	<LQ	67.7
Seran (<i>n</i> = 3)	0.06	0.08	0.51	66.73	0.46	0.23	59.50
Strenbach (<i>n</i> = 1)	0.05	0.29	0.16	50.4	0.3	0.27	104
Vancelle (<i>n</i> = 2)	0.02	0.07	0.33	56.10	0.37	0.27	49.90
Vernay (<i>n</i> = 3)	0.06	0.52	0.56	61.47	0.37	1.07	54.83

Regarding acute Cd sensitivity tests (Figure 2), Cd-contaminated and Cd-intermediate populations present a significant higher tolerance compared to reference populations (log-rank test: *p*-values < 0.03) except for Strenbach and Raenthal populations which do not present significant higher survival times than the Séran population (log-rank test: *p*-value = 0.09 and 0.1). Hence, tolerance results reinforce the statement that a gradient of chronic Cd exposure affect the populations of the study.

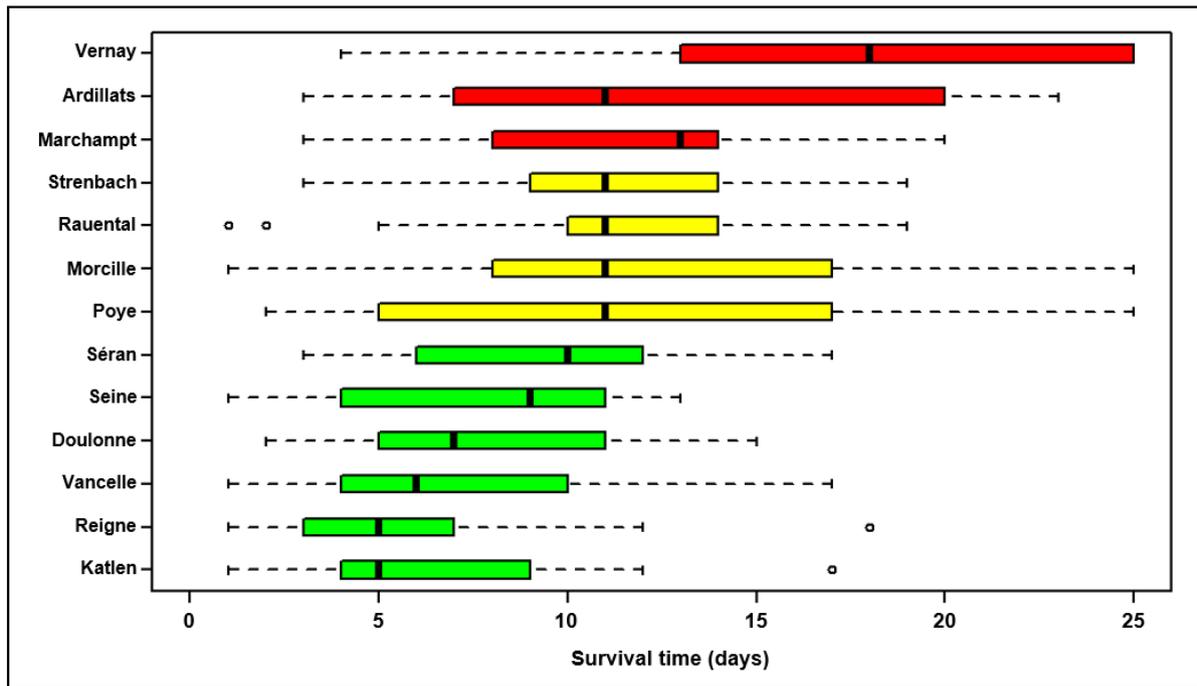


Figure 2 : Cd-tolerance of thirteen field populations assessed through the distribution of individual survival times of male adults exposed to 80 $\mu\text{g/L}$ of Cd in the laboratory, one day after their collection in the field. Red, yellow and green colours correspond to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see 3.1)

3.2- Characterisation of the physical and physicochemical characteristics of habitats of the thirteen rivers

The first PCA revealed a great homogeneity in the physical habitat characteristics of ten rivers among the 13 study rivers, belonging to different geographical areas and independent on the contamination status (Figure 3). These ten rivers correspond to small rivers in natural environment (Strahler rank of 1 or 2, full width below 7 meters with local land use occupied by more than 70% of natural areas), close to the source (less than 6 kilometers), with a high percentage of lotic facies (more than 78%) and substrate diversity (Simpson index (SIDI) higher than 0.6) (Annexe T9, Supplementary Figure 1). Three uncontaminated rivers diverge from the group, the Sérán, the Reigne and the Seine river. The Sérán and the Reigne rivers are quite larger rivers (Strahler rank 4, full width over 10 meters) with poor substrate diversity (SIDI equal to 0.32 and 0.44, respectively) (Annexe T9). The Seine river is characterised by a greater proportion of lentic facies, compared with others rivers (Annexe T9, Supplementary Figure 1).

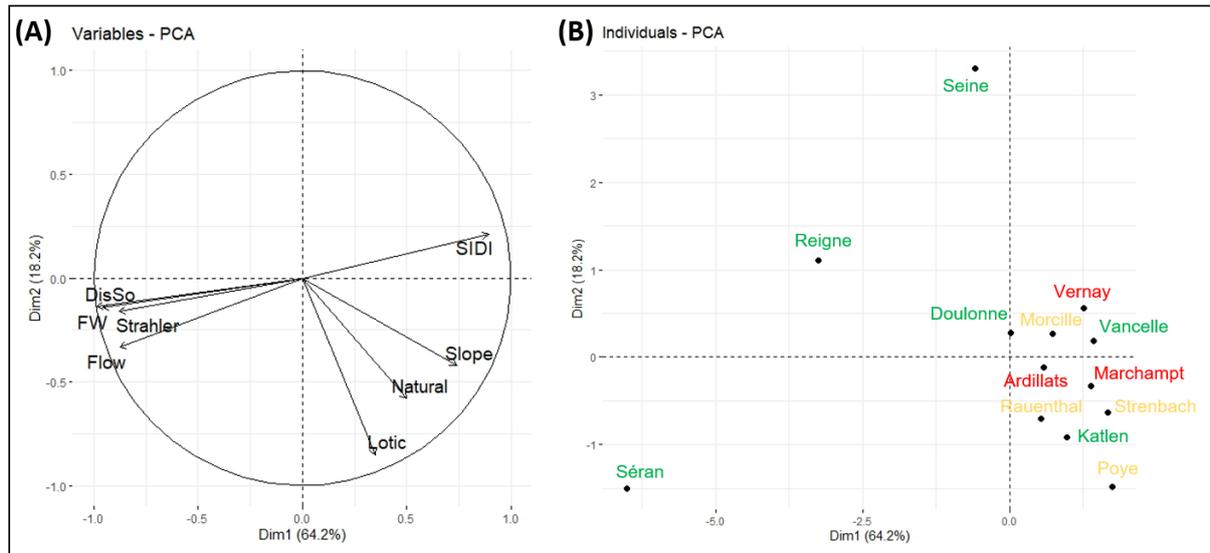


Figure 3 : (A) Correlation circle of principal component analysis on physical environmental parameters of the thirteen study sites (DisSo: Distance to source; FW: Full width; Strahler: Strahler rank; Flow: Flow rate; SIDI: substrate diversity index; Slope; Natural: Natural area; Lotic: Lotic facies) and (B) position of populations in relation to the physical environmental parameters. Red, yellow and green colours correspond respectively to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see 3.1).

Regarding physico-chemical water parameters (Figure 4), the Vancelle population appeared quite different from other rivers, but this was only explained by a lowest O_2 concentration (8.5 mg/L). However, this value conforms to a “good state” criteria based on the French environmental quality standard (SEQ-Eau). The other notable point is the variability in conductivity, with two rivers presenting a high conductivity compared to the others: the Seine with 290 $\mu\text{s}/\text{cm}$ and the Séran with 373 $\mu\text{s}/\text{cm}$ (Annexe T10), both located in sedimentary geological areas. This result is not surprising, since conductivity can be considered as a proxy of water hardness in headwater rivers located in natural context. In addition, also as expected from the selection of rivers in either crystalline bedrocks versus sedimentary and from the negative influence of water hardness on Cd bioaccumulation, the three exposed populations are among rivers with low levels of conductivity (Supplementary Figure 2).

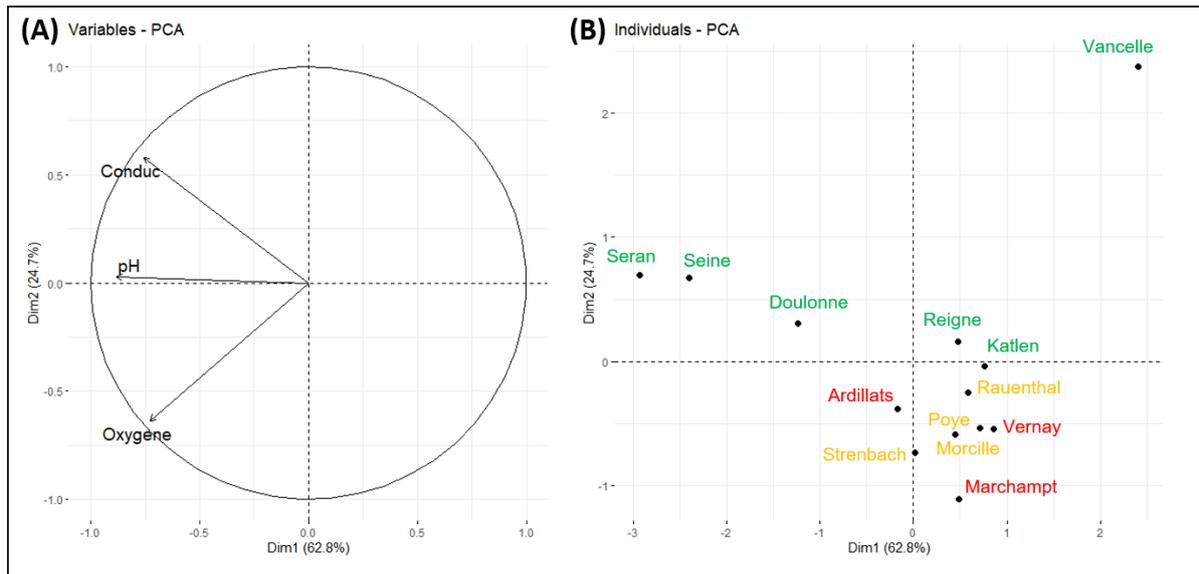


Figure 4 : (A) Correlation circle of principal component analysis on physico-chemical parameters of the thirteen study sites (pH; oxygene; Conduc: conductivity) and (B) position of populations in relation to the physico-chemical parameters. Red, yellow and green colours correspond respectively to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see 3.1).

3.3- Cd-exposure impacts the size distribution of *G. fossarum* populations

We estimated the size distribution of females (Figure 5) and the maximal size of male gammarids (using the 95th percentile as indicator) for each population (Figure 6). The results show that females (Figure 5) from the three contaminated populations present significant smaller median sizes than females from intermediate contaminated populations (Student test: p-values < $2 \cdot 10^{-3}$) and uncontaminated populations (Student test: p-values < $6 \cdot 10^{-4}$). We observed 50%, 34% and 49% of female with a size inferior or equal at 6.50 mm respectively for Ardillats, Marchampt and Vernay populations, whereas this proportion was less than 15% for the six uncontaminated populations (Annexe T11). Females from Rauenthal, Poye, Morcille and Strenbach populations, which experience intermediate levels of Cd exposure present intermediate distribution of size with a larger percentage of female with size inferior at 6.50 mm (between 12% and 19%; Annexe T11) than uncontaminated populations. The results therefore reveal an overall negative correlation between the level of bioavailable Cd contamination and the size of females, either in terms of Q25, Q50 or Q95 (Spearman-correlation test: p-values < 10^{-2} ; Supplementary Figure 2).

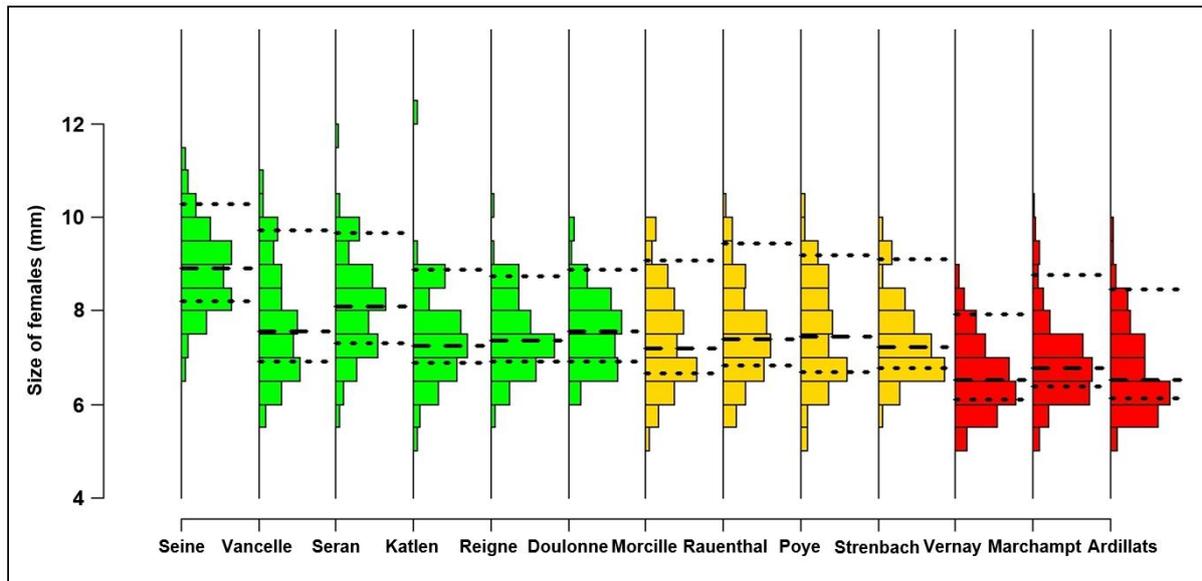


Figure 5 : Size distribution of breeding females (mm) in the thirteen study. The three dashed segments represent the Q25, Q50 and Q95 of the size distribution of each population. Red, yellow and green colours correspond to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see 3.1).

We then focused on the maximal size reached by males within each population, based on the estimation the 95th percentile of male adult size distribution (Figure 6). Male gammarids from Ardillats, Marchampt and Vernay populations present a significant smaller maximal size than intermediate contaminated and uncontaminated populations (Student test: p-values < 0.01) except for Marchampt with Reigne, Morcille and Poye populations (Student test: p-values > 0.1) (Figure 6). For Strenbach and Rauenthal populations, the 95th percentile of male size is not different from the distribution for Katlen population (Student test: p-value = 0.06 and 0.21). Similarly, Poye population is also not different from Reigne population (Student test: p-value = 0.07). Finally, a positive correlation exists between the level of Cd contamination in the different sites and the 95th percentile of male sizes (Spearman-correlation test: p-value = 2.10^{-3} , Figure 6).

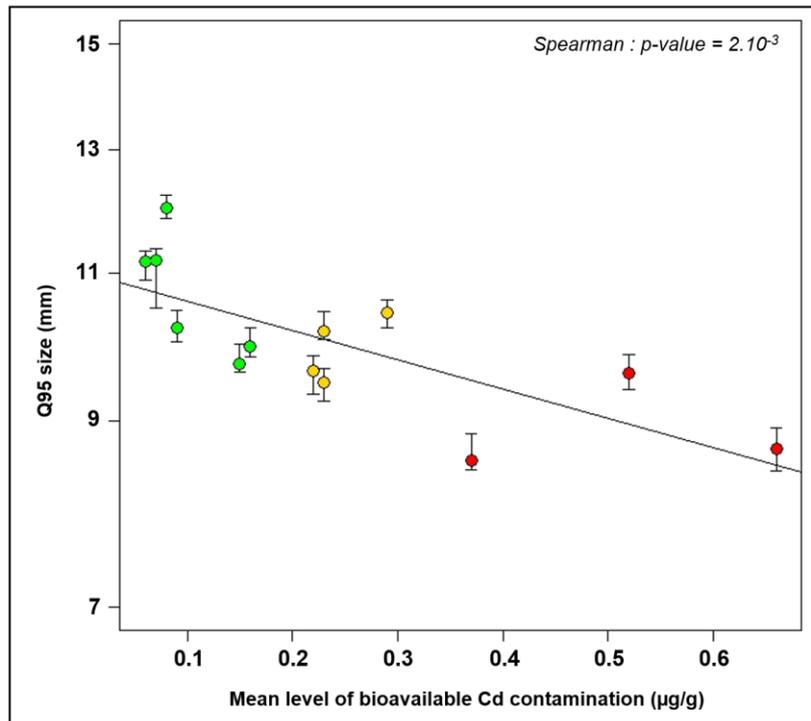


Figure 6 : Correlation between the maximal size of male adults (estimate by the 95th percentile of size distribution) and the level of Cd exposure of populations (mean Cd concentration accumulated by 7-day caged gammarids). Red, yellow and green colours correspond to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see 3.1).

3.4- Analysis of the effect of water conductivity

We investigated the potential confounding influence of water conductivity in the observed effect of population Cd exposure on the size distribution of gammarids (Figure 7). We observed no effect of conductivity in the distribution of size between females (ANCOVA: p-value = 0.09) or males (ANCOVA: p-value = 0.19) from uncontaminated populations. For example, for females, there is no difference in the distribution of size (Wilcoxon-test: p-value = 0.2) between Katlen and Doulonne populations which presented different conductivities (101 and 175 µs/cm, respectively). Moreover, the conductivity does not explain the size differential between uncontaminated and contaminated populations since we observe a significant difference between size distributions of Ardillats and Katlen populations (Wilcoxon-test: p-value = 10⁻⁶) which experience the same conductivity (101 µs/cm; Annexe T10). Similarly, a conductivity of 67 µs/cm and 69 µs/cm is found for Vernay and Poye populations (Annexe T10) which also present a significant difference in the distribution of size (Wilcoxon-test: p-value = 3.10⁻⁷).

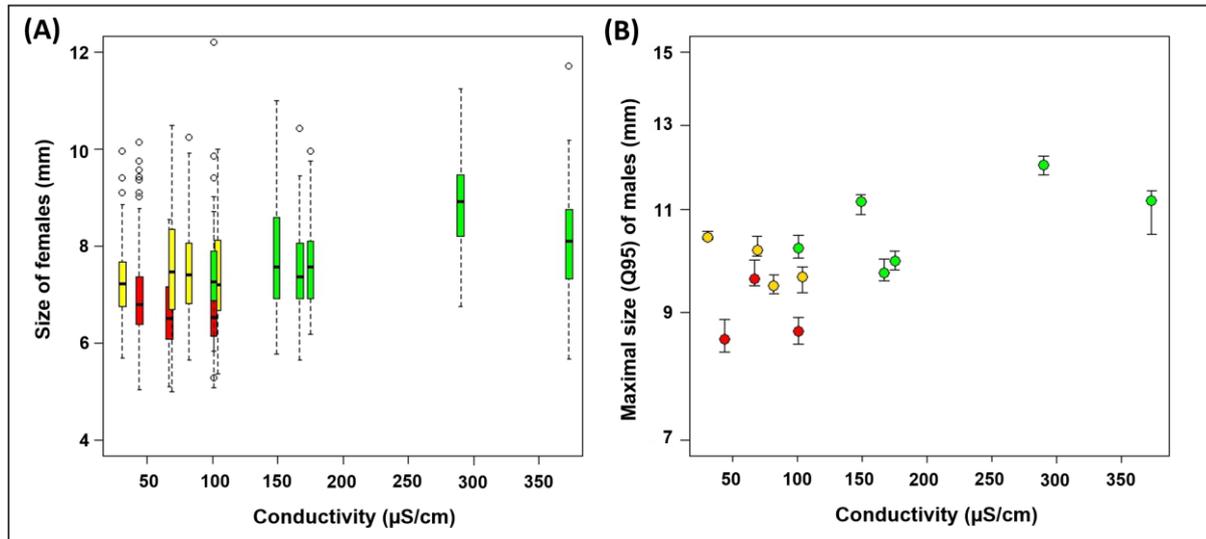


Figure 7 : Correlation between the conductivity ($\mu\text{S/cm}$) and (A) the maximal size (represented by the Q95) and (B) the size of breeding female (mm) of the thirteen study populations. Red, yellow and green colours correspond to Cd contaminated, intermediate and uncontaminated status of populations (see 3.1).

4- Discussion

There is limited research on the ecological effects of chronic exposure to contaminants in field populations. A major issue in the rare studies that examined the divergence of life history traits in the field is that they mainly rely on paired comparisons of populations (contaminated vs uncontaminated) and thus do not fully overcome the potential confounding influence of environmental factors other than contamination (Feckler et al., 2012; Oziolor et al., 2020; Romero-Blanco and Alonso, 2022). To address this issue, here we considered a dozen of *G. fossarum* populations sheltered by rivers distributed in a large region scale and presenting homogeneous physico-chemicals and habitat parameters, with various levels of bioavailable Cd contamination. Indeed, based on our analyses of habitat conditions, we identified ten populations in small headwaters rivers in natural context, characterised by a high proportion of lotic facies and substrate diversity. The habitats of three additional uncontaminated populations, the Seine, Sérán, and Reigne populations, were quite different compared to the other rivers, with a higher proportion of lentic facies for the former one, or bigger river size and lower substrate diversity for the two latter. Moreover, the Sérán and the Seine rivers present higher levels of water conductivity. Overall, we observed that exposed populations were found among the set of rivers with lowest conductivities. This observation was expected, because it is well

known that water hardness influences the bioavailability of heavy metals, especially Cd (Lebrun et al., 2011; Urien et al., 2015). And variations in water conductivity are mainly explained by variations in water hardness in the natural context, where we selected the 13 populations. Among the 13 sites, we observed that Cd exposure leads to an overall reduction in the sizes of adult organisms, both for males and females. We thus inspected the potential confounding influence of conductivity on the covariation between size and Cd exposure. Some studies indeed documented that a lower concentration of calcium leads to a strongly reduced growth of gammarids due to the use of calcium by gammarids to carry out their moult, especially during growth (Rukke, 2002; Rollin et al., 2018). Thus, a low conductivity could lead to a decrease in the average size of organisms. But here is no difference between the maximal size of males and/or the size distribution of females living in uncontaminated rivers with different conductivities (e.g. Katlen vs Doulonne or Reigne populations with respectively a conductivity of 101 $\mu\text{S/cm}$, 175 $\mu\text{S/cm}$ and 167 $\mu\text{S/cm}$). Furthermore, the two populations Katlen and Vancelle live in similar water conductivity ($\sim 100 \mu\text{S/cm}$) as the Ardillats population (contaminated). Hence, we concluded that the reduced adult sizes in Cd exposed populations are not explained by the low water hardness of contaminated rivers.

Faced with Cd exposure, we thus observed that females from contaminated sites presented a shift towards smaller size classes in their size distribution, compared to those from uncontaminated populations. These populations present indeed a density peak in female size classes around 6 mm while for uncontaminated populations it is around 8 mm. The size at puberty also appears to be reduced, with for instance a shift from 6.5 mm to 5.5 mm for the 5th percentile of females' size distribution. Concomitantly, there is also a lack of large females which can be illustrated by the 75th percentile of observed sizes of only 7.3 mm for contaminated populations, whereas it ranges between 7.9 and 9.5 mm for uncontaminated populations. We found the same results with lower maximal sizes reached by males in contaminated populations. Several studies are in accordance with these results. They suggest that an exposure can impact some life history traits with reduction in adult size after multi-generation exposure to heavy metals in laboratory was reported for example in *Daphnia pulex* (Chen et al., 2016), *Daphnia magna* (Muysen and Janssen, 2001), *Caenorhabditis elegans* (Yu

et al., 2016) or in *Chironomius riparius* (Beaudouin et al., 2012). This also agrees with field studies, which report a reduction of size in field populations of terrestrial invertebrates exposed to metallic pollution, such as isopods (Donker et al., 1993; Jones and Hopkin, 1998; Ghemari et al., 2019) or arachnids (Eraly et al., 2011). In our study we showed that the contaminated populations had a higher number of small breeding females than the uncontaminated populations, which could be a sign of early maturity (*i.e.* at a smaller size) in this population compared with the other populations. Variation in female size at puberty has already been documented in *Daphnia longispina* after an exposure to Cd by Martins et al. (2017) who put forward the hypothesis of a reduced energy acquisition related to decreasing feeding rates. This hypothesis of reduced feeding rate should be discarded in our case if we refer on the *in situ* measurement of feeding rate in the Ardillats population previously reported in the study of Vigneron et al. (2015).

Our results hence lead us to discuss the population mechanisms explaining the modification of adult size distribution in populations of *G. fossarum* long term exposed to Cd. Firstly, the modification of life history traits can be directly linked to the chronic toxic effects of Cd. In our case, we can hypothesize that Cd impact growth or survival of gammarids and thus, lead to earlier size at puberty or drop in maximal size reached by adults. In the study of Bighiu et al. (2017), an inhibition of growth and reproduction was observed in snails *Theodoxus fluviatilis* engaged in contaminated environments by copper and zinc. Similarly, Zheng et al. (2023) concluded that the growth retardation observed in *Hyphantria cunea* larvae is a consequence of Cd toxicity which leads to disturbances in food utilization and in energy metabolism. A second hypothesis could be a modification of growth rates or adult survival linked to a cost of tolerance. Confirming our previous study (Lalouette et al., 2023), we showed here again with a new sampling campaign and additional populations the development of an increased Cd tolerance in relation to the natural exposure of *G. fossarum* populations to this metal. The changes in life-history traits, here lower sizes of females and males, would then be explained by reallocation of energy (*i.e.* normally allocated to reproduction or growth) to the mechanisms that enable tolerance (Xie and Klerks, 2004). Such fitness costs of tolerance were already illustrated in the crustacean species *Daphnia magna* where tolerant organisms to Cd present a lower size and

reproduction than sensitive organisms (Chen et al., 2016). Similarly, in *Daphnia longispina* clones exposed to copper, it was observed that tolerant individuals reproduced 3 days earlier, grew 20% faster and produced 3 more offspring per day than non-tolerant individuals of the same species (Agra et al., 2011). Other studies have also shown similar results, such as decrease in feeding rate (Yu et al., 2016; Dong et al., 2020) and/or growth rate (Pane et al., 2004; Guan and Wang, 2006b; Yu et al., 2016), smaller size at puberty (Fisker et al., 2011; Martins et al., 2017) and reduced fertility (number of embryos per female) (Guan and Wang, 2006b; Yu et al., 2016; Martins et al., 2017). As a last alternative hypothesis, the modifications of life-history traits could have an adaptive value and be the result of the natural selection of life history (Posthuma and Van Straalen, 1993). This type of modification in response to chemical stress through life-history adaptation has, for example, been proposed for the terrestrial isopod *Porcellio scaber* by Donker et al. (1993) and the aquatic isopod *Asellus aquaticus* by Maltby (1991) in a metal-contaminated environment. In such situations, the reduction of size at puberty, the earlier investment in reproduction is interpreted as an adaptation to shorter lifespan induced by toxic pressure.

The species *G. fossarum* is a keystone species in natural environment (Kunz et al., 2010; Chaumot et al., 2015). Then, the changing in the life history traits in natural populations of this species observed in this study can modify the way in which species exploit their ecological niches and participate in the overall functioning of the ecosystem, thereby affecting key ecosystem functions (Jørgensen et al., 2007; Medina et al., 2007). Whatever the underlying mechanisms are, the reduction in body size of populations observed here in an environmental context exemplifies the need to integrate the evolutionary consequences of long-term exposure to contamination into the evaluation of ecological risk assessment of chemicals (Jørgensen et al., 2007; Medina et al., 2007). The lower size of gammarids could result in a significant reduction in food resources for predators. Gammarids are also involved in recycling of organic material in stream, playing a key role in the incorporation of terrestrial organic material (Maltby and Crane, 1994). As a first quantitative assessment, a reduction of 1 mm of body sizes in *G. fossarum* population should result in a 15% reduction of litter decomposition rate, if we refer to the model developed by Coulaud et al (2011).

5- Conclusion

Results of this study originally document a major influence of long-term exposure to Cd exposure on the life history of an ecologically relevant aquatic species in natural context. Chronic Cd exposure of *G. fossarum* populations result in an overall reduction the body size of adults, and more specifically in size at puberty and maximum size. This conclusion was established thanks to a detailed characterisation of stream habitat of a large set of populations, enabling to exclude potential confounding effects of other abiotic factors unrelated to Cd contamination. These results call now for complementary investigations to establish whether this modification of population size distribution is related to evolutionary process related to either a cost of toxicological tolerance or an adaptation of life history of populations exposed to toxic pressure.

6- Bibliography

Agra, A.R., Soares, A.M.V.M., Barata, C., 2011. Life-history consequences of adaptation to pollution. “*Daphnia longispina* clones historically exposed to copper.” *Ecotoxicology* 20, 552–562. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0621-5>

Alric, B., Geffard, O., Chandesris, A., Ferréol, M., François, A., Perceval, O., Piffady, J., Villeneuve, B., Chaumot, A., 2019. Multisubstance Indicators Based on Caged *Gammarus* Bioaccumulation Reveal the Influence of Chemical Contamination on Stream Macroinvertebrate Abundances across France. *Environ. Sci. Technol.* 53, 5906–5915. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01271>

Baird, D.J., Brown, S.S., Lagadic, L., Liess, M., Maltby, L., Moreira-Santos, M., Schultz, R., Scott, G.I., 2007. In Situ–Based Effects Measures: Determining the Ecological Relevance of Measured Responses. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3, 259–267.

Beaudouin, R., Dias, V., Bonzom, J.M., Péry, A., 2012. Individual-based model of *Chironomus riparius* population dynamics over several generations to explore adaptation following exposure to uranium-spiked sediments. *Ecotoxicology* 21, 1225–1239. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0877-4>

Betini, G.S., Wang, X., Fryxell, J.M., 2020. Transgenerational plasticity mediates temperature effects on fitness in the water flea *Daphnia magna*. *Can. J. Zool.* 98, 661–665. <https://doi.org/10.1139/cjz-2020-0080>

Bighiu, M.A., Gorokhova, E., Carney Almroth, B., Eriksson Wiklund, A.-K., 2017. Metal contamination in harbours impacts life-history traits and metallothionein levels in snails. *PLoS ONE* 12, e0180157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180157>

Chen, S., Nichols, K.M., Poynton, H.C., Sepúlveda, M.S., 2016. MicroRNAs are involved in cadmium tolerance in *Daphnia pulex*. *Aquatic Toxicology* 175, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.023>

Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., Maltby, L., 2015. Gammarids as Reference Species for Freshwater Monitoring, in: Aquatic Ecotoxicology. Elsevier, pp. 253–280. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00011-5>

Ciliberti, A., Chaumot, A., Recoura-Massaquant, R., Chandesris, A., François, A., Coquery, M., Ferréol, M., Geffard, O., 2017. Caged *Gammarus* as biomonitors identifying thresholds of toxic metal bioavailability that affect gammarid densities at the French national scale. *Water Research* 118, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.031>

Coulaud, R., Mouthon, J., Quéau, H., Charles, S., Chaumot, A., 2013. Life-history phenology strongly influences population vulnerability to toxicants: A case study with the mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 1727–1736. <https://doi.org/10.1002/etc.2235>

Dong, D.T., Miranda, A.F., Carve, M., Shen, H., Trestrail, C., Dinh, K.V., Nuggeoda, D., 2020. Population- and sex-specific sensitivity of the marine amphipod *Allorchestetes compressa* to metal exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 206, 111130. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111130>

Donker, M.H., Zonneveld, C., van Straalen, N.M., 1993. Early reproduction and increased reproductive allocation in metal-adapted populations of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Oecologia* 96, 316–323. <https://doi.org/10.1007/BF00317500>

Eraly, D., Hendrickx, F., Backeljau, T., Bervoets, L., Lens, L., 2011. Direct and indirect effects of metal stress on physiology and life history variation in field populations of a lycosid spider. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1489–1497. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.014>

Feckler, A., Thielsch, A., Schwenk, K., Schulz, R., Bundschuh, M., 2012. Differences in the sensitivity among cryptic lineages of the *Gammarus fossarum* complex. *Science of The Total Environment* 439, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.003>

Fisker, K.V., Sørensen, J.G., Damgaard, C., Pedersen, K.L., Holmstrup, M., 2011. Genetic adaptation of earthworms to copper pollution: is adaptation associated with fitness costs in *Dendrobaena octaedra*? *Ecotoxicology* 20, 563–573. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0610-8>

Forrow, D.M., Maltby, L., 2000. Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2100–2106.

Ghemari, C., Ayari, A., Ghribi, F., Nasri-Ammar, K., 2019. Changes in life history characteristics of *Porcellio laevis* (Isopoda: Oniscidea) along a cadmium pollution gradient in Sfax (Central Tunisia). *Biologia* 74, 1475–1487. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00252-9>

Guan, R., Wang, W.-X., 2006. Multigenerational cadmium acclimation and biokinetics in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* 141, 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.036>

Halen, H., Van Bladel, R., Garcia-Navarro, M., 1991. Adsorption du cadmium dans les sols calcaires du Sud-Est de l'Espagne. *Agronomie* 11, 35–44. <https://doi.org/10.1051/agro:19910105>

Hargeby, A., Petersen Jr, R.C., 1988. Effects of low ph and humus on the survivorship, growth and feeding of *Gammarus pulex* (L.) (amphipoda). *Freshwater Biology*.

Hoffmann, A.A., Hercus, M.J., 2000. Environmental Stress as an Evolutionary Force. *BioScience* 50, 217. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2000\)050\[0217:ESAAEF\]2.3.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2000)050[0217:ESAAEF]2.3.CO;2)

IPBES (2019): Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. S. Díaz, J.

Settele, E. S. Brondízio, H. T. Ngo, M. Guèze, J. Agard, A. Arneth, P. Balvanera, K. A. Brauman, S. H. M. Butchart, K. M. A. Chan, L. A. Garibaldi, K. Ichii, J. Liu, S. M. Subramanian, G. F. Midgley, P. Miloslavich, Z. Molnár, D. Obura, A. Pfaff, S. Polasky, A. Purvis, J. Razzaque, B. Reyers, R. Roy Chowdhury, Y. J. Shin, I. J. Visseren-Hamakers, K. J. Willis, and C. N. Zayas (eds.). IPBES secretariat, Bonn, Germany. 56 pages. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3553579>

Jones, D.T., Hopkin, S.P., 1998. Reduced survival and body size in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* from a metal-polluted environment. *Environmental Pollution* 99, 215–223. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(97\)00188-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00188-7)

Jørgensen, C., Enberg, K., Dunlop, E.S., Arlinghaus, R., Boukal, D.S., Brander, K., Ernande, B., Gårdmark, A.G., Johnston, F., Matsumura, S., Pardoe, H., Raab, K., Silva, A., Vainikka, A., Dieckmann, U., Heino, M., Rijnsdorp, A.D., 2007. Ecology: Managing Evolving Fish Stocks. *Science* 318, 1247–1248. <https://doi.org/10.1126/science.1148089>

Kadiene, E.U., Meng, P.-J., Hwang, J.-S., Souissi, S., 2019. Acute and chronic toxicity of cadmium on the copepod *Pseudodiaptomus annandalei*: A life history traits approach. *Chemosphere* 233, 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.220>

Kenig, B., Stamenković-Radak, M., Anđelković, M., 2013. Population specific fitness response of *Drosophila subobscura* to lead pollution: Effect of lead on fitness in *Drosophila*. *Insect Science* 20, 245–253. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01501.x>

Kestrup, Å., Ricciardi, A., 2010. Influence of conductivity on life history traits of exotic and native amphipods in the St. Lawrence River. *Environmental Pollution* 176, 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.01.024>

Kimberly, D.A., Salice, C.J., 2015. Multigenerational contaminant exposures produce non-monotonic, transgenerational responses in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* 207, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.09.020>

Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A., 2010. *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests, in: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 205, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer New York, New York, NY, pp. 1–76. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5623-1_1

Lebrun, J.D., Perret, M., Uher, E., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.04.011>

Macneil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., 2007. The trophic ecology of freshwater *gammarus* spp. (crustacea:amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews* 72, 349–364. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1997.tb00017.x>

Maltby, L., 1991. Pollution as a Probe of Life-History Adaptation in *Asellus aquaticus* (Isopoda). *Oikos* 61, 11. <https://doi.org/10.2307/3545402>

Maltby, L., Crane, M., 1994. Responses of *Gammarus pulex* (amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution* 84, 45–52. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(94\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0269-7491(94)90069-8)

Martins, C., Jesus, F.T., Nogueira, A.J.A., 2017. The effects of Copper and Zinc on survival, growth and reproduction of the cladoceran *Daphnia longispina*: introducing new data in an “old” issue. *Ecotoxicology* 26, 1157–1169. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1841-0>

Mažuran, N., Hršak, V., Kovačević, G., 2022. Fitness recovery and two-generation phenotypic plasticity in the freshwater snail *Planorbarius corneus* L. exposed to hyperosmotic solutions. *Period Biol* 124, 29–40. <https://doi.org/10.18054/pb.v124i1-2.11623>

Medina, M.H., Correa, J.A., Barata, C., 2007. Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 67, 2105–2114. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.024>

Muysen, B.T.A., Janssen, C.R., 2001. Multigeneration zinc acclimation and tolerance in *Daphnia magna*: Implications for water-quality guidelines and ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 20, 2053–2060. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200926>

Neuparth, T., Costa, F.O., Costa, M.H., 2001. Effects of Temperature and Salinity on Life History of the Marine Amphipod *Gammarus locusta*. Implications for Ecotoxicological Testing.

Osborne, R.K., Gillis, P.L., Prosser, R.S., 2020. Transgenerational Effects of Copper on a Freshwater Gastropod, *Planorbella pilsbryi*. *Freshwater Mollusk Biology and Conservation* 23, 42. <https://doi.org/10.31931/fmbc.v22i2.2020.42-54>

Oziolor, E.M., DeSchamphelaere, K., Lyon, D., Nacci, D., Poynton, H., 2020. Evolutionary Toxicology—An Informational Tool for Chemical Regulation? *Environ Toxicol Chem* 39, 257–268. <https://doi.org/10.1002/etc.4611>

Pane, E.F., McGeer, J.C., Wood, C.M., 2004. Effects of chronic waterborne nickel exposure on two successive generations of *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 23, 1051. <https://doi.org/10.1897/03-208>

Pellet, B., Geffard, O., Lacour, C., Kermaol, 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. *Environ Toxicol Chem* 28, 2434. <https://doi.org/10.1897/09-042.1>

Pike, R.G., Redding, T.E., Schwarz, C.J., 2016. Development and testing of a modified transparent velocity-head rod for stream discharge measurements. *Canadian Water Resources Journal / Revue canadienne des ressources hydriques* 41, 372–384. <https://doi.org/10.1080/07011784.2015.1127776>

Piscart, C., Bollache, L., 2012. Crustacés amphipodes de surface (Gammare de l’eau douce), Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales de France. Association Française de Limnologie (AFL), Thonon-les-Bains.

Pöckl, M., 1992. Effects of temperature, age and body size on moulting and growth in the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. *Freshwater Biol* 27, 211–225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1992.tb00534.x>

Posthuma, L., Van Straalen, N.M., 1993. Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 106, 11–38. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90251-F](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90251-F)

Prato, E., Biantolino, F., Scardicchio, C., 2008. Implications for toxicity tests with amphipod *Gammarus aequicauda*: effects of temperature and salinity on life cycle. *Environmental Technology* 29, 1349–1356. <https://doi.org/10.1080/09593330802379482>

Rollin, M., Coulaud, R., Danger, M., Sohm, B., Flayac, J., Bec, A., Chaumot, A., Geffard, O., Felten, V., 2018. Additive effect of calcium depletion and low resource quality on *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) life history traits. *Environ Sci Pollut Res* 25, 11264–11280. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9390-x>

Romero-Blanco, A., Alonso, Á., 2022. Laboratory versus wild populations: the importance of population origin in aquatic ecotoxicology. *Environ Sci Pollut Res* 29, 22798–22808. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17370-0>

Rukke, N.A., 2002. Effects of low calcium concentrations on two common freshwater crustaceans, *Gammarus lacustris* and *Astacus astacus*: Calcium limitation in crustaceans. *Functional Ecology* 16, 357–366. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2002.00637>.

Sigmund, G., Ågerstrand, M., Antonelli, A., Backhaus, T., Brodin, T., Diamond, M.L., Erdelen, W.R., Evers, D.C., Hofmann, T., Hueffer, T., Lai, A., Torres, J.P.M., Mueller, L., Perrigo, A.L., Rillig, M.C., Schaeffer, A., Scheringer, M., Schirmer, K., Tlili, A., Soehl, A., Triebkorn, R., Vlahos, P., vom Berg, C., Wang, Z., Groh, K.J., 2023. Addressing chemical pollution in biodiversity research. *Global Change Biology* 29, 3240–3255. <https://doi.org/10.1111/gcb.16689>

Stearns, S.C., 1992. *The Evolution of Life Histories*. Oxford Univ. Press.

Urien, N., Lebrun, J.D., Fechner, L.C., Uher, E., François, A., Quéau, H., Coquery, M., Chaumot, A., Geffard, O., 2016. Environmental relevance of laboratory-derived kinetic models to predict trace metal bioaccumulation in gammarids: Field experimentation at a large spatial scale (France). *Water Research* 95, 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.023>

Vigeneron, A., 2015. Capacités d’adaptation des populations naturelles à la contamination des milieux aquatiques: cas d’étude du cadmium chez le crustacé *Gammarus fossarum*. Université de Lyon, Lyon.

Vigeneron, A., Geffard, O., Coquery, M., François, A., Quéau, H., Chaumot, A., 2015. Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a *Gammarus fossarum* population inhabiting a low-level contaminated stream. *Ecotoxicology* 24, 1239–1249. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1491-z>

Wattier, R., Mamos, T., Copilaş-Ciocianu, D., Jelić, M., Ollivier, A., Chaumot, A., Danger, M., Felten, V., Piscart, C., Žganec, K., Rewicz, T., Wysocka, A., Rigaud, T., Grabowski, M., 2020. Continental-scale patterns of hyper-cryptic diversity within the freshwater model taxon *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Sci Rep* 10, 16536. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73739-0>

Vogt, C., Nowak, C., Diogo, J.B., Oetken, M., Schwenk, K., Oehlmann, J., 2007. Multi-generation studies with *Chironomus riparius* – Effects of low tributyltin concentrations on life history parameters and genetic diversity. *Chemosphere* 67, 2192–2200. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.025>

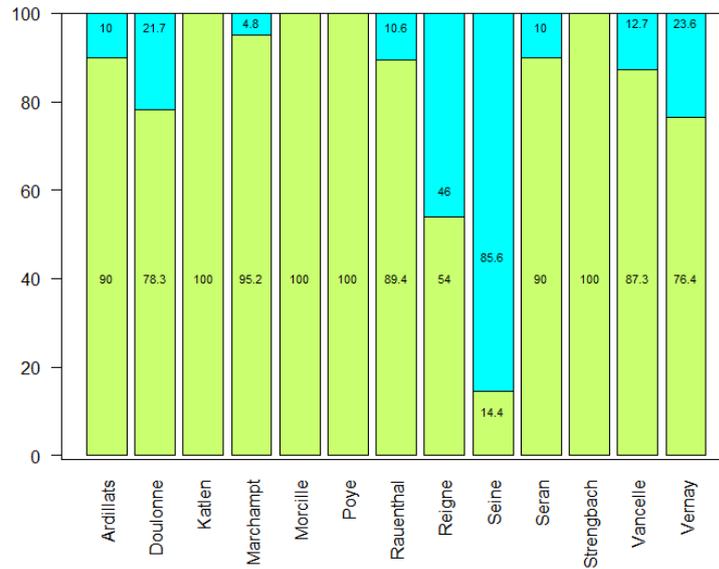
Xie, L., Klerks, P.L., 2004. Fitness cost of resistance to cadmium in the least killifish (*Heterandria formosa*). *Environ Toxicol Chem* 23, 1499. <https://doi.org/10.1897/03-96>

Yang, X., Han, Y., Mu, Y., Yang, P., Gu, W., Zhang, M., 2020. Multigenerational effects of cadmium on the lifespan and fertility of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere* 245, 125533. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125533>

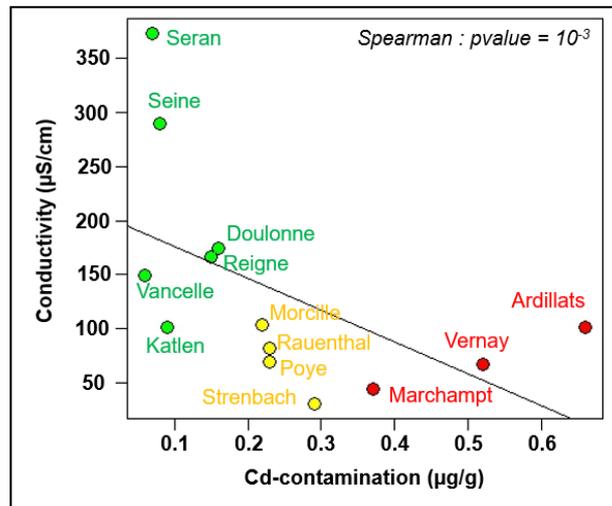
Yu, Z., Zhang, J., Yin, D., 2016. Multigenerational Effects of Heavy Metals on Feeding, Growth, Initial Reproduction and Antioxidants in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 11, e0154529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154529>

Zheng, L., Tan, M., Yan, S., Jiang, D., 2023. Cadmium exposure-triggered growth retardation in *Hyphantria cunea* larvae involves disturbances in food utilization and energy metabolism. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 256, 114886. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114886>

Supplementary materials:



Supplementary Figure 1 : Characterization of the percentage of lotic (green) and lentic (blue) facies in the thirteen study sites.



Supplementary Figure 2 : Spearman-correlation between the conductivity and the status of Cd contamination of each sites.

2.2. Note n°2 : Compléments à la publication n°2

Cette note vient en complément des résultats des distributions de tailles des femelles en reproduction et de la taille maximale des mâles obtenus dans la partie précédente. Les résultats présentés ci-dessous ont été acquis lors des différentes campagnes de prélèvement (entre février 2021 et avril 2022) menées au cours de ces travaux de thèse. Dans l'optique d'étudier la modification des traits d'histoire de vie par rapport à une exposition chronique au Cd chez des populations naturelles, la consommation alimentaire, la fécondité (nombre d'embryons en fonction de la taille des femelles) et la croissance ont été mesurées après prélèvement *in situ*. Les différents protocoles sont détaillés dans le Chapitre II de ce manuscrit.

La Figure III-2 présente la consommation alimentaire chez les mâles adultes obtenus après prélèvement *in situ*. Les résultats montrent une consommation alimentaire significativement inférieure pour la population Ardillats en février 2021 et en avril 2021 comparé à la population Cressonnière (Student-test : p-values < 0.03). Ces résultats seraient en accord avec ceux de Vignerot et al. (2015) où une diminution de la consommation alimentaire lors d'un retour en eau non contaminée a été rapportée chez cette même population vis-à-vis de trois populations de référence. Cependant, nos résultats ne montrent aucune différence entre les populations Ardillats et Sérans (Student-test : p-values > 0.05), ni entre la population Marchamp et les deux populations de référence aux dates testées. Ces résultats viennent donc invalider l'hypothèse que les tailles réduites observées *in situ* dans les populations contaminées sont liées avec une réduction de la prise alimentaire.

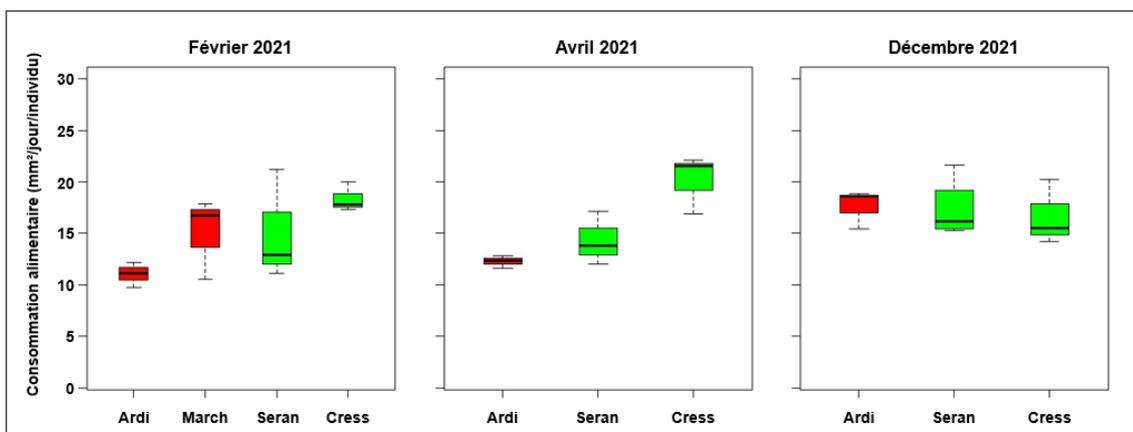


Figure III-2 : Consommation alimentaire chez les mâles après prélèvement *in situ*. Les couleurs rouge et verte correspondent au statut des populations contaminées et non contaminées par le Cd.

La fécondité des femelles prélevées sur les terrains au sein des populations Ardillats, Vernay, Marchampt, Vancelle, Doulonne et Katlen (campagne d'avril 2022) a également été évaluée par le comptage du nombre d'embryons chez des femelles gravides de tailles variées. Les résultats sont présentés dans la Figure III-3. Tout d'abord, on retrouve une relation positive entre la taille et la fécondité pour chacune des populations (ANCOVA : p -value = 2.10^{-16}), comme cela a déjà pu être démontré chez le gammare notamment par Coulaud et al. (2014) et Vignerou (2015). Les résultats obtenus chez les six populations montrent que l'on a un effet significatif de la contamination au Cd de la population d'origine (ANCOVA : p -value = 3.10^{-6}) sur le nombre d'embryons, avec un nombre d'embryons visiblement légèrement plus important chez les populations contaminées pour une même taille individuelle. Ce résultat irait donc dans le sens d'un investissement accru dans l'effort reproductif chez les populations exposées.

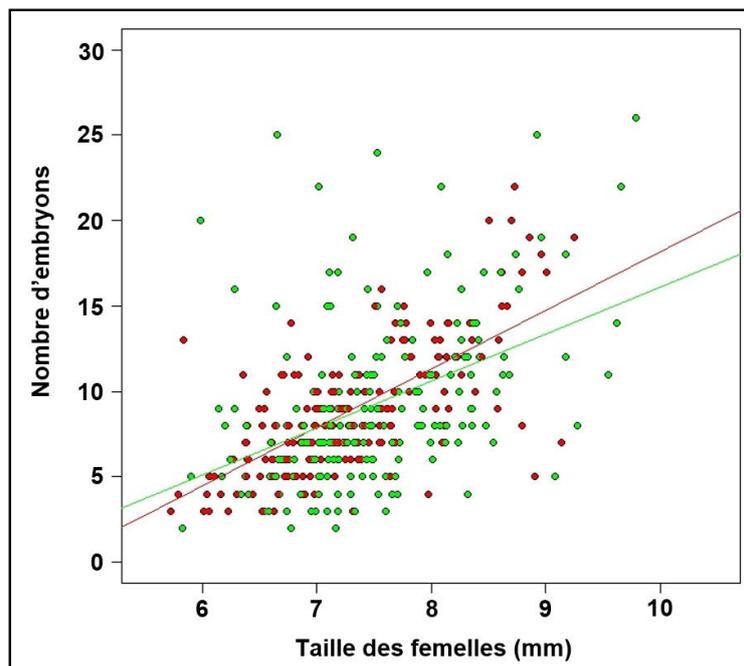


Figure III-3 : Fécondité des femelles prélevées *in situ* lors de la campagne d'avril 2022. Les couleurs rouge et verte correspondent au statut des populations contaminées et non contaminées par le Cd. La droite rouge représente la droite de régression des populations contaminées et la verte celle des populations non contaminées.

Enfin, des résultats ont également été acquis pour la mesure des taux de croissance (Figure III-4). Lors d'un suivi sur 2 mois, on observe une différence significative entre les taux de croissance des jeunes issus des populations contaminées et non contaminées (ANOVA : p -value = 5.10^{-3}). En effet, les gains de croissance sont relativement plus faibles pour les deux populations contaminées par rapport à la population Cressonnière. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus par Coulaud (2012) et Vigneron (2015).

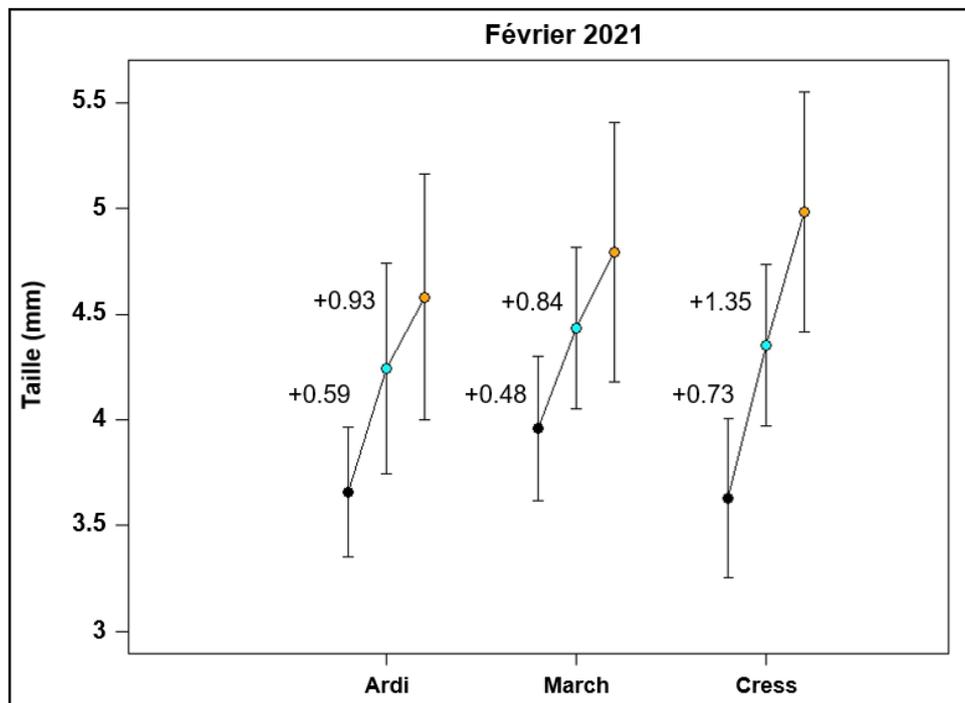


Figure III-4 : Taux de croissance au laboratoire effectué chez des jeunes après le prélèvement des populations Ardillats, Marchampt et Cressonnière de Février 2021. Pour chaque population, le premier point représente la taille moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus à t0, le deuxième point la taille moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus après 1 mois et le troisième point la moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus après 2 mois. Les valeurs correspondent à la moyenne (mm) des croissances individuelles mesurées au cours du test calculées en soustrayant la taille moyenne à t0.

L'étude de la consommation alimentaire, de la fécondité des femelles et du taux de croissance au sein de populations naturelles montrent une certaine variabilité entre les populations d'un même statut de contamination ainsi qu'une divergence des populations contaminées vis-à-vis des populations de référence. On observe notamment une tendance à la diminution des taux de croissance et un inversissement accru dans la reproduction.

2.3. Note n°3 : Variabilité des traits d'histoire de vie après un retour en eau propre au laboratoire

À la suite des résultats obtenus en sortie de terrain chez des populations naturelles vivant dans des milieux contaminés et non contaminés par le Cd, une expérimentation réalisée en octobre 2022 a visé à récolter deux populations contaminées (Ardillats et Vernay) et deux populations non contaminées (Séran et Doulonne), à les garder en eau propre au laboratoire durant 6 mois (common-garden) pour évaluer si l'écart dans les distributions de taille observé sur le terrain en lien avec la contamination cadmique, se maintient quand les populations se développent sans cadmium. 6 mois correspond au temps estimé pour passer du stade nouveau-né à la puberté. Le protocole est détaillé dans le Chapitre II de ce manuscrit. Pour rappel, le lot de départ d'où proviennent les individus testés correspond aux aquariums dans lesquels ont été répartis les adultes fraîchement pêchés au cours de la campagne d'Octobre 2022.

La taille des femelles (femelles correspondant à la première génération d'individus) en reproduction a été mesurée chez trente femelles prises aléatoirement pour chacune des populations (en forçant le tri sur les plus petites) et les résultats sont présentés dans la Figure III-5. Comme en sortie de terrain (voir Publication n°2), on retrouve une taille significativement inférieure chez les femelles des milieux contaminés par rapport aux femelles venant des milieux de référence (Pairwise Wilcoxon-test : $p\text{-values} < 1.10^{-5}$). Ces résultats nous permettant d'exclure l'hypothèse d'un effet toxique direct du Cd qui expliquerait les différences de taille au sein des populations *in situ*, car aucun retour à la normale n'est observé malgré l'absence de la pression toxique. Cependant, les taux de croissance des jeunes provenant de ces quatre populations sont similaires entre eux (ANOVA : $p\text{-value} = 0.52$) (Figure III-6), allant de 0.82 mm pour la population Séran à 1.44 mm pour la population Ardillats. Globalement, ces résultats nous permettent de supposer d'une adaptation de la modification de la distribution des structures de tailles (taille à la puberté, taille médiane et taille maximale atteinte).

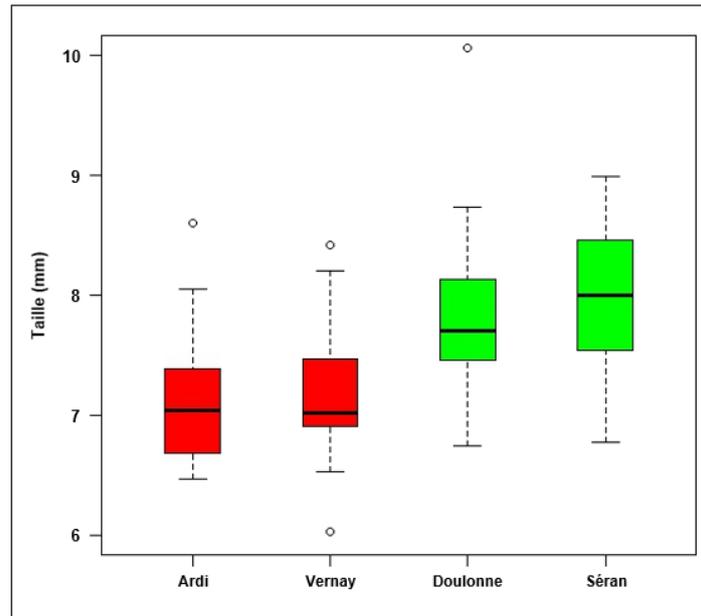


Figure III-5 : Taille des femelles (F1) en reproduction (n = 30) après 6 mois de maintien au laboratoire en condition propre (exempte de Cd). Les couleurs rouge et verte correspondent au statut des populations respectivement contaminé et non contaminé par le Cd

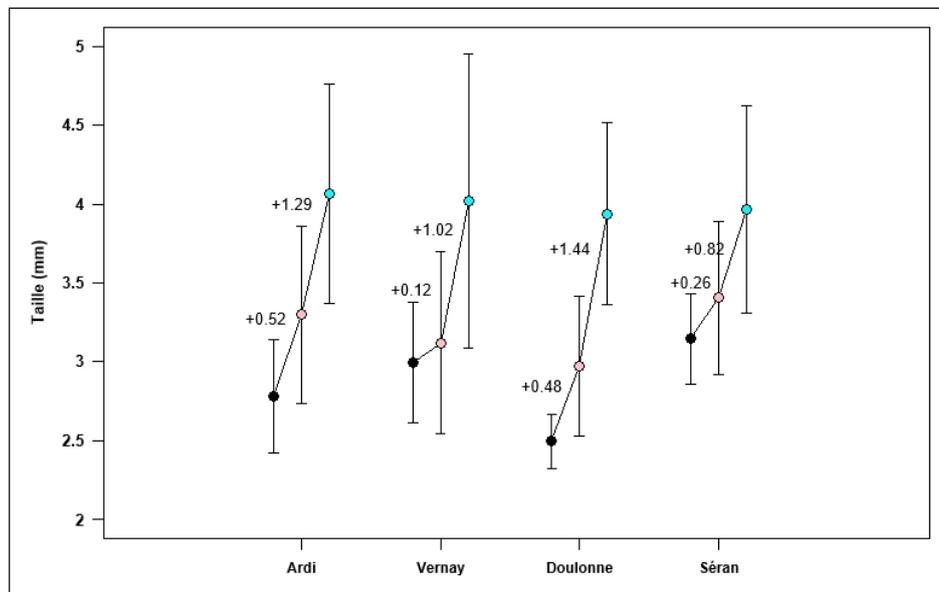


Figure III-6 : Taux de croissance après 6 mois au laboratoire. Pour chaque population, le premier point représente la taille moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus à t_0 , le deuxième point la taille moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus après 15 jours et le troisième point la moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus après 30 jours. Les valeurs correspondent à la moyenne (mm) des croissances individuelles mesurées au cours du test calculées en soustrayant la taille moyenne à t_0 .

2.4. Note n°4 : Etude de l'effet du Cd sur la surface des branchies

Le Cd est un métal lourd qui est toxique pour les organismes aquatiques, notamment dû au fait de son accumulation dans les tissus. Chez les crustacés, l'exposition à des concentrations sublétales de ce métal entraîne des effets délétères sur les fonctions biochimiques, physiologiques et reproductives pouvant affecter la survie à long terme des populations (De Almeida Rodrigues et al., 2022; Frías-Espericueta et al., 2022). De plus, le Cd est associé à la production de ROS, qui provoquent un stress oxydatif produisant divers effets cellulaires négatifs (Unsal et al., 2020). Chez les organismes aquatiques, il est évoqué que les branchies sont une voie d'entrée importante dans l'accumulation des métaux lourds par voie dissoute (Henry et al., 2012; De Almeida Rodrigues et al., 2022; Gestin et al., 2022). En effet, les branchies sont d'importantes zones perméables remplies de canaux ioniques favorables au passage des ions métalliques. Celles-ci ont un rôle essentiel dans les mécanismes physiologiques de régulation ioniques, osmotiques ainsi que dans la balance acide-base et dans l'excrétion de l'ammonium (Nunez-Nogueira et al., 2006; Henry et al., 2012). Les branchies peuvent avoir un rôle de stockage des métaux ou jouer le rôle d'organe de transit pour les métaux avant leur distribution aux autres organes (Henry et al., 2012).

Ainsi, notre étude a voulu examiner la variabilité de la taille des branchies entre des populations naturelles de *G. fossarum* tolérantes au Cd et des populations sensibles dans l'hypothèse où les populations chroniquement exposées auraient des branchies plus petites (en termes de surface) afin de limiter les surfaces d'échanges avec le milieu et ainsi limiter les effets toxiques. Pour cela, cette étude a été conduite sur cinq populations contaminées (Ardillats, Vernay, Marchampt, Rauenthal et Strenbach) et huit populations non contaminées (Cressonnière, Doulonne, Séran, Katlen, Morcille, Poye et Vancelle). Les populations de gammarès ont été prélevées sur le terrain et ramenées au laboratoire en suivant le protocole décrit dans le paragraphe II-3 de ce manuscrit. Le lendemain de la pêche, 10 gammarès mâles ont été récupérés pour chacune des populations. Les paires de branchies n°2, n°3 et n°4 (voir Figure III-7) de chaque gammarès ont été récupérées à l'aide d'une pince sous loupe binoculaire. La surface des branchies a ensuite été mesurée à l'aide du logiciel imageJ. Pour chaque gammarès, la somme des branchies n°2, 3 et 4 d'un seul côté a été considérée. Les données ont été traitées

avec le logiciel R (R Core Team, 2018). Une ANCOVA a été réalisée en prenant en compte la taille des gammares, la condition (contaminée, non contaminée) et l'interaction condition x taille.

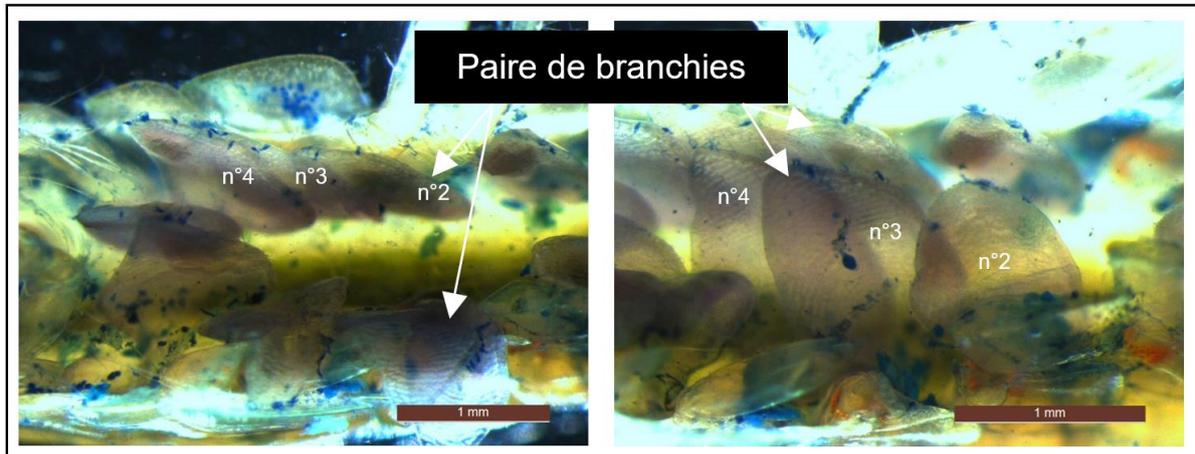


Figure III-7 : Illustration des paires de branchies n°2, n°3 et n°4 chez *G. fossarum* (photos : Nicolas Delorme)

Les résultats de la surface totale d'un seul côté des branchies n°2, 3 et 4 en fonction de la taille des gammares sont présentés dans la Figure III-8. Tout d'abord, on ne retrouve aucun effet de l'interaction condition x taille (ANCOVA : p -value = 0.21). Lorsque l'on compare les populations contaminées aux populations non contaminées, on retrouve un effet significatif de la taille (ANCOVA : p -value = 10^{-13}) et de la condition « contamination » (ANCOVA : p -value = $3 \cdot 10^{-4}$) sur la surface des branchies. Ces résultats valident notre hypothèse de départ quant au fait que les gammares des populations contaminées pourraient présenter des surfaces de branchies modifiées par rapport aux populations non contaminées, mais à l'inverse de notre prédiction, celles-ci sont relativement plus grandes que dans les milieux non contaminés. Dans l'étude de Buchwalter and Luoma (2005) réalisée sur différentes espèces d'invertébrés aquatiques, les auteurs ont montré que les taux d'absorptions du Cd ou du Zn n'étaient pas liés aux caractéristiques morphologiques telles que la taille du corps ou la taille des branchies. Dans notre cas, l'observation de l'augmentation de la taille des branchies dans les populations tolérantes au Cd pourrait être rapprochée d'une récente étude chez *G. fossarum*, qui a mis en évidence qu'après une exposition au Cd durant 7 jours, les branchies étaient le principal organe

accumulateur (avec des concentrations maximales jusqu'à 3.5 fois plus élevées que celles enregistrées dans les caecum et les intestins). Par la suite, une phase de dépuration de 21 jours a montré une absence d'élimination du Cd dans les tissus des branchies. Donc le patron observé pourrait être interprété comme une augmentation de la capacité de stockage du Cd, éventuellement sous une forme détoxiquée.

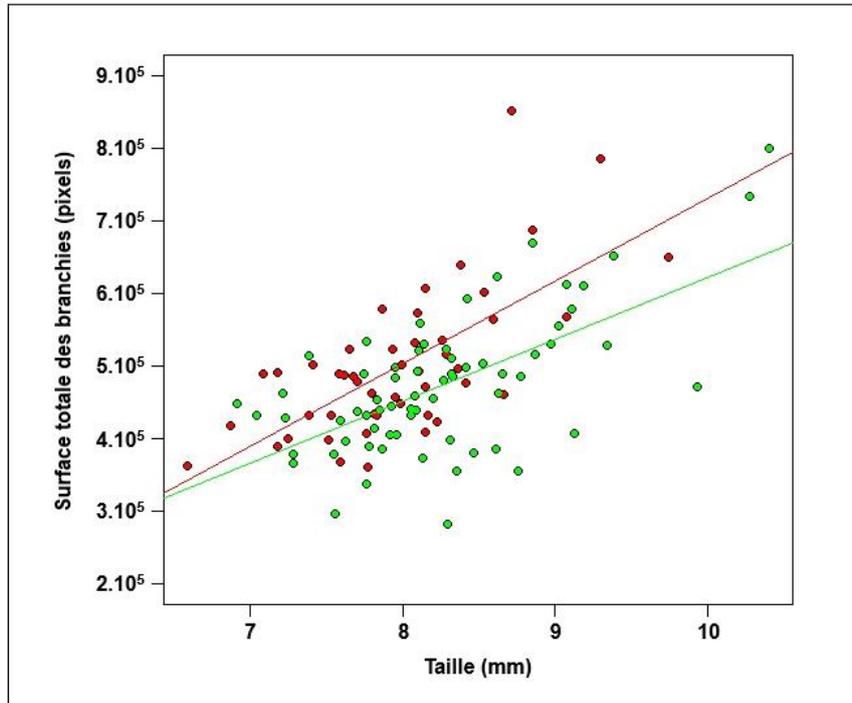


Figure III-8 : Surface totale des branchies (branchies n°2, 3 et 4) en fonction de la taille des gammarus provenant des populations contaminées (rouge) ou non contaminées (vert). La droite rouge représente la droite de régression des populations contaminées et la verte celle des populations non contaminées.

Conclusions du Chapitre III

Dans ce chapitre une approche comparative entre des populations naturelles chroniquement exposées au Cd et des populations naturelles naïves a été mise en œuvre sur une douzaine de populations. De nouvelles situations d'exposition cadmique de populations de *G. fossarum* en contexte naturel ont ainsi pu être identifiées pour permettre une généralisation des résultats antérieurs à nos travaux.

Tout d'abord, la première partie visant à étudier la sensibilité toxicologique chez ces populations à montrer qu'une **tolérance au Cd** modérée était retrouvée dans toutes les populations exposées et ceci pour toutes les classes d'âge. Chez ces populations, la tolérance correspond à une **acclimatation non génétique** reposant sur la plasticité phénotypique puisque celle-ci peut être perdue transitoirement dans les populations de terrain et par les individus lorsqu'ils sont isolés dans de l'eau exempte de Cd au laboratoire. D'autre part, une **transmission non génétique de la tolérance** entre les générations a été confirmée. Cette transmission dépend notamment **d'effets parentaux** qui ne se limitent pas aux effets maternels. En effet, la transmission intergénérationnelle peut se faire par les deux sexes et **dépend de l'exposition parentale à long terme**.

La deuxième partie de ce chapitre a porté sur l'existence potentielle de coûts d'adaptation de la tolérance et sur les altérations du cycle de vie chez ces mêmes populations de gammares tolérantes au Cd. Les résultats ont montré que la contamination chronique au Cd a une influence significative sur les traits d'histoire de vie chez ces populations, conduisant à une **réduction des tailles des organismes**. Une réduction de la taille à la puberté et de la taille maximale atteinte sont symptomatique de cette réduction. Ce patron se retrouve même lors d'un maintien des populations au laboratoire. D'autre part, une tendance a été observée des **taux de croissance** chez ces mêmes populations en sortie de terrain et un investissement accru dans la fonction de reproduction. Ces résultats nous amènent à suggérer une possible adaptation de l'histoire de vie des populations à la pression toxique.

Chapitre IV : Etude de la covariation des niveaux d'expression de la métallothionéine et de la tolérance au cadmium chez des populations naturelles de *G. fossarum*

Ce chapitre est consacré à l'étude de l'expression de la métallothionéine chez les populations naturelles de *G. fossarum* chroniquement exposées au Cd et de sa covariation avec la tolérance au Cd. Il est composé de deux publications (en cours de préparation) et d'une note.

Une première partie méthodologique concerne l'identification de deux métallothionéines dans le transcriptome de *G. fossarum*. Dans cette partie, l'expression de ces deux métallothionéines a été étudiée au niveau individuel dans les branchies et les caeca des gammares.

Dans la deuxième partie, l'hypothèse d'une covariation entre la tolérance au Cd et l'expression des métallothionéines a été testée. Pour cela, l'expression au niveau des branchies et des caeca de la métallothionéine identifiée comme étant spécifique au Cd a été mesurée chez des populations tolérantes et sensibles au Cd, en sortie de terrain et après deux mois au laboratoire. En complément, l'expression de cette métallothionéine a été étudiée dans différents organes (branchies, caeca, ovaires et testicules) chez une population tolérante au Cd et chez une population naïve. Ces résultats sont présentés dans la note n°5.

1. Identification et profil d'expression organise-spécifique de deux métallothionéines chez l'espèce *G. fossarum*

Publication n°3: Identification and organ-specific patterns of expression of two metallothioneins in the sentinel species *Gammarus fossarum*

Davide Degli Esposti^{1,a}, Auréline Lalouette^{1,a}, Karen Gaget², Louveline Lepeule¹, Zineb Chaabi¹, Maxime Leprêtre¹, Anabelle Espeyte¹, Nicolas Delorme¹, Hervé Quéau¹, Laura Garnero¹, Federica Calevro², Arnaud Chaumot¹, Olivier Geffard¹.

^a equal contribution

¹ INRAE, UR RiverLy, Ecotoxicology Team.

² Université Lyon, INRAE, INSA Lyon, BF2i, UMR 203

DOI : 10.1016/j.cbpb.2023.110907

Résumé

La contamination métallique est une préoccupation majeure pour les environnements aquatiques. Dans les milieux d'eau douce, une contamination générale par les éléments traces métalliques a été décrite, de même que leur capacité de bioaccumulation, pouvant entraîner une toxicité et un transfert trophique. Les métallothionéines constituent une famille évolutivement conservée de protéines de faible poids moléculaire, riches en cystéines et chélatrices de métaux, dont les principales fonctions physiologiques sont le maintien de l'homéostasie des métaux essentiels, la détoxification des métaux non essentiels et la protection contre le stress oxydatif et les radicaux libres. Dans cette étude, nous avons identifié deux transcrits codant pour la métallothionéine dans le transcriptome de l'amphipode *Gammarus fossarum*, une espèce sentinelle largement utilisée pour évaluer la qualité des bassins versants. Pour la première fois, nous avons étudié les profils d'expression spécifiques aux organes de ces deux gènes de métallothionéine au niveau individuel dans les branchies et le caeca de crustacé de petite taille (~10 mm). L'analyse *in silico* et l'exposition expérimentale à des concentrations de cadmium, de zinc et d'argent pertinentes pour l'environnement ont montré que l'induction du gène *mt1* de *G. fossarum* est plus forte après l'exposition au Cd qu'aux autres métaux testés. D'autre part, *mt1* a davantage été induit dans le caeca que dans les branchies des organismes exposés, quelle que soit l'exposition aux métaux, tandis que *G. fossarum mt2* est, au moins au niveau individuel,

plus inductible dans les branchies que dans le caeca de *G. fossarum* lors d'une exposition au Cd et au Zn. Nos résultats fournissent de nouvelles ressources moléculaires qui permettront d'améliorer la compréhension de l'homéostasie des métaux chez cette espèce sentinelle.

Abstract

Metal pollution is a major concern for aquatic environments. Widespread contamination by various trace metal ions has been described in freshwater streams as well as their subsequent bioaccumulation, potentially leading to toxicity and trophic transfer. Metallothioneins constitute an evolutionary conserved family of low molecular weight, cysteine-rich, metal-chelating proteins, whose main physiological functions are the maintenance of the homeostasis of essential metals, the detoxification of non-essential metals, and the protection against oxidative stress and free radicals. In this study, we identified two metallothionein-coding transcripts, *mt1* and *mt2*, in the transcriptome of the amphipod *Gammarus fossarum*, a sentinel species widely used to assess the quality of watersheds. For the first time, we investigated the organ-specific patterns of expression of these two mt transcripts at the individual level in the gills and the caeca of this small crustacean. In silico analysis and experimental exposures to environmentally relevant concentrations of cadmium, zinc and silver showed that *G. fossarum mt1* induction is stronger after Cd exposure compared to the other tested metals. *G. fossarum mt1* was more significantly induced in the caeca than in the gills of exposed organisms for any metal exposure, while *G. fossarum mt2* was, at least at the individual level, more inducible in the gills than in the caeca of *G. fossarum* exposed to Cd and Zn. Our results provide new genetic resources that will help to improve the understanding of metal homeostasis in this sentinel species.

1- Introduction

Metal pollution has become a major concern for aquatic environments. Widespread contamination by various metal ions has been described in freshwater streams as well as their subsequent bioaccumulation, potentially leading to high toxicity and trophic transfer (Idrus et al., 2018; Alric et al., 2019; Liu et al., 2021). In particular, some of these metals, such as cadmium, mercury, nickel and lead are considered priority substances to be monitored in Europe (EU, 2000). Others, such as zinc or copper, are considered as essential metals as they are cofactors of several proteins and enzymes, but they may exert toxic effects at high concentrations, notably for aquatic animals (Liu et al., 2021; Prato et al., 2021; Slobodian et al., 2021).

In order to assess the environmental exposure to chemicals and to improve spatial and time comparisons of bioavailable contamination levels, sentinel species, such as the amphipod *Gammarus fossarum*, are increasingly used in active biomonitoring campaigns (Chaumot et al., 2015; Alric et al., 2019; Babut et al., 2020). This freshwater crustacean species is of particular interest for its ability to accumulate efficiently metals (Alric et al., 2019), thus being an organism key to identify the sources and origins of contamination in freshwater ecosystems (Sarkis et al., 2020). Multiplexed targeted mass spectrometry has recently fostered the development of protein biomarkers for *in situ* application in *G. fossarum* (Gouveia et al., 2017, 2019; Faugere et al., 2020; Leprêtre et al., 2022a, 2022b). However, mass spectrometry methods targeting specific protein families, especially small (<10 kDa) polypeptides, are only available for some human proteins (Mehus et al., 2014; Gunn et al., 2021). Moreover, little is still known about the relations between external exposure to a given pollutant and its distribution and molecular effects across different tissues and organs, notably in small invertebrate species. As an example, recent works have characterized the toxicokinetics of Cd and Zn ions in various organs of *G. fossarum* using radioactive isotopes, thus providing a multi-compartment model of Cd bioaccumulation (Gestin et al., 2021). Indeed, there is an increasing interest in identifying specific molecular biomarkers that may provide insights on tissue-specific toxicity (Forcella et al., 2022; Pinto et al., 2022) or specific chemical exposures (Wu et al., 2019; Reinwald et al., 2022).

A number of molecular defence mechanisms, such as oxidative stress response, DNA repair, or metal trafficking, might contribute to the response of living organisms towards metal exposure and toxicity (Amiard et al., 2006; Janssens et al., 2009). Among them, the role of a family of metal-binding proteins, known as metallothioneins, is evolutionarily conserved across the tree of life (Luo et al., 2020). Metallothioneins constitute a heterogeneous superfamily of low molecular weight, cysteine-rich, metal-chelating proteins (Capdevila and Atrian, 2011). Their main physiological functions are the maintenance of the homeostasis of essential metals such as zinc and copper, the detoxification of toxic metals such as cadmium or mercury, and the protection against oxidative stress and free radicals (Capdevila and Atrian, 2011; Isani and Carpenè, 2014). Metal preference is one of the criteria used for MTs classification, leading to the identification of zinc, copper or even cadmium thioneins. Metal-specific gene-induction or metal ion recovery in native protein preparations are some of the strategies used to classify MTs, since identifying the sequence features determining metal specificity is still challenging in this diverse protein family (Capdevila and Atrian, 2011; Luo et al., 2020).

In invertebrates, MTs are often quantified either directly at the transcript level using RT-qPCR, or indirectly by spectrophotometric or size-exclusion chromatography quantification of a partially purified metalloprotein fraction extracted from tissue homogenates (Viarengo et al., 1997; A. Geffard et al., 2010; Cosio et al., 2021; Pereira Righi et al., 2022). In some animals living in aquatic environments characterized by various level of metal contaminations, organisms' size allows direct measures of metal bioaccumulation and the study of metal detoxification mechanisms at the organ level. A recent transcriptomic study in the giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* has shown different expression patterns of several genes involved in the response to Cd exposure in the gills and the hepatopancreas (Liu et al., 2021). In particular, one MT was found more induced in the gills than in the hepatopancreas after 3 hours and 3 days of exposure at 80 µg/L of Cd²⁺ (Liu et al., 2021). Another study in the mangrove crab *Ucides cordatus* provided the response of few different biomarkers (*e.g.* DNA strand breaks, micronucleates cell or metallothioneins) together with lead bioaccumulation in two different population of crabs, showing that environmentally exposed organisms have different bioaccumulation and detoxification capacities, a possible strategy for developing a tolerance to this exposure (Duarte et al., 2020). In other invertebrates, such as the bivalve

Mytilus coruscus, MT content decreases in the gills when the mussels are co-exposed to 0.31 mg/l of Cd and 50 µg/l of benzo(a)pyrene, leading to an increased Cd toxicity (Xu et al., 2021). In oysters, MT concentration and soluble metal concentration are correlated with temporal variations of metal exposures, in contrast to the digestive gland MT concentrations, suggesting the importance of an organ-specific approach to correctly assess the response to metal pollution (Geffard et al., 2002). In smaller invertebrates, such as the daphnids or gammarids, organ dissection is not a common procedure due to their small size, thus leading to a lack of detailed information about metal homeostasis, detoxification or adaptation mechanisms at the organ level for these species (Tang et al., 2015; Chain et al., 2019; Cosio et al., 2021).

In this study, we first identified two *mt* transcripts in the amphipod *Gammarus fossarum* by mining RNA-seq data previously obtained (Cogne et al., 2019) and characterized them by sequence and structure prediction analyses. We also investigated the organ-specific expression patterns of these two *mt* transcripts. To do this, we selected the gills, a major tissue for metal uptake in aquatic invertebrates (Cooper et al., 2010; Gestin et al., 2021), and the caeca, a major detoxification organ in the amphipods (Gismondi et al., 2017). We quantified *mt* expression levels under environmentally relevant concentrations of cadmium, silver and zinc and showed, for the first time in this small crustacean, different metal- and organ-dependent responses.

2- Material and methods

2.1- Transcriptome resources and sequence homology search

Our previously published *G. fossarum de novo* transcriptome assembly (Cogne et al., 2019) served as search database to perform the sequence homology search. A searchable database from the assembly was created using the command-line BLAST function `makeblastdb`. `tblastn` was used to identify homolog sequences to the amphipod *Hyaella atzeca* MTs (HAZT008668, a putative MT-like B; HAZT008669 a putative MT-like C). A search for the Open Reading Frames was performed using the NCBI tool ORFfinder.

2.2- Prediction of 3D structure from MT protein sequences

The 3D structures and the structure-based functional annotation of the two putative metallothionein ORFs identified in *G. fossarum* were predicted using the I-TASSER server (Yang et al., 2015). For each target, I-TASSER simulations generate tens of thousands of conformations (called decoys). To select the final models, I-TASSER uses the SPICKER program to cluster all the decoys based on the pair-wise structure similarity, and report up to five models that correspond to the five states of lowest free energy and therefore have the highest confidence. The confidence of each model is quantitatively measured by C-score. C-score is typically in the range of [-5, 2], where a C-score of a higher value signifies a model with a higher confidence. Ligand binding sites were predicted using the COFACTOR and COACH software (Yang et al., 2013; Zhang et al., 2017).

2.3- Sampling and maintenance of organisms and laboratory exposure to metal ions

Gammarids were collected from the River Le Pollon in France (45°57'25.8"N 5°15'43.6"E) and acclimatized to laboratory conditions as previously described (Leprêtre et al., 2023). Male gammarids were sorted two days before the beginning of the exposure and acclimatized in 50% Evian water and 50% drilled groundwater. Organisms were retrieved from a previous experiment described in detail in Leprêtre et al. (2023). Briefly, gammarids were exposed to equivalent ion concentrations of 0.6 or 5.4 µg/L of Cd (as CdCl₂), to 6.6 or 60 µg/L of Zn (as ZnSO₄) or to 0.066 or 0.6 µg/L of Ag (as AgNO₃) dissolved in Evian water. Both experimental concentrations of these metals are environmentally relevant. The highest concentrations did not induce mortality, while they affected the feeding behaviour of gammarids, an ecotoxicological relevant end-point (Leprêtre et al 2023). For each condition, twenty calibrated male gammarids were then placed in 500 ml plastic beakers (10 gammarids per beakers, 2 beakers per condition). Control organisms were kept in Evian water. Organisms were fed *ad libitum* with conditioned alder leaves (*Alnus glutinosa*). Renewal of exposure media was performed daily. After 8 days of exposure, five organisms per group were dissected and the gills and the caeca were individually collected for each organism as described in Gestin et al. (2021). Organs were flash-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until RNA extraction.

2.4- RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative PCR

RNA was extracted from each organ sample using the RNeasy fibrous tissues kit (Qiagen, Hilden, Germany) and quality and quantity were assessed by spectrophotometry using NanodropOne (Thermofisher, Waltham, MA, USA). RNAs (about 100 ng per sample) were retro-transcribed using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Specific primers were designed using the NCBI web tool Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Table 1). Diluted cDNAs (1:5) were amplified using the OneGreen sybr green mix (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) in a Bio-Rad CFX96 qPCR platform (Hercules, CA, USA) using the following conditions: 95°C for 3 minutes followed by 40 cycles at 95°C for 10 seconds, 61°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds. Melting curves were also established with a 0.5°C of resolution to evaluate the PCR specificity. MTs were quantified using the relative quantification method (ΔC_t) using the elongation factor (EF) transcript to normalize gene expression across samples (Gouveia et al., 2018).

Table 1 : Identification of two metallothioneins in the amphipod *G. fossarum*

IDs	Coding DNA Sequence	Open Reading Frame (ORF)	Primers qPCR
GFBF_DN110944_c4_g1_i2 putative MT-1	ATGCCTAACGACTGCTGCAAAG AGGACTGCAAATGCACCGCCG AGGAATGCGGGAAGGACTGCG GCTGCACGGACTGCGACTGCC AGAAGTGCAGAAATTGCAAGG GCAGCTGCGACTGCTCCTCTGT TGACGCCTGCGCTACCAACTG CGACACGCCATGCAGCTGCTG CCCTACGGAGTAG	>MPNDCKEDCKCTAEE CGKDCGCTDCDCQKCE NCKGSCDCSSVDACATN CDTPCSCCPT	Forward: AACGACTGCTGCAAA GAGGA Reverse : CAGTGCCTTGCAA TTCTC
GFBF_DN110487_c1_g1_i4 putative MT-2	ATGCCTAAGACTTGCTGTAAAG AGTCCTGCAAGTGCGCCGCCG CCAAGTGCAGGGAAGGAATGTG CCTGCACAGACTGCGACTGCC AGAAGTGCAGCAAATGTGATGG CGCCTGCCCTGCTCCACCAG CCAAGACTGCGCTACCAAGTCA AAGATCCCTGCCCTGCTGCC CC	>MPKTCKESCKCAA CGKECACTDCDCQKCD KCDGACPCSTSQDCATK CKDPCPCPATDTPKTP DTKAP	Forward: AAGTGCAGCAAATGT GATGG Reverse : CACTTGGTAGCGCAG TCTTG

3- Results and Discussion

3.1- Identification of two metallothioneins in *Gammarus fossarum* transcriptome

We mined the transcriptome of *G. fossarum* by BLASTt using *H. atzeca* MTs sequences (HAZT008668, a putative MT-like B; HATZ008669 a putative MT-like C) as queries. We identified two contigs with partial homology, each one containing several potential open reading frames (ORFs). We screened the various ORFs identified using InterProScan from InterPro database (Blum et al., 2021) and we identified one ORF in each contig predicted as a crustacean metallothionein (Table 1). In particular, the contig GFBBF_DN110944_c4_g1_i2 codes for an ORF of 60 amino acids residues that we named as *mt1*. The contig GFBBF_DN110487_c1_g1_i4 codes for an ORF of 71 amino acids that we named *mt2* (Table 1). These putative *mt* ORFs both contain 18 cysteine residues, similarly to the majority of described MTs in other crustacean, such as decapods or the amphipod *Hyaella atzeca* (Mahmood et al., 2009; Bain et al., 2016; Poynton et al., 2018). Amino acid sequence alignment of the two identified amino acid sequences to other crustacean MTs showed that the positions of the 18 cysteine residues are highly conserved, while the remaining residues (except two proline residues in position 2 and 57 in *G. fossarum* ORFs) did not show strong conservation (Figure 1). Interestingly, *G. fossarum* MT2 shows a longer C-terminus sequence compared to most of the identified MTs, similarly to the MT of the clade F recently identified in *D. melanogaster* (Luo et al., 2020). These characteristics lead the authors to suggest that this MT might be able to bind Zn ions in the *Diptera* (Luo et al., 2020).

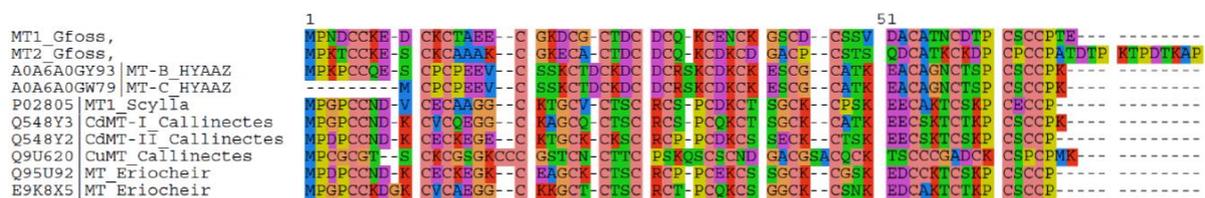


Figure 1 : Sequence alignment of the two putative *Gammarus fossarum* metallothioneins (MT-1_*Gfoss* and MT-2_*Gfoss*) with other crustacean metallothioneins (the amphipod *Hyaella atzeca*; the decapods *Scylla serrata*, *Callinectes sapidus* and *Eriocheir sinensis*).

To better characterize these two putative MTs in *G. fossarum*, we performed a 3D structure prediction using I-TASSER. The best models for MT1 (C-score = -1.59) and MT2 (C-score = -2.49) predicted the presence of a α -helix of six amino acids (including one of the 18 Cys residues, Cys 46) at the C-terminus in each protein (most of the residues having a confidence score higher than 7 with 9 indicating the highest confidence) (Figure 2). I-TASSER also provided a functional prediction based on the 3D models by integrating the COFACTOR and COACH softwares (Yang et al., 2013; Zhang et al., 2017). In both *G. fossarum* MT-1 and MT-2, a cadmium-binding site involving the same four cysteine residues (Cys 40, Cys 46, Cys 50, and Cys 57) was predicted (Figure 2A-B). Moreover, a zinc-binding site was predicted only for MT-2, involving four different cysteine residues located in proximity of the N-terminal (Cys 5, Cys 10, Cys 17, Cys 21) (Figure 2C).

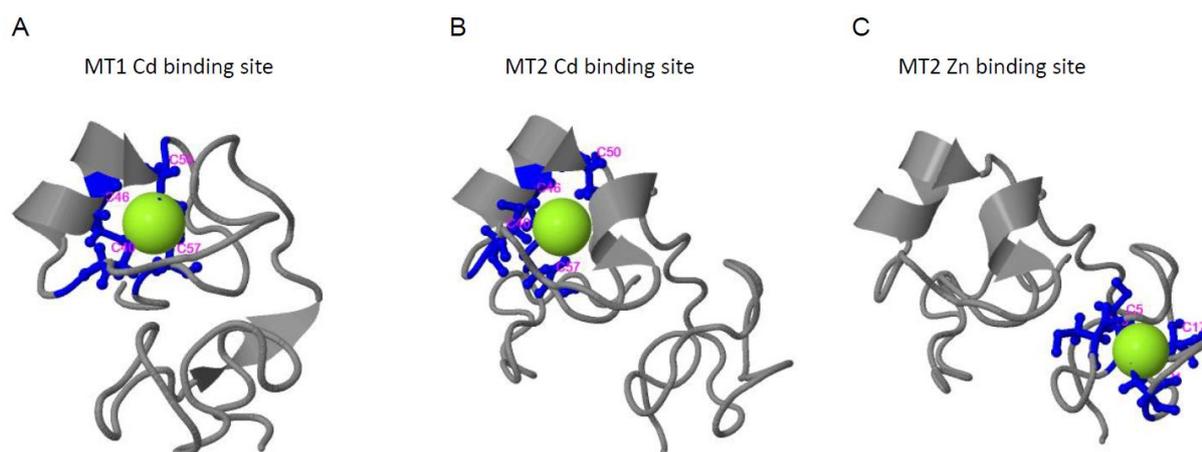


Figure 2 : *Gammarus fossarum* MT-1 and MT-2 predicted 3D structures and ligand predictions. A) MT-1 structure with the predicted Cd binding site. B) MT-2 structure with the predicted Cd binding site. C) MT-2 structure with the predicted Zn binding site.

3.2- Metallothioneins induction in the caeca and gills of *G. fossarum*

While amphipods and other small aquatic invertebrates accumulate and are affected by environmental metal exposure (Filipović Marijić et al., 2016; Alric et al., 2019; Dong et al., 2020), to our knowledge, there is no available information on the expression profiles of amphipod *mt* genes at the organ level in this taxon. Thus, the lack of knowledge about the molecular physiology of these genes and corresponding coded-proteins in organisms used as

sentinel species limits our capacity of use MTs as informative molecular biomarker (Le et al., 2016). For this reason, the expression of these two new putative *G. fossarum mt* genes were measured in the caeca and the gills of calibrated male amphipods in absence of metal exposure. First, we observed that relative expression of *mt1* and *mt2* showed similar basal levels in either caeca or gills in non-exposed organism (p-value = 0.22 and 0.55, respectively, Wilcoxon test) (Supplementary Figure 1; Table 2). *Mt* tissue-specific expression has been studied in other invertebrates, such as decapods and bivalves, thanks to an easier access to the organs in these bigger organism (Mahmood et al., 2009; Liu et al., 2021). Interestingly, in the decapod *Macrobrachium rosenbergii*, basal levels of one MT were higher in the hepatopancreas compared with other organs and no expression was observed in the gills (Mahmood et al., 2009). Similarly, in the white shrimp *Litopenaus vannamei*, a high variability in basal expression in different tissues was observed, with highest level in the heart and hepatopancreas and lowest levels in the hemocytes and the gills (Felix-Portillo et al., 2014). Similar patterns of expression were observed in the bivalve *Mytilus galloprovincialis* exposed to dissolved Cd ion or Cd dots (Rocha et al., 2018). In particular, both the *mt* genes studied, *mt10* and *mt20*, showed similar basal level in the gills and in the digestive gland. Notably, the *mt20* gene was more induced in the gills than in the digestive gland of exposed organisms to both Cd forms (Rocha et al., 2018), indicating organ- specific pattern of *mt* expression. Thus, there is evidence that basal levels of *mt* expression in different organs are likely to be species-specific and the acquisition of knowledge about their organotropism is relevant for an efficient development of molecular biomarkers.

Table 2 : Relative expression of MT-1 and MT-2 in caeca and gills of *G. fossarum* exposed at different level of metal ions.

Group	MT-1						MT-2					
	Caeca			Gills			Caeca			Gills		
	1 st Q	Med.	3 rd Q	1 st Q	Med.	3 rd Q	1 st Q	Med.	3 rd Q	1 st Q	Med.	3 rd Q
Control	0.002	0.007	0.028	0.002	0.005	0.091	0.079	0.082	0.102	0.001	0.002	0.024
Cd 0.6 µg/L	0.656	1.723	5.554	0.043	0.457	0.874	0.081	0.084	0.127	0.001	0.002	0.003
Cd 5.4 µg/L	1.362	4.949	7.767	0.899	1.471	3.961	0.080	0.140	0.285	0.002	0.135	0.320
Zn 6.6 µg/L	0.048	0.071	0.074	0.004	0.007	0.012	0.004	0.007	0.012	0.001	0.022	0.036
Zn 60 µg/L	0.024	0.024	0.683	0.001	0.004	0.005	0.001	0.004	0.005	0.001	0.392	0.610
Ag 0.066 µg/L	0.020	0.033	0.035	0.001	0.001	0.003	0.037	0.073	0.077	0.001	0.002	0.368
Ag 0.6 µg/L	0.007	0.019	0.028	0.001	0.001	0.002	0.087	0.099	0.099	0.002	0.002	0.115

G. fossarum mt1 was generally more significantly induced in the caeca than in the gills of exposed organisms for any metal exposure tested here, albeit high individual variability was observed (Table 2, Figure 3). In the caeca of amphipods exposed to Cd, *mt1* was significantly increased at 5.4 $\mu\text{g/L}$ condition, an environmental relevant condition, and an increasing trend was observed at a concentration as low as 0.6 $\mu\text{g/L}$, (adjusted p-value = 0.014 and 0.06 respectively, Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn's multiple comparison test). Results showed an increased median expression of *mt1* with a log₂ fold change (logFC) of 7.9 and 9.4 in the caeca at 0.6 and 5.4 $\mu\text{g/L}$ compared to the controls, respectively (Table 2, Figure 3B). The increased expression observed in the gills did not reach statistical significance since a high level of individual variability was observed, whereas the observed *mt1* increase corresponded to a logFC of 6.6 and 8.3 at 0.6 and 5.4 $\mu\text{g/L}$ compared to the controls, respectively (Figure 3A). Zinc and Ag exposures induced slightly but non-significantly *mt1* expression in the caeca (logFC ranged from 1.4 to 3.3), while no induction at all was observed in the gills in the same conditions (logFC ranged from -2.8 to 0.58).

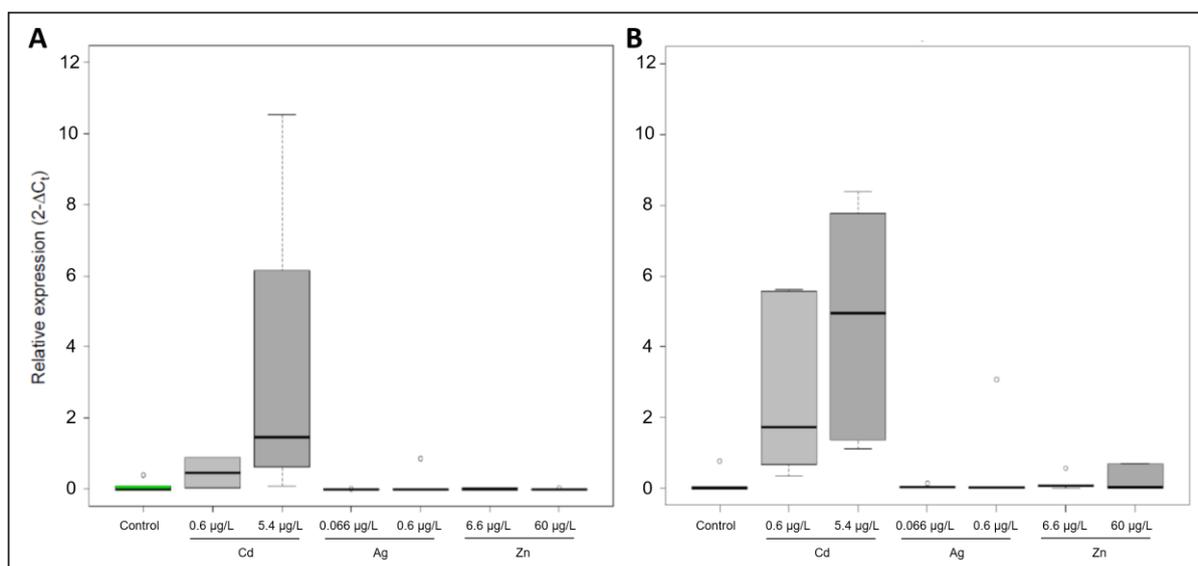


Figure 3 : MT-1 relative expression in *G. fossarum* males exposed to Cd (0.6 or 5.4 $\mu\text{g/L}$), Zn (0.066 or 0.6 $\mu\text{g/L}$) or Ag (6.6 or 60 $\mu\text{g/L}$). Results are presented (A) in gills and in (B) caeca.

G. fossarum mt2 did not show statistically significant differences in any of the tested conditions compared to the controls (Figure 4). However, exposure at the highest Cd concentration induced a slight increase (logFC = 5.8) in *mt2* expression in the gills. Moreover, Zn exposure induced a

higher *mt2* expression at both 6 and 60 $\mu\text{g/L}$ conditions in the gills (Table 2), with a logFC induction of 3.2 and 7.3 respectively, but no induction was observed in the caeca. These results suggest that *mt2* is, at least at the individual level, more inducible in the gills than in the caeca of *G. fossarum* exposed to Cd and Zn.

These results indicate that *G. fossarum mt1* induction is stronger after Cd exposure compared to the other tested metals, while *mt2* expression shows high individual variability and it is not strongly influenced but the metal exposure in our experimental conditions. Indeed, functional annotation based on structure prediction of MT-2 showed it might bind both cadmium and zinc (Figure 2). Our results support the interest of *in vivo* experimental validation in parallel to *in silico* studies, in particular for proteins that exhibit high amino acid sequence divergence, such as those belonging to the MT superfamily. Experimental approaches focusing on the expression at the organ level help to characterize metallothionein metal preference and to elucidate different *mt* genes pattern of expression. Indeed, it would be of great interest to develop specialized mass spectrometry methods to address the direct and specific quantification of MT proteins in sentinel specie, since these methods are currently available only for human MTs (Mehus et al., 2014; Gunn et al., 2021).

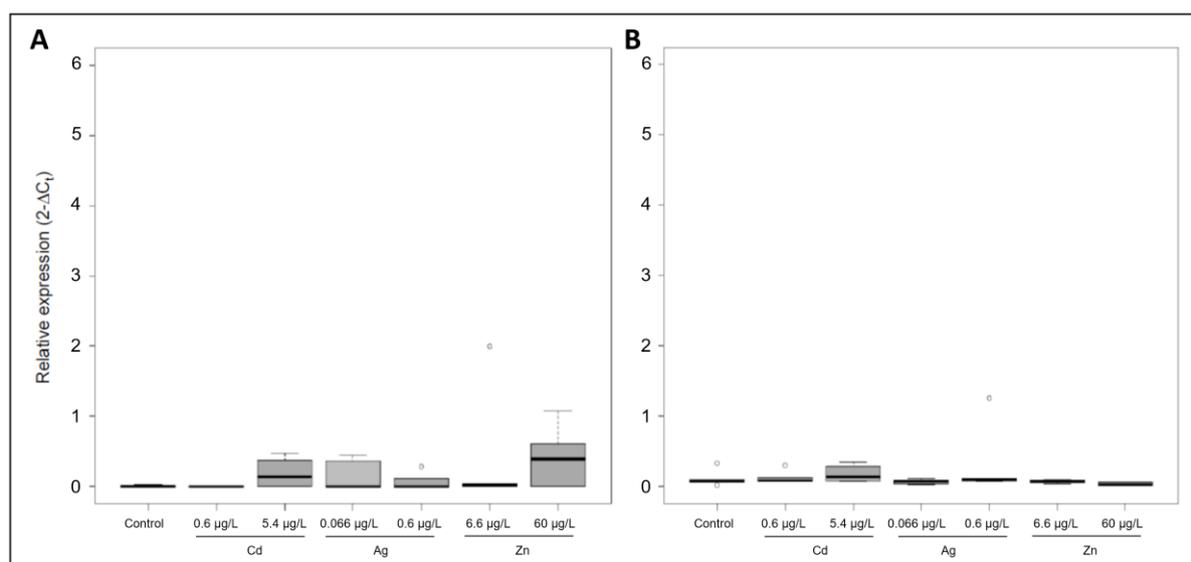


Figure 4 : MT-2 relative expression in *G. fossarum* males exposed to Cd (0.6 or 5.4 $\mu\text{g/L}$), Zn (0.066 or 6.6 $\mu\text{g/L}$) or Ag (6.6 or 60 $\mu\text{g/L}$). Results are presented (A) in gills and in (B) caeca.

4- **Conclusion**

This study identified two metallothionein coding transcripts in the amphipod *G. fossarum*. Our results suggest that *G. fossarum mt1* codes for a Cd-thionein, providing a potential biomarker to investigate the mechanisms of metal detoxification, for example in population of gammarids naturally exposed to Cd (Vigneron et al., 2019; Lalouette et al., 2023). *G. fossarum mt2* was not significantly induced by any metal exposure, although higher variability was observed in the gills under both zinc concentrations and at the highest dose of cadmium. Moreover, our results suggest that metallothionein expression might be regulated by tissue-specific mechanisms that can differ on the base of the metal exposure. The individual variability observed in laboratory conditions opens the question of the individual sensitivity to metal, in particular Cd, exposure. This aspect needs to be considered both for the interest of using MTs as biomarkers of exposure and for investigating the molecular mechanisms of phenotypic plasticity observed in a number of gammarids' population exhibiting tolerance to cadmic environments (Lalouette et al., 2023). Finally, our results suggest an important link between the uneven distribution of metals in different organs and the tissue-specific induction of the different members of *mt* genes (Gestin et al., 2021, 2022). Thus, organ-specific expression patterns of metal-induced genes or proteins will allow a better understanding of metal detoxification mechanisms in sentinel species.

5- **Bibliography**

Alric, B., Geffard, O., Chandris, A., Ferréol, M., François, A., Perceval, O., Piffady, J., Villeneuve, B., Chaumot, A., 2019. Multisubstance Indicators Based on Caged *Gammarus* Bioaccumulation Reveal the Influence of Chemical Contamination on Stream Macroinvertebrate Abundances across France. *Environ. Sci. Technol.* 53, 5906–5915. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01271>

Babut, M., Ferrari, B.J.D., Jame, P., Assoumani, A., Lestremau, F., Hette-Tronquart, N., Miege, C., Perceval, O., 2020. Monitoring priority substances in biota under the Water Framework Directive: how effective is a tiered approach based on caged invertebrates? A proof-of-concept study targeting PFOS in French rivers. *Environmental Sciences Europe* 32, 131. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00416-4>

Bain, P.A., Gregg, A.L., Kumar, A., 2016. De novo assembly and analysis of changes in the protein-coding transcriptome of the freshwater shrimp *Paratya australiensis* (Decapoda: Atyidae) in response to acid sulfate drainage water. *BMC Genomics* 17, 890. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3208-y>

Blum, M., Chang, H.-Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G.A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J.,

Haft, D.H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D.A., Necci, M., Orengo, C.A., Pandurangan, A.P., Rivoire, C., Sigrist, C.J.A., Sillitoe, I., Thanki, N., Thomas, P.D., Tosatto, S.C.E., Wu, C.H., Bateman, A., Finn, R.D., 2021. The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research* 49, D344–D354. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977>

Capdevila, M., Atrian, S., 2011. Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J Biol Inorg Chem* 16, 977–989. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0798-3>

Chain, F.J.J., Finlayson, S., Crease, T., Cristescu, M., 2019. Variation in transcriptional responses to copper exposure across *Daphnia pulex* lineages. *Aquatic Toxicology* 210, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.016>

Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., Maltby, L., 2015. Gammarids as Reference Species for Freshwater Monitoring, in: *Aquatic Ecotoxicology*. Elsevier, pp. 253–280. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00011-5>

Cogne, Y., Degli-Esposti, D., Pible, O., Gouveia, D., François, A., Bouchez, O., Eché, C., Ford, A., Geffard, O., Armengaud, J., Chaumot, A., Almunia, C., 2019. De novo transcriptomes of 14 gammarid individuals for proteogenomic analysis of seven taxonomic groups. *Sci Data* 6, 184. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0192-5>

Cooper, S., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2010. Subcellular partitioning of cadmium in the freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, after separate short-term exposures to waterborne or diet-borne metal. *Aquatic Toxicology* 100, 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.027>

Cosio, C., Degli-Esposti, D., Almunia, C., Gaillet, V., Sartelet, H., Armengaud, J., Chaumot, A., Geffard, O., Geffard, A., 2021. Subcellular Distribution of Dietary Methyl-Mercury in *Gammarus fossarum* and Its Impact on the Amphipod Proteome. *Environ. Sci. Technol.* 55, 10514–10523. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02385>

Dong, D.T., Miranda, A.F., Carve, M., Shen, H., Trestrail, C., Dinh, K.V., Nuggeoda, D., 2020. Population- and sex-specific sensitivity of the marine amphipod *Allorchestes compressa* to metal exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 206, 111130. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111130>

Duarte, L.F.A., Blasco, J., Catharino, M.G.M., Moreira, E.G., Trombini, C., Nobre, C.R., Moreno, B.B., Abessa, D.M. de S., Pereira, C.D.S., 2020. Lead toxicity on a sentinel species subpopulation inhabiting mangroves with different status conservation. *Chemosphere* 251, 126394. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126394>

Faugere, J., Gouveia, D., Ayciriex, S., Chaumot, A., Almunia, C., François, A., Armengaud, J., Lemoine, J., Geffard, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., 2020. High-multiplexed monitoring of protein biomarkers in the sentinel *Gammarus fossarum* by targeted scout-MRM assay, a new vision for ecotoxicoproteomics. *Journal of Proteomics* 226, 103901. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103901>

Felix-Portillo, M., Martinez-Quintana, J.A., Peregrino-Uriarte, A.B., Yepiz-Plascencia, G., 2014. The metallothionein gene from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and expression in response to hypoxia. *Marine Environmental Research* 101, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.09.005>

Filipović Marijić, V., Dragun, Z., Sertić Perić, M., Matonićkin Kepčija, R., Gulinić, V., Velki, M., Ečimović, S., Hackenberger, B.K., Erk, M., 2016. Investigation of the soluble metals in tissue as biological response pattern to environmental pollutants (*Gammarus fossarum* example). *Chemosphere* 154, 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.058>

Forcella, M., Lau, P., Fabbri, M., Fusi, P., Oldani, M., Melchiorretto, P., Gribaldo, L., Urani, C., 2022. Is Cadmium Toxicity Tissue-Specific? Toxicogenomics Studies Reveal Common and Specific Pathways in Pulmonary, Hepatic, and Neuronal Cell Models. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 1768. <https://doi.org/10.3390/ijms23031768>

Geffard, A., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., 2002. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* 7, 123–137. <https://doi.org/10.1080/13547500110091292>

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, 822–829. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.051>

Gestin, O., Lacoue-Labarthe, T., Coquery, M., Delorme, N., Garnero, L., Dherret, L., Ciccia, T., Geffard, O., Lopes, C., 2021. One and multi-compartments toxicokinetic modeling to understand metals' organotropism and fate in *Gammarus fossarum*. *Environment International* 156, 106625. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106625>

Gestin, O., Lopes, C., Delorme, N., Garnero, L., Geffard, O., Lacoue-Labarthe, T., 2022. Organ-specific accumulation of cadmium and zinc in *Gammarus fossarum* exposed to environmentally relevant metal concentrations. *Environmental Pollution* 308, 119625. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119625>

Gismondi, E., Thomé, J.-P., Urien, N., Uher, E., Baiwir, D., Mazzucchelli, G., De Pauw, E., Fechner, L.C., Lebrun, J.D., 2017. Ecotoxicoproteomic assessment of the functional alterations caused by chronic metallic exposures in gammarids. *Environmental Pollution* 225, 428–438. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.006>

Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., Cristobal, S., Sheehan, D., Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., 2019. Ecotoxicoproteomics: A decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. *Journal of Proteomics, 10 Year Anniversary of Proteomics* 198, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.001>

Gouveia, D., Bonneton, F., Almunia, C., Armengaud, J., Quéau, H., Degli-Esposti, D., Geffard, O., Chaumot, A., 2018. Identification, expression, and endocrine-disruption of three ecdysone-responsive genes in the sentinel species *Gammarus fossarum*. *Sci Rep* 8, 3793. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22235-7>

Gouveia, D., Chaumot, A., Charnot, A., Almunia, C., François, A., Navarro, L., Armengaud, J., Salvador, A., Geffard, O., 2017. Ecotoxicoproteomics for Aquatic Environmental Monitoring: First in Situ Application of a New Proteomics-Based Multibiomarker Assay Using Caged Amphipods. *Environ. Sci. Technol.* 51, 13417–13426. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03736>

Gunn, A.P., McLean, C.A., Crouch, P.J., Roberts, B.R., 2021. Quantification of metallothionein-III in brain tissues using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 630, 114326. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114326>

Idrus, F.A., Basri, M.M., Rahim, K.A.A., Rahim, N.S.A., Chong, M.D., 2018. Concentrations of Cadmium, Copper, and Zinc in *Macrobrachium rosenbergii* (Giant Freshwater Prawn) from Natural Environment. *Bull Environ Contam Toxicol* 100, 350–355. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2270-3>

Isani, G., Carpenè, E., 2014. Metallothioneins, Unconventional Proteins from Unconventional Animals: A Long Journey from Nematodes to Mammals. *Biomolecules* 4, 435–457. <https://doi.org/10.3390/biom4020435>

Janssens, T.K.S., Roelofs, D., van Straalen, N.M., 2009. Molecular mechanisms of heavy metal tolerance and evolution in invertebrates. *Insect Science* 16, 3–18. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2009.00249.x>

Lalouette, A., Degli Esposti, D., Garnero, L., Allibert, M., Dherret, L., Dabrin, A., Delorme, N., Recoura-Massaquant, R., Chaumot, A., 2023. Acclimation and transgenerational plasticity support increased cadmium tolerance in *Gammarus* populations exposed to natural metal contamination in headwater streams. *Science of The Total Environment*.

Le, T.T.Y., Zimmermann, S., Sures, B., 2016. How does the metallothionein induction in bivalves meet the criteria for biomarkers of metal exposure? *Environmental Pollution* 212, 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.070>

Leprêtre, M., Chaumot, A., Aboud, R., Delorme, N., Espeyte, A., Salvador, A., Ayciriex, S., Armengaud, J., Coquery, M., Geffard, O., Degli-Esposti, D., 2023. Dynamic Multiple Reaction Monitoring of amphipod *Gammarus fossarum* caeca expands molecular information for understanding the impact of contaminants. *Science of The Total Environment* 893, 164875. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164875>

Leprêtre, M., Geffard, A., Palos Ladeiro, M., Dedourge-Geffard, O., David, E., Delahaut, L., Bonnard, I., Barjhoux, I., Nicolai, M., Noury, P., Espeyte, A., Chaumot, A., Degli-Esposti, D., Geffard, O., Lopes, C., 2022a. Determination of biomarkers threshold values and illustration of their use for the diagnostic in large-scale freshwater biomonitoring surveys. *Environmental Sciences Europe* 34, 115. <https://doi.org/10.1186/s12302-022-00692-2>

Leprêtre, M., Geffard, O., Espeyte, A., Faugere, J., Ayciriex, S., Salvador, A., Delorme, N., Chaumot, A., Degli-Esposti, D., 2022b. Multiple reaction monitoring mass spectrometry for the discovery of environmentally modulated proteins in an aquatic invertebrate sentinel species, *Gammarus fossarum*. *Environmental Pollution* 315, 120393. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120393>

Liu, X., Jiang, H., Ye, B., Qian, H., Guo, Z., Bai, H., Gong, J., Feng, J., Ma, K., 2021. Comparative transcriptome analysis of the gills and hepatopancreas from *Macrobrachium rosenbergii* exposed to the heavy metal Cadmium (Cd²⁺). *Sci Rep* 11, 16140. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95709-w>

Luo, M., Finet, C., Cong, H., Wei, H., Chung, H., 2020. The evolution of insect metallothioneins. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 287.

Mahmood, K., Yang, J.-S., Chen, D., Wang, M., Yang, F., Yang, W.-J., 2009. Response of metallothionein gene-1 to laboratory exposure to heavy metals and thermal stress in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Hazardous Materials* 167, 523–530. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.029>

Mehus, A.A., Muhonen, W.W., Garrett, S.H., Somji, S., Sens, D.A., Shabb, J.B., 2014. Quantitation of Human Metallothionein Isoforms: A Family of Small, Highly Conserved, Cysteine-rich Proteins*. *Molecular & Cellular Proteomics* 13, 1020–1033. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.033373>

Pereira Righi, B.D., Abujamara, L.D., Barcarolli, I.F., Jorge, M.B., Zebal, Y.D., Costa, P.G., dos Reis Martinez, C.B., Bianchini, A., 2022. Response of biomarkers to metals, hydrocarbons and organochlorine pesticides contamination in crabs (*Callinectes ornatus* and *C. bocourti*) from two tropical estuaries (São José and São Marcos bays) of the Maranhão State (northeastern Brazil). *Chemosphere* 288, 132649. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132649>

Pinto, P.I., Anjos, L., Estêvão, M.D., Santos, S., Santa, C., Manadas, B., Monsinjon, T., Canário, A.V.M., Power, D.M., 2022. Proteomics of sea bass skin-scales exposed to the emerging pollutant fluoxetine compared to estradiol. *Science of The Total Environment* 814, 152671. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152671>

Poynton, H.C., Hasenbein, S., Benoit, J.B., Sepulveda, M.S., Poelchau, M.F., Hughes, D.S.T., Murali, S.C., Chen, S., Glastad, K.M., Goodisman, M.A.D., Werren, J.H., Vineis, J.H., Bowen, J.L., Friedrich, M., Jones, J., Robertson, H.M., Feyereisen, R., Mechler-Hickson, A., Mathers, N., Lee, C.E., Colbourne, J.K., Biales, A., Johnston, J.S., Wellborn, G.A., Rosendale, A.J., Cridge, A.G., Munoz-Torres, M.C., Bain, P.A., Manny, A.R., Major, K.M., Lambert, F.N., Vulpe, C.D., Tuck, P., Blalock, B.J., Lin, Y.-Y., Smith, M.E., Ochoa-Acuña, H., Chen, M.-J.M., Childers, C.P., Qu, J., Dugan, S., Lee, S.L., Chao, H., Dinh, H., Han, Y., Doddapaneni, H., Worley, K.C., Muzny, D.M., Gibbs, R.A., Richards, S., 2018. The Toxicogenome of *Hyalella azteca*: A Model for Sediment Ecotoxicology and Evolutionary Toxicology. *Environ. Sci. Technol.* 52, 6009–6022. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00837>

Prato, E., Fabbrocini, A., Libralato, G., Migliore, L., Parlapiano, I., D'Adamo, R., Rotini, A., Manfra, L., Lofrano, G., Carraturo, F., Trifuoggi, M., Biandolino, F., 2021. Comparative toxicity of ionic and nanoparticulate zinc in the species *Cymodoce truncata*, *Gammarus aequicauda* and *Paracentrotus lividus*. *Environ Sci Pollut Res* 28, 42891–42900. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13712-0>

Reinwald, H., Alvincz, J., Salinas, G., Schäfers, C., Hollert, H., Eilebrecht, S., 2022. Toxicogenomic profiling after sublethal exposure to nerve- and muscle-targeting insecticides reveals cardiac and neuronal developmental effects in zebrafish embryos. *Chemosphere* 291, 132746. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132746>

Rocha, T.L., Bilbao, E., Cardoso, C., Soto, M., Bebianno, M.J., 2018. Changes in metallothionein transcription levels in the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to CdTe quantum dots. *Ecotoxicology* 27, 402–410. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1903-y>

Sarkis, N., Geffard, O., Souchon, Y., Chandesris, A., Ferréol, M., Valette, L., Alric, B., François, A., Piffady, J., Chaumot, A., Villeneuve, B., 2020. How to quantify the links between bioavailable contamination in watercourses and pressures of anthropogenic land cover, contamination sources and hydromorphology at multiple scales? *Science of The Total Environment* 735, 139492. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139492>

Slobodian, M.R., Petahtegoose, J.D., Wallis, A.L., Levesque, D.C., Merritt, T.J.S., 2021. The Effects of Essential and Non-Essential Metal Toxicity in the *Drosophila melanogaster* Insect Model: A Review. *Toxics* 9, 269. <https://doi.org/10.3390/toxics9100269>

Tang, S., Wu, Y., Ryan, C.N., Yu, S., Qin, G., Edwards, D.S., Mayer, G.D., 2015. Distinct expression profiles of stress defense and DNA repair genes in *Daphnia pulex* exposed to cadmium, zinc, and quantum dots. *Chemosphere* 120, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.011>

Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research* 44, 69–84. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00103-1)

Vigneron, A., Geffard, O., Quéau, H., François, A., Chaumot, A., 2019. Nongenetic inheritance of increased Cd tolerance in a field *Gammarus fossarum* population: Parental exposure steers offspring sensitivity. *Aquatic Toxicology* 209, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.001>

Wu, D., Liu, Z., Cai, M., Jiao, Y., Li, Y., Chen, Q., Zhao, Y., 2019. Molecular characterisation of cytochrome P450 enzymes in waterflea (*Daphnia pulex*) and their expression regulation by polystyrene nanoplastics. *Aquatic Toxicology* 217, 105350. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105350>

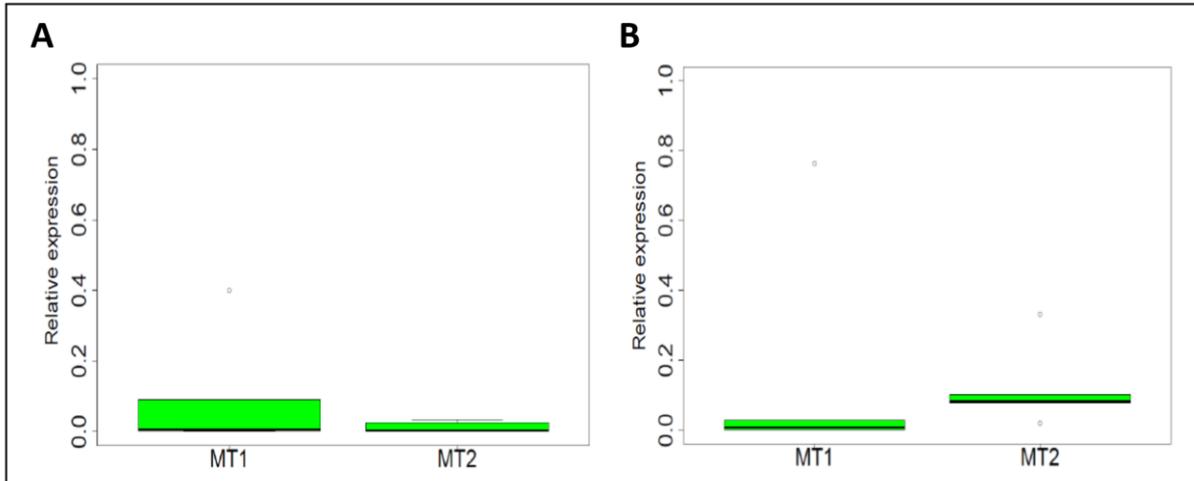
Xu, K., Wang, H., Li, P., 2021. The cadmium toxicity in gills of *Mytilus coruscus* was accentuated by benzo(a)pyrene of higher dose but not lower dose. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 249, 109128. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109128>

Yang, J., Roy, A., Zhang, Y., 2013. Protein–ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics* 29, 2588–2595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt447>

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12, 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>

Zhang, C., Freddolino, P.L., Zhang, Y., 2017. COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein–protein interaction information. *Nucleic Acids Research* 45, W291–W299. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx366>

Supplementary materials



Supplementary Figure 1 : MT-1 and MT-2 relative expression in *G. fossarum* gills (A) and caeca (B).

2. Variabilité intraspécifique de l'expression de la métallothionéine en lien avec l'exposition chronique cadmique des populations

La première partie de ce chapitre nous a permis d'identifier une métallothionéine, *G. fossarum* MT1, répondant spécifiquement au Cd dans les branchies et les caeca des gammares. Ainsi, nous avons fait l'hypothèse d'un potentiel lien entre l'expression de *mt1* et de la tolérance au cadmium. Dans cette deuxième partie, nous avons donc étudié l'expression de *mt1* en sortie de terrain chez un large panel de populations tolérantes et sensibles au Cd. De plus, la covariation des niveaux d'expression de *mt1* et de la tolérance au Cd chez ces populations a été étudiée chez certaines populations lors d'un maintien en eau propre au laboratoire.

2.1. Publication n°4 : Covariation des niveaux d'expression des métallothionéines et de la tolérance au cadmium dans les populations naturelles de *Gammarus fossarum*

Article en cours de préparation

Résumé

Les métallothionéines (MT) sont des protéines de faible poids moléculaire riches en cystéine, notamment impliquées dans la détoxification des métaux non essentiels. Chez les invertébrés aquatiques, les MT ont été identifiées comme pouvant jouer un rôle dans l'adaptation des populations à l'exposition métallique dans des environnements contaminés. Chez différentes populations du crustacé *Gammarus fossarum* naturellement exposées à des sources géochimiques, nous avons précédemment documenté une tolérance accrue au cadmium (Cd) chez les organismes adultes, pouvant être transmise à la descendance par le biais d'effets parentaux. L'objectif de cette étude a été de déterminer s'il existait une possible covariation entre l'expression d'une métallothionéine précédemment identifiée dans le transcriptome de *G. fossarum* (*mt1*) et la tolérance au Cd à différents stades de vie, chez des organismes fraîchement prélevés sur le terrain ou après un maintien en laboratoire dans des conditions exemptes de Cd (6 mois). Pour ce faire, douze populations naturelles de *G. fossarum* provenant

de rivières contaminées et non contaminées par le Cd ont été collectées suite à une caractérisation fine de la biodisponibilité du Cd pour chacun des sites (*via* une méthode de biosurveillance active). Nous avons simultanément évalué la tolérance au Cd (tests de mortalité) et les niveaux d'expression de *G. fossarum mt1* par RT-qPCR dans les branchies et le caeca des mâles adultes et chez les nouveau-nés. Les résultats ont montré, à différentes dates de l'année, une corrélation entre la tolérance au Cd et les niveaux d'expression de *mt1*. Cette covariation a également été confirmée par une diminution parallèle de la tolérance et de l'expression des MT dans les caeca au cours du maintien en eau propre au laboratoire. D'autre part, une transmission de la tolérance à la progéniture non exposée a été confirmée. Il est intéressant de noter qu'alors que des niveaux similaires d'expression de *mt1* ont été observés dans des conditions sans Cd chez les nouveau-nés issus de géniteurs sensibles ou tolérants, nous avons observé une inductibilité plus importante de cette expression chez les nouveau-nés issus de populations tolérantes lors d'une réexposition au Cd en laboratoire. D'autre part, des résultats intermédiaires quant à la tolérance au Cd ou à l'induction du gène *mt1* ont été observés chez les descendants issus d'un seul géniteur tolérant. Ce schéma conduit à une discussion sur les relations entre la plasticité phénotypique observée chez la population tolérante et la dynamique de l'expression des gènes, particulièrement de *G. fossarum mt1*.

1- Introduction

La contamination par les métaux dans les milieux aquatiques est en constante augmentation et représente une contrainte environnementale majeure pour les populations habitant ces écosystèmes. En réponse à la contamination métallique variable de l'environnement, les organismes peuvent présenter une tolérance accrue aux métaux, notamment à travers la mise en place de mécanismes d'acclimatation transgénérationnelle (Morgan et al., 2007; Amiard-Triquet, 2019). Ces changements de sensibilité peuvent être réversibles et se produisent en réponse à des environnements auxquels non seulement les individus ont été confrontés, mais aussi les générations précédentes, par le biais de l'effet parental ou de mécanismes épigénétiques (Uller, 2008; Badyaev and Uller, 2009). La plupart de ces mécanismes impliqueraient des processus physiologiques qui régulent le niveau d'exposition chimique

interne d'un individu, tels que l'absorption, la distribution, le métabolisme et/ou l'excrétion (Ahearn et al., 2004a; Amiard-Triquet, 2019). Bien que de nombreuses informations soient disponibles sur les mécanismes de défense contre les substances toxiques, les mécanismes sous-jacents à l'acquisition et/ou liés à la tolérance ne sont pas encore très bien connus. La régulation transcriptionnelle semble toutefois jouer un rôle important dans l'adaptation des organismes à l'environnement. En ce sens, de plus en plus d'exemples décrivent des réponses transcriptionnelles plastiques en réponse à des modifications de l'environnement (Janssens et al., 2009).

La tolérance à l'exposition métallique peut impliquer les mécanismes de gestion des métaux qui permettent notamment de détoxifier et d'éliminer les métaux incorporés dans l'organisme (Amiard-Triquet, 2019). Parmi ces mécanismes, la superfamille des gènes de la métallothionéine (MT) est l'un des groupes de protéines principalement proposés comme étant impliqués dans l'évolution de la résistance aux métaux (Amiard et al., 2006; Dallinger and Höckner, 2013). Les MT sont des protéines de faible poids moléculaire riches en cystéine qui participent à l'homéostasie des métaux essentiels, à la détoxification des métaux non essentiels et à la protection contre le stress oxydatif (Amiard et al., 2006; Mao et al., 2012). Ces protéines sont hautement conservées au sein de l'arbre phylogénétique des espèces animales et sont considérées comme les principaux agents de défense des invertébrés pour immobiliser les métaux (Ziller and Fraissinet-Tachet, 2018; Duarte et al., 2019). D'autre part, l'implication des MT dans la tolérance aux métaux a été suggérée chez de nombreuses espèces terrestres et aquatiques (comme le montrent les review de Amiard et al., 2006; Morgan et al., 2007; Janssens et al., 2009; Dallinger and Höckner, 2013). En général chez les populations tolérantes, les niveaux de base des MT sont plus élevés et/ou leur capacité d'induction est plus forte que dans les populations naïves de la même espèce. Par exemple, on retrouve des niveaux d'expression de MT plus élevés chez des populations tolérantes de *Chironomus riparius* par rapport à des populations sensibles de la même espèce en sortie de terrain (Pedrosa et al., 2017b). Au contraire, chez *Orchesella cincta* des niveaux similaires entre les populations tolérantes et sensibles ont été retrouvés en sortie de terrain mais avec une capacité d'induction des MT accrue chez les populations tolérantes lors d'une réexposition au métal d'intérêt (Stereborg and Roelofs, 2003). Il semblerait donc qu'il existe une certaine plasticité de la réponse des MT

puisque celles-ci sont régulées à la hausse de manière variée parmi les populations ayant des antécédents différents d'exposition aux métaux. C'est par exemple ce que montre l'étude de Bonneris et al. (2005) chez la moule *Pyganodon grandis* où les concentrations de MT augmentent le long du gradient de contamination métallique des différents sites d'études. L'implication des MT dans la transmission de la tolérance à la descendance n'a été que très peu étudiée, notamment chez les invertébrés. Cependant, le rôle potentiel de la MT dans le transfert de la tolérance aux métaux à la descendance a été suggéré dans certaines études réalisées chez la daphnie (Tsui and Wang, 2005; Guan and Wang, 2006b), les bivalves (Weng and Wang, 2014) ou les poissons (Wu et al., 2008, 2012).

Les espèces du genre *Gammarus* ont fait l'objet de diverses études sur l'acquisition de la tolérance induite par les métaux (par exemple, Stuhlbacher and Maltby, 1992; Khan et al., 2011; Vigneron et al., 2015; Lalouette et al., 2023). Ce sont des espèces clés qui jouent un rôle sentinelle dans un large éventail d'écosystèmes aquatiques. Reconnus depuis longtemps comme des espèces indicatrices de l'environnement, les gammarus sont de bons candidats pour étudier les effets long terme induits par une exposition aux métaux (Kunz et al., 2010; Chaumot et al., 2015). De précédents travaux réalisés au laboratoire sur plusieurs populations de *G. fossarum* vivant dans des rivières naturellement contaminées par des sources géochimiques de cadmium (Cd) ont révélé une tolérance accrue à ce métal dans ces populations. Chez ces populations, la tolérance semble être liée à une acclimatation non génétique, et plus précisément à la plasticité phénotypique puisque celle-ci peut être perdue transitoirement dans les populations et par les individus lorsqu'ils sont isolés dans de l'eau exempte de Cd (Lalouette et al., 2023). D'autre part, la tolérance au Cd est transmissible entre générations par les effets parentaux et semble dépendre de l'exposition parentale à long terme des deux sexes puisque celle-ci peut être transmise par les mères et/ou par les pères (Lalouette et al., 2023). De plus, une récente exploration des ressources transcriptomiques chez *G. fossarum* suivie d'une validation expérimentale par RT-qPCR nous a permis d'identifier deux MT, *mt1* et *mt2*, la première répondant fortement à l'exposition au Cd (en particulier dans les branchies et les caeca des mâles adultes) (voir publication n°3 dans le paragraphe 1 de ce chapitre).

Ainsi, deux objectifs ont été définis : (1) déterminer une possible covariation entre l'expression de *G. fossarum mt1* et la tolérance au Cd à différents stades de vie à partir d'organismes fraîchement collectés sur le terrain ou après avoir été maintenus pendant 2 mois au laboratoire dans des conditions exemptes de Cd et (2) évaluer les effets parentaux sur l'expression de *G. fossarum mt1* chez la progéniture afin d'améliorer notre compréhension de la transmission intergénérationnelle non génétique de la tolérance précédemment décrite dans Vigneron et al. (2019) et Lalouette et al. (2023).

2- Matériel et méthodes

Dans cette partie matériel et méthodes, les protocoles ne sont que brièvement décrits et font référence aux différentes sections présentes dans ce manuscrit de thèse. Un résumé des différentes expérimentations mise en place est présenté dans la Figure 1.

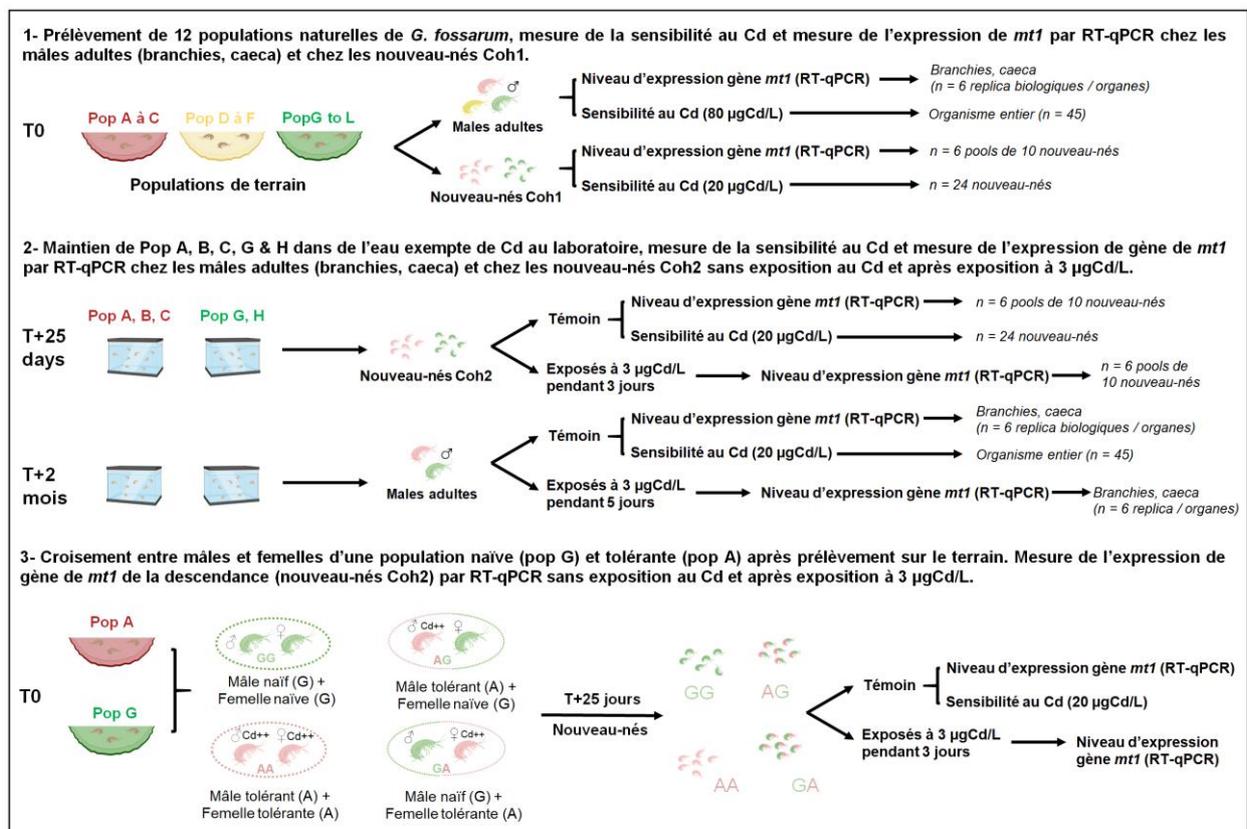


Figure 1 : Résumé des expérimentations mises en place dans le cadre de la publication n°4.

2.1- Prélèvement des populations naturelles et mesures effectuées en sortie de terrain

Le premier objectif de cette étude a été d'étudier les niveaux de base de l'expression de *mt1* chez des populations tolérantes et naïves en sortie de terrain. Pour cela, les populations Ardillats, Vernay, Marchampt (populations contaminées), Strenbach, Rauenthal, Morcille (populations intermédiaires), Séran, Doulonne, Katlen, Reigne, Vancelle et Rombach (populations non contaminées) ont été utilisées. Afin de faciliter la lecture des figures, des lettres ont été attribuées pour chacune des populations comme suit : Ardillats (A), Marchampt (B), Vernay (C), Strenbach (D), Rauenthal (E), Morcille (F), Séran (G), Doulonne (H), Katlen (I), Reigne (J), Vancelle (K) et Rombach (L). Le détail de la localisation des sites est donné dans le Tableau II-1. Le statut de contamination de chaque site (contaminée, intermédiaire et non contaminée) a été déterminé selon la méthode de biosurveillance active (décrite dans le paragraphe II.2.2) et les résultats pour chacun des sites peuvent être retrouvés dans l'Annexe T1. Les populations ont été prélevées selon le même protocole que décrit dans la section II.3.1.

Le lendemain de la pêche et pour chacune des populations, 45 mâles adultes ont été utilisés pour réaliser les tests de sensibilité aiguë au Cd. De plus, les branchies et les caeca de 6 mâles adultes ont été récupérés pour chacune des populations afin de mesurer l'expression de gène de *mt1* en sortie de terrain. Quelques jours après la pêche, les nouveau-nés Coh1 (1^{ère} cohorte de nouveau-nés produits correspondant à un développement d'embryon sur le terrain) ont été récupérés pour mesurer la sensibilité au Cd (n = 24) et l'expression de *mt1* a été mesurée (Figure 1).

2.2- Maintien des populations en eau propre et réexposition au Cd

Afin d'étudier la covariation de la tolérance au Cd et de l'expression de *mt1* (Objectif n°1), les populations Ardillats (A), Marchampt (B), Vernay (C), Séran (G) et Doulonne (H) ont été maintenues au laboratoire pendant 2 mois dans de l'eau exempte de Cd (voir II.3.3 et Figure 1). Après un cycle de reproduction (environ 25 jours), la sensibilité au Cd a été mesurée chez les nouveau-nés Coh2 (c'est-à-dire, ayant passé leur développement embryonnaire au laboratoire). De même, afin d'étudier l'inductibilité de la MT, l'expression de gène de *mt1* a été mesurée

après réexposition au Cd ou non (3 µgCd/L pendant 3 jours). Pour cela et pour chaque population, 120 nouveau-nés ont été récupérés et isolés par pool de 10 nouveau-nés dans des falcons contenant un mélange d'eau d'Evian et d'eau déminée (50/50, conductivité d'environ 300 µs/cm) avec ou sans Cd (3 µgCd/L). Pour chaque condition, 6 falcons ont été considérés et l'exposition s'est déroulée pendant 3 jours. Au bout des 3 jours, les nouveau-nés des deux conditions ont été récupérés, placés dans des tubes eppendorf de 2 mL puis congelés à -80°C.

Chez les mâles adultes maintenus pendant 2 mois au laboratoire dans de l'eau exempte de Cd, la sensibilité au Cd a été mesurée ainsi que l'expression de gène de *mt1* après réexposition au Cd ou non (3 µgCd/L pendant 5 jours) dans les branchies et les caeca. Pour cela et pour chacune des populations, 20 mâles de chaque population ont été récupérés et isolés dans des béciers de 300 mL contenant un mélange d'eau de forage et d'eau déminée (conductivité d'environ 300 µs/cm) avec ou sans Cd (3 µgCd/L). Pour chaque condition, 1 bécier contenant 10 gammares a été considéré et l'exposition s'est déroulée pendant 5 jours. Au terme de l'exposition, les branchies et les caeca de 6 adultes par condition ont été récupérés et placés individuellement dans des tubes eppendorf de 2 mL puis congelés à -80°C.

2.3- Croisement entre population sensible et population tolérante

Le deuxième objectif de cette étude a voulu évaluer les effets parentaux sur l'expression de *mt1* chez la progéniture afin d'améliorer la compréhension de la transmission intergénérationnelle non génétique de la tolérance. Pour cela, un croisement de populations a été réalisé entre la population Séran (sensible) et la population Ardillats (tolérante). Le protocole détaillé peut être retrouvé dans la section II.4.2 et Figure 1. Les nouveau-nés issus de ces croisements ont été récupérés afin de mesurer leur sensibilité au Cd et l'expression du gène *mt1*. L'inductibilité de *mt1* a été étudié à la suite d'une réexposition à 3 µg/L de Cd pendant 3 jours selon le même protocole que décrit précédemment (voir 2.2).

2.4- Test de toxicité aiguë pour l'évaluation de la tolérance au Cd

La tolérance au Cd a été mesurée en sortie de terrain chez les mâles adultes de chacune des populations et après 2 mois au laboratoire (voir II-5). De même, celle-ci a également été mesurée chez la première cohorte de descendants (nouveau-nés nés quelques jours après la pêche des individus adultes) et chez la deuxième cohorte de descendants (c'est-à-dire ayant passé leur développement embryonnaire au laboratoire et en milieu propre) nés des populations de terrains ou des croisements de populations (voir Figure II-6).

2.5- Mesure de l'expression de gène de la métallothionéine *G. fossarum mt1*

L'expression de gène de la métallothionéine (*mt1*) a été mesurée par RT-qPCR selon le même protocole décrit dans le paragraphe II-7. Chez les mâles adultes, 6 réplica biologiques par organe et par population ont été considérés. Pour les nouveau-nés, l'expression de gène de *mt1* a été mesurée à partir de pool de 10 nouveau-nés. Pour chaque mesure, 6 pools de 10 nouveau-nés ont été considérés.

Les métallothionéines sont quantifiées par la méthode de quantification relative (ΔCt) en utilisant la transcription du facteur d'élongation (EF) (gène de référence) pour normaliser l'expression des gènes entre les échantillons. Afin d'obtenir une meilleure visualisation des résultats, ceux-ci ont été transformés en utilisant la fonction racine carrée ($\sqrt{2\Delta Ct}$).

2.6- Tests statistiques

Les données ont été analysées avec le logiciel R (R Core Team, 2018). Pour les données de survie obtenues à partir des tests de sensibilité aiguë, des analyses de survie de type Kaplan-Meier (test du log-rank) avec un niveau de significativité de 5% ont été utilisées. Concernant l'expression de *mt1*, les résultats obtenus ont été analysés en utilisant le test de Wilcoxon (abréviation utilisée : PW) avec correction pour les tests multiples par la méthode de Benjamini-Hochberg (abréviation utilisée : BH).

3- Résultats

3.1- Sensibilité au Cd et niveau basal d'expression du gène *G. fossarum mt1* chez les adultes après prélèvement sur le terrain

La Figure 2 présente les résultats de la distribution des temps de survie individuels obtenus lors des tests de sensibilité aigue au Cd chez les gammarés mâles adultes fraîchement prélevés sur le terrain lors de la campagne d'Avril 2022 dans les douze populations de l'étude.

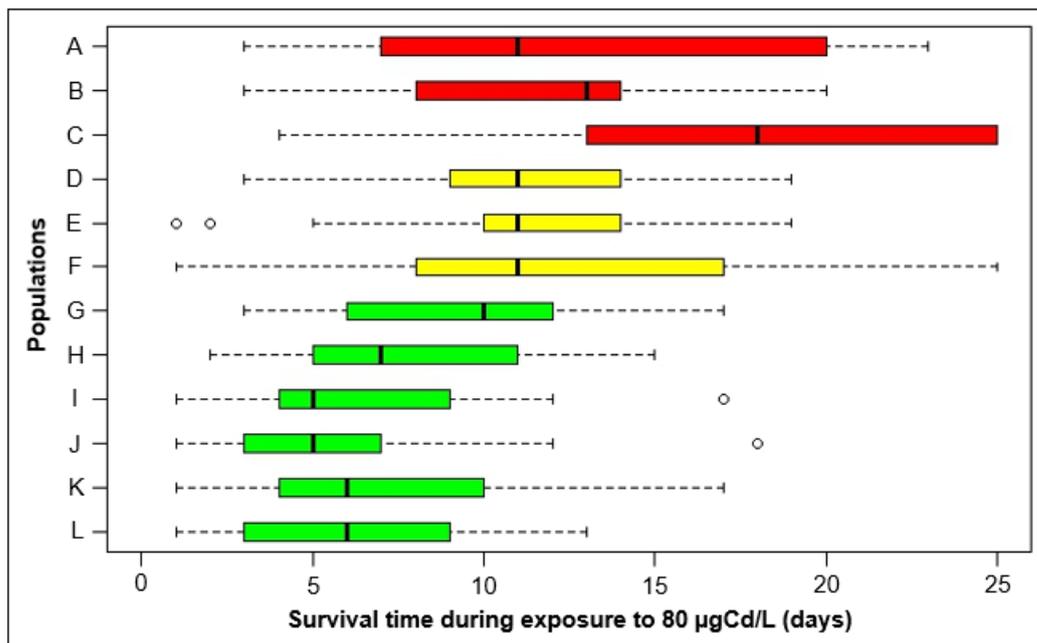


Figure 2 : Tolérance au Cd des douze populations de terrain (Ardillats (A), Marchamp (B), Vernay (C), Strenbach (D), Rauenthal (E), Morcille (F), Séran (G), Doulonne (H), Katlen (I), Reigne (J), Vancelle (K), Rombach (L)) évaluée par la distribution des temps de survie individuels des mâles adultes exposés à 80 µg/L de Cd au laboratoire, un jour après leur collecte sur le terrain (Avril 2022). Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent respectivement au statut contaminé, intermédiaire et non contaminé des populations.

Les populations contaminées A, B et C présentent une tolérance au Cd significativement plus élevée que les populations non contaminées G à L (log-rank test : p -values $< 6.10^{-3}$). En accord avec ce décalage de la distribution des temps de survie, la proportion de gammarés adultes sensibles dans les populations A, B et C est plus faible que celle des six populations non contaminées. Par exemple, moins de 20% des organismes provenant des populations contaminées présentent un temps de survie inférieur ou égal à 6 jours contre 27% pour la

population G et plus de 45% pour les populations H à L (Annexe T12). D'autre part, la proportion des individus les plus tolérants au Cd augmente dans les populations contaminées comme l'illustre le troisième quantile des temps de survie (LT75) qui est de 14, 20 et 25 jours pour les populations A, B et C, respectivement, contre moins de 12 jours pour les populations non contaminées (Annexe T12). Les populations D, E et F qui vivent dans des milieux avec des niveaux intermédiaires d'exposition au Cd présentent des niveaux intermédiaires de tolérance au Cd avec des gammares adultes plus tolérants que les populations non contaminées, sauf pour les populations D et E avec la population G. De plus, les distributions des temps de survie des trois populations intermédiaires ne sont pas différentes de celle des populations A et B mais sont différentes de la population C (log-rank test : p-values < 0.04).

En parallèle, l'expression de *mt1* a été mesurée dans les branchies et les caeca de mâles adultes après prélèvement sur le terrain sur ces mêmes populations. Les résultats montrent que l'expression de *mt1* est plus élevée dans les branchies des organismes provenant des populations contaminées par rapport aux populations non contaminées (PW test : adjusted (BH) p-value = 10^{-9}) (Figure 3). D'autre part, une différence d'expression de *mt1* dans les branchies a été retrouvée entre les populations contaminées et les populations intermédiaires (PW test : adjusted (BH) p-value = 0.03). Comme pour les populations contaminées, les populations intermédiaires présentent des niveaux d'expression de *mt1* plus élevés que celle des populations non contaminées (PW test : adjusted (BH) p-value = 3.10^{-8}) sauf pour les populations E et F avec la population L, ainsi que pour la population D avec les populations H, J et L. De même que pour les branchies, on retrouve des niveaux d'expressions de *mt1* dans les caeca (Figure 3) des organismes provenant des populations contaminées plus élevés que ceux des populations non contaminées (PW test : adjusted (BH) p-value = 10^{-5}). Plus précisément, toutes les populations contaminées présentent une expression de *mt1* dans les caeca supérieure à celle de la population G (PW test : adjusted (BH) p-values < 0.03). L'expression de *mt1* est également supérieure dans les caeca de la population B par rapport aux populations J, K et L (PW test : adjusted (BH) p-value < 0.03), ainsi que pour la population C avec la population L (PW test : adjusted (BH) p-value = 0.03). D'autre part, les niveaux d'expression de *mt1* sont identiques

entre les populations contaminées et intermédiaires (PW test : adjusted (BH) p-value = 0.38), sauf entre la population B et E (PW test : adjusted (BH) p-value = 0.02). De même que pour certaines populations contaminées, la population D présente une expression de *mt1* dans les caeca supérieure à celle des populations G, I, J et L (PW test : adjusted (BH) p-values < 0.02), la population E à celle de la population H (PW test : adjusted (BH) p-value = 0.03), et la population F à celle des populations G et L (PW test : adjusted (BH) p-values = 0.03).

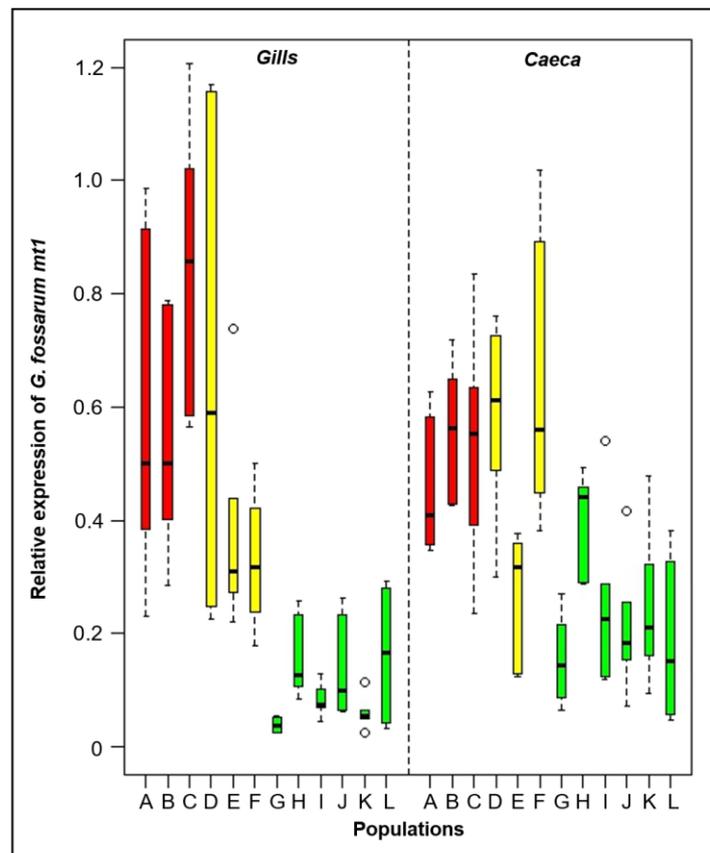


Figure 3 : Expression du gène *G. fossarum mt1* mesurée par RT-qPCR ($\sqrt{2\Delta Ct}$) dans les branchies et les caeca des mâles adultes en sortie de terrain chez douze populations (Ardillats (A), Marchampt (B), Vernay (C), Strenbach (D), Raenthal (E), Morcille (F), Séran (G), Doulonne (H), Katlen (I), Reigne (J), Vancelle (K), Rombach (L)). Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent respectivement au statut contaminé, intermédiaire et non contaminé des populations.

Enfin, ces résultats révèlent une corrélation positive entre le temps de survie médian (LT50) de chaque population et l'expression médiane de *mt1* dans les branchies (Spearman-correlation, $\rho = 0.8$; p-value = 10^{-3} ; Supplementary Figure 1) et les caeca (Spearman-correlation, $\rho = 0.7$; p-value = 9.10^{-3} ; Supplementary Figure 1) des mâles adultes.

3.2- Evolution de la tolérance cadmique et de l'expression du gène *G. fossarum mt1* après maintien des organismes dans de l'eau exempte de Cd au laboratoire

Par la suite nous nous sommes focalisés sur trois populations contaminées (populations A, B, C) et deux populations non contaminées (populations G et H) comme contrôle afin d'étudier si l'expression de *mt1* et la tolérance chez les gammarès mâles adultes varient après avoir été maintenus pendant 2 mois au laboratoire dans de l'eau exempte de Cd. Les résultats des tests de sensibilité sont présentés dans la Figure 4.

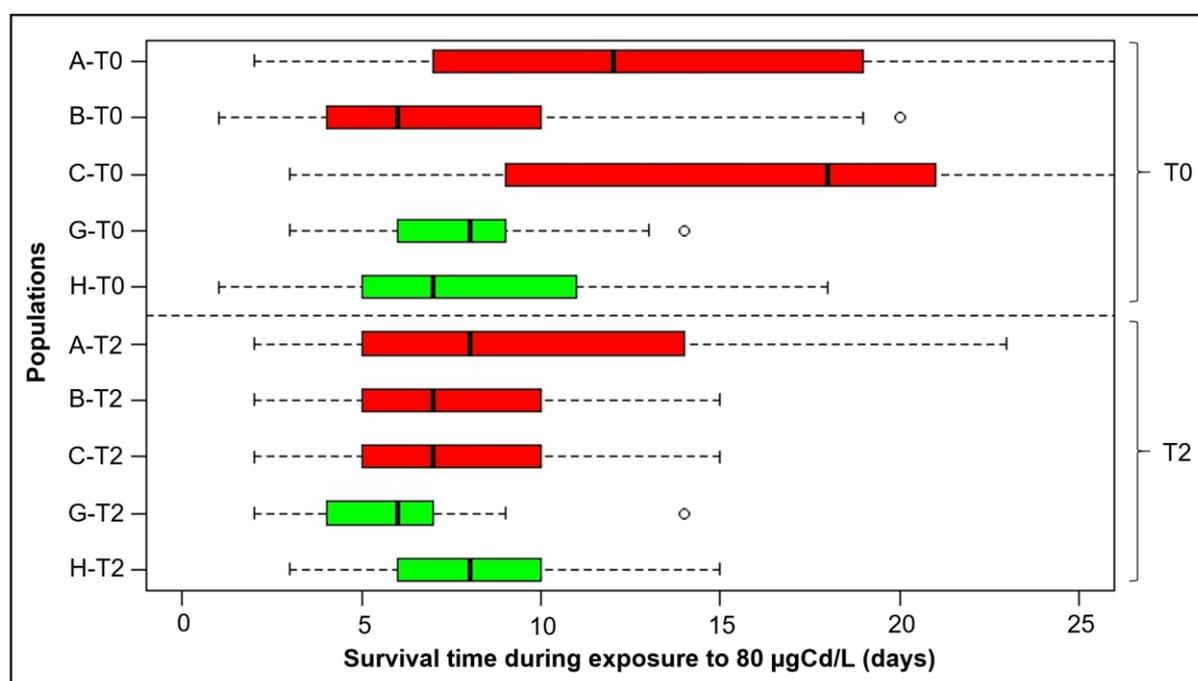


Figure 4 : Evolution de la tolérance au Cd chez les populations de terrain (Ardillats (A), Marchampt (B), Vernay (C), Séran (G), Doulonne (H)) au cours de leur maintien en eau propre au laboratoire (Octobre 2022). Les boxplots représentent la distribution des temps de survie individuels des mâles adultes après prélèvement sur le terrain (T0) et après leur maintien pendant 2 mois en eau propre (T2). Les adultes ont été exposés à 80 µg/L de Cd. Les couleurs rouge et verte correspondent respectivement au statut contaminé et non contaminé des populations.

Lorsque l'on compare les résultats en sortie de terrain et après le maintien dans l'eau sans Cd, on observe une diminution des temps de survie après exposition à 80 µg/L de Cd chez la population A (log-rank test : $p\text{-value} = 6.10^{-3}$) et la population C (log-rank test : $p\text{-value} = 8.10^{-8}$). Pour la population B, aucune tolérance au Cd n'a été observée en sortie de terrain à la date testée. Aucune différence de sensibilité au Cd n'a donc été observée entre B-T0 et B-T2. La

diminution des temps de survie observée chez les organismes des populations A et C indique une perte des niveaux de tolérance individuelle les plus élevés, ainsi qu'une diminution des niveaux les plus faibles jusqu'à la gamme des temps de survie observés dans les populations non contaminées. Par exemple, seuls 16% et 14% des individus A-T0 et C-T0, respectivement, avaient un temps de survie moyen inférieur ou égal à 6 jours en sortie de terrain, contre 40% des A-T2 et 44% des C-T2 après 2 mois au laboratoire (Annexe T5). De même, après 2 mois dans de l'eau exempte de Cd, le temps de survie médian (LT50) a diminué de 12 à 8 jours pour la population A et de 18 à 7 jours pour la population C (Annexe T5).

Les niveaux d'expression de *mt1* dans les branchies et les caeca de mâles adultes en sortie de terrain et après 2 mois passés en eau propre au laboratoire ont été mesurés (Figure 5). On observe une diminution significative de l'expression de *mt1* dans les caeca chez les organismes des populations A et B (Pairwise-Wilcoxon (PW) test : adjusted (BH) p-values < 0.03) et la même tendance, mais non significative pour les organismes de la population C (PW test : adjusted (BH) p-value = 0.58). En revanche, on n'observe pas de modulation d'expression de *mt1* dans les branchies des organismes de ces mêmes populations après 2 mois en eau propre (PW test : adjusted (BH) p-value = 0.99). En ce qui concerne les populations non contaminées, aucune différence d'expression de *mt1* dans les caeca ou dans les branchies est observée au cours du temps (PW test : adjusted (BH) p-value = 0.29 et p-value = 0.77, respectivement).

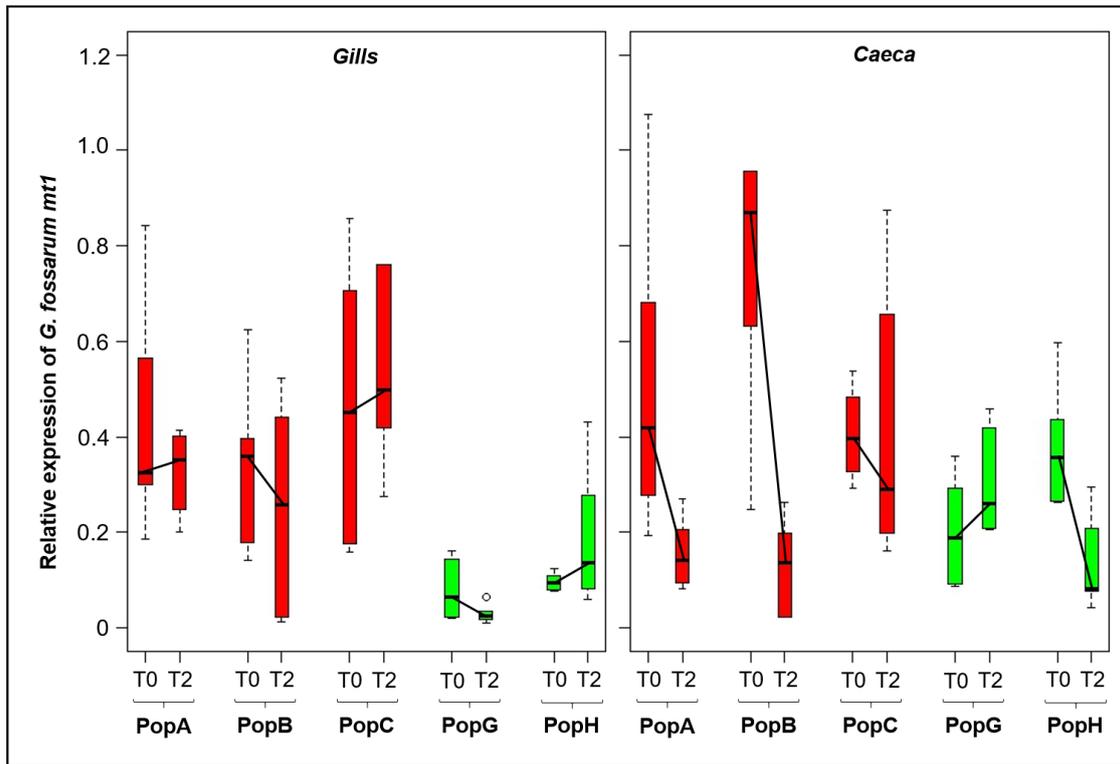


Figure 5 : Expression du gène *G. fossarum mt1* mesurée par RT-qPCR ($\sqrt{2}\Delta Ct$) dans les branchies et les caeca des mâles adultes après prélèvement sur le terrain (T0) et après maintien dans une eau exempt de Cd pendant 2 mois (T2) au laboratoire chez cinq populations de terrain (Ardillats (A), Marchampt (B), Vernay (C), Sérans (G), Doulonne (H)). Les couleurs rouge et verte correspondent respectivement au statut contaminé et non contaminé des populations.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la capacité des organismes à répondre au Cd en induisant l'expression de *mt1*, même après 2 mois au laboratoire et en eau propre. Pour cela, l'expression de *mt1* a été mesurée dans les branchies et les caeca des mâles adultes après un challenge au Cd (3 $\mu\text{gCd/L}$ pendant 5 jours) et les résultats sont présentés dans la Figure 6. On observe par rapport aux populations contrôles, une inductibilité plus élevée (facteur d'inductibilité > 2) de *G. fossarum mt1* dans les branchies des mâles adultes issus des populations contaminées déacclimatées lors d'une réexposition au Cd. Cependant, aucune différence avec les contrôles dans l'expression de *mt1* dans les caeca n'a été observée entre les conditions après l'exposition à 3 $\mu\text{gCd/L}$ pendant 5 jours.

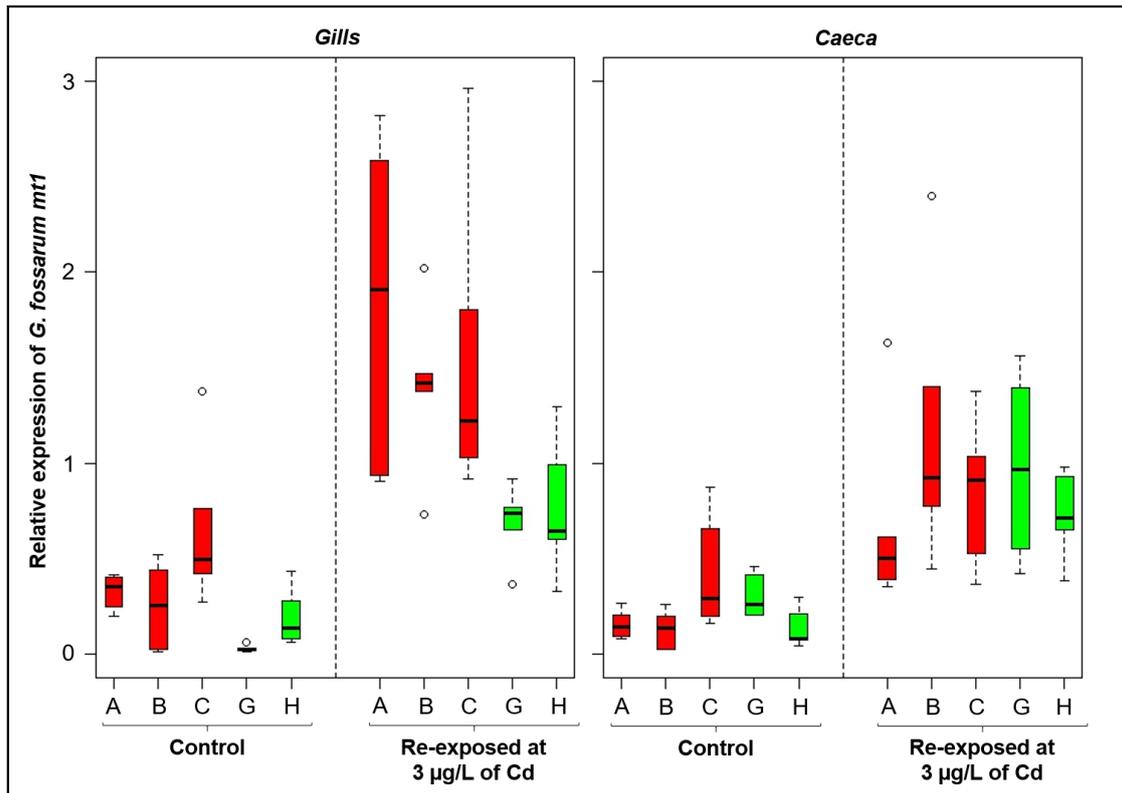


Figure 6 : Expression du gène *G. fossarum mt1* mesurée par RT-qPCR ($\sqrt{2\Delta Ct}$) dans les branchies et les caeca des mâles adultes déacclimatés (Ardillats (A), Marchampt (B), Vernay (C), Séran (G), Doulonne (H)) en condition contrôle et après une exposition à 3 $\mu\text{gCd/L}$ pendant 5 jours). Les couleurs rouge et verte correspondent respectivement au statut contaminé et non contaminé des populations.

3.3- Transmission intergénérationnelle de la tolérance au Cd et de l'expression de gène de *G. fossarum mt1* chez les nouveau-nés

Les résultats présentés dans la Figure 7 montrent comme attendu, les premières cohortes de nouveau-nés nés au laboratoire à partir de géniteurs prélevés dans des populations contaminées (A-Coh1, B-Coh1 et C-Coh1) présentent une tolérance au Cd significativement plus élevée que les premières cohortes issues de géniteurs venant de populations non contaminées (G-Coh1 et H-Coh1) (log-rank test : $p\text{-values} < 1.10^{-3}$). Les nouveau-nés A-Coh1, B-Coh1 et C-Coh1 présentent respectivement une LT_{50} égale à 6, 6 et 5 jours, contre 2 jours pour G-Coh1 et H-Coh1. Plus précisément, le pourcentage de nouveau-nés dont le temps de survie est inférieur ou égal à 3 jours renforce ces observations de tolérance accrue au Cd transmise à la descendance, avec une proportion de 0% pour A-Coh1, 4% pour le C-Coh1 et 21% pour B-Coh1, contre 79% et 75% pour G-Coh1 et H-Coh1 (Annexe T6). On retrouve toujours une tolérance accrue au Cd

dans la seconde cohorte pour les populations contaminées (A-Coh2, B-Coh2 et C-Coh2) (long-rank test : p-values < 0.01).

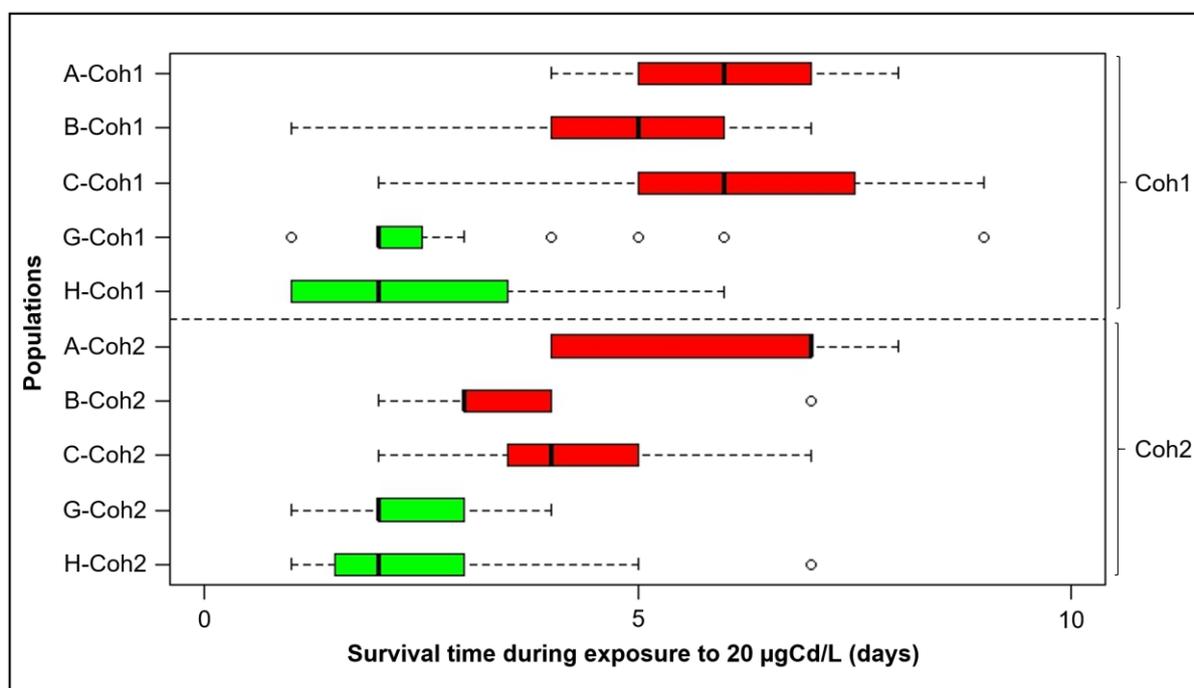


Figure 7 : Tolérance au Cd (distribution des temps de survie individuels pendant l'exposition à 20 µg/L de Cd) chez deux cohortes successives de nouveau-nés produits au laboratoire dans des conditions sans Cd par des géniteurs échantillonnés dans la population A (A-Coh1, A-Coh2), B (B-Coh1, B-Coh2), C (C-Coh1, C-Coh2), G (G-Coh1, G-Coh2) et H (H-Coh1, H-Coh2). Les nouveau-nés ont été exposés individuellement au Cd un jour après leur sortie du marsupium maternel. Les couleurs rouge et verte correspondent respectivement au statut contaminé ou non contaminé des populations dans leur habitat d'origine.

Dans l'idée d'étudier la transmission intergénérationnelle de la tolérance au Cd, nous avons émis l'hypothèse d'une possible transmission de la capacité de surexpression de *mt1* à la descendance. Ainsi, les niveaux d'expression de *mt1* ont été mesurés en eau propre chez les nouveau-nés des deux cohortes (Figure 8-A) et après une courte exposition au Cd (3 µgCd/L pendant 3 jours) chez les nouveau-nés de la deuxième cohorte (Figure 8-B). A la naissance en eau propre (Figure 8-A), aucune différence dans l'expression de *mt1* a été observée entre les populations contaminées et non contaminées de la Coh1 (PW test : adjusted (BH) p-value = 0.33) et de la Coh2 (PW test : adjusted (BH) p-value = 0.72). Toutefois, une plus grande inductibilité a été observée dans l'expression de *mt1* (facteur d'inductibilité > 2) chez les nouveau-nés de la deuxième cohorte née de géniteurs contaminés, après une courte réexposition

au Cd, ce qui conforte l'hypothèse d'un contrôle transcriptionnel de *mt1* à la base de la tolérance au Cd.

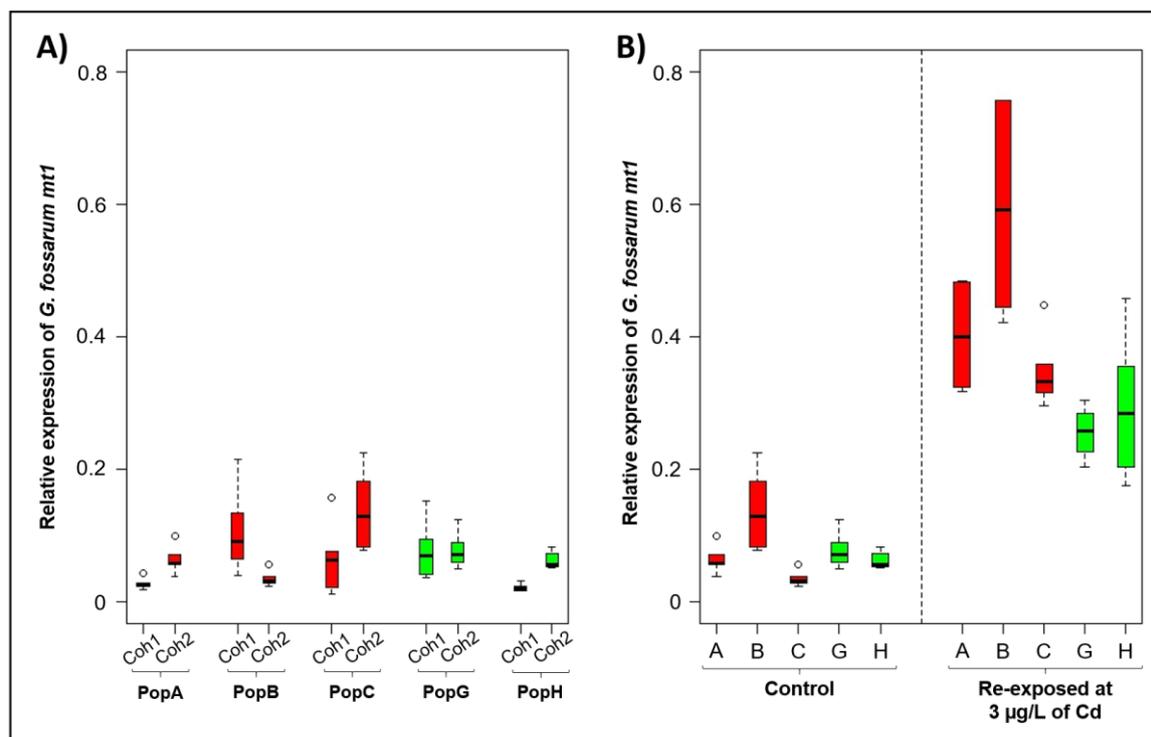


Figure 8 : Expression du gène *G. fossarum mt1* mesurée par RT-qPCR ($\sqrt{2\Delta Ct}$) chez (A) les nouveau-nés de la cohorte 1 (Coh1 ; nés au laboratoire à partir de géniteurs récoltés sur le terrain) et chez les nouveau-nés de la cohorte 2 (Coh2 ; nés après un cycle de reproduction au laboratoire) nés dans de l'eau sans Cd et chez (B) les nouveau-nés Coh2 sans exposition au Cd et après une exposition à 3 µgCd/L pendant 3 jours. Les couleurs rouge et verte correspondent respectivement au statut contaminé ou non contaminé des populations dans leur habitat d'origine.

Enfin, la Figure 9 présente les résultats des tests de sensibilité au Cd effectués sur des nouveau-nés issus du croisement de géniteurs entre une population contaminée (population A) et non contaminée (population G). Les nouveau-nés issus de la population contaminée sont plus tolérants comparés à ceux provenant de la population de référence (log-rank test : p-value = 0.02). Les résultats obtenus pour le croisement révèlent que les nouveau-nés nés d'un père tolérant (condition AG) et d'une mère tolérante (condition GA) présentent une distribution des temps de survie intermédiaire entre les distributions des deux conditions des populations parentales. En effet, la distribution des temps de survie des nouveau-nés AG n'est pas différent

de celle des nouveau-nés GG et AA (log-rank test : p-value = 0.05 et 0.3, respectivement) tandis que les nouveau-nés de la condition GA diffèrent significativement de la condition GG (log-rank test : p-value = 6.10^{-3}).

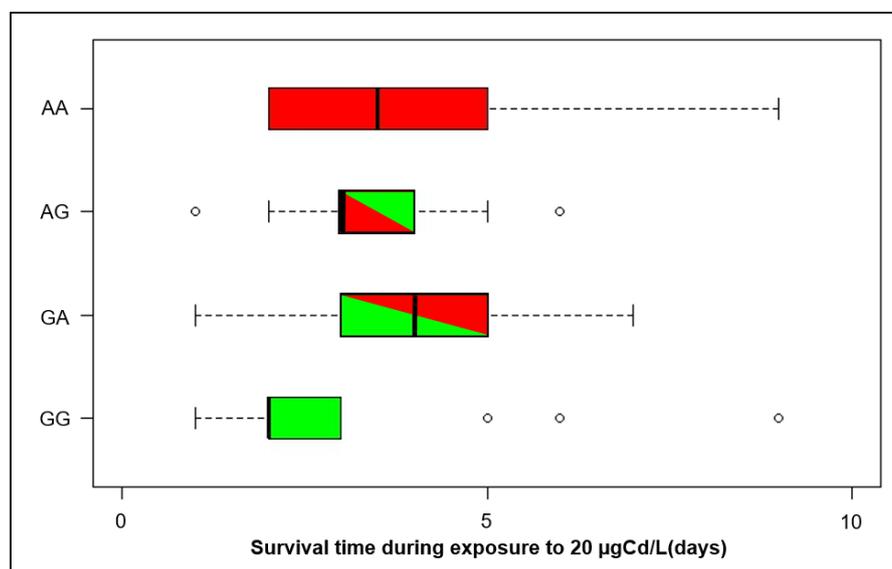


Figure 9 : Croisement entre une population sensible et une population tolérante. La figure présente la tolérance au Cd chez les nouveau-nés (distribution des temps de survie individuels lors d'une exposition à 20 µgCd/L) produits par la population tolérante au Cd (A), naïve (G) et à partir des croisements de populations. Pour la légende des différentes conditions, la première lettre majuscule correspond à la première lettre du nom de la population du mâle et la deuxième lettre majuscule correspond à la première lettre du nom de la population de la femelle (notation ♂/♀ : par exemple, la condition AG correspond au croisement entre un mâle de la population A et une femelle de la population G). Les nouveau-nés ont été exposés à 20 µg/L de Cd en laboratoire un jour après leur libération du marsupium maternel.

Les niveaux d'expression de *mt1* ont été mesurés en condition contrôle et après un challenge à 3 µgCd/L pendant 3 jours (Figure 10). Les résultats ne montrent aucune différence d'expression de *mt1* entre les conditions en milieu propre (Figure 10). Cependant, on retrouve une inductibilité de *mt1* plus élevée chez les nouveau-nés AA, AG et GA dans des conditions d'exposition au Cd par rapport aux nouveau-nés GG (facteur d'inductibilité > 1.5) (Figure 10).

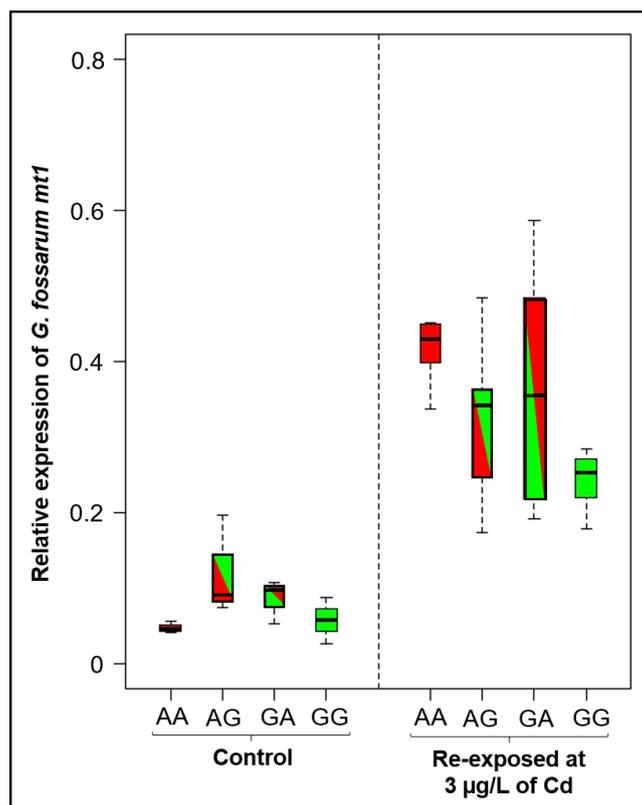


Figure 10 : Expression du gène *G. fossarum mt1* mesurée par RT-qPCR ($\sqrt{2}\Delta Ct$) chez les nouveau-nés issus de la population tolérante (A), de la population naïve (G) et des croisements de populations (AG et GA) sans exposition au Cd et après exposition à 3 $\mu\text{gCd/L}$ pendant 3 jours.

4- Discussion

4.1- L'exposition long-terme sur plusieurs générations affecte l'inductibilité de l'expression de *G. fossarum mt1* chez des populations de *G. fossarum* tolérantes au Cd

La capacité des populations à survivre dans des environnements contaminés par les métaux dépend de l'efficacité des mécanismes qui, d'une part, protègent les organismes contre l'accumulation des métaux dans les tissus et, d'autre part, neutralisent les effets nocifs (toxiques) des métaux après qu'ils ont pénétré dans l'organisme (Stohs, 1995). L'un de ces mécanismes s'appuie sur la synthèse des métallothionéines. Ainsi, l'hypothèse d'un lien entre tolérance accrue à un métal et une meilleure capacité de gestion des contaminants chez des populations chroniquement exposées peut être suggérée. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au lien entre l'expression d'une métallothionéine (*G. fossarum mt1*) décrite pour être spécifiquement exprimée lors d'exposition au Cd chez *G. fossarum* (voir publication n°3,

Chapitre III-1) et la tolérance au Cd observée chez des populations naturelles chroniquement exposées de cette espèce.

Tout d'abord, nous avons mesuré l'expression de *mt1* en sortie de terrain chez des populations naturelles tolérantes et sensibles au Cd au niveau de deux organes, les caeca et les branchies, connus pour être impliqués dans la gestion des métaux chez *G. fossarum* (Gestin et al., 2022). Nos résultats ont montré l'existence d'une corrélation entre l'expression de *mt1* et la tolérance cadmique avec des niveaux d'expression plus hauts de *mt1* dans les branchies et les caeca des populations tolérantes. Ce résultat est cohérent avec d'autres travaux qui montrent que la tolérance observée chez des populations vivant dans des milieux contaminés est associée à des niveaux de base plus élevés de protéines de détoxification telles que les métallothionéines. Par exemple, Pedrosa et al. (2017) ont montré que des populations de *Chironomus riparius* tolérantes au Cd présentent des niveaux basaux d'expression de métallothionéine plus élevés que les populations sensibles. De même, chez le collembole *Orchesella cincta*, les individus tolérants provenant de sites contaminés par les métaux présentent une expression accrue d'un gène de métallothionéine par rapport à une population de référence (Sterenborg and Roelofs, 2003; Timmermans et al., 2005; Roelofs et al., 2009). L'implication des métallothionéines en réponse à une exposition aux métaux et/ou dans la tolérance aux métaux a également été documentée chez de nombreuses espèces d'arthropodes tels que les amphipodes (Stuhlbacher and Maltby, 1992; Martinez et al., 1996; Correia et al., 2002b; Dong et al., 2020), les daphnies (Tsui and Wang, 2005; Guan and Wang, 2006b; Li et al., 2016), les diptères (Mireji et al., 2010; Rosabal et al., 2012) et les crabes (Ma et al., 2008), ou de vertébrés (Paul and Small, 2021; Chang et al., 2022), mais également chez d'autres groupes d'invertébrés comme les annélides (Ogunlaja et al., 2020) et les bivalves (Wallace et al., 2003; Bonneris et al., 2005; Y. Li et al., 2015). L'induction des métallothionéines est considérée comme faisant partie de processus antioxydants en liant les métaux libres et en réduisant ainsi leurs effets pro-oxydants (Amiard et al., 2006; Mao et al., 2012). De même, chez les populations tolérantes il a été suggéré que l'augmentation des niveaux de base de métallothionéines permettrait de maintenir l'homéostasie chez ces populations (Atrian and Capdevila, 2013).

Nos résultats montrent également que chez les gammares exposés au Cd, les métallothionéines sont régulées à la hausse de manière différente entre les populations ayant des historiques différents d'exposition aux métaux. Plus précisément, l'expression moyenne de *mt1* est d'environ 4 et 6 fois supérieure dans les branchies pour les populations intermédiaires et tolérantes, respectivement, par rapport aux populations sensibles. De même dans les caeca, on retrouve un facteur de surexpression 2 fois supérieur pour les populations intermédiaires et tolérantes. Des résultats similaires ont été retrouvés dans les branchies de la moule *Pyganodon grandis* où les concentrations en métallothionéine augmentent le long du gradient de contamination métallique des différents sites d'études (Bonneris et al., 2005). Toutefois, une corrélation entre tolérance et expression des métallothionéines n'est pas systématiquement retrouvée. Par exemple, Chiodi Boudet et al. (2019) ont montré des stratégies différentes de détoxification chez *Palaemon argentinus*. En cas d'exposition aux métaux chez cette espèce, la voie principale de détoxification chez les populations tolérantes se fait par complexation du Cd dans des granules (Cd-MRG) alors que les populations sensibles détoxifient principalement le Cd par liaisons aux métallothionéines. De même, Vijver et al. (2004) suggèrent que les granules seraient responsables de la tolérance lors d'une exposition long terme au Cd tandis que les métallothionéines agiraient principalement lors d'exposition à court terme. Enfin, certaines études ne suggèrent aucun lien existant entre les mécanismes de détoxifications et la tolérance aux métaux. C'est le cas par exemple chez l'amphipode *G. pulex* où aucune différence dans les niveaux de compartimentation subcellulaire (métallothionéines et/ou MRG) n'a été retrouvée entre des populations tolérantes et naïves (Khan et al., 2011). Toutefois, dans cette dernière étude, l'exposition des individus *in situ* considérés n'a pas été finement caractérisée par des mesures de bioaccumulation par exemple.

Par la suite, trois populations tolérantes (popA, B et C) et deux populations sensibles (popG et H) ont été maintenues en eau propre au laboratoire pendant 2 mois afin d'étudier si l'expression de *mt1* et la tolérance chez les gammares adultes covarient. Quand les individus des populations tolérantes au Cd ne sont plus exposés à ce métal pendant 2 mois, on observe une diminution parallèle de la tolérance et des niveaux d'expression de *mt1* dans les caeca, mais pas dans les

branchies. Ces résultats peuvent s'expliquer grâce à la connaissance de la toxicocinétique du Cd chez *G. fossarum* dans ces deux organes (Gestin et al., 2022) et par leur différent rôle dans l'élimination du Cd. Les caeca sont supposés contribuer à détoxifier le Cd à l'inverse des branchies qui stockent ce métal (Gestin et al., 2022). En effet, il a été constaté que les concentrations de Cd accumulés dans les branchies durant une exposition de 7 jours restaient les mêmes après une phase de dépuration de 30 jours, alors que les concentrations de Cd dans les caeca diminuaient de 66% (Gestin et al., 2022). Comme vu précédemment avec les résultats obtenus en sortie de terrain, les gammares tolérants peuvent avoir acquis, durant les processus d'acclimatation, une capacité à retenir plus le Cd dans les caeca où il peut être séquestré par les métallothionéines puis éliminé. Nos résultats suggèrent que, dans les branchies, l'induction des métallothionéines peut être une réponse rapide à l'exposition au Cd afin d'éviter une saturation dans les caeca (Figure 6). Les branchies sont connues comme étant un organe d'accumulation des métaux toxiques chez les crustacés aquatiques (Henry et al., 2012). Ainsi, le Cd n'y est que difficilement éliminé. D'autre part, l'une des hypothèses pouvant expliquer une surexpression de *mt1* dans les branchies des gammares déacclimatés provenant des sites contaminés peut venir du fait que les métallothionéines ont une demi-vie plus courtes que celle du Cd et par conséquent les cellules épithéliales doivent maintenir une activité transcriptionnelle soutenue du gène *mt1*. En effet, il a par exemple été montré que chez *Littorina littorea*, la demi-vie des métallothionéines dans les branchies est de 69 jours alors que la demi-vie du Cd est de 300 jours (Bebianno and Langston, 1998). Les auteurs de l'étude ont donc suggéré un cycle fermé du métal dans l'organe obligeant un renouvellement constant en métallothionéines permettant de repiéger le Cd libre présent dans l'organe (Bebianno and Langston, 1998). Ce même constat a également été fait chez *Mytilus edulis* où la demi-vie des métallothionéines est de 25 jours contre 300 jours pour le Cd (Bebianno and Langston, 1993).

D'autre part, lorsque l'on expose de nouveau les gammares déacclimatés à une faible concentration de Cd sur une courte durée (3 µgCd/L pendant 5 jours), on observe une plus grande inductibilité de *mt1* (facteur d'inductibilité > 2) dans les branchies des mâles provenant des populations tolérantes déacclimatés alors qu'aucune différence n'a été retrouvée dans les caeca entre les cinq populations. L'examen de la perte de la tolérance en relation avec une potentielle diminution des niveaux d'expression de la métallothionéine au niveau des différents

organes n'est que très peu documenté chez les arthropodes. Une étude menée chez *Daphnia pulex* a montré que la capacité d'hyper-induction de la métallothionéine observée chez les individus tolérants au Cd peut disparaître en l'espace d'une génération en même temps que la tolérance au Cd (Shaw et al., 2019). En lien avec la perte de la tolérance observée chez les populations de gammarés provenant des milieux exposés et déacclimatés dans notre étude, il semble que les individus perdent leur plus grande capacité de détoxification du Cd par *mt1* dans les caeca pendant la phase de deux mois en eau propre. Les branchies quant à elles, semblent toujours être aptes à induire plus fortement *mt1* lors d'une exposition aigue au Cd. Cette corrélation et covariation entre l'expression de *mt1* et la tolérance au Cd renforcent l'hypothèse que l'expression de *mt1* soit au moins un des mécanismes moléculaires qui explique la tolérance au Cd observée chez les populations de *G. fossarum*. De plus, l'approche moléculaire multi-organe permet d'avancer l'hypothèse d'une réponse systémique à la contamination cadmique où les mécanismes de défense des deux organes collaborent, les branchies répondant plus rapidement à l'exposition au Cd en stockant de grandes quantités de Cd permettant de ne pas surcharger les caeca qui assurent la détoxification.

4.2- Effets parentaux, expression de *G. fossarum mt1* et transmission de la tolérance à la descendance

Nous avons testé l'hypothèse que l'expression de *mt1* chez la descendance dépend de l'exposition des parents (et donc des effets parentaux) dans l'objectif d'améliorer notre compréhension de la transmission intergénérationnelle non génétique de la tolérance précédemment décrite dans les études de Vigneron et al. (2019) et de Lalouette et al. (2023). Pour cela, la tolérance au Cd et l'expression de *mt1* ont été suivies chez deux cohortes de nouveau-nés : une première cohorte (Coh1) née au laboratoire à partir des géniteurs fraîchement récoltés sur le terrain et une deuxième cohorte (Coh2) née après un cycle de reproduction en eau propre et au laboratoire. Tout d'abord, la tolérance au Cd a été retrouvée chez les nouveau-nés Coh1 et Coh2 des trois populations tolérantes, confirmant la transmissibilité de la tolérance à la descendance déjà identifiée par Vigneron et al. (2019) et Lalouette et al. (2023). Aucune différence n'a été observée dans l'expression de *mt1* en condition contrôle chez les nouveau-

nés tolérants et sensibles des deux cohortes. Cependant, une plus grande inductibilité de l'expression de *mt1* a été observée chez les nouveau-nés tolérants, après une courte réexposition au Cd. Ces résultats viennent renforcer l'hypothèse d'un lien entre la capacité de surexprimer *mt1* et la tolérance au Cd chez *G. fossarum* avec de possibles effets parentaux sur l'expression de *mt1* chez la descendance. En accord avec ces observations, Shaw et al. (2019) ont montré des résultats similaires chez la daphnie (*Daphnia pulex*) après une exposition multigénérationnelle au Cd sur 50 générations. Dans cette étude, des niveaux identiques dans l'expression basale des métallothionéines ont été retrouvés entre les individus tolérants et naïfs de la cinquantième génération et une expression plus élevée des métallothionéines a été observée chez les individus tolérants après une courte réexposition au Cd (Shaw et al., 2019). De même chez le ver *Dendrobaena octaedra*, Fisker et al. (2013) ont montré que les individus tolérants au Cd de la deuxième génération présentaient une capacité de réponse plus rapide dans la surexpression d'une métallothionéine lors d'une exposition au Cd. Toutefois, le rôle potentiel de la métallothionéine dans le transfert de la tolérance aux métaux des adultes à la descendance a rarement été souligné, en particulier chez les arthropodes. Dans l'étude de Guan and Wang (2006b), l'exposition multigénérationnelle au Cd réalisée chez *Daphnia magna* a entraîné une augmentation de la tolérance à ce métal et une induction significative de la métallothionéine chez les daphnies exposées dans toutes les générations, avec une synthèse maximale dans les générations tardives. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que l'effet transgénérationnel de l'exposition au Cd sur l'induction rapide de la métallothionéine provenait de l'augmentation de la concentration de Cd dans l'organisme de la descendance. Ainsi, les daphnies nées de mères exposées seraient plus disposées à synthétiser davantage de métallothionéines (Guan and Wang, 2006b). Chez cette même espèce, une autre étude n'exclut pas le rôle des métallothionéines dans la tolérance au mercure observée chez la descendance puisqu'ils suggèrent que l'ARN messager (ARNm) des métallothionéines pourrait être transféré par le biais de la reproduction (Tsui and Wang, 2005). D'autre part, quelques études sur les poissons suggèrent que le transfert des métaux maternel à la descendance peut entraîner la transcription des ARNm des métallothionéines dans les embryons ou les larves. Ce mécanisme serait alors responsable de l'augmentation de la tolérance aux métaux dans la progéniture produite par des adultes préexposés aux métaux (Lin et al., 2000; Wu et al., 2008, 2012). Weng and Wang (2014) ont

conclu que les métaux transférés par la mère induisant un niveau élevé de synthèse de métallothionéines dans les œufs chez l'huître *Crassostrea sikamea* étaient l'un des mécanismes possibles responsables de la tolérance accrue aux métaux des embryons et des larves d'huîtres provenant de sites fortement contaminés. Ainsi, dans le cas d'un transfert purement maternel, trois hypothèses peuvent être suggérées : (1) un transfert direct des métallothionéines maternelles à la descendance, (2) un transfert des ARNm des métallothionéines *via* les œufs, et (3) un transfert des métaux induisant des niveaux d'expressions des métallothionéines élevés dans les œufs.

Dans la présente étude, le rôle des deux sexes dans la transmission de la tolérance au Cd à la descendance a été évalué en réalisant un croisement entre des géniteurs provenant d'une population tolérante et d'une population sensible. On a retrouvé un rôle symétrique des deux sexes dans la transmission de la tolérance au Cd, corrélé à une meilleure capacité d'induction de *mt1*. Ces résultats excluent donc l'hypothèse d'un effet purement maternel, suggérant un éventuel transfert des ARNm de *mt1* à la descendance par les parents des deux sexes. Une autre hypothèse serait l'implication d'un transfert de modifications épigénétiques différentes entre les mâles et les femelles. Il a par exemple été suggéré que les messages épigénétiques encodés dans la chromatine des spermatozoïdes peuvent être hérités de manière transgénérationnelle et ainsi influencer la transcription dans l'embryon (Teperek and Miyamoto, 2013; Teperek et al., 2016).

5- Conclusion

Cette étude réalisée chez des populations naturelles de *G. fossarum* suggère une corrélation entre l'expression de la métallothionéine, *G. fossarum mt1*, et la tolérance au Cd. En effet, nous avons démontré que l'expression de *mt1* est surexprimée dans les branchies et les caeca (deux organes impliqués dans la gestion du Cd chez cette espèce) chez les populations tolérantes au Cd en sortie de terrain. Cette covariation a également été confirmée par une diminution parallèle de la tolérance et de l'expression des MT dans les caeca au cours du maintien en eau propre au laboratoire. D'autre part, notre étude montre que l'expression de *mt1* peut être modulée par des processus transgénérationnels adaptatifs survenant au cours d'une exposition historique chez

des populations de terrains. Notamment, cette étude suggère un rôle symétrique des deux sexes dans la transmission de la tolérance au Cd, corrélé à une meilleure capacité d'induction de *mt1* lors d'une courte réexposition à ce métal. Ces résultats conduisent donc à discuter des mécanismes de plasticité sous-jacents à la modification de la sensibilité et à sa transmission dans les populations naturelles exposées. Nous suggérons un rôle des mécanismes épigénétiques dans l'acclimatation intergénérationnelle observée chez ces populations.

Bibliography

Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal, A., 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J Comp Physiol B* 174. <https://doi.org/10.1007/s00360-004-0438-0>

Amiard, J., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>

Amiard-Triquet, C., 2019. Pollution Tolerance in Aquatic Animals: From Fundamental Biological Mechanisms to Ecological Consequences, in: *Ecotoxicology*. Elsevier, pp. 33–91. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-314-1.50002-X>

Atrian, S., Capdevila, M., 2013. Metallothionein-protein interactions. *BioMolecular Concepts* 4, 143–160. <https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0049>

Badyaev, A.V., Uller, T., 2009. Parental effects in ecology and evolution: mechanisms, processes and implications. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 1169–1177. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0302>

Bebianno, M.J., Langston, W.J., 1998. Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea*. *Talanta* 46, 301–313. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(97\)00344-5](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00344-5)

Bebianno, M.J., Langston, W.J., 1993. Turnover rate of metallothionein and cadmium in *Mytilus edulis*. *Biomaterials* 6, 239–244. <https://doi.org/10.1007/BF00187762>

Bonneris, E., Giguère, A., Perceval, O., Buronfosse, T., Masson, S., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2005. Sub-cellular partitioning of metals (Cd, Cu, Zn) in the gills of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*: role of calcium concretions in metal sequestration. *Aquatic Toxicology* 71, 319–334. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.11.025>

Chang, F.M., Lin, C.H., Wu, S.M., 2022. Duration of Induced Metallothionein is a Critical Factor in the Cadmium-Resistance Among Goldfish (*Carassius auratus*) and Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Bull Environ Contam Toxicol* 108, 725–730. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03449-4>

Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., Maltby, L., 2015. Gammarids as Reference Species for Freshwater Monitoring, in: *Aquatic Ecotoxicology*. Elsevier, pp. 253–280. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00011-5>

Chen, S., Nichols, K.M., Poynton, H.C., Sepúlveda, M.S., 2016. MicroRNAs are involved in cadmium tolerance in *Daphnia pulex*. *Aquatic Toxicology* 175, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.023>

Chiodi Boudet, L., Mendieta, J., Romero, M.B., Dolagaratz Carricavur, A., Polizzi, P., Marcovecchio, J.E., Gerpe, M., 2019. Strategies for cadmium detoxification in the white shrimp *Palaemon argentinus* from clean and polluted field locations. *Chemosphere* 236, 124224. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.194>

Correia, A.D., Livingstone, D.R., Costa, M.H., 2002. Effects of water-borne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod *Gammarus locusta*. *Marine Environmental Research* 54, 357–360. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00114-9)

Dallinger, R., Höckner, M., 2013. Evolutionary concepts in ecotoxicology: tracing the genetic background of differential cadmium sensitivities in invertebrate lineages. *Ecotoxicology* 22, 767–778. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1071-z>

Dong, D.T., Miranda, A.F., Carve, M., Shen, H., Trestrail, C., Dinh, K.V., Nugegoda, D., 2020. Population- and sex-specific sensitivity of the marine amphipod *Allorchestes compressa* to metal exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 206, 111130. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111130>

Duarte, L.F. de A., Moreno, J.B., Catharino, M.G.M., Moreira, E.G., Trombini, C., Pereira, C.D.S., 2019. Mangrove metal pollution induces biological tolerance to Cd on a crab sentinel species subpopulation. *Science of The Total Environment* 687, 768–779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.039>

Fisker, K.V., Holmstrup, M., Sørensen, J.G., 2013. Variation in metallothionein gene expression is associated with adaptation to copper in the earthworm *Dendrobaena octaedra*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 157, 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.11.007>

Gestin, O., Lopes, C., Delorme, N., Garnero, L., Geffard, O., Lacoue-Labarthe, T., 2022. Organ-specific accumulation of cadmium and zinc in *Gammarus fossarum* exposed to environmentally relevant metal concentrations. *Environmental Pollution* 308, 119625. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119625>

Guan, R., Wang, W.-X., 2006. Multigenerational cadmium acclimation and biokinetics in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* 141, 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.036>

Henry, R.P., Lucu, Č., Onken, H., Weihrauch, D., 2012. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front. Physio.* 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00431>

Janssens, T.K.S., Roelofs, D., van Straalen, N.M., 2009. Molecular mechanisms of heavy metal tolerance and evolution in invertebrates. *Insect Science* 16, 3–18. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2009.00249.x>

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, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.001>

Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A., 2010. *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests, in: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 205, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, New York, NY, pp. 1–76. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5623-1_1

Lalouette, A., Degli Esposti, D., Garnero, L., Allibert, M., Dherret, L., Dabrin, A., Delorme, N., Recoura-Massaquant, R., Chaumot, A., 2023. Acclimation and transgenerational plasticity support increased cadmium tolerance in *Gammarus* populations exposed to natural metal contamination in headwater streams. *Science of The Total Environment* 903. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166216>

Li, S., Sheng, L., Xu, J., Tong, H., Jiang, H., 2016. The induction of metallothioneins during pulsed cadmium exposure to *Daphnia magna*: Recovery and trans-generational effect. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.015>

Li, Y., Yang, H., Liu, N., Luo, J., Wang, Q., Wang, L., 2015. Cadmium Accumulation and Metallothionein Biosynthesis in Cadmium-Treated Freshwater Mussel *Anodonta woodiana*. PLoS ONE 10, e0117037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117037>

Lin, H.C., Hsu, S.C., Hwang, P.P., 2000. Maternal transfer of cadmium tolerance in larval *Oreochromis mossambicus*. Journal of Fish Biology 57, 239–248. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb00789.x>

Ma, W., Wang, L., He, Y., Yan, Y., 2008. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanensis* during acute exposure to waterborne cadmium. Environmental toxicology 23, 393–400. <https://doi.org/10.1002/tox.20339>

Mao, H., Wang, D.-H., Yang, W.-X., 2012. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. Aquatic Toxicology 110–111, 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.018>

Martinez, M., Ramo, J.D., Torreblanca, A., Pastor, A., Diaz-Mayans, J., 1996. Cadmium toxicity, accumulation and metallothionein induction in *Echinogammarus echinosetosus*. Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology 31, 1605–1617. <https://doi.org/10.1080/10934529609376445>

Mireji, P.O., Keating, J., Hassanali, A., Impoinvil, D.E., Mbogo, C.M., Muturi, M.N., Nyambaka, H., Kenya, E.U., Githure, J.I., Beier, J.C., 2010. Expression of metallothionein and α -tubulin in heavy metal-tolerant *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.08.004>

Morgan, A.J., Kille, P., Stürzenbaum, S.R., 2007. Microevolution and Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. Environ. Sci. Technol. 41, 1085–1096. <https://doi.org/10.1021/es061992x>

Ogunlaja, A., Sharma, V., Lin, J., 2020. Ex-situ induction of Metallothionein gene in *Lybiodrilus violaceus* post cadmium and zinc exposure. Gene Reports 20, 100701. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100701>

Paul, J.S., Small, B.C., 2021. Chronic exposure to environmental cadmium affects growth and survival, cellular stress, and glucose metabolism in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquatic Toxicology 230, 105705. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105705>

Pedrosa, J., Gravato, C., Campos, D., Cardoso, P., Figueira, E., Nowak, C., Soares, A.M.V.M., Barata, C., Pestana, J.L.T., 2017. Investigating heritability of cadmium tolerance in *Chironomus riparius* natural populations: A physiological approach. Chemosphere 170, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.008>

Roelofs, D., Janssens, T.K.S., Timmermans, M.J.T.N., Nota, B., Mariën, J., Bochdanovits, Z., Ylstra, B., Van Straalen, N.M., 2009. Adaptive differences in gene expression associated with heavy metal tolerance in the soil arthropod *Orchesella cincta*. Molecular Ecology 18, 3227–3239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04261.x>

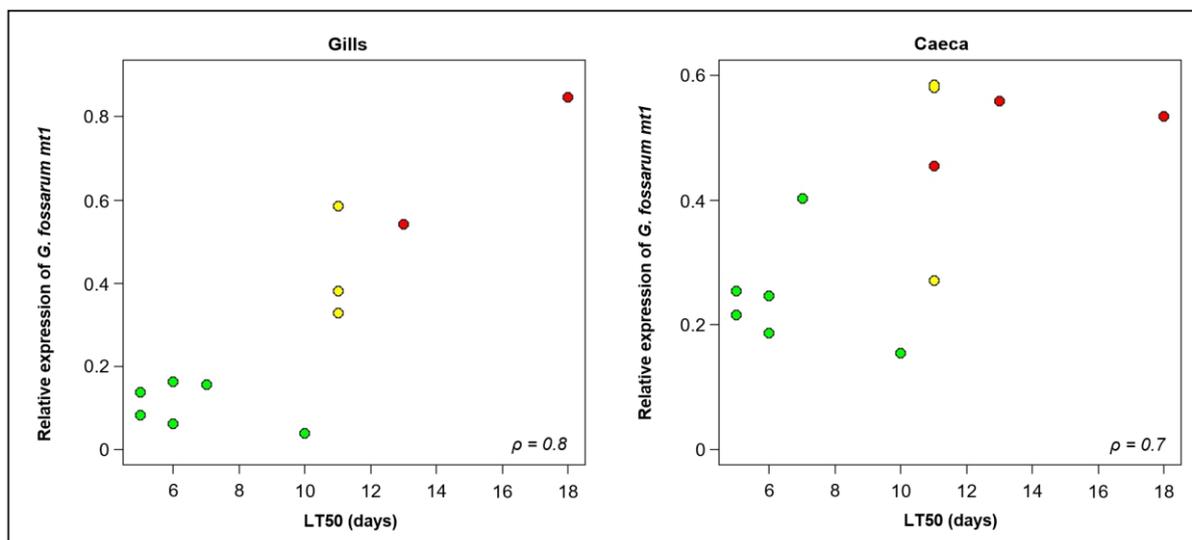
Rosabal, M., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2012. Subcellular metal partitioning in larvae of the insect *Chaoborus* collected along an environmental metal exposure gradient (Cd, Cu, Ni and Zn). Aquatic Toxicology 120–121, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.05.001>

Shaw, J.R., Colbourne, J.K., Glaholt, S.P., Turner, E., Folt, C.L., Chen, C.Y., 2019. Dynamics of Cadmium Acclimation in *Daphnia pulex* : Linking Fitness Costs, Cross-Tolerance, and Hyper-Induction of Metallothionein. Environ. Sci. Technol. 53, 14670–14678. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05006>

Sterenborg, I., Roelofs, D., 2003. Field-selected cadmium tolerance in the springtail *Orchesella cincta* is correlated with increased metallothionein mRNA expression. Insect Biochem Mol Biol 33, 741–747. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(03\)00070-5](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(03)00070-5)

- Stuhlbacher, A., Maltby, L., 1992. Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 22. <https://doi.org/10.1007/BF00212093>
- Teperék, M., Miyamoto, K., 2013. Nuclear reprogramming of sperm and somatic nuclei in eggs and oocytes. Reprod Med Biol 12, 133–149. <https://doi.org/10.1007/s12522-013-0155-z>
- Teperék, M., Simeone, A., Gaggioli, V., Miyamoto, K., Allen, G.E., Erkek, S., Kwon, T., Marcotte, E.M., Zegerman, P., Bradshaw, C.R., Peters, A.H.F.M., Gurdon, J.B., Jullien, J., 2016. Sperm is epigenetically programmed to regulate gene transcription in embryos. Genome Res 26, 1034–1046. <https://doi.org/10.1101/gr.201541.115>
- Timmermans, M.J.T.N., Ellers, J., Roelofs, D., van Straalen, N.M., 2005. Metallothionein mRNA Expression and Cadmium Tolerance in Metal-stressed and Reference Populations of the Springtail *Orchesella cincta*. Ecotoxicology 14, 727–739. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0020-x>
- Tsui, M.T.K., Wang, W.-X., 2005. Influences of maternal exposure on the tolerance and physiological performance of *Daphnia magna* under mercury stress. Environ Toxicol Chem 24, 1228. <https://doi.org/10.1897/04-190R.1>
- Uller, T., 2008. Developmental plasticity and the evolution of parental effects. Trends in Ecology & Evolution 23, 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.04.005>
- Vigneron, A., Geffard, O., Coquery, M., François, A., Quéau, H., Chaumot, A., 2015. Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a *Gammarus fossarum* population inhabiting a low-level contaminated stream. Ecotoxicology 24, 1239–1249. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1491-z>
- Vigneron, A., Geffard, O., Quéau, H., François, A., Chaumot, A., 2019. Nongenetic inheritance of increased Cd tolerance in a field *Gammarus fossarum* population: Parental exposure steers offspring sensitivity. Aquatic Toxicology 209, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.001>
- Vijver, M.G., van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 2004. Internal Metal Sequestration and Its Ecotoxicological Relevance: A Review. Environ. Sci. Technol. 38, 4705–4712. <https://doi.org/10.1021/es040354g>
- Wallace, W., Lee, B., Luoma, S., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). Mar. Ecol. Prog. Ser. 249, 183–197. <https://doi.org/10.3354/meps249183>
- Weng, N., Wang, W.-X., 2014. Improved tolerance of metals in contaminated oyster larvae. Aquatic Toxicology 146, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.036>
- Wu, S.M., Lin, H., Yang, W., 2008. The effects of maternal Cd on the metallothionein expression in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae. Aquatic Toxicology 87, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.02.012>
- Wu, S.M., Tsai, P.R., Yan, C.J., 2012. Maternal cadmium exposure induces mt2 and smtB mRNA expression in zebrafish (*Danio rerio*) females and their offspring. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 156, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.02.001>
- Ziller, A., Fraissinet-Tachet, L., 2018. Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein. Metallomics 10. <https://doi.org/10.1039/C8MT00165K>

Supplementary data



Supplementary Figure 1 : Corrélation entre le temps de survie médian (LT50) de chaque population et l'expression médiane de *G. fossarum mt1* dans les branchies et les caeca. Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent au statut contaminé, intermédiaire et non contaminé de chaque population. La valeur donnée (ρ) correspond au coefficient de corrélation de Spearman.

2.2. Note n°5 : Complément à la publication n°3

Cette note vient en complément des résultats obtenus dans la partie précédente sur la variabilité de l'expression de *mt1* dans les branchies et les caeca des populations contaminées et non contaminées. Les résultats présentés ci-dessous ont été acquis lors de la campagne de prélèvement de Décembre 2021 menée au cours de ces travaux de thèse. L'objectif a été d'étudier l'expression de *G. fossarum mt1* dans différents organes (branchies, caeca, ovaires et testicules) après prélèvement *in situ* chez les organismes d'une population non contaminée (Séran) et d'une population contaminée (Ardillats) pour étudier si l'exposition *in situ* entraîne une expression de *G. fossarum mt1* différente et organo-spécifique entre les organismes des deux populations, potentiellement en lien avec la tolérance au Cd observée (voir Chapitre III - 1.1). Les différents protocoles de prélèvement des populations et de mesure de l'expression de *mt1* sont détaillés dans le Chapitre II et dans le Chapitre IV-1 de ce manuscrit.

La Figure IV-1 représente l'expression de *mt1* dans les différents organes en sortie de terrain pour la population Ardillats et la population Séran. Tout d'abord, les résultats montrent que l'expression de *mt1* varie entre les organes chez les individus de chaque population. Notamment, l'expression de *mt1* est plus élevée dans les ovaires, suivi des testicules, du caeca et des branchies au sein de la population Séran (en vert) (Pairwise Wilcoxon test : adjusted (BH) p-values < 3.10^{-3}). De façon similaire, les femelles de la population Ardillats montrent une forte expression dans les ovaires, par rapport aux autres organes, (Pairwise Wilcoxon test : adjusted (BH) p-values < 3.10^{-3}). D'autre part, il existe une différence d'expression de *mt1* entre la population Séran et la population Ardillats pour les branchies, les caeca et les ovaires (Pairwise Wilcoxon test : adjusted (BH) p-values < 0.03) (Figure IV-1) avec un fold-change de 15 pour les branchies, de 3 pour les caeca et de 1.5 pour les ovaires.

Comme démontré dans le Chapitre III de ce manuscrit (voir Chapitre III - 1.1), la population Ardillats présente une tolérance accrue au Cd par rapport aux populations naïves. Ainsi, ces résultats ont permis d'ouvrir l'hypothèse d'un possible lien entre l'expression de *mt1* et la tolérance au Cd discuté dans la publication n°4.

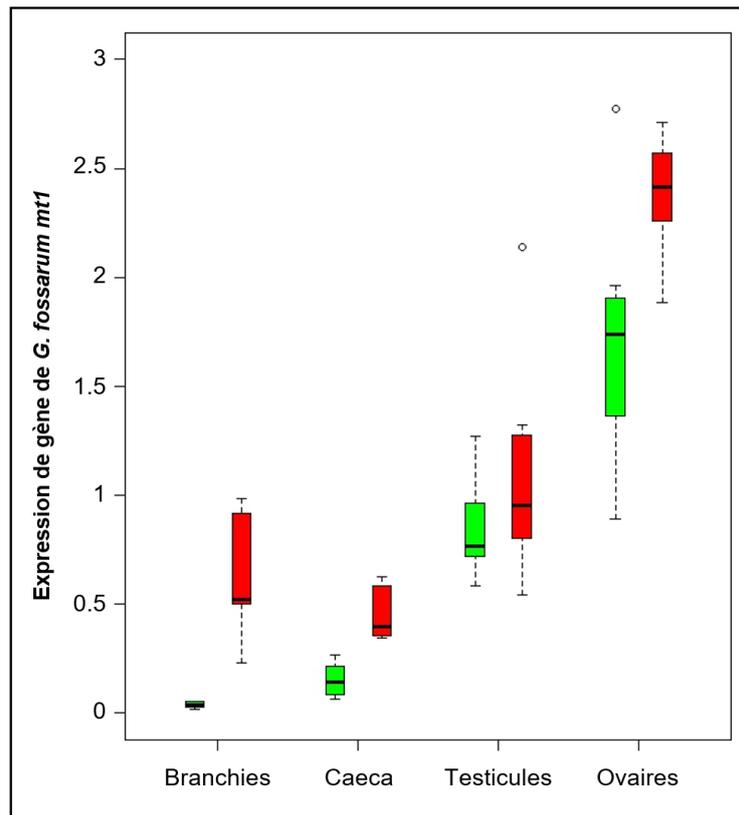


Figure IV-1 : Expression relative de *G. fossarum* mt1 ($\sqrt{2\Delta Ct}$) dans les branchies, les caeca, les testicules et les ovaires chez la population Sérans (vert) et Ardillats (rouge) après prélèvement sur le terrain.

Conclusions du Chapitre IV

Ce chapitre a montré les avancements concernant les mécanismes moléculaires sous-jacents à la mise en place de la tolérance au Cd chez *G. fossarum* par l'identification et l'étude de l'expression des métallothionéines.

Grâce à la détermination du transcriptome du gammare (Cogne et al., 2019), deux transcrits codant pour deux métallothionéines ont pu être identifiés chez *G. fossarum*. Les résultats ont mis en évidence une première métallothionéine appelée **mt1** qui semble être une **Cd-thionéine** puisque celle-ci répond fortement à une exposition au Cd dans les branchies et les caeca des gammares provenant d'une population naïve. La deuxième métallothionéine, **mt2**, **n'est pas induite** par une exposition au Cd.

Par la suite, les travaux exposés dans la deuxième partie ont montré l'existence d'une co-variation entre les niveaux d'expression de *mt1* et la tolérance au Cd. En effet, les résultats ont montré que les populations tolérantes au Cd présentaient une **surexpression de mt1 dans les branchies et les caeca** en sortie de terrain. D'autre part, en parallèle de la **perte de la tolérance au Cd** observée chez les adultes des populations déacclimatées, une **diminution de l'expression de mt1 dans les caeca** a été observée. De même, on retrouve une **plus grande inductibilité de mt1 dans les branchies** des adultes des populations contaminées déacclimatés lors d'une réexposition au Cd. Ces résultats pouvant être expliqués par le rôle de stockage des branchies identifié par des études sur la modélisation toxicocinétique du Cd chez le gammare (Gestin et al., 2021, 2022). Enfin, l'expression de *mt1* peut être modulée par des **processus transgénérationnels adaptatifs** survenant au cours d'une exposition chronique des populations. Notamment, cette étude suggère **un rôle symétrique des deux sexes** dans la transmission de la tolérance au Cd, corrélé à une **meilleure capacité d'induction de mt1**. À la suite de ces résultats, la note n°5 est venue compléter ces résultats en allant regarder l'expression de *mt1* dans différents organes (branchies, caeca, ovaires et testicules) chez une population tolérante au Cd et chez une population naïve. Les résultats montrent une **surexpression de mt1 dans les branchies, les caeca et les ovaires de la population tolérante au Cd** vis-à-vis de la population naïve.

Chapitre V : Etude de la modification de la sensibilité et des traits d'histoire de vie de *G. fossarum* lors d'une exposition cadmique multigénérationnelle au laboratoire

Ce chapitre, composé de parties, est consacré à l'étude de l'induction de la tolérance au Cd chez une population naïve de gammare (population Séran) par des approches d'expositions à des concentrations représentatives de l'environnement.

La première partie présente les résultats d'une exposition réalisée pendant un cycle de reproduction (environ 21 jours) chez des adultes provenant de la population naïve Séran dans le but de confirmer que seule une exposition long terme peut entraîner une modification de la sensibilité chez les populations de *G. fossarum*.

La deuxième partie est consacrée à des travaux d'évolution expérimentale qui ont mis en œuvre une exposition multigénérationnelle réalisée au laboratoire afin d'étudier dans des conditions contrôlées la mise en place de la tolérance au Cd et la modification des traits d'histoire de vie, en mimant les niveaux d'exposition rencontrés sur le terrain.

1. Exposition de géniteurs naïfs pendant 21 jours

Dans la publication n°1, nous avons évalué expérimentalement au laboratoire la modification possible de la sensibilité au Cd de la descendance à la suite d'une exposition au Cd pendant la gamétogénèse ou l'embryogénèse (voir Chapitre III - 1.1). Durant cette expérimentation, nous avons également testé si l'exposition opérée pendant 21 jours entraînait une modification de la sensibilité chez les géniteurs afin de valider le fait que l'acquisition de tolérance au Cd chez *G. fossarum* est bien liée à des phénomènes d'exposition long terme.

Pour cela, une exposition a été réalisée au laboratoire pendant 21 jours sur des mâles adultes provenant d'une population de référence (Séran). Pour cela, une condition témoin et une condition exposée à 0.1 µgCd/L ont été considérées. Pour chaque condition, deux aquariums de 2 L contenant 30 gammares mâles chacun ont été considérés. Les aquariums témoins ont été remplis avec 1.5 L d'eau de forage (eau non contaminée) préalablement oxygénée durant 24h et ayant une conductivité d'environ 350 µS/cm. Les deux aquariums contaminés contiennent également 1.5 L de cette même eau de forage (oxygénée et conductivité à 350 µS/cm) avec ajout d'une solution mère de Cd pour arriver à la concentration d'exposition choisie. Les gammares ont été nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulnes conditionnées. Le renouvellement de l'eau des aquariums (témoins et contaminés) a été réalisé quotidiennement afin d'assurer un taux d'oxygénation de l'eau suffisant et afin de maintenir constante la concentration de Cd dans les aquariums contaminés. Au terme de l'exposition cadmique réalisée au laboratoire, la sensibilité au Cd des adultes a été testée pour chacune des conditions selon le même protocole décrit dans le paragraphe 5 du Chapitre II.

La Figure V-1 présente les distributions des temps de survie individuels obtenus lors des tests de sensibilité aiguë au Cd réalisés chez les gammares mâles adultes des deux conditions. Les résultats montrent qu'il n'y a aucune différence en termes de sensibilité entre les gammares provenant de la condition contrôle et ceux de la condition exposée (log-rank test : p-value = 0.7). À la différence de certaines espèces où l'observation d'une mise en place de tolérance peut s'effectuer après seulement quelques jours d'exposition, une exposition durant une courte période de 21 jours chez le gammare ne modifie pas la sensibilité toxicologique.

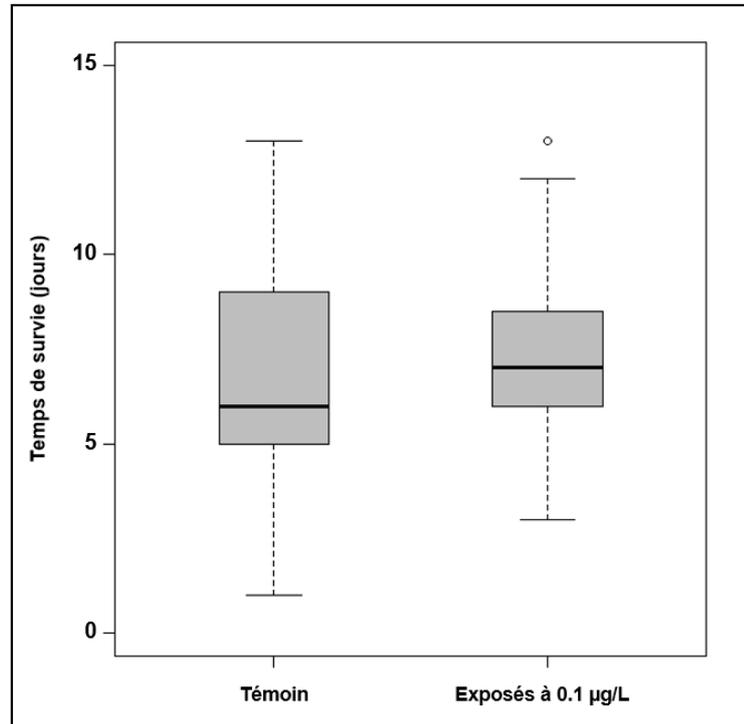


Figure V-1 : Influence d'une exposition courte au Cd (21 jours) et à un niveau d'exposition représentatif de l'environnement (0.1 µgCd/L) chez des gammares mâles provenant d'une population naïve. Les boxplots représentent la distribution de survie individuel des adultes exposés à 80 µgCd/L.

Ces résultats viennent donc confirmer le fait que la tolérance au Cd observée chez les populations naturelles dépend d'une exposition long-terme et qu'une exposition aux faibles concentrations considérées durant une courte période du cycle de vie des gammares ne permet pas d'induire une tolérance à ce métal, comme cela a pu être rapporté dans de nombreuses études au laboratoire de préexposition que l'on peut retrouver dans la littérature écotoxicologique (Khan et al., 1988; Bodar et al., 1990; Stuhlbacher and Maltby, 1992; Klerks, 1999).

2. Exposition multigénérationnelle

Afin de venir compléter l'approche comparative de terrain, une exposition multigénérationnelle a été conduite au laboratoire dans l'objectif d'étudier les mécanismes d'acquisition de tolérance au Cd observée en conditions naturelles. Pour cela, de jeunes gammares issus d'une population de référence (population Séran) ont été exposés à une concentration de cadmium représentative de la contamination des milieux naturels (0.5 µg/L). L'exposition a été réalisée sur deux lots qui se distinguent par leur date de pêche : le lot du 22 février 2022 et le lot du 03 octobre 2022. Au cours de l'exposition, des tests de sensibilité au Cd ainsi que des mesures de traits d'histoire de vie (taille des femelles, taux de croissance, alimentation) ont été réalisés à différents temps d'exposition et à différentes générations.

2.1. Validation de l'exposition au Cd durant l'exposition multigénérationnelle

Afin de valider les niveaux d'exposition au Cd durant l'exposition multigénérationnelle, des mesures des niveaux de Cd bioaccumulé dans des gammares ont été réalisées en suivant le même protocole décrit dans le paragraphe 2.2 du Chapitre II.

Les résultats des tests de bioaccumulation sont présentés dans le Tableau V-1. Les résultats ne montrent aucune contamination dans les aquariums témoins (entre 0.03 et 0.05 µg/g). Dans les aquariums contaminés, on retrouve des niveaux de Cd bioaccumulés au moins 3 fois supérieurs à ceux retrouvés dans les aquariums non contaminés. Les niveaux sont variables entre les aquariums 2 L et 11 L, pouvant être dû aux renouvellements de l'eau qui se fait plus rapidement dans les petits aquariums. D'autre part, dans les aquariums 11 L, on retrouve des niveaux de Cd bioaccumulés allant de 0.15 µg/g et 0.37 µg/g, soit des niveaux que l'on considère comme étant « intermédiaire » et « contaminé » dans les populations de terrain (voir Publication n°2).

Ainsi, ces résultats permettent de valider que les niveaux d'exposition au Cd durant l'exposition multigénérationnelle sont similaires à ceux retrouvés dans l'environnement et que les gammares exposés ont bien vu du Cd au cours des différentes générations.

Tableau V-1 : Résultats des tests de bioaccumulation réalisée dans les aquariums de l’exposition multigénérationnelle. La contamination biodisponible en Cd a été évaluée par les concentrations de métaux accumulés en µg/g de poids sec dans les gammares encagés dans les aquariums pendant 7 jours (organismes de la provenant de la population de référence du laboratoire)

Date de la mesure	Type d’aquarium	Concentration de Cd bioaccumulé dans les gammares encagés (µg/g poids sec)	
		Aquariums exposés	Aquariums témoins
Février 2022	Aquarium 2L	2.34	0.05
Septembre 2022	Aquarium 2L	2.23	0.04
	Aquarium 11L	0.27	0.04
	Aquarium 11L	0.26	0.06
Mars 2023	Aquarium 2L	3.24	0.05
	Aquarium 11L	0.37	0.04
	Aquarium 11L	0.24	0.03
	Aquarium 11L	0.30	0.03
	Aquarium 11L	0.23	0.03
Juin 2023	Aquarium 2L	3.68	0.04
	Aquarium 11L	0.26	0.03
	Aquarium 11L	0.17	0.03
	Aquarium 11L	0.15	0.03
	Aquarium 11L	0.19	0.03

2.2. Une exposition supérieure à 3 générations semble nécessaire pour acquérir une tolérance au cadmium

Les tests de sensibilité aiguë ont uniquement été réalisés chez les nouveau-nés. La correspondance des générations a été estimée grâce à la connaissance du cycle de reproduction (entrée en reproduction à une taille d’environ 5-6 mm) et des taux de croissance (les gammares grandissent d’environ 1 mm par mois) pour cette espèce et à la température de 16°C (Coulaud, 2012; Chaumot et al., 2020), en considérant que la génération F0 correspond aux jeunes péchés qui ont constitué les lots de départ des expérimentations (le détail est donné dans les Annexe F2 et F3).

La Figure V-2 présente les résultats de la distribution des temps de survie individuels obtenus lors des tests de sensibilité aiguë au Cd chez les nouveau-nés du lot du 22 février 2022 à différents temps d’exposition. Les nouveau-nés testés en avril 2022 (Figure V-2A) sont issus de la génération F1, ceux testés en novembre 2022 (Figure V-2B) sont issus d’un mélange de fin de génération F1 et de début de F2, en février 2023 (Figure V-2C) de fin de la génération

F2 et début de la génération F3 et en mai 2023 (Figure V-2D) de la génération F3. On n'observe aucune différence de sensibilité au cadmium entre les nouveau-nés issus des aquariums non exposés et exposés en avril 2022 (log-rank test : p-value = 0.4), en novembre 2022 (log-rank test : p-value = 0.8) et en février 2023 (log-rank test : p-value = 0.2). Pour cette dernière date, les aquariums n°2T, 6T, 9T, 2C, 6C et 9C ont été testés (Annexe F4-A). Lorsque l'on regarde plus précisément, les nouveau-nés issus de l'aquarium contaminé C3 présentent une tolérance au Cd significativement plus élevée que les nouveau-nés non exposés des aquariums T1, T2 et T3 (log-rank test : p-values < 3.10^{-2}). En mai 2023, les nouveau-nés issus des aquariums exposés présentent une tolérance au Cd significativement plus élevée que les nouveau-nés non exposés (log-rank test : p-value = 10^{-4} ; Figure V-2D). A cette date, les individus provenant de 4 aquariums contaminés et non contaminés ont été testés (Annexe F4-B). Les nouveau-nés issus de chaque aquarium contaminé présentent une tolérance au Cd significativement plus élevée que ceux de l'aquarium T4 (log-rank test : p-values < 0.03). Les individus des aquariums C1 et C4 sont également plus tolérants que les individus des aquariums T1 et T2 (log-rank test : p-values < 0.04). D'autre part, on observe une augmentation du LT75 pour les nouveau-nés des aquariums exposés passant de 4.75 et 4 jours pour avril et novembre 2022 à 7 et 6 jours pour février et mai 2023 (Annexe T13). D'autre part, en mai 2023, seuls 63% de nouveau-nés issus des aquariums exposés présentent un temps de survie inférieur ou égal à 3 jours contre 85% pour les nouveau-nés des aquariums non exposés (Annexe T13).

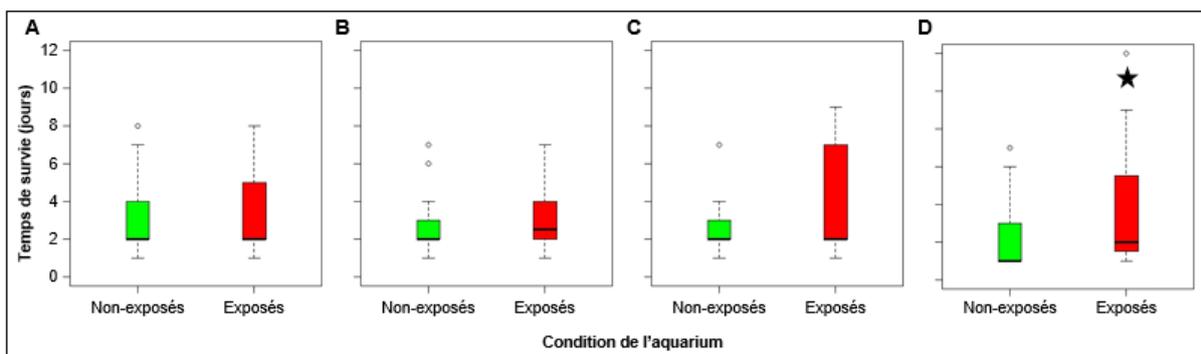


Figure V-2 : Évolution de la tolérance au Cd (distribution des temps de survie individuels pendant l'exposition à 20 µg/L de Cd) chez les nouveau-nés du lot du 22 février 2022 au cours de l'exposition multigénérationnelle. La sensibilité au Cd a été testée (A) en avril 2022 (F1), (B) en novembre 2022 (F1/F2), (C) en février 2023 (F2/F3) et (D) en mai 2023 (F3).

La sensibilité au Cd a également été testée en février 2023 (Figure V-3A) et en mai 2023 (Figure V-3B) pour les nouveau-nés issus du lot du 03 octobre 2022. A ces deux dates, on n'observe aucune différence entre les nouveau-nés issus des aquariums exposés et non exposés (log-rank test : p-value = 0.5 et p-value = 0.9, respectivement).

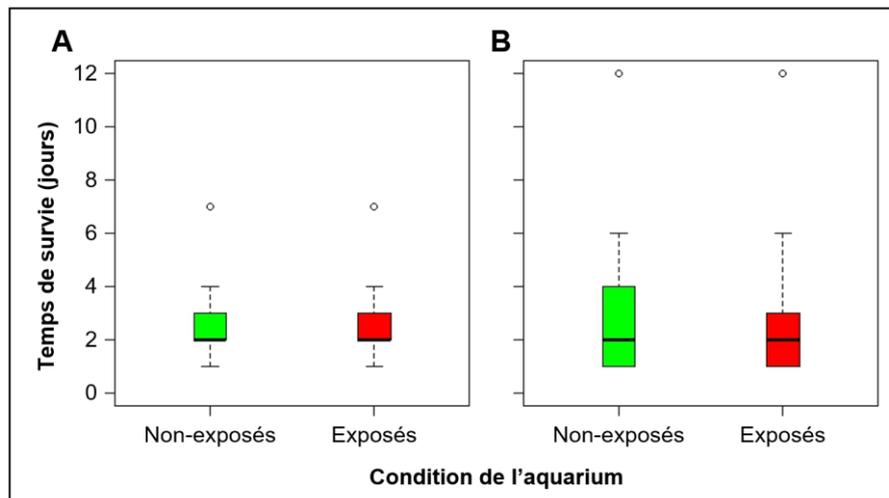


Figure V-3 : Évolution de la tolérance au Cd (distribution des temps de survie individuels pendant l'exposition à 20 µg/L de Cd) chez les nouveau-nés du lot du 03 octobre 2022 au cours de l'exposition multigénérationnelle. La sensibilité au Cd a été testé (A) en février 2023 (F1) et (B) en mai 2023 (F1/F2).

Ces résultats montrent qu'il faut attendre plusieurs générations avant d'observer une acquisition de tolérance au Cd lors d'une exposition contrôlée à des concentrations représentatives de l'environnement. En effet, aucune différence de sensibilité au Cd n'a été observée chez les générations F1 et début F2 des deux lots testés. Les niveaux de tolérance au Cd observés en fin de génération F2 et dans la génération F3 ne sont pas très élevés mais sont retrouvés dans plus d'un réplica d'aquarium contaminé en F3 (Figure V-2C et D). Cela souligne l'importance d'étudier les phénomènes d'acquisition de tolérance sur le long terme et au-delà d'une seule génération, et d'étudier la mise en place de ces phénomènes chez les espèces non modèles. En effet, chez l'espèce *Daphnia magna* par exemple, la tolérance au Cd acquise par acclimatation apparaît dès la première génération (Guan and Wang, 2006b; Chen et al., 2016).

2.3. Variabilité des traits d'histoires de vie

2.3.1. Taille des femelles

Pour le lot du 22 février 2022 et du 03 octobre 2022, la taille des femelles a été mesurée dans deux aquariums contaminés et deux aquariums non contaminés en février (Figure V-4A et Figure V-5A) et en mai 2023 (Figure V-4B et Figure V-5B). Les femelles du lot du 22 février 2022 appartiennent à la génération F2 lors des mesures réalisées en février 2023 et à la génération F2/F3 pour les mesures de mai 2023. Pour le lot du 03 octobre 2022, les femelles appartiennent à la génération F0 et à la génération F1 pour les tests de février et mai 2023, respectivement.

Les résultats montrent que pour chacune des deux dates du premier lot, aucune différence significative entre les femelles des aquariums contaminés et non contaminés a été observée (ANOVA : p-value = 0.08 et p-value = 0.39, respectivement, Figure V-5). Toutefois, lorsque l'on regarde dans le détail les résultats obtenus en mai 2023, on observe une différence significative entre les femelles de l'aquarium non contaminé T1 et celles de l'aquarium contaminé C2 (Wilcoxon-test : p-value = 0.02).

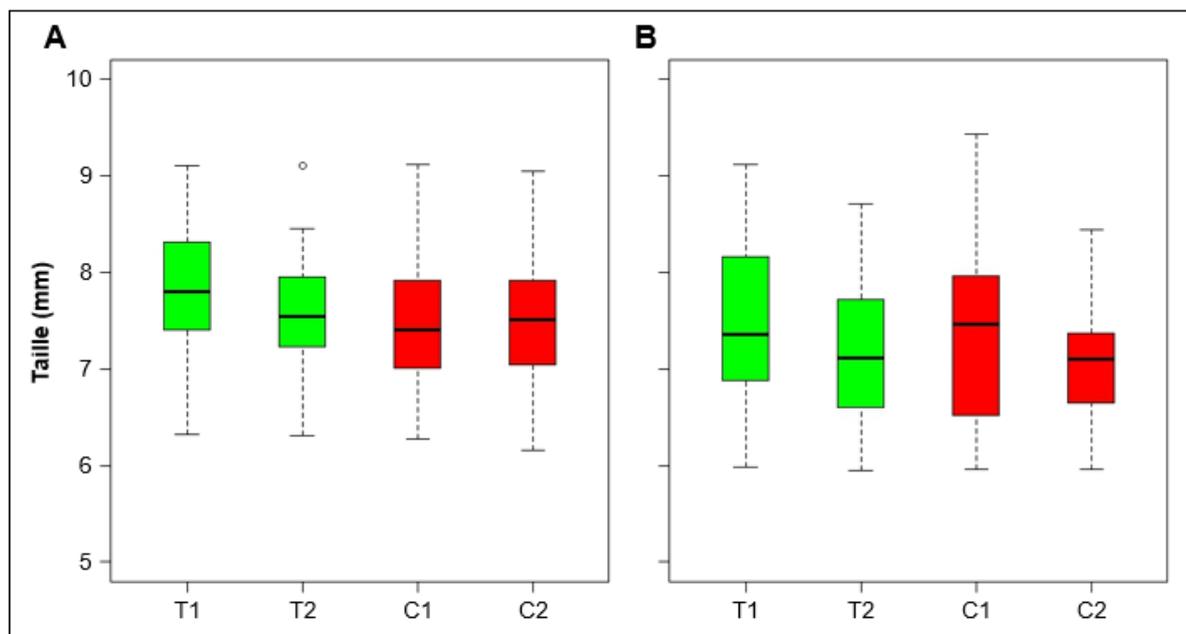


Figure V-4 : Taille des femelles du lot du 22 février 2022 au cours de l'expérimentation multigénérationnelle. La taille a été mesurée chez 30 femelles dans deux aquariums non contaminés et deux aquariums contaminés en (A) février 2023 (femelles F2) et (B) mai 2023 (femelles F2/F3).

Pour le lot du 03 octobre 2022, aucune différence significative n'a été observée entre les femelles des aquariums contaminés et non contaminés en février 2023 (ANOVA : p-value = 0.26) (Figure V-5A). En mai 2023, il existe une interaction entre le facteur aquarium et le facteur condition (ANOVA : p-value = 8.10^{-4}). Toutefois, aucune différence n'a été observée entre les aquariums contaminés et non contaminés (test HSD de Tukey : p-value = 0.85).

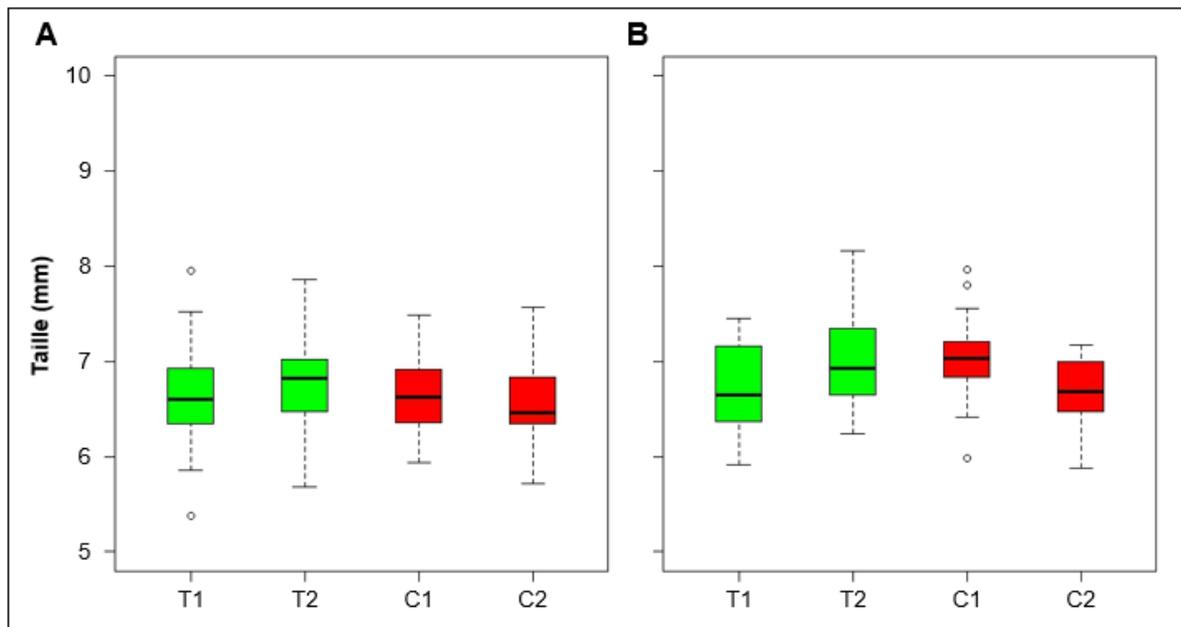


Figure V-5 : Taille des femelles du lot du 03 octobre 2022 au cours de l'expérimentation multigénérationnelle. La taille a été mesurée chez 30 femelles dans deux aquariums non contaminés et deux aquariums contaminés en (A) février 2023 (femelles F0) et (B) mai 2023 (femelles F1).

Le Cd ne semble pas affecter la taille des femelles. Chez les populations naturelles, nous avons observé une plus petite taille des femelles en sortie de terrain chez les populations tolérantes au Cd (voir Publication n°2). Après 6 mois au laboratoire, ces mêmes populations ont perdu leur tolérance au Cd mais les femelles présentent toujours une plus petite taille vis-à-vis des populations naïves déacclimatées (voir 2.3 – Chapitre III). Ainsi, nos observations semblent confirmer que la modification de la taille des femelles observée chez les populations naturelles est liée à une adaptation des traits d'histoire de vie acquise sur le long terme puisqu'il semblerait que l'on commence à voir un décalage des tailles en génération F2/F3.

2.3.2. Taux de croissance

Les taux de croissance ont été mesurés à une seule date pour le lot du 22 février 2022 et du 03 octobre 2022 dans deux aquariums contaminés et dans deux aquariums non contaminés.

La Figure V-6 présente les résultats des taux de croissance du lot du 22 février 2022. Après 45 jours, il existe une interaction entre le facteur aquarium et le facteur condition (ANOVA : p -value = 3.10^{-5}). Malgré cette interaction, nous avons pu conclure que les jeunes des aquariums contaminés grandissent moins vite que les jeunes des aquariums non contaminés (test HSD de Tukey : p -value = 5.10^{-7}). En effet, au bout de 45 jours le gain de taille est de 2.22 mm et 1.25 mm dans les deux aquariums non contaminés (Figure V-6A) alors qu'il est de 0.75 mm et 1.04 mm dans les aquariums contaminés (Figure V-6B).

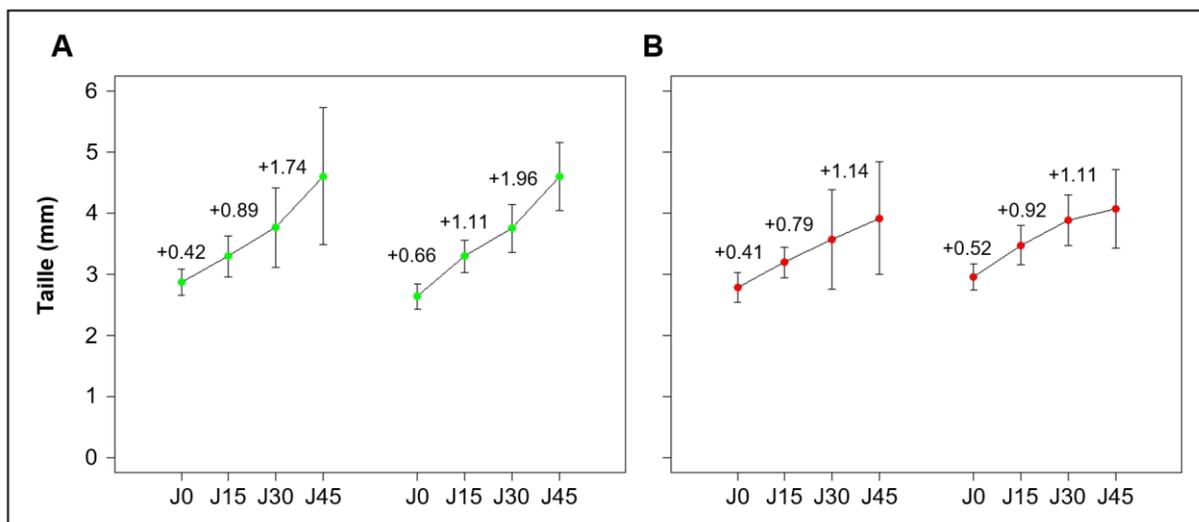


Figure V-6 : Courbe de croissance chez des jeunes du lot du 22 février 2022 au cours de l'exposition multigénérationnelle. Le suivi de croissance a été réalisé en mai 2023 (génération F3) dans (A) deux aquariums non contaminés et (B) deux aquariums contaminés. Pour chacune des figures, le premier point représente la taille moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus à J0, suivi du point de la taille moyenne \pm l'écart-type à J15, J30 et J45. Les valeurs correspondent à la moyenne (mm) des gains de taille mesurée au cours du test calculé en soustrayant la taille moyenne à J0. Les couleurs rouge et verte correspondent au statut de contamination de l'aquarium (rouge : contaminé ; vert : non contaminé).

De même, pour le lot du 03 octobre 2022 (Figure V-7), les jeunes provenant des aquariums contaminés grandissent moins vite que les jeunes des aquariums non contaminés (ANOVA : p -value = 3.10^{-3}). Le gain de taille est plus faible chez les individus contaminés, il est de 0.75 mm et 1.04 mm (Figure V-7B) contre 2.22 et 1.25 chez les individus des aquariums non contaminés (Figure V-7A).

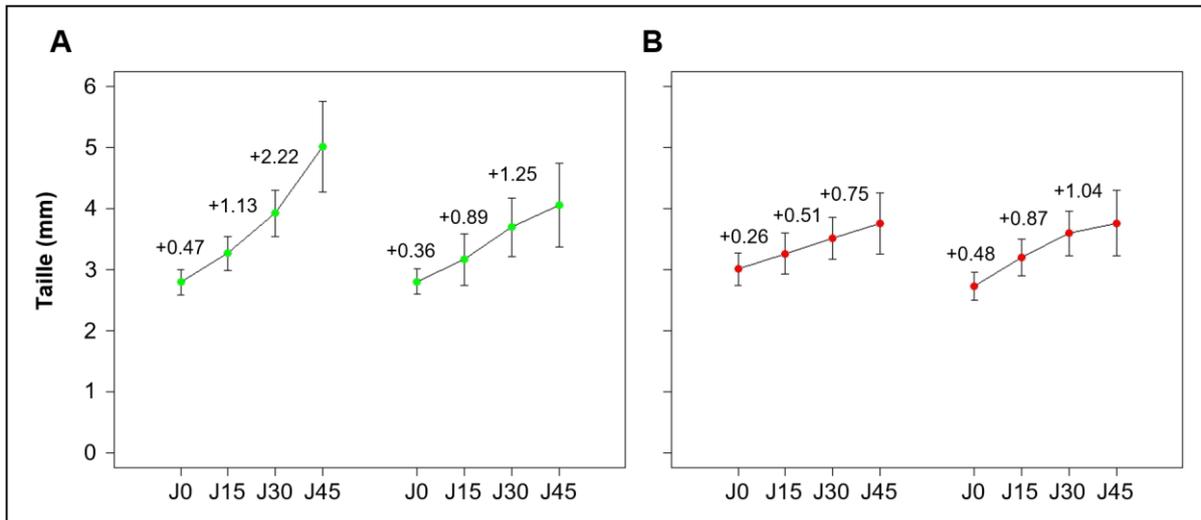


Figure V-7 : Courbe de croissance chez les jeunes du lot du 03 octobre 2022 au cours de l'exposition multigénérationnelle. Le suivi de croissance a été réalisé en mai 2023 (génération F1) dans (A) deux aquariums non contaminés et (B) deux aquariums contaminés. Pour chacune des figures, le premier point représente la taille moyenne \pm l'écart-type (mm) des individus à J0, suivi du point de la taille moyenne \pm l'écart-type à J15, J30 et J45. Les valeurs correspondent à la moyenne (mm) des croissances individuelles mesurées au cours du test calculées en soustrayant la taille moyenne à J0. Les couleurs rouge et verte correspondent au statut de contamination de l'aquarium (rouge : contaminé ; vert : non contaminé).

Les individus testés appartiennent à la génération F3 pour le lot du 22 février 2022 qui est tolérante au Cd et à la génération F1 pour le lot du 03 octobre 2022 qui ne présente pas de tolérance au Cd. Ainsi, les résultats observés nous confortent dans l'hypothèse d'un effet toxique du Cd sur la croissance des gammarès. En effet, les jeunes des aquariums contaminés grandissent moins vite que ceux des aquariums non contaminés, peu importe le lot testé, n'étant donc pas lié à la tolérance au Cd.

2.3.3. Taux d'alimentation

La consommation alimentaire a été évaluée une seule fois, en mai 2023 pour les deux lots étudiés. Pour cela, 10 gammares mâles homogènes en taille de chaque aquarium (provenant de 2 aquariums contaminés et 2 aquariums non contaminés pour chacun des deux lots) ont été placés dans une cage avec 10 disques de feuilles calibrés en taille (selon le protocole décrit dans le paragraphe 6.3 du Chapitre II). Chaque cage a été replacée dans l'aquarium correspondant où les mâles ont été prélevés pendant 7 jours. Les mâles utilisés pour le lot du 22 février 2022 appartiennent à la génération F2 et ceux du lot du 03 octobre 2022 à la génération F0.

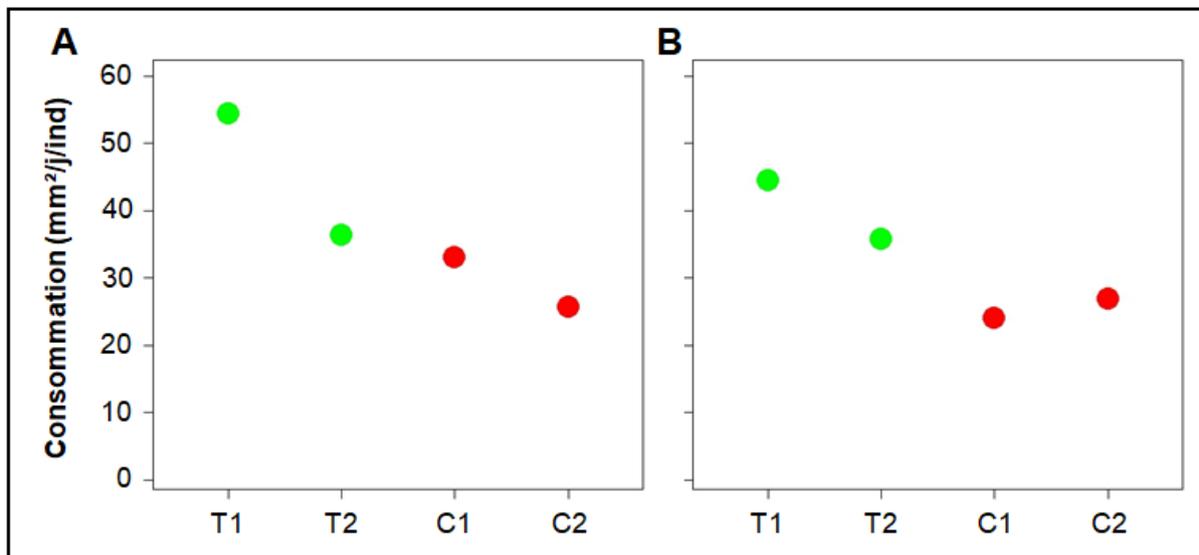


Figure V-8 : Consommation alimentaire en mm²/jour/individu chez les mâles dans deux aquariums non contaminés (vert) et deux aquariums contaminés (rouge) du lot du (A) 22 février 2022 (mâles F2) et (B) 03 octobre 2022 (mâles F0).

La Figure V-8 présente la consommation alimentaire chez les mâles obtenus pour les différents aquariums des deux lots. Dus au manque de données pour chaque lot, nous avons comparé la consommation alimentaire entre les témoins des deux lots et entre les contaminés des deux lots. Ces résultats préliminaires ont montré que la consommation alimentaire était la même entre les 4 aquariums témoins (Student-test : p-value = 0.67) et entre les 4 aquariums contaminés (Student-test : p-value = 0.47).

Ainsi, pour comparer la consommation alimentaire entre les aquariums contaminés et les aquariums non contaminés, les données des deux lots ont été regroupés (Figure V-9). Les résultats montrent une consommation alimentaire significativement inférieure chez les mâles des aquariums contaminés au Cd par rapport à ceux des aquariums non contaminés (Student test : p -value = 0.03). Pour les deux lots, les organismes n'appartiennent pas aux générations tolérantes. Ainsi, la modification de la consommation alimentaire n'est pas dû à un coût de tolérance et semble être liée à un effet toxique direct du Cd.

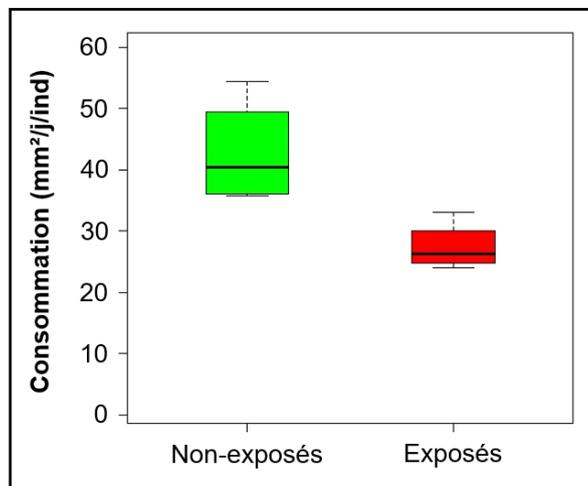


Figure V-9 : Consommation alimentaire en mm²/jour/individu chez les mâles des deux lots réunis (lot du 22 février 2022 et lot du 03 octobre 2022).

Conclusion du Chapitre V

Ce dernier chapitre de résultats constitue la partie expérimentale d'exposition au laboratoire. Cette partie ne présente que des résultats préliminaires obtenus au cours de l'exposition multigénérationnelle au laboratoire.

Les résultats obtenus dans la première partie ont permis de confirmer que **seule une exposition long-terme peut induire une modification de la sensibilité** chez les populations de *G. fossarum*. En effet, aucune acquisition de tolérance n'a été observée chez les adultes après une exposition durant 21 jours.

La deuxième partie, consacrée à l'exposition multigénérationnelle, a permis de mettre en évidence qu'il fallait **au moins trois générations pour observer une modification de la sensibilité toxicologique** chez une population naïve de *G. fossarum*, confirmant une nouvelle fois la nécessité d'une exposition long terme dans l'acquisition de la tolérance au Cd. D'autre part, nous avons également observé des modifications des traits d'histoire de vie, notamment une **inhibition de l'alimentation et de la croissance**. Mais nous n'avons observé **aucune modification de la taille des femelles**. Ces résultats nous amènent donc à rediscuter des mécanismes mis en place dans la modification des traits d'histoire de vie (effet toxique direct, coût de tolérance ou adaptation de l'histoire de vie) mais également de mettre en lumière l'importance d'aller étudier les modifications de sensibilité au-delà d'une seule génération, puisque dans notre cas, nous observons un délai dans l'apparition des effets, avec des hétérogénéités entre répliques et lors d'exposition.

Chapitre VI : Discussion générale

1. Pertinence du jeu de populations établi pour étudier les effets long terme induits par l'exposition chronique cadmique en milieu naturel

L'enjeu de cette thèse a notamment été de travailler avec des populations naturelles de l'espèce *G. fossarum* appartenant à la même lignée cryptique (*G. fossarum* B, BIN-ACG7784) et vivants dans des milieux présentant un gradient de contamination biodisponible en Cd. Le choix des populations utilisées dans ce manuscrit a été fait à partir du site des Ardillats identifié dans une précédente thèse réalisée au laboratoire d'écotoxicologie INRAE (Vigneron, 2015). Sur ce site, une population de *G. fossarum* habite un cours d'eau naturellement contaminé par le Cd du fait du contexte géochimique local. Sur ce site, la forte biodisponibilité du Cd est amplifiée par la faible dureté de l'eau sur le substrat cristallin présent dans la région du Beaujolais. Ainsi, à partir de cette population et à l'aide de précédentes études de prospection réalisées au laboratoire d'écotoxicologie INRAE (Besse et al., 2013; Ciliberti et al., 2017; Alric et al., 2019), nous avons sélectionné onze nouvelles populations de *G. fossarum* dans des rivières de tête de bassin versant, certains sur des substrats cristallins dans la région du Beaujolais ainsi que dans les Vosges, et quatre autres substrats sédimentaires en Bourgogne ou dans les pré-Alpes. Recourant à la méthode de biosurveillance active développée chez le gammare (Alric et al., 2019) aujourd'hui largement appliquée en surveillance opérationnelle par les Agences de l'eau (Geffard et al., 2021), la caractérisation des niveaux de Cd biodisponible chez ces quinze populations naturelles a permis de mettre en évidence trois populations vivants dans des milieux chroniquement exposés par le Cd (c'est-à-dire présentant des niveaux de Cd biodisponible supérieure à la valeur BBAC défini pour le Cd, $BBAC_{Cd} = 0.30 \mu\text{g/g}$), quatre populations expérimentant des niveaux intermédiaires de contamination (c'est-à-dire présentant des niveaux de Cd biodisponible proche de la valeur BBAC) et huit populations vivants dans des milieux non contaminés (c'est-à-dire présentant une $BBAC_{Cd} < 0.20 \mu\text{g/g}$). Bien que la source d'exposition au Cd dans ces cours d'eau soit d'origine naturelle en raison du contexte géochimique, les sites Ardillats, Vernay et Marchampt figurent parmi les 10% des sites présentant des niveaux de contamination biodisponible en Cd les plus importants enregistrés dans l'ensemble des cours d'eau français, d'après les données de surveillance nationale rapportées dans Alric et al. (2019). Aujourd'hui, la norme européenne de qualité

environnementale pour le Cd dans les eaux douces ($< 40 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$) est fixée à $0.08 \text{ }\mu\text{g/L}$ (Directive 2008/105/CE). La réglementation actuelle semble donc protéger les effets micro-évolutifs induits par une exposition à long terme. Toutefois dans ces travaux de thèse, nous avons identifié des processus micro-évolutifs ou transgénérationnels sur trois sites contaminés, et notamment sur le site des Ardillats où la concentration de Cd dissous est seulement de $0.045 \text{ }\mu\text{g/L}$ pour une dureté de l'eau de $30 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ (Vigneron et al., 2015). Ainsi, nos résultats renforcent la recommandation de De Coninck et al. (2014) d'aller étudier les effets micro-évolutifs à des concentrations inférieures aux seuils de protection actuellement définis comme étant une contamination environnementale acceptable. D'autre part, les résultats des tests de bioaccumulation (Annexe T1) ont également mis en évidence l'existence d'une contamination biodisponible ponctuelle en Pb sur les sites classés comme « intermédiaires » ou « contaminés » pour le Cd. Toutefois, le contraste de contamination en Pb entre les sites contaminés et non contaminés est beaucoup plus faible que pour le Cd en ce qui concerne les concentrations moyennes obtenues dans les différents sites au fil du temps. En effet, les niveaux de contamination biodisponible en Pb retrouvés dans ces sites se situent dans la moyenne des niveaux observés dans les rivières françaises (Alric et al., 2019). Comme pour le Cd, la contamination par le Pb peut être liée au fond géochimique local des roches cristallines dans les régions du Beaujolais et des Vosges. Dans l'ensemble, les trois populations présentant une contamination historique et monosubstance constituent des cas d'étude uniques pour étudier les processus écotoxicologiques agissant en cas d'exposition multigénérationnelle au Cd dans le cadre de la variabilité environnementale. Néanmoins, il convient d'être vigilant avant de transposer nos résultats à des situations de contamination multiple rencontrées dans des contextes anthropisés, situations principalement étudiées dans le contexte de l'évaluation du risque. Par exemple, plusieurs études ont montré que la tolérance aux insecticides chez des populations d'amphipodes d'eau douce n'était pas systématiquement retrouvée dans des contextes de contamination urbaine ou agricole (Major et al., 2020; Švara et al., 2021; Grethlein et al., 2022; Schneeweiss et al., 2023), alors que celle-ci a clairement été démontrée dans de multiples populations de terrain de ce même taxon (Weston et al., 2013; Shahid et al., 2018a; Gamble et al., 2023).

En milieu naturel, les études qui s'intéressent aux effets long-terme de l'exposition aux contaminants comparent généralement une population contaminée vs une population non contaminée. De plus, l'un des principaux verrous de ces études dans l'interprétation des résultats est la présence de nombreux facteurs de confusion, en plus du contaminant, pouvant être responsable de l'observation de la modification des traits d'histoire de vie ou de la sensibilité toxicologique (Coutellec and Barata, 2013). Ici, nous avons voulu améliorer les connaissances sur les effets long terme induits par une exposition chronique au Cd en milieu naturel chez l'espèce *G. fossarum* en comparant plusieurs sites présentant un gradient de contamination tout en s'affranchissant des facteurs de confusion. Ainsi, les sites ont été choisis sur des petits cours d'eau de tête de bassin versant, dans des contextes naturels ou semi-naturels, garantissant un faible niveau de sources de contamination anthropiques ou d'altération d'habitats, ainsi qu'une certaine homogénéité des caractéristiques hydromorphologiques. Les résultats de la caractérisation des paramètres d'habitats des sites d'études ont confirmé que les rivières présentaient des paramètres hydromorphologiques et physico-chimiques homogènes (publication n°2, chapitre III). Les cours d'eau sélectionnés sont tous de petites rivières situées dans des milieux naturels, caractérisées par de faibles débits, avec une forte proportion de faciès lotiques et une grande diversité de substrat, et présentant un bon état physico-chimique des masses d'eau pour les paramètres température, oxygène, pH au regard des normes de qualité du SEQ-eau national. Seules trois rivières non contaminées sortent du lot : le Sérán, la Seine et la Reigne. Par rapport aux autres rivières, le Sérán et la Reigne sont des rivières de plus grande taille (rang de Strahler de 4, largeur plein bord supérieure à 10 mètres) et la Seine présente un faciès plus lentique. Globalement, les rivières non contaminées présentent toutes une conductivité plus élevée que les rivières de statut intermédiaire et contaminé. Cette observation était attendue du fait que la dureté (synonyme de conductivité dans ces milieux en contexte de tête de bassin naturels) influence la biodisponibilité des métaux lourds pour les organismes aquatiques et en particulier chez le gammaré (Lebrun et al., 2011; Urien et al., 2015). Dans notre jeu de sites nous avons toutefois pu inclure quelques rivières non contaminées, notamment Katlen et Vancelle qui présente des niveaux de conductivité proches de ceux trouvés dans les rivières intermédiaires et contaminées. Ainsi, grâce à l'utilisation de sites homogènes en termes de paramètres d'habitats physiques, et au gradient non confondu de conductivité avec le niveau

de contamination cadmique biodisponible, on a pu s'assurer que les modifications observées (sensibilité toxicologique, traits d'histoire de vie et/ou expression de gène de la métallothionéine) au cours de ces travaux de thèse étaient directement liées au gradient d'exposition au Cd des populations.

Enfin, à la différence de la majorité des études écotoxicologiques réalisées au laboratoire, nous avons relevé le défi de mettre en place une exposition multigénérationnelle au Cd chez une espèce non modèle ayant un cycle de vie long afin d'étudier les effets long terme d'une exposition chronique en utilisant des concentrations représentatives des niveaux d'imprégnation des populations naturelles. Malgré de premières difficultés dans le maintien des élevages sur le long terme au laboratoire et dans la biodisponibilité du Cd (dû à la forte teneur en calcaire de l'eau du laboratoire), nous sommes parvenus à mettre en place cette expérimentation et avons acquis des résultats jusqu'à la troisième génération d'individus. Cela semble peu comparé à d'autres espèces telles que les daphnies, mais ceci a été un réel défi puisqu'il faut environ 4 à 5 mois pour obtenir une génération chez l'espèce *G. fossarum*.

2. La tolérance au Cd chez les populations de *G. fossarum* relève de processus d'acclimatation plastique et d'hérédité non génétique

Les travaux décrits dans les Chapitres III, IV et V ont permis d'avancer sur la compréhension du caractère plastique de la tolérance observée chez l'espèce *G. fossarum* lors d'exposition long terme au Cd et dans la transmission non génétique de celle-ci à la descendance.

Généralisation des phénomènes de tolérance chez les populations de *G. fossarum*

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse ont permis de généraliser l'observation d'acquisition de tolérance au Cd chez différentes populations de l'espèce *G. fossarum* lors d'exposition naturelle multigénérationnelle à ce métal. En effet, nous avons retrouvé un niveau de tolérance au Cd chez les adultes (Figure VI-1) corrélé au niveau d'exposition. D'autre part, comme précédemment souligné dans Vigneron et al. (2015), la tolérance au Cd est relativement modérée malgré les niveaux élevés d'exposition des

populations Ardillats, Vernay et Marchampt par rapport au gradient national de contamination par le Cd (10% des sites les plus contaminés). En effet, nous avons observé un facteur de tolérance d'environ deux en ce qui concerne les LT50 chez les populations exposées par rapport aux populations naïves.

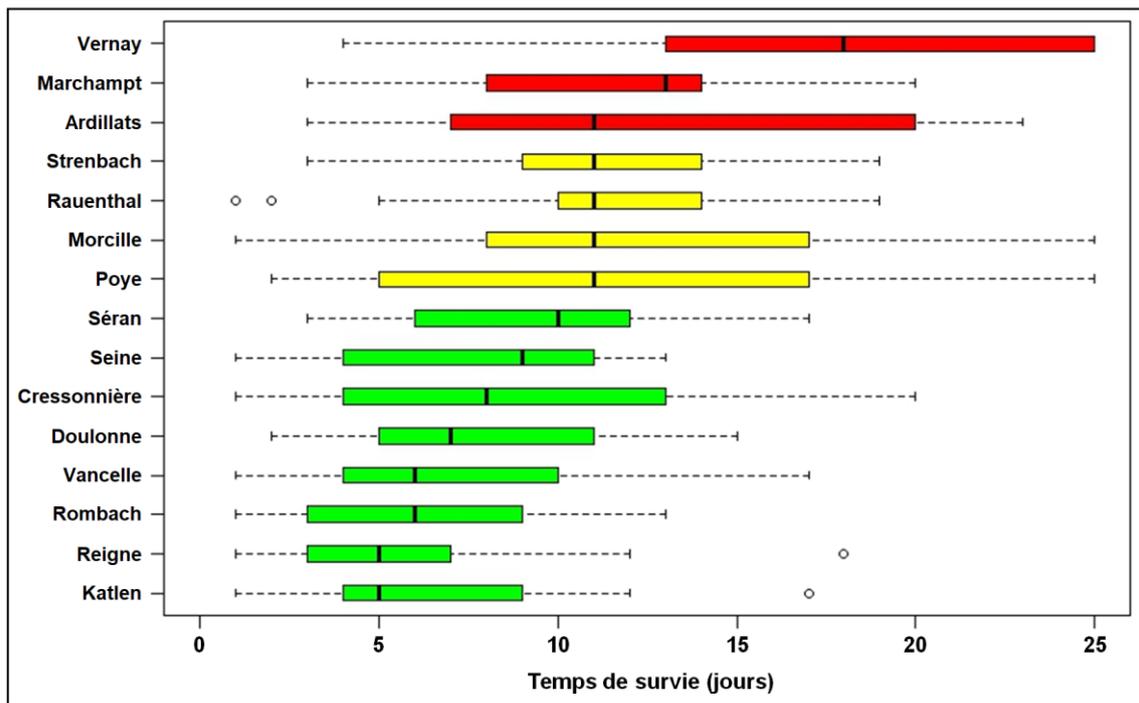


Figure VI-1 : Sensibilité au Cd des adultes des quinze populations de ce manuscrit, évaluée par la distribution des temps de survie individuels après exposition à 80 µg/L de Cd au laboratoire (résultats du printemps 2022), un jour après leur collecte sur le terrain. Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent aux statuts contaminé, intermédiaire et non contaminé en Cd des populations.

Ces résultats sont en accord avec les facteurs de tolérance au Cd précédemment rapportés dans les populations de terrain d'invertébrés aquatiques exposés à la contamination métallique, tels que les décapodes (Chiodi Boudet et al., 2013), les chironomes (Groenendijk et al., 2002 ; Pedrosa et al., 2017) ou les annélides (Levinton et al., 2003). Cela contraste avec les facteurs de résistance supérieurs à 500 rapportés pour les insecticides pyréthrinoïdes et organophosphorés chez l'amphipode *Hyalella azteca*, pour lesquels une base génétique a clairement été démontrée par des études moléculaires (Major et al., 2020 ; Weston et al., 2013). À l'inverse, les facteurs de tolérance observée chez nos populations se situe dans la fourchette

des facteurs de tolérance retrouvés chez les populations de *G. pulex* exposées aux néonicotinoïdes dans les cours d'eau agricoles d'Allemagne (Shahid et al., 2018a ; Siddique et al., 2020), tolérance qui a été supposée être la combinaison de phénomènes d'acclimatation, d'effets épigénétiques et d'évolution génétique (Siddique et al., 2021).

D'autre part, le suivi temporel des niveaux de tolérance dans les populations Ardillats et Marchampt a montré que la tolérance est retrouvée à la fois chez les organismes adultes, les jeunes et les nouveau-nés des deux populations, confirmant la transmissibilité de la tolérance à la descendance déjà identifiée par Vigneron et al. (2015, 2019).

L'acclimatation explique la tolérance au Cd chez les populations de G. fossarum

La tolérance au Cd peut être transitoirement perdue chez les populations chroniquement exposées. Chez la population Marchampt par exemple, la tolérance au Cd n'a pas été retrouvée à toutes les dates de prélèvement, peu importe la classe d'âge testée. Cette variation temporelle des niveaux de tolérance a été attribuée à des phénomènes d'acclimatation phénotypique en réponse à des niveaux variables d'exposition environnementale. Deux autres hypothèses sont retrouvées dans la littérature pour expliquer la variation des niveaux de tolérance : (1) la dilution génétique épisodique liée aux flux migratoires des populations vivant dans des milieux non contaminés et (2) une diminution de la possibilité de détecter des différences de sensibilité individuelles dû à la sélection des individus tolérants survivant après un stress trop fort. Dans notre cas, ces deux hypothèses ont pu être écartées puisque (1) nous avons sélectionné des sites situés en amont des cours d'eau avec une imprégnation géochimique par le Cd affectant l'ensemble de la zone amont et (2) les niveaux d'exposition aux contaminants sur le terrain n'entraînent pas de mortalité à court terme chez les gammarès. Ceci a notamment été confirmé par les nombreux encagements réalisés au cours de l'étude et par les très faibles niveaux de concentration de Cd dans l'eau retrouvée sur le site des Ardillats (concentration moyenne en Cd de 0.045 µg/L, Vigneron et al. (2015). Ainsi, l'hypothèse d'une covariation entre les niveaux d'exposition et les niveaux de tolérance ont été privilégiés pour expliquer la variabilité des niveaux de tolérance au Cd observée entre populations mais également pour expliquer la variabilité temporelle de la tolérance observée dans la population Marchampt.

D'autre part, une perte de la tolérance au niveau individuel a également été observée. En effet, les résultats obtenus lors des expérimentations de déacclimatation réalisées au laboratoire ont mis en évidence une baisse des temps de survie chez les jeunes et les adultes des populations contaminées. Cette baisse correspond à une perte des niveaux les plus élevés de tolérance individuelle, ainsi qu'à une diminution des niveaux les plus bas jusqu'à la gamme des temps de survie observée dans les populations non contaminées. L'hypothèse d'une acclimatation plastique à la contamination est l'hypothèse privilégiée dans la tolérance observée dans les populations de gammares chroniquement exposées.

Dans l'ensemble, les résultats des expérimentations de déacclimatation en laboratoire, ainsi que l'observation de niveaux de tolérance variables sur le terrain, permettent de conclure qu'une acclimatation phénotypique non génétique explique la tolérance au Cd chez les populations exposées de *G. fossarum*. D'autre part, nous n'avons observé aucune acquisition de tolérance au Cd chez des gammares adultes après une exposition au Cd durant 21 jours. Ces résultats montrent donc que la plasticité de la tolérance au Cd observée chez les populations naturelles ne semble pas être uniquement due à une acclimatation physiologique et semble être liée à un conditionnement long terme des populations.

Les effets parentaux dans la transmission intergénérationnelle de la tolérance au Cd

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse ont également montré l'importance des effets parentaux dans la transmission non génétique de la tolérance au Cd à la descendance déjà identifiée dans les travaux de Vigneron (2015). Tout d'abord, nous avons écarté l'hypothèse d'une sélection embryonnaire ou d'un phénomène de plasticité développementale lors d'une exposition de géniteurs naïfs à des concentrations pertinentes pour l'environnement durant un cycle de reproduction au laboratoire (Publication n°1). De même, nous avons également montré que l'exposition au cours d'un cycle de gamétogénèse n'était pas suffisante pour induire une tolérance accrue au Cd chez les descendants. L'exposition à long terme au Cd des géniteurs est donc nécessaire pour mettre en place les effets parentaux impliqués dans la transmission non génétique de la tolérance à la progéniture. Cette hypothèse étant cohérente avec les résultats obtenus au cours de l'expérimentation d'exposition multigénérationnelle au laboratoire où nous

avons observé qu'il fallait attendre trois générations pour observer un début d'acquisition de tolérance chez les individus exposés. De même, cette hypothèse est en accord avec les précédentes études de génétiques quantitatives qui ont conclu que le caractère héritable de la sensibilité au Cd était négligeable dans les populations naturelles de *G. fossarum*, rendant peu probable l'hypothèse de la sélection génétique de génotypes résistants chez cette espèce (Chaumot et al., 2009 ; Vigneron et al., 2016). Cette hypothèse d'un déterminisme non génétique de la tolérance au Cd est également fortement supportée par la perte de la tolérance observée au laboratoire chez les descendants des populations tolérantes. Ces résultats ont mis en évidence que la tolérance au Cd observée chez les nouveau-nés des populations contaminées dépend de l'exposition parentale. En effet, en accord avec les résultats obtenus par Vigneron et al. (2019), qui suggèrent une plasticité intergénérationnelle de la tolérance au Cd dans la population Ardillats, nous avons observé une absence de nouveau-nés sensibles dans les deux premières cohortes (première cohorte exposée sur le terrain, deuxième cohorte issue de la fécondation des gamètes sur le terrain) des populations Ardillats, Vernay et Marchampt alors qu'ils étaient présents dans la troisième cohorte (cohorte n'ayant jamais été exposée au Cd). D'autre part, les expérimentations de croisement entre géniteurs issus de populations tolérantes et sensibles ont montré que les deux parents peuvent transmettre la tolérance à leur descendance. Cela invalide les hypothèses préliminaires de Vigneron et al. (2019) sur des effets purement maternels dans l'explication de l'hérédité non génétique de la tolérance au Cd observée chez la population Ardillats et montre l'importance de la prise en compte des effets paternels, souvent oubliés. Combinés au caractère transitoire de la tolérance observée lors de l'arrêt de l'exposition au Cd, ces résultats ouvrent l'hypothèse de l'existence de mécanismes épigénétiques dans l'acquisition et la transmission de la tolérance chez les populations exposées. Dans le cas de modification épigénétique, cette transmission peut par exemple se faire au travers de modifications de la chromatine (par exemple : (dé)méthylation de l'ADN, modification des histones), de transferts d'ARN non codants, de transferts de différents facteurs de régulation ou de défense (Ho and Burggren, 2010; Bonduriansky et al., 2012) ou encore par le transfert de messages épigénétiques encodés dans la chromatine des spermatozoïdes (Teperek and Miyamoto, 2013; Teperek et al., 2016). Ainsi l'acquisition de la tolérance au Cd chez la

descendance résulte très probablement d'effets parentaux soutenus par des variations épigénétiques transmises symétriquement par les voies paternelles et/ou maternelles.

Pertinence de l'expérimentation multigénérationnelle conduite au laboratoire dans le cadre de l'évaluation du risque écologique

Relevant le défi d'un temps expérimental conséquent compte tenu de la durée du cycle de vie de *G. fossarum*, nous sommes parvenus à mettre en place une exposition multigénérationnelle au laboratoire à partir d'une population d'organisme naïf. Cette expérimentation, pertinente d'un point de vue environnemental par l'utilisation d'une concentration d'exposition similaire à celles retrouvées dans les milieux aquatiques (confirmé par la mesure des niveaux de Cd bioaccumulés) et par l'utilisation d'une espèce représentative des milieux, a notamment permis de confirmer que l'exposition long terme au Cd était nécessaire pour observer un décalage des sensibilités entre les individus exposés et non exposés. Nous avons notamment noté qu'il fallait attendre trois générations pour observer un début d'acquisition de tolérance chez les populations exposées. Cette expérimentation permet également de montrer l'importance de la réalisation d'expositions sur plusieurs générations dans le cadre de l'évaluation des risques écologiques afin de prendre en compte les effets longs termes de telles expositions.

Dans le cas de l'évaluation des risques écologiques, le modèle gammare ne semble pas être le plus pertinent afin d'étudier les effets long-terme et l'occurrence des phénomènes plastiques notamment du fait de la durée de son cycle de vie (environ 6 mois pour une génération, à 16°C). Nous avons également pu noter que le maintien de cette espèce au laboratoire sur plusieurs générations peut se révéler compliqué, observant de forts taux de mortalité lors de nos premiers essais. De même, une certaine variabilité entre réplica a pu être observé. Dans le cadre de cette thèse, cette expérimentation nous a permis d'aller étudier au laboratoire ce que l'on a observé en milieu naturel dans le cas de contamination monosubstance. Toutefois, ces cas d'études sont rares en milieu naturel. Les résultats obtenus sont donc difficilement transposables dans les situations de contamination multiples principalement rencontrés dans les milieux naturels et anthropisés. Ainsi, dans le cas de l'évaluation des risques, l'utilisation du modèle *Hyaella azteca* semble être une bonne alternative puisque cette espèce est une espèce représentative des

milieux naturels, largement étudiés (Weston et al., 2013; Poynton et al., 2018; Sever et al., 2020; Fung et al., 2021; Major et al., 2022; Gamble et al., 2023) et présentant un cycle de vie moins long (environ 3 semaines pour une génération, à 24°C).

3. Les métallothionéines : l'un des mécanismes moléculaires sous-jacents à la mise en place de la tolérance au Cd chez *G. fossarum* ?

Dans ces travaux de thèse nous avons voulu avancer sur la compréhension des mécanismes moléculaires pouvant être lié aux phénomènes de tolérance observée chez les populations de *G. fossarum*. Tout d'abord, nous avons profité des ressources moléculaires aujourd'hui disponibles chez les gammaridés (Cogne et al., 2019). À partir de celle-ci, nous avons vérifié l'existence de transcrit codant pour des métallothionéines car de nombreuses études ont montré une augmentation de l'expression de ces protéines ou de l'expression de leurs gènes chez les espèces tolérantes à la contamination (Chapitre I-2.2). Ainsi, nous avons identifié deux transcrits codant pour deux métallothionéines dans le transcriptome de *G. fossarum* (publication n°3, Chapitre IV-1). L'expression de ces transcrits a pu être mesurée dans les branchies et les caeca de cette espèce, deux organes connus pour être impliqués dans la gestion des métaux, lors d'une exposition à des concentrations pertinentes pour l'environnement chez une population de référence (Gestin et al., 2021, 2022). Cette première étude a ainsi permis de mettre en évidence que le transcrit *G. fossarum mt1* était fortement induit lors d'une exposition au Cd dans les deux organes.

*Covariation entre l'expression de *G. fossarum mt1* et la tolérance au Cd chez les adultes*

Suite à l'identification de ces deux métallothionéines chez le gammare, nous nous sommes intéressés au potentiel lien existant entre l'expression de *G. fossarum mt1* et la tolérance au Cd chez les quinze populations de l'étude. Nos résultats ont montré l'existence d'une corrélation entre l'expression de *mt1* et la contamination biodisponible en Cd (Figure VI-2A) ainsi qu'entre l'expression de *mt1* et la tolérance au Cd (Figure VI-2B) avec des niveaux d'expressions plus hauts de *mt1* dans les branchies et les caeca des populations tolérantes. Ces résultats semblent

également montrer l'existence d'un plateau de l'expression de *mt1* dans les caeca. En effet, à partir d'un certain niveau de contamination ou de LT50, l'expression de *mt1* n'augmente plus dans les caeca à la différence des branchies. Cette observation peut être dû aux différents rôles des deux organes dans la gestion des métaux : les caeca ayant un rôle important dans la détoxification et l'élimination alors que les branchies ont un rôle dans l'accumulation et le stockage des métaux (Gestin et al., 2022).

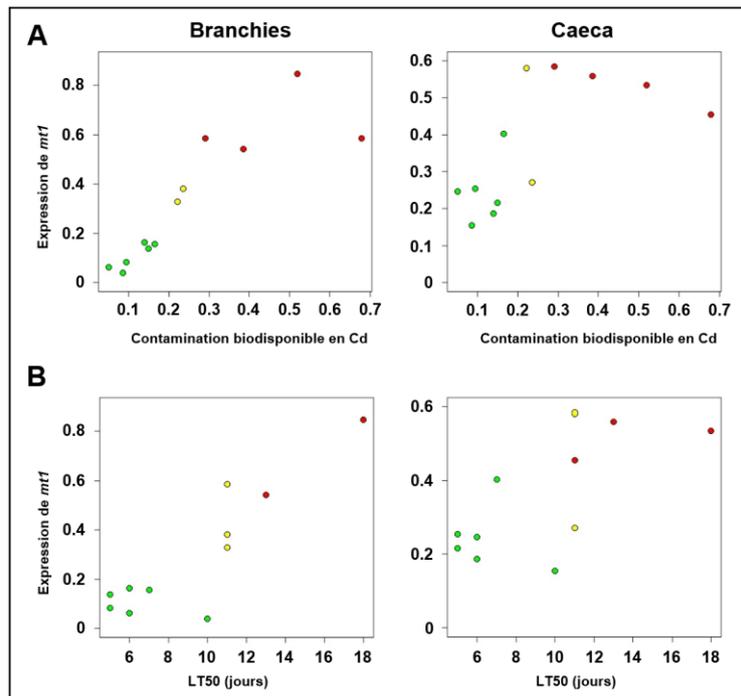


Figure VI-2 : Corrélation entre les niveaux d'expression médian de *G. fossarum mt1* dans les branchies et les caeca et (A) la contamination biodisponible en Cd ($\mu\text{g/g}$ poids sec) ou (B) les temps de survie médians (LT50) de douze populations. Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent au statut contaminé, intermédiaire et non contaminé de chaque population.

En parallèle, la diminution de la tolérance observée chez les adultes des populations contaminées après 2 mois en eau propre au laboratoire s'accompagne d'une diminution de l'expression de *mt1* dans les caeca. De plus, lors d'une courte réexposition au Cd chez ces mêmes populations, l'induction de *mt1* dans cet organe est non significativement différente de celle des populations naïves déacclimatées. En revanche, dans les branchies, aucune diminution n'a été observée chez les populations contaminées après déacclimatation. D'autre part, nous

avons observé une capacité d'induction plus forte de l'expression de *mt1* dans cet organe chez les individus de ces mêmes populations lors d'une réexposition au Cd. Ces résultats suggèrent que la surexpression de *mt1* est responsable, en moins en partie, de la tolérance au Cd observée chez les adultes avec l'implication d'une collaboration entre les deux organes étudiés. Dans les caeca, la baisse observée de l'expression de *mt1* peut s'expliquer par leur rôle dans l'élimination du Cd. Ainsi, l'absence de surexpression de *mt1* chez les populations contaminées déacclimatées et réexposées à une faible dose de Cd peut être mise en relation avec la surexpression de *mt1* dans les branchies observées dans les mêmes conditions : cela permettrait d'avancer un schéma dans lequel un des mécanismes moléculaires de tolérance s'explique par le dialogue entre les branchies qui stockent le Cd dès que l'organisme exposé internalise le Cd du milieu, même à faible concentration, et les caeca qui interviennent pour détoxifier le Cd adsorbé par l'organisme. Cette hypothèse serait en accord avec l'augmentation de la taille des branchies observées chez les populations tolérantes qui permettraient à ces individus de stocker davantage de Cd. De même, ce schéma étant en accord avec les modèles toxicocinétiques décrit chez *G. fossarum* lors d'une exposition au Cd en condition de laboratoire (Gestin et al., 2022). En effet, Gestin et al. (2022) ont notamment mis en évidence que les concentrations de Cd accumulés après une exposition de 7 jours restaient les mêmes dans les branchies après une phase de dépuración de 30 jours, alors qu'elles diminuaient de 66% dans les caeca. D'autre part, chez les crustacés aquatiques, les branchies sont connues comme étant un organe d'accumulation des métaux toxiques qui y sont difficilement éliminés (Henry et al., 2012; McNamara and Faria, 2012; Dayras et al., 2017). De plus, il a été mis en évidence chez deux invertébrés aquatiques que la demi-vie des métallothionéines dans les branchies était plus courte que la demi-vie du Cd (Bebianno and Langston, 1993, 1998). Ainsi, la surexpression de *mt1* observée dans les branchies des gammarés contaminés déacclimatés en milieu propre pourrait venir du fait que les métallothionéines ont une demi-vie plus courte que celle du Cd, obligeant un renouvellement constant en métallothionéines dans le but de repiéger le Cd libre présent dans l'organe, n'entraînant donc pas la diminution de l'expression du gène de la métallothionéine. Cette hypothèse pourrait ainsi expliquer l'observation de la plus grande capacité d'induction de *mt1* dans les branchies des mâles provenant des populations tolérantes déacclimatés après une réexposition au Cd. En effet, l'expression basale du gène de la

métallothionéine n'ayant pas diminué, cela a pu entraîner une réponse plus forte de l'expression de *mt1* lors d'un nouveau stress cadmique. Ces résultats renforcent donc l'hypothèse de l'existence d'une corrélation entre l'expression de *mt1* et la tolérance au Cd avec l'hypothèse d'une collaboration entre les deux organes : les branchies répondant plus rapidement à l'exposition au Cd en stockant de grandes quantités de Cd ce qui permet de ne pas surcharger le caeca, qui est chargé de la détoxification. Une étude réalisée chez des populations naturelles du crabe *Ucides cordatus* a montré que les individus d'une population tolérantes au Cd présentaient des niveaux plus élevés de métallothionéines dans l'hépatopancréas alors que ceux de la population sensible présentaient des niveaux plus élevés dans les branchies lors d'une réexposition au Cd (Duarte et al., 2019). Les auteurs ayant suggérés que l'existence de réponses différentes entre les organes des deux populations pouvait être considérée comme une voie menant à la tolérance au Cd (Duarte et al., 2019). Ainsi, pour compléter nos résultats, il serait également intéressant d'aller étudier la capacité d'induction de *mt1* chez les populations en sortie de terrain.

Bien que les branchies semblent stocker le Cd, les études de toxicocinétiques disponibles se limitent à une observation correspondant à une fenêtre d'un cycle de mue chez les gammaridés (Henry et al., 2012). Ainsi, il serait aussi intéressant d'étudier la possibilité que le Cd puisse être progressivement éliminé de cet organe via les différents cycles de mue qui s'opèrent chez les gammaridés. Pour cela, nous pourrions de nouveau tester l'expression de *mt1* chez les populations déacclimatées après 6 mois et/ou 1 an au laboratoire en condition propre et après une réexposition au Cd. Des résultats préliminaires obtenus chez les organismes entiers (Figure VI-3A) ainsi que dans les branchies et les caeca des gammares mâles de la population Ardillats et Séran après 6 mois ont été obtenus (Figure VI-3B). Dans les organismes entiers, on observe des niveaux d'expression de *mt1* similaires entre les deux populations au bout de 6 mois (PW test : adjusted (BH) p-value = 0.08) (Figure VI-3A). Lorsque l'on se focalise sur les organes, on retrouve des niveaux d'expression de *mt1* similaires dans les caeca entre les deux populations après 2 mois en eau propre (PW test : adjusted (BH) p-value = 0.54) alors qu'il faut attendre 6 mois pour observer des niveaux d'expression de *mt1* similaires entre les deux populations dans les branchies (PW test : adjusted (BH) p-value = 0.46) (Figure VI-3B).

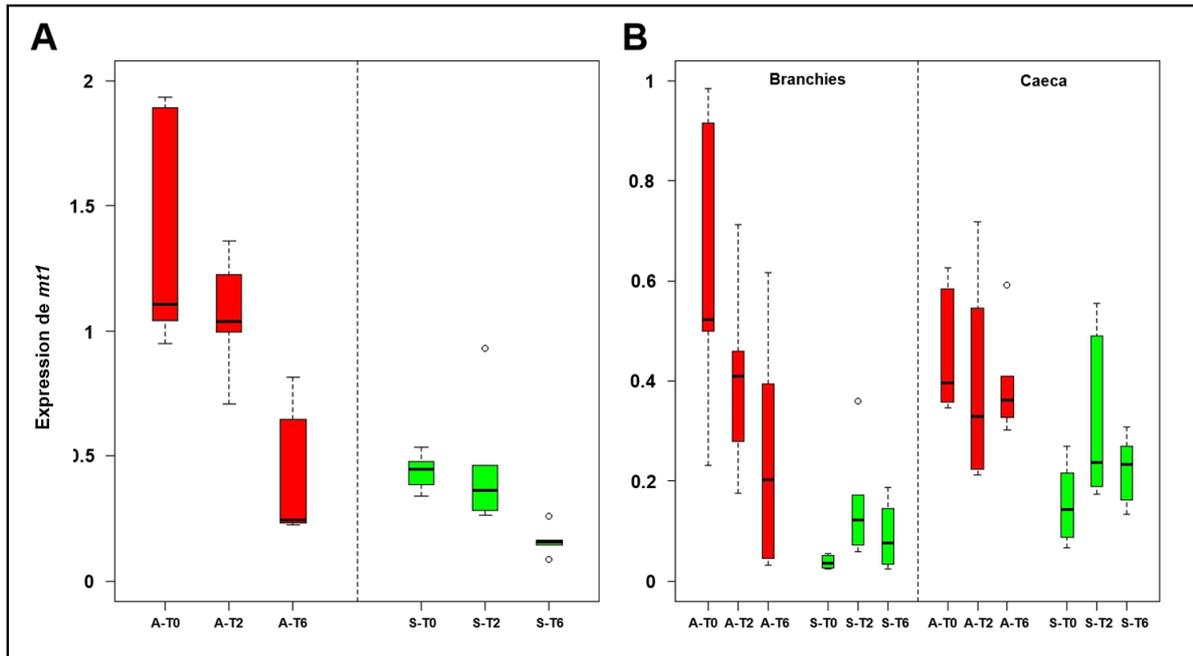


Figure VI-3 : Expression du gène *G. fossarum mt1* mesurée par RT-qPCR ($\sqrt{2\Delta Ct}$) dans (A) les organismes entiers et (B) les branchies et les caeca des mâles adultes après prélèvement sur le terrain (T0) et après maintien dans une eau exempt de Cd pendant 2 mois (T2) et 6 mois (T6) au laboratoire chez la population Ardillats (A-T0, A-T2, A-T6) et la population Sérans (S-T0, S-T2, S-T6). Les couleurs rouge et verte correspondent au statut contaminé en Cd de la population Ardillats et au statut non contaminé de la population Sérans.

L'étude de la métallothionéine par d'autres méthodes directes de dosage de cette protéine pourrait venir compléter les données déjà acquises. Par exemple, l'utilisation de la spectrométrie de masse pourrait permettre de mesurer la quantité de protéine à un temps donné. Mais aujourd'hui cette méthode n'est disponible que pour l'être humain (Mehus et al., 2014; Gunn et al., 2021) et nécessite donc d'être développée pour les gammaridés, notamment lors de la préparation des échantillons car la protéine peut être difficile à extraire lorsque celle-ci est liée au Cd ou à un autre métal.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous suggérons que la capacité de sur-induction de la métallothionéine est impliquée dans la tolérance observée chez les populations de *G. fossarum*. Toutefois, la tolérance aux métaux peut impliquer d'autres mécanismes de gestion des métaux (par exemple MRG, phytochélatine ou organelles) mais également des mécanismes de défense contre le stress oxydant (par exemple, la SOD, la catalase ou la GST) (Morgan et al., 2007). Par exemple, quelques études suggèrent que l'implication des MRG (metal-rich granules) serait également impliquée dans la tolérance avec les métallothionéines (Weeks, 1992; Vijver et al.,

2004; Chiodi Boudet et al., 2019), mécanismes pouvant travailler en collaboration ou séparément. D'autre part, une étude protéomique pourrait être réalisée chez les populations en sortie de terrain dans l'objectif d'étudier si, en plus des métallothionéines, d'autres protéines ou enzymes sont régulées différemment chez les populations contaminées ce qui pourrait confirmer que les mécanismes moléculaires sont impliqués dans la tolérance au Cd. Dans ce sens, nous avons mis en place une expérimentation préliminaire chez les nouveau-nés de première et de deuxième cohorte afin de voir si certaines protéines sont différemment exprimées entre les populations tolérantes et non tolérantes.

Les métallothionéines dans le transfert de la tolérance au Cd à la descendance

Les travaux menés dans cette thèse nous ont également conduits à évaluer les effets parentaux sur l'expression de *mt1* en lien avec la tolérance observée chez la descendance. À la différence des adultes, nous n'avons pas retrouvé de différence de niveaux d'expression de *mt1* en condition propre entre les nouveau-nés tolérants et sensibles chez les deux premières cohortes relargués en eau propre. Toutefois, nous avons retrouvé une plus forte inductibilité de l'expression de *mt1* chez les nouveau-nés tolérants de la deuxième cohorte, après une courte réexposition au Cd. Pour venir compléter ces résultats, il serait également intéressant de venir tester l'inductibilité de *mt1* chez les nouveau-nés de la première cohorte. D'autre part, on retrouve de nouveau un rôle symétrique des deux sexes dans le transfert de la capacité à mieux induire *mt1*, corrélé à la tolérance au Cd. Ces résultats viennent renforcer l'hypothèse d'un lien entre la capacité à sur-exprimer *mt1* et la tolérance au Cd chez *G. fossarum* avec un effet parental sur l'expression de *mt1* chez la descendance. Dans la littérature, le rôle potentiel de la métallothionéine dans le transfert de la tolérance aux métaux des adultes à la descendance a rarement été étudié, en particulier chez les arthropodes. Quelques études chez les daphnies sont retrouvées (Tsui and Wang, 2005; Guan and Wang, 2006b), ou encore chez les bivalves (Weng and Wang, 2014) et les poissons (Wu et al., 2008, 2012). Dans ces travaux, les mécanismes possiblement responsables de la tolérance aux métaux ont été étudiés sous l'angle des effets maternels, négligeant alors un potentiel rôle des effets paternels. Chez *G. fossarum*, plusieurs

mécanismes pourraient être impliqués dans la transmission de la capacité à sur-induire la métallothionéine :

- Du côté maternel, différentes hypothèses peuvent être retrouvées dans la littérature : un transfert direct des métallothionéines maternelles à la descendance, un transfert des ARNm des métallothionéines *via* les œufs, et un transfert des métaux induisant des niveaux d'expressions des métallothionéines élevés dans les œufs (Tsui and Wang, 2005; Guan and Wang, 2006b; Wu et al., 2008, 2012; Ho and Burggren, 2010; Weng and Wang, 2014).
- Du côté paternel, la transmission peut également se faire par le transfert des ARNm des métallothionéines (Ho and Burggren, 2010). Un autre mécanisme de plus en plus retrouvé dans la littérature, notamment chez les vertébrés, suggère un transfert *via* les messages épigénétiques encodés dans la chromatine des spermatozoïdes (Teperek and Miyamoto, 2013; Teperek et al., 2016).

Au regard des résultats obtenus, nous discuterons des hypothèses en lien avec les mécanismes épigénétiques dans le paragraphe suivant.

4. L'épigénétique comme mécanisme déterminant la tolérance au Cd ?

Dans l'ensemble des résultats présentés précédemment, nous avons donc démontré que les phénomènes plastiques de la tolérance chez *G. fossarum* sont corrélés avec la plasticité de l'expression d'un gène, *G. fossarum mt1*, codant pour un facteur impliqué dans la gestion des métaux. De même, nous avons observé que les effets parentaux jouent un rôle dans la transmission intergénérationnelle de la tolérance et de la capacité à sur-exprimer *G. fossarum mt1*. Ces résultats suggèrent l'implication de mécanismes épigénétiques, c'est-à-dire des changements phénotypiques hérités qui ne sont pas dus à une modification de la séquence de l'ADN. Ces mécanismes permettent aux organismes de répondre aux altérations de l'environnement en modifiant l'expression des gènes, sans modifier la séquence d'ADN (Merritt and Bewick, 2017; Skinner and Nilsson, 2018). L'hérédité épigénétique intergénérationnelle peut se produire si des altérations épigénétiques et des changements dans

le phénotype d'un organisme sont hérités par la lignée germinale dans des générations qui n'ont jamais été exposées à un facteur inducteur tel que la présence d'un toxique dans l'environnement ou encore à cause d'un changement dans les paramètres environnementaux (température, salinité, pH...). Ainsi, l'héritage épigénétique intergénérationnel exige que l'information ou les changements épigénétiques soient présents dans les cellules germinales (c'est-à-dire les spermatozoïdes ou les ovules), car c'est par l'intermédiaire de ces cellules que l'héritage se produit (Skinner and Nilsson, 2018). Un des mécanismes d'épigénétique très connu, notamment chez les mammifères, appelé « genomic imprinting » ou empreinte parentale, peut être impliqué dans le transfert d'informations à la descendance. L'empreinte parentale est due à des marques épigénétiques (méthylation de l'ADN, modification des histones et hétérochromatisation) et correspond au processus par lequel une seule copie d'un gène chez un individu (provenant du génome haploïde maternel ou paternel) est exprimée, tandis que l'expression de l'autre copie est supprimée (Bajrami and Spiroski, 2016). Ici, ce mécanisme ne semble pas pouvoir être impliqué dans la transmission de la tolérance et/ou de la capacité à sur-exprimer *G. fossarum mt1* à la descendance chez *G. fossarum*. En effet, nos résultats tendent à montrer que les niveaux de tolérance au Cd ou d'induction de *G. fossarum mt1* observée chez la descendance étaient plus élevés lorsque les nouveau-nés étaient issus de deux parents tolérants et qu'une surexpression intermédiaire était observée dans le cas de croisements avec au moins un des deux parents tolérants. Il est à noter que les mécanismes et la fonction biologique de l'imprinting sont moins connus chez les arthropodes par rapport aux modèles vertébrés (notamment les mammifères) et que lorsqu'ils le sont, ces connaissances ne concernent que le modèle *Drosophila* (Lloyd, 2000; McEachern et al., 2014; Emborski and Mikheyev, 2019; Morimoto, 2022). Ainsi, les résultats de cette thèse prônent à l'approfondissement de l'étude des mécanismes moléculaires des effets parentaux dans la plasticité phénotypique chez les espèces sentinelles.

Chez *G. fossarum*, les travaux de thèse de Criuiu (2020) sur les niveaux de méthylation globale des cytosines de l'ADN ont montré que les niveaux de méthylation étaient plus élevés chez la population Ardillats par rapport aux populations des sites non contaminés. De plus, Criuiu et

al. (2018) ont permis de démontrer que l'exposition au Cd au laboratoire à différents temps d'exposition (14 jours et 1 mois) chez *Gammarus* influence le taux de méthylation global des cytosines de l'ADN. Plus précisément, une hypo-méthylation a été observée au bout de 14 jours, suivis d'une hyper-méthylation après 1 mois d'exposition au Cd (Crițiu et al., 2018). Ainsi, la méthylation de l'ADN pourrait être un mécanisme impliqué dans le transfert de la tolérance à la descendance. Dans le cas des métallothionéines, il serait par exemple intéressant d'aller voir si on observe des niveaux de méthylation différents au niveau du promoteur des métallothionéines chez les populations en sortie de terrain, et si ces niveaux de méthylation varient en même temps que la perte de la tolérance. Dans les études épigénétiques, on recense de nombreuses reviews (Burton and Metcalfe, 2014; Ho and Burggren, 2010; Kappeler and Meaney, 2010; Šrut, 2021) qui soulignent chez plusieurs espèces l'implication de la méthylation de l'ADN dans la transmission intergénérationnelle des caractères permettant aux individus de mieux s'adapter aux changements de l'environnement. Par exemple, une étude chez le moustique *Aedes albopictus* a montré que l'exposition parentale à deux composés organiques (vinclozoline et génistéine) a entraîné des changements dans le niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN qui ont persisté jusqu'à la génération F2, modifications corrélées à une sensibilité réduite à l'insecticide imidaclopride (Oppold et al., 2015). Chez la daphnie (*Daphnia magna*), Feiner et al. (2022) ont testé différents stress dont le zinc, une toxine et la température au cours de quatre générations successives. Les auteurs ont ainsi pu identifier des positions CpG différenciellement méthylées principalement localisées au niveau des exons, spécifiques au stress et héréditaires jusqu'à la quatrième génération (Feiner et al., 2022). D'autre part, chez deux espèces de moules il a été constaté que l'hypo-méthylation de l'ADN était plus importante dans les populations vivant dans des environnements contaminés et/ou présentant une forte salinité, suggérant l'idée que la réduction de la méthylation de l'ADN augmenterait la plasticité phénotypique (Ardura et al., 2018). Des résultats similaires ont également été retrouvés chez une espèce d'ascidie invasive où des niveaux globaux de méthylation de l'ADN significativement réduits pourraient être à l'origine d'une plasticité phénotypique accrue (Hawes et al., 2019). Ainsi, l'hypothèse de l'implication de la méthylation de l'ADN comme vecteur de la transmission de la tolérance à la descendance chez *G. fossarum* par des mécanismes épigénétiques peut être suggérée. Toutefois, d'autres marqueurs épigénétiques,

moins étudiés, ne sont pas à négliger. Par exemple, les études sur les effets des modifications des histones chez les espèces animales sont moins fréquentes, mais les études disponibles suggèrent que les modifications des histones, en fonction de l'emplacement de la modification, peuvent jouer un rôle majeur (Vogt, 2021). La méthylation des lysines de certaines histones (par exemple, H3K9me3, H3K9me2 ou H4K20me3) induit l'hétérochromatisation et ainsi réprime l'expression des gènes tandis que l'acétylation (H4K8ac ou H3K9ac) est associée principalement à l'euchromatine et permet l'expression des gènes (Vogt, 2021). Par exemple, chez le crustacé *Artemia salina* exposé à un stress thermique, une augmentation de la production de protéines Hsp70 et une résistance importante au stress thermique ont été observées chez les trois générations successives de descendants ainsi que des changements du niveau global de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones H3 et H4 (Norouzitallab et al., 2014). Les micro-ARN contribuent également aux variations phénotypiques, mais les études sont encore rares (Vogt, 2021). Pourtant ces derniers peuvent répondre à divers stimuli environnementaux (y compris les métaux non essentiels et les composés organiques) et peuvent être impliqués dans l'héritage intergénérationnel chez les invertébrés et les vertébrés (Šrut, 2021). Par exemple, une étude réalisée chez des daphnies tolérantes au Cd a suggéré que la tolérance pouvait être retrouvée chez la descendance grâce au transfert d'informations épigénétiques *via* les micro-ARN contenus dans les spermatozoïdes des mâles (Chen et al., 2016).

Aujourd'hui, il ne fait donc aucun doute que l'acclimatation et/ou l'adaptation des organismes à faire face aux fluctuations et aux changements brusques des conditions environnementales s'appuient sur des mécanismes épigénétiques. Notamment, diverses études ont montré que les marques épigénétiques peuvent être héritées de manière intergénérationnelle et persister pendant plusieurs générations, mais le rôle précis des processus épigénétiques dans les phénomènes de plasticité n'a pas encore été élucidé chez la plupart des organismes sentinelles.

5. La modification des traits d'histoire de vie

Enfin, en parallèle de l'étude de l'évolution des sensibilités toxicologiques, nos travaux se sont également attachés à étudier la possibilité que différents traits d'histoire de vie soient affectés par l'exposition à long terme au Cd au sein des populations. Ainsi, divers traits ont été mesurés en sortie de terrain tels que la distribution des tailles, les taux de croissance, l'alimentation ou encore la fécondité. Suite aux travaux de Vigneron (2015) suggérant des différences de traits d'histoire de vie de la population Ardillats, nous avons pu généraliser certains résultats par l'étude de plusieurs populations exposées. Les résultats obtenus en sortie de terrain et présentés dans le Chapitre III montrent que les populations contaminées se différencient des populations non contaminées et que la contamination chronique au Cd conduit à une réduction globale de la taille des organismes notamment, affectant la taille médiane des adultes, la taille à la puberté et la taille maximale atteinte dans les populations (Publication n°2). D'autre part, une tendance a été observée à la réduction des taux de croissance chez ces mêmes populations (mesures en sortie de terrain) (Figure III-4) alors que leur taux d'alimentation est similaire entre populations contaminées et non contaminées (Figure III-2). Ce patron de taux de croissance individuelle réduits *in situ* a déjà été démontré pour la population des Ardillats dans de précédents travaux de thèse (Coulaud, 2012). Ces résultats nous ont amenés à questionner les mécanismes sous-jacents à ces modifications des traits d'histoire de vie. Trois hypothèses explicatives peuvent être émises, une modification des traits d'histoire de vie liée à 1- un effet toxique direct du Cd, 2- un coût associé à la tolérance cadmique observée chez ces populations ou 3- une sélection des histoires de vie des populations exposées à la pression toxique.

Dans la plupart des études, la modification des traits d'histoire de vie observée chez les populations tolérantes est attribuée à un phénomène de coût de tolérance, c'est-à-dire résultant d'un coût associé à l'augmentation de la tolérance toxicologique. Toutefois, il est difficile de s'abstraire de l'effet toxique direct du contaminant lors de l'observation de modification de traits d'histoire de vie chez des populations tolérantes et donc exposées. Ainsi, pour discriminer ces processus, nous avons maintenu deux populations tolérantes et deux populations naïves au laboratoire dans de l'eau exempte de Cd pendant 6 mois. Chez les populations « déacclimatées », qui ont perdu leur tolérance au Cd pour les individus venant des populations

contaminées), nous avons observé des taux de croissance individuelle similaires entre les quatre populations testées. Pour ce trait, l'hypothèse de l'adaptation de l'histoire de vie a ainsi pu être écartée au profit de l'hypothèse d'un effet toxique direct du Cd ou d'un coût de fitness associé à la tolérance à ce métal. Pour départager ces deux hypothèses nous pouvons utiliser les résultats obtenus lors de l'expérimentation d'exposition multigénérationnelle (Chapitre V). Nous avons observé dans cette expérimentation une inhibition des taux de croissance chez les individus F3 tolérants au Cd mais également chez les individus F2 non tolérants au Cd. Les résultats obtenus au cours de ces expérimentations ont ainsi pu attribuer l'inhibition des taux de croissance au moins pour partie à un effet toxique du Cd. Des résultats similaires ont été observés chez des clones de *Daphnia magna* où les individus issus des clones tolérants et sensibles présentaient une inhibition de la croissance lors d'une exposition au Cd (Guan and Wang, 2006a). D'autre part, nous avons également mesuré les taux d'alimentation chez les adultes mâles au cours de l'exposition multigénérationnelle. Nous avons observé une inhibition des taux d'alimentation en présence de Cd chez des individus non tolérants, suggérant donc une nouvelle fois l'hypothèse d'un effet toxique direct du Cd. Toutefois, il semble que les individus des populations historiquement exposées *in situ* soient en partie adaptés, car on ne retrouve pas pour ces mêmes niveaux d'exposition l'inhibition alimentaire. Au final, il semble donc qu'il y ait tout de même un coût à la croissance dans les milieux étudiés naturellement contaminés par le Cd. Ainsi, pour le patron de réduction des taux de croissance individuelle au sein des populations contaminées, nos résultats semblent invalider l'hypothèse d'un coût de tolérance émise au cours des travaux de Vigneron (2015) et suggèrent plutôt une modification des taux de croissance due à l'effet toxique du Cd au sein des populations contaminées. Ce coût peut être dû à un plus grand investissement dans des mécanismes de défense contre le toxique, tels que la production de métallothionéines, dont nous avons montré une surexpression chez les organismes des populations contaminées.

Concernant la modification de la structure de taille des populations (réduction de la taille à la puberté, taille médiane, taille maximale), nos résultats obtenus dans le Chapitre III en sortie de terrain montrent une plus grande proportion de femelles en reproduction dans les classes de petite taille chez les populations contaminées indiquant une maturité sexuelle des femelles plus précoces (c'est-à-dire à une taille inférieure) pour ces populations. Ces observations appuient

les résultats préliminaires obtenus chez la population Ardillats dans les travaux de Vigneron (2015). Les résultats obtenus au cours de l'expérimentation de déacclimatation semblent confirmer l'hypothèse d'une adaptation de l'histoire de vie. En effet, alors que les taux de croissance individuels semblent revenir à la « normale », on retrouve toujours une plus grande proportion de femelles en reproduction dans les classes de petite taille chez les populations contaminées déacclimatées. Néanmoins, au cours de l'exposition multigénérationnelle, la taille des femelles en reproduction a été mesurée chez des femelles appartenant à la génération F1 et à un mélange de générations F2/F3 (Chapitre V). Les résultats n'ont montré aucune différence entre les femelles des aquariums contaminés et non contaminés. Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que l'adaptation de l'histoire de vie ne se met en place qu'après plusieurs générations d'exposition à un contaminant puisque l'on commence à observer des différences significatives entre réplica à partir des générations F2/F3. Toutefois, l'ensemble de ces résultats semble aller dans le sens de l'hypothèse d'une adaptation de l'histoire de vie des femelles, permettant d'assurer le maintien de la population en milieu contaminé. L'adaptation de l'histoire de vie correspond à un ajustement des traits d'histoire de vie par des effets de processus évolutifs de sélection. Ces phénomènes peuvent constituer un mécanisme de tolérance par lui-même chez les populations (« tolérance écologique »), contrebalançant les effets négatifs de l'exposition à la contamination toxique. L'absence d'individus de grande taille dans les populations contaminées peut d'ailleurs traduire une réduction de l'espérance de vie des individus due aux effets toxiques du Cd. Par ailleurs, les taux de fécondité supérieurs observés au sein des populations exposées constituent un argument complémentaire pour conclure au fait d'une modification du trade-off survie-croissance-reproduction est modifié au sein de ces populations par le stress cadmique. Ainsi, en accord avec les prédictions de la théorie des histoires de vie, l'avancée de la taille à la maturité et les tailles de portée augmentées pourraient donc constituer une adaptation de l'histoire de vie des populations aux effets toxiques du Cd. L'implication d'une diminution du taux de croissance ou d'une mortalité plus importante dans les grandes classes de tailles a également été proposée pour expliquer une réduction de la taille moyenne et de la taille maximale au sein de populations naturelles de l'isopode *Porcellio scaber* exposées aux métaux (Jones and Hopkin, 1998).

Conclusion générale et perspectives

Face aux manques de connaissances terrain sur les effets évolutifs des expositions long terme à la contamination environnementale, cette thèse est venue apporter des éléments nouveaux chez une espèce représentative des milieux, le gammare. Cette thèse a souligné le rôle central de la plasticité de la sensibilité toxicologique et des traits d'histoire de vie dans l'adaptation des populations historiquement et naturellement exposées à la contamination cadmique.

Nos travaux ont souligné le rôle négligé de la plasticité et de la transmission non génétique de la tolérance toxicologique au cours d'une exposition à long terme des populations naturelles à la contamination environnementale. De même, les niveaux d'expositions considérés dans ces travaux sont faibles au regard de la norme de qualité environnementale pour le Cd considérée comme protectrice vis-à-vis de potentiels effets sur les populations. Grâce à la combinaison d'une approche comparative entre populations naturelles chroniquement exposées ou non, en sortie de terrain et/ou après maintien sur plusieurs mois en eau non contaminée et d'une approche d'exposition multigénérationnelle au laboratoire, nous avons pu confirmer que la tolérance au Cd observée chez *G. fossarum* dépend de phénomène de plasticité phénotypique et que cette tolérance peut être transmise à la descendance via les effets parentaux avec un rôle symétrique des deux sexes. Ces travaux ont ainsi montré que les effets paternels, en plus des effets maternels, peuvent également être impliqués dans la transmission de la tolérance et appuient l'importance de leur prise en compte dans les études écotoxicologiques. Nous suggérons un rôle de l'épigénétique comme mécanisme plausible pour la plasticité de la sensibilité au Cd observée sur le terrain. Par exemple, chez ces populations, des changements de méthylation de l'ADN pourraient apporter un niveau de flexibilité phénotypique au sein des populations ce qui permettrait aux populations de réagir rapidement à la contamination de l'environnement. Des études moléculaires spécifiques seraient nécessaires pour explorer les processus épigénétiques opérant dans ces populations de terrain. En plus de l'étude en sortie de terrain, l'expérimentation d'exposition multigénérationnelle a permis de confirmer que la mise en place de la tolérance dépend de processus sur le long terme puisque l'on observe une modification de la sensibilité seulement à partir de la troisième génération d'individus. Cela permet une nouvelle fois de mettre en évidence l'importance d'aller étudier les modifications

de sensibilité au-delà d'une seule génération, puisque dans notre cas, nous observons un délai dans l'apparition de ces effets.

Dans l'objectif de mettre en évidence certains mécanismes moléculaires sous-jacents à l'acquisition de la tolérance au Cd chez *G. fossarum*, nous avons choisi d'étudier le rôle d'un mécanisme de gestion des métaux impliquant les métallothionéines. Ainsi, cette thèse a permis l'identification de deux métallothionéines dans le transcriptome du gammare dont une, appelée *G. fossarum mt1*, est impliquée dans la réponse à une exposition au Cd. L'étude de ce mécanisme a permis de soutenir l'hypothèse de l'implication de ce mécanisme dans la tolérance au Cd observée chez les gammares puisque nous avons observé une covariation entre les niveaux de tolérance au Cd et l'expression de *mt1*, corrélé à une meilleure capacité d'induction de cette métallothionéine chez les populations tolérantes. De plus, nous avons montré que l'expression de *mt1* pouvait être modulée par des processus transgénérationnels adaptatifs survenant au cours d'une exposition chronique des populations. Notamment, nous avons observé un rôle symétrique des deux sexes dans la transmission de la tolérance au Cd, corrélé à une meilleure capacité d'induction de *mt1*. Ainsi ces résultats soutiennent l'hypothèse d'un rôle de l'épigénétique dans la plasticité de la tolérance au Cd observée chez les populations de *G. fossarum*.

En plus de la modification de sensibilité toxicologique et de l'expression de *mt1*, l'exposition long terme au Cd induit des modifications d'autres traits d'histoire de vie chez les populations de *G. fossarum*. Nous avons par exemple observé une adaptation de la taille des femelles, celle-ci rentrant en puberté à des tailles plus faibles que les populations non exposées. Nous avons par ailleurs pu conclure à une adaptation de l'histoire de vie concernant ce trait grâce aux approches terrain et laboratoire mis en place au cours de cette thèse.

L'étude des effets long-terme à la contamination chez l'espèce non modèle de laboratoire *G. fossarum* ouvre un certain nombre de perspectives.

Afin d'approfondir les connaissances sur la modification de la sensibilité toxicologique chez *G. fossarum*, la question des phénomènes de cotoérance ou de vulnérabilité accrue à d'autres stress pourrait être explorée chez les populations tolérantes au Cd en sortie de terrain. Cette expérience pourrait être réalisée en testant, par exemple, la sensibilité au plomb chez les populations des milieux contaminés, d'autant que des niveaux de contamination biodisponible en plomb sont ponctuellement retrouvés dans ces mêmes populations. De même, une étude dans l'objectif d'observer si une vulnérabilité accrue aux pesticides ou à l'augmentation de la température est retrouvée chez les populations tolérantes peut être envisagée.

Pour approfondir les recherches sur les mécanismes moléculaires pouvant être impliqués dans la mise en place et/ou le transfert de la tolérance au Cd chez *G. fossarum*, diverses expérimentations peuvent être mises en place. L'étude de l'implication des MRG (metal-rich granules) pourrait être une piste puisque ces granules sont souvent associées à la tolérance lors d'une exposition long terme. Pour cela, la quantité de MRG pourrait être quantifiée dans les organes des populations de gammarés en sortie de terrain et après maintien au laboratoire en eau propre par une méthode de fractionnement subcellulaire (comme décrit par Wallace et al. (2003)) ou par une méthode d'extraction suivie d'une analyse par microanalyse aux rayons X (comme décrit par Walker et al. (1975)).

Nous avons suggéré l'implication des mécanismes épigénétiques dans la plasticité et la transmission non génétique de la tolérance toxicologique. De précédents travaux réalisés au laboratoire ont par ailleurs permis de mettre en évidence des niveaux globaux de méthylation des cytosines de l'ADN plus élevés chez les adultes provenant d'une population tolérante par rapport à des populations naïves. Ces résultats permettent d'envisager un potentiel rôle de la méthylation de l'ADN dans la tolérance au Cd. Ainsi, une expérience complémentaire visant à tester si les niveaux élevés de méthylation retrouvés chez les adultes tolérants sont transmis à la descendance peut être envisagée, de même que l'étude d'une covariation entre les niveaux globaux de méthylation de l'ADN et la tolérance au Cd. Par exemple, une approche envisageable serait d'identifier le promoteur et la structure du gène *mt1* puis d'aller étudier les

niveaux de méthylation au niveau des îlots CpG du promoteur et du corps du gène (notamment au niveau des premiers introns et exons qui sont les régions les plus susceptibles d'altérer l'expression de *mt1*).

Enfin, dans la continuité de l'exposition multigénérationnelle mise en place au laboratoire et afin de compléter les résultats obtenus en sortie de terrain chez les populations naturelles, divers tests peuvent être réalisés : la remise en eau propre des individus chroniquement exposés pour étudier les phénomènes de plasticité (perte de tolérance, retour à la normale des taux de croissance...), la mesure de la taille des femelles dans les générations consécutives pour observer la mise en place de l'adaptation de l'histoire de vie de ce trait, ou encore la mesure des niveaux d'expression de *mt1* en corrélation avec l'acquisition de la tolérance au Cd.

Références bibliographiques

Agra, A.R., Soares, A.M.V.M., Barata, C., 2011. Life-history consequences of adaptation to pollution. “*Daphnia longispina* clones historically exposed to copper.” *Ecotoxicology* 20, 552–562. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0621-5>

Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal, A., 2004a. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J Comp Physiol B* 174. <https://doi.org/10.1007/s00360-004-0438-0>

Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal, A., 2004b. Organelle-specific zinc ATPases in Crustacean ER and lysosomal membranes. *International Congress Series* 1275, 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2004.08.067>

Alam, M.R., Rahman, M.M., Kit Yu, R.M., MacFarlane, G.R., 2023. Offspring of metal contaminated saltmarsh (*Juncus acutus*) exhibit tolerance to the essential metal Zn but not the nonessential metal Pb. *Environmental Pollution* 323. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121333>

Allibert M., 2017. Variabilité de la sensibilité au cadmium chez le crustacé *Gammarus* : différences entre lignes phylogénétiques et influence de l'exposition long terme des populations. Rapport de stage de master 2. Université Grenoble Alpes.

Alonso, Á., 2023. Previous stress causes a contrasting response to cadmium toxicity in the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum*: lethal and behavioral endpoints. *Environ Sci Pollut Res* 30, 41348–41358. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24932-3>

Alric, B., Geffard, O., Chandesris, A., Ferréol, M., François, A., Perceval, O., Piffady, J., Villeneuve, B., Chaumot, A., 2019. Multisubstance Indicators Based on Caged *Gammarus* Bioaccumulation Reveal the Influence of Chemical Contamination on Stream Macroinvertebrate Abundances across France. *Environ. Sci. Technol.* 53, 5906–5915. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01271>

Aly, W., Williams, I.D., Hudson, M.D., 2014. Limitations of metallothioneins in common cockles (*Cerastoderma edule*) and sponges (*Haliclona oculata*) as biomarkers of metal contamination in a semi-enclosed coastal area. *Science of The Total Environment* 473–474, 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.136>

Amiard, J., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>

Amiard-Triquet, C., 2019. Pollution Tolerance in Aquatic Animals: From Fundamental Biological Mechanisms to Ecological Consequences, in: *Ecotoxicology*. Elsevier, pp. 33–91. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-314-1.50002-X>

Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Roméo, M., 2011. *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press.

Ardura, A., Clusa, L., Zaiko, A., Garcia-Vazquez, E., Miralles, L., 2018. Stress related epigenetic changes may explain opportunistic success in biological invasions in Antipode mussels. *Sci Rep* 8, 10793. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29181-4>

Asselman, J., Glaholt, S.P., Smith, Z., Smagghe, G., Janssen, C.R., Colbourne, J.K., Shaw, J.R., De Schampelaere, K.A.C., 2012. Functional characterization of four metallothionein genes in *Daphnia pulex* exposed to environmental stressors. *Aquatic Toxicology* 110–111, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.12.010>

Asselman, J., Shaw, J.R., Glaholt, S.P., Colbourne, J.K., De Schampelaere, K.A.C., 2013. Transcription patterns of genes encoding four metallothionein homologs in *Daphnia pulex* exposed to copper and cadmium are time- and homolog-dependent. *Aquatic Toxicology* 142–143, 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.010>

Atrian, S., Capdevila, M., 2013. Metallothionein-protein interactions. *BioMolecular Concepts* 4, 143–160. <https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0049>

Babut, M., Ferrari, B.J.D., Jame, P., Assoumani, A., Lestremau, F., Hette-Tronquart, N., Miege, C., Perceval, O., 2020. Monitoring priority substances in biota under the Water Framework Directive: how effective is a tiered approach based on caged invertebrates? A proof-of-concept study targeting PFOS in French rivers. *Environmental Sciences Europe* 32, 131. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00416-4>

Badyaev, A.V., Uller, T., 2009. Parental effects in ecology and evolution: mechanisms, processes and implications. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 1169–1177. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0302>

Bain, P.A., Gregg, A.L., Kumar, A., 2016. De novo assembly and analysis of changes in the protein-coding transcriptome of the freshwater shrimp *Paratya australiensis* (Decapoda: Atyidae) in response to acid sulfate drainage water. *BMC Genomics* 17, 890. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3208-y>

Baird, D.J., Brown, S.S., Lagadic, L., Liess, M., Maltby, L., Moreira-Santos, M., Schultz, R., Scott, G.I., 2007. *In Situ*-Based Effects Measures: Determining the Ecological Relevance of Measured Responses. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3, 259–267. https://doi.org/10.1897/ieam_2006-031.1

Bajrami, E., Spiroski, M., 2016. Genomic Imprinting. *Open Access Maced J Med Sci* 4, 181–184. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2016.028>

Baldanzi, S., Watson, R., McQuaid, C.D., Gouws, G., Porri, F., 2017. Epigenetic variation among natural populations of the South African sandhopper *Talorchestia capensis*. *Evol Ecol* 31, 77–91. <https://doi.org/10.1007/s10682-016-9877-9>

Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C., 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 140, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.013>

Baurand, P.-E., Pedrini-Martha, V., de Vaufleury, A., Niederwanger, M., Capelli, N., Scheifler, R., Dallinger, R., 2015. Differential Expression of Metallothionein Isoforms in Terrestrial Snail Embryos Reflects Early Life Stage Adaptation to Metal Stress. *PLoS ONE* 10, e0116004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116004>

Beaudouin, R., Dias, V., Bonzom, J.M., Péry, A., 2012. Individual-based model of *Chironomus riparius* population dynamics over several generations to explore adaptation following exposure to uranium-spiked sediments. *Ecotoxicology* 21, 1225–1239. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0877-4>

Bebianno, M.J., Langston, W.J., 1998. Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea*. *Talanta* 46, 301–313. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(97\)00344-5](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00344-5)

Bebianno, M.J., Langston, W.J., 1993. Turnover rate of metallothionein and cadmium in *Mytilus edulis*. *Biometals* 6, 239–244. <https://doi.org/10.1007/BF00187762>

Becker, J.M., Russo, R., Shahid, N., Liess, M., 2020. Drivers of pesticide resistance in freshwater amphipods. *Science of The Total Environment* 735, 139264. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139264>

Beckerman, A., Benton, T.G., Ranta, E., Kaitala, V., Lundberg, P., 2002. Population dynamic consequences of delayed life-history effects. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 263–269. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02469-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02469-2)

Bernhardt, E.S., Rosi, E.J., Gessner, M.O., 2017. Synthetic chemicals as agents of global change. *Front Ecol Environ* 15, 84–90. <https://doi.org/10.1002/fee.1450>

Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Research* 47, 650–660. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.024>

Betini, G.S., Wang, X., Fryxell, J.M., 2020. Transgenerational plasticity mediates temperature effects on fitness in the water flea *Daphnia magna*. *Can. J. Zool.* 98, 661–665. <https://doi.org/10.1139/cjz-2020-0080>

Bighiu, M.A., Gorokhova, E., Carney Almroth, B., Eriksson Wiklund, A.-K., 2017. Metal contamination in harbours impacts life-history traits and metallothionein levels in snails. *PLoS ONE* 12, e0180157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180157>

Blum, M., Chang, H.-Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G.A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D.H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D.A., Necci, M., Orengo, C.A., Pandurangan, A.P., Rivoire, C., Sigrist, C.J.A., Sillitoe, I., Thanki, N., Thomas, P.D., Tosatto, S.C.E., Wu, C.H., Bateman, A., Finn, R.D., 2021. The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research* 49, D344–D354. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977>

Bodar, C.W.M., van der Sluis, I., van Montfort, J.C.P., Voogt, P.A., Zandee, D.I., 1990. Cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 16, 33–39. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(90\)90075-Z](https://doi.org/10.1016/0166-445X(90)90075-Z)

Bofill, R., Capdevila, M., Atrian, S., 2009. Independent metal-binding features of recombinant metallothioneins convergently draw a step gradation between Zn- and Cu-thioneins. *Metallomics* 1, 229. <https://doi.org/10.1039/b904953c>

Bonduriansky, R., Crean, A.J., Day, T., 2012. The implications of nongenetic inheritance for evolution in changing environments: Nongenetic inheritance and environmental change. *Evolutionary Applications* 5, 192–201. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2011.00213.x>

Bonduriansky, R., Head, M., 2007. Maternal and paternal condition effects on offspring phenotype in *Telostylinus angusticollis* (Diptera: Neriidae). *J Evolution Biol* 20, 2379–2388. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01419.x>

Bonneris, E., Giguère, A., Perceval, O., Buronfosse, T., Masson, S., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2005. Sub-cellular partitioning of metals (Cd, Cu, Zn) in the gills of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*: role of calcium concretions in metal sequestration. *Aquatic Toxicology* 71, 319–334. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.11.025>

Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M., 2006. Evolutionary Response to Rapid Climate Change. *Science* 312, 1477–1478. <https://doi.org/10.1126/science.1127000>

Brady, S.P., Monosson, E., Matson, C.W., Bickham, J.W., 2017. Evolutionary toxicology: Toward a unified understanding of life's response to toxic chemicals. *Evolutionary Applications* 10, 745–751. <https://doi.org/10.1111/eva.12519>

Brondízio, E.S., Settele, J., Díaz, S., Ngo, H.T. (Eds.), 2019. The global assessment report of the intergovernmental science-policy platform on biodiversity and ecosystem services. Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services (IPBES), Bonn.

Brouwer, M., Schlenk, D., Huffman Ringwood, A., Brouwer-Hoexum, T., 1992. Metal-Specific Induction of Metallothionein Isoforms in the Blue Crab *Callinectes sapidus* in Response to Single- and Mixed-Metal Exposure. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 294, 461–468. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90712-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90712-6)

Brown, B.E., 1978. Lead detoxification by a copper-tolerant isopod. *Nature* 276, 388–390.

Brown, B.E., 1977. Uptake of copper and lead by a metal tolerant isopod *Asellus meridianus*. *Freshwater Biol* 7, 235–244. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1977.tb01671.x>

Buchwalter, D.B., Luoma, S.N., 2005. Differences in Dissolved Cadmium and Zinc Uptake among Stream Insects: Mechanistic Explanations. *Environ. Sci. Technol.* 39, 498–504. <https://doi.org/10.1021/es0404421>

Bundy, J.G., Kille, P., 2014. Metabolites and metals in Metazoa – what role do phytochelatins play in animals? *Metallomics* 6, 1576–1582. <https://doi.org/10.1039/C4MT00078A>

Bundy, J.G., Kille, P., Liebeke, M., Spurgeon, D.J., 2014. Metallothioneins May Not Be Enough—The Role of Phytochelatins in Invertebrate Metal Detoxification. *Environ. Sci. Technol.* 48, 885–886. <https://doi.org/10.1021/es4054779>

Burggren, W.W., 2020. Phenotypic Switching Resulting From Developmental Plasticity: Fixed or Reversible? *Front. Physiol.* 10, 1634. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01634>

Burton, T., Metcalfe, N.B., 2014. Can environmental conditions experienced in early life influence future generations? *Proc. R. Soc. B.* 281, 20140311. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0311>

Cameron, T.C., O’Sullivan, D., Reynolds, A., Piertney, S.B., Benton, T.G., 2013. Eco-evolutionary dynamics in response to selection on life-history. *Ecol Lett* 16, 754–763. <https://doi.org/10.1111/ele.12107>

Capdevila, M., Atrian, S., 2011. Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J Biol Inorg Chem* 16, 977–989. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0798-3>

Cazan, A.M., Klerks, P.L., 2015. Physiological effects and reduced tolerance following maternal metal exposure in the live-bearing fish *Gambusia affinis*: Maternal metal exposure effects in offspring of *G. affinis*. *Environ Toxicol Chem* 34, 1337–1344. <https://doi.org/10.1002/etc.2919>

Chain, F.J.J., Finlayson, S., Crease, T., Cristescu, M., 2019. Variation in transcriptional responses to copper exposure across *Daphnia pulex* lineages. *Aquatic Toxicology* 210, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.016>

Chang, F.M., Lin, C.H., Wu, S.M., 2022. Duration of Induced Metallothionein is a Critical Factor in the Cadmium-Resistance Among Goldfish (*Carassius auratus*) and Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Bull Environ Contam Toxicol* 108, 725–730. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03449-4>

Chapman, P.M., 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin* 44, 7–15. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00253-3](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00253-3)

Chaumot, A., Coulaud, R., Adam, O., Quéau, H., Lopes, C., Geffard, O., 2020. In Situ Reproductive Bioassay with Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 1—Gauging the Confounding Influence of Temperature and Water Hardness. *Enviro Toxic and Chemistry* 39, 667–677. <https://doi.org/10.1002/etc.4655>

Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., Maltby, L., 2015. Gammarids as Reference Species for Freshwater Monitoring, in: *Aquatic Ecotoxicology*. Elsevier, pp. 253–280. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00011-5>

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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.015>

Chavez-Crooker, P., Garrido, N., Pozo, P., Ahearn, G.A., 2003. Copper transport by lobster (*Homarus americanus*) hepatopancreatic lysosomes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 135, 107–118. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00103-0](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00103-0)

Chen, S., Nichols, K.M., Poynton, H.C., Sepúlveda, M.S., 2016. MicroRNAs are involved in cadmium tolerance in *Daphnia pulex*. *Aquatic Toxicology* 175, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.023>

Chiodi Boudet, L., Mendieta, J., Romero, M.B., Dolagaratz Carricavur, A., Polizzi, P., Marcovecchio, J.E., Gerpe, M., 2019. Strategies for cadmium detoxification in the white shrimp *Palaemon argentinus* from clean and polluted field locations. *Chemosphere* 236, 124224. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.194>

Chiodi Boudet, L., Polizzi, P., Romero, M.B., Robles, A., Gerpe, M., 2013. Lethal and sublethal effects of cadmium in the white shrimp *Palaemonetes argentinus*: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Ecotoxicol Environ Saf* 89, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.008>

Choi, W.I., Neher, D.A., Ryoo, M.I., 2008. Life-history trade-offs of *Paronychiurus kimi* (Lee) (Collembola: Onychiuridae) populations exposed to paraquat. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.01.008>

Ciliberti, A., Chaumot, A., Recoura-Massaquant, R., Chandesris, A., François, A., Coquery, M., Ferréol, M., Geffard, O., 2017. Caged *Gammarus* as biomonitors identifying thresholds of toxic metal bioavailability that affect gammarid densities at the French national scale. *Water Research* 118, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.031>

Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>

Cogne, Y., Degli-Esposti, D., Pible, O., Gouveia, D., François, A., Bouchez, O., Eché, C., Ford, A., Geffard, O., Armengaud, J., Chaumot, A., Almunia, C., 2019. *De novo* transcriptomes of 14 gammarid individuals for proteogenomic analysis of seven taxonomic groups. *Sci Data* 6, 184. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0192-5>

Colomb, C., 2022. Influence de la contamination chronique au cadmium des cours d'eau sur les traits d'histoire de vie des populations de *Gammarus*. Rapport stade de master 1. Université Lumière Lyon 2.

Cooper, S., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2010. Subcellular partitioning of cadmium in the freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, after separate short-term exposures to waterborne or diet-borne metal. *Aquatic Toxicology* 100, 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.027>

Correia, A.D., Costa, M.H., Ryan, K.P., Nott, J.A., 2002a. Studies on biomarkers of copper exposure and toxicity in the marine amphipod *Gammarus locusta* (Crustacea): I. Copper-containing granules within the midgut gland. *J. Mar. Biol. Ass.* 82, 827–834. <https://doi.org/10.1017/S0025315402006197>

Correia, A.D., Livingstone, D.R., Costa, M.H., 2002b. Effects of water-borne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod *Gammarus locusta*. *Marine Environmental Research* 54, 357–360. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00114-9)

Cosio, C., Degli-Esposti, D., Almunia, C., Gaillet, V., Sartelet, H., Armengaud, J., Chaumot, A., Geffard, O., Geffard, A., 2021. Subcellular Distribution of Dietary Methyl-Mercury in *Gammarus fossarum* and Its Impact on the Amphipod Proteome. *Environ. Sci. Technol.* 55, 10514–10523. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02385>

Coulaud, R., 2012. Modelisation et changement d'échelles pour l'évaluation écotoxicologique : application à deux macroinvertébrés aquatiques, *Gammarus fossarum* (crustacé amphipode) et *Potamopyrgus antipodarum* (mollusque gastéropode). Thèse de doctorat. Université Claude Bernard, Lyon.

Coulaud, R., Geffard, O., Coquillat, A., Quéau, H., Charles, S., Chaumot, A., 2014. Ecological modeling for the extrapolation of ecotoxicological effects measured during *in situ* assays in *Gammarus*. *Environ Sci Technol* 48, 6428–6436. <https://doi.org/10.1021/es501126g>

Coulaud, R., Mouthon, J., Quéau, H., Charles, S., Chaumot, A., 2013. Life-history phenology strongly influences population vulnerability to toxicants: A case study with the mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 1727–1736. <https://doi.org/10.1002/etc.2235>

Coutellec, M.-A., Barata, C., 2013. Special issue on long-term ecotoxicological effects: an introduction. *Ecotoxicology* 22, 763–766. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1092-7>

Coutellec, M.-A., Barata, C., 2011. An introduction to evolutionary processes in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20, 493–496. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0637-x>

Cribiu, P., 2020. Étude des effets inter et transgénérationnels de l'exposition parentale au stress chimique chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard, Lyon.

Cribiu, P., Chaumot, A., Geffard, O., Ravanat, J.-L., Bastide, T., Delorme, N., Quéau, H., Caillat, S., Devaux, A., Bony, S., 2018. Natural variability and modulation by environmental stressors of global genomic cytosine methylation levels in a freshwater crustacean, *Gammarus fossarum*. *Aquatic Toxicology* 205, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.09.015>

Cribiu, P., Devaux, A., Garnero, L., Abbaci, K., Bastide, T., Delorme, N., Quéau, H., Degli Esposti, D., Ravanat, J.-L., Geffard, O., Bony, S., Chaumot, A., 2020. A “Population Dynamics” Perspective on the Delayed Life-History Effects of Environmental Contaminations: An Illustration with a Preliminary Study of Cadmium Transgenerational Effects over Three Generations in the Crustacean *Gammarus*. *IJMS* 21, 4704. <https://doi.org/10.3390/ijms21134704>

Dallinger, R., Höckner, M., 2013. Evolutionary concepts in ecotoxicology: tracing the genetic background of differential cadmium sensitivities in invertebrate lineages. *Ecotoxicology* 22, 767–778. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1071-z>

Darimont, C.T., Carlson, S.M., Kinnison, M.T., Paquet, P.C., Reimchen, T.E., Wilmers, C.C., 2009. Human predators outpace other agents of trait change in the wild. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 952–954. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809235106>

Dayras, P., Charmantier, G., Chaumot, A., Vigneron, A., Coquery, M., Quéau, H., Artells, E., Lignot, J.-H., Geffard, O., Issartel, J., 2017. Osmoregulatory responses to cadmium in reference and historically metal contaminated *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) populations. *Chemosphere* 180, 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.016>

De Almeida Rodrigues, P., Ferrari, R.G., Kato, L.S., Hauser-Davis, R.A., Conte-Junior, C.A., 2022. A Systematic Review on Metal Dynamics and Marine Toxicity Risk Assessment Using Crustaceans as Bioindicators. *Biol Trace Elem Res* 200, 881–903. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02685-3>

De Coninck, D.I.M., Janssen, C.R., Schampelaere, K.A.C.D., 2014. An approach to assess the regulatory relevance of microevolutionary effects in ecological risk assessment of chemicals: A case study with cadmium: Assessing regulatory relevance of microevolutionary effects. *Environ Toxicol Chem* 33, 453–457. <https://doi.org/10.1002/etc.2434>

Dinh, K.V., Doan, K.L.U., Doan, N.X., Pham, H.Q., Le, T.H.O., Le, M.-H., Vu, M.T.T., Dahms, H.-U., Truong, K.N., 2021. Parental exposures increase the vulnerability of copepod offspring to copper and a simulated marine heatwave. *Environmental Pollution* 287, 117603. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117603>

Dong, D.T., Miranda, A.F., Carve, M., Shen, H., Trestrail, C., Dinh, K.V., Nuggeoda, D., 2020. Population- and sex-specific sensitivity of the marine amphipod *Allorchestes compressa* to metal exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 206, 111130. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111130>

Donker, M.H., Zonneveld, C., van Straalen, N.M., 1993. Early reproduction and increased reproductive allocation in metal-adapted populations of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Oecologia* 96, 316–323. <https://doi.org/10.1007/BF00317500>

Duarte, L.F.A., Blasco, J., Catharino, M.G.M., Moreira, E.G., Trombini, C., Nobre, C.R., Moreno, B.B., Abessa, D.M. de S., Pereira, C.D.S., 2020. Lead toxicity on a sentinel species subpopulation inhabiting mangroves with different status conservation. *Chemosphere* 251, 126394. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126394>

Duarte, L.F.A., Moreno, J.B., Catharino, M.G.M., Moreira, E.G., Trombini, C., Pereira, C.D.S., 2019. Mangrove metal pollution induces biological tolerance to Cd on a crab sentinel species subpopulation. *Science of The Total Environment* 687, 768–779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.039>

Egli, D., Domènech, J., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Hua, H., Capdevila, M., Georgiev, O., Schaffner, W., Atrian, S., 2006. The four members of the *Drosophila* metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metal homeostasis and detoxification. *Genes to Cells* 11, 647–658. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00971.x>

Emborski, C., Mikheyev, A.S., 2019. Ancestral diet transgenerationally influences offspring in a parent-of-origin and sex-specific manner. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374, 20180181. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0181>

Eraly, D., Hendrickx, F., Backeljau, T., Bervoets, L., Lens, L., 2011. Direct and indirect effects of metal stress on physiology and life history variation in field populations of a lycosid spider. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1489–1497. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.014>

Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*, 4th edition. ed. Longman.

Faugere, J., Gouveia, D., Ayciriex, S., Chaumot, A., Almunia, C., François, A., Armengaud, J., Lemoine, J., Geffard, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., 2020. High-multiplexed monitoring of protein biomarkers in the sentinel *Gammarus fossarum* by targeted scout-MRM assay, a new vision for ecotoxicoproteomics. *Journal of Proteomics* 226, 103901. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103901>

Feckler, A., Thielsch, A., Schwenk, K., Schulz, R., Bundschuh, M., 2012. Differences in the sensitivity among cryptic lineages of the *Gammarus fossarum* complex. *Science of The Total Environment* 439, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.003>

Feiner, N., Radersma, R., Vasquez, L., Ringnér, M., Nystedt, B., Raine, A., Tobi, E.W., Heijmans, B.T., Uller, T., 2022. Environmentally induced DNA methylation is inherited across generations in an aquatic keystone species. *iScience* 25, 104303. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104303>

Felix-Portillo, M., Martinez-Quintana, J.A., Peregrino-Uriarte, A.B., Yepiz-Plascencia, G., 2014. The metallothionein gene from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and expression in response to hypoxia. *Marine Environmental Research* 101, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.09.005>

Filipović Marijić, V., Dragun, Z., Sertić Perić, M., Matoničkin Kepčija, R., Gulin, V., Velki, M., Ečimović, S., Hackenberger, B.K., Erk, M., 2016. Investigation of the soluble metals in tissue as biological response pattern to environmental pollutants (*Gammarus fossarum* example). *Chemosphere* 154, 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.058>

Fisker, K.V., Holmstrup, M., Sørensen, J.G., 2013. Variation in metallothionein gene expression is associated with adaptation to copper in the earthworm *Dendrobaena octaedra*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 157, 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.11.007>

Fisker, K.V., Sørensen, J.G., Damgaard, C., Pedersen, K.L., Holmstrup, M., 2011. Genetic adaptation of earthworms to copper pollution: is adaptation associated with fitness costs in *Dendrobaena octaedra*? *Ecotoxicology* 20, 563–573. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0610-8>

Flynn, R.W., Love, C.N., Coleman, A., Lance, S.L., 2019. Variation in metal tolerance associated with population exposure history in Southern toads (*Anaxyrus terrestris*). *Aquatic Toxicology* 207, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.009>

Forcella, M., Lau, P., Fabbri, M., Fusi, P., Oldani, M., Melchiorretto, P., Gribaldo, L., Urani, C., 2022. Is Cadmium Toxicity Tissue-Specific? Toxicogenomics Studies Reveal Common and Specific Pathways in Pulmonary, Hepatic, and Neuronal Cell Models. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 1768. <https://doi.org/10.3390/ijms23031768>

Forrow, D.M., Maltby, L., 2000. Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2100–2106.

Frías-Espéricueta, M.G., Bautista-Covarrubias, J.C., Osuna-Martínez, C.C., Delgado-Alvarez, C., Bojórquez, C., Aguilar-Juárez, M., Roos-Muñoz, S., Osuna-López, I., Páez-Osuna, F., 2022. Metals and oxidative stress in aquatic decapod crustaceans: A review with special reference to shrimp and crabs. *Aquatic Toxicology* 242, 106024. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106024>

Fung, C.Y., Zhu, K.Y., Major, K., Poynton, H.C., Huff Hartz, K.E., Wellborn, G., Lydy, M.J., 2021. The contribution of detoxification pathways to pyrethroid resistance in *Hyalella azteca*. *Environ Pollut* 284, 117158. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117158>

Gall, M.L., Holmes, S.P., Dafforn, K.A., Johnston, E.L., 2013. Differential tolerance to copper, but no evidence of population-level genetic differences in a widely-dispersing native barnacle. *Ecotoxicology* 22, 929–937. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1063-z>

Gamble, N.E., Huff Hartz, K.E., Figuero, A.E., Poynton, H.C., Lydy, M.J., 2023. Development of insecticide resistance in *Hyalella azteca*. *Environmental Pollution* 322, 121165. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121165>

Gan, C., Liu, Z., Pang, B., Zuo, D., Hou, Y., Zhou, L., Yu, J., Chen, L., Wang, H., Gu, L., Du, X., Zhu, B., Yi, Y., 2022. Integrative physiological and transcriptome analyses provide insights into the Cadmium (Cd) tolerance of a Cd accumulator: *Erigeron canadensis*. *BMC Genomics* 23, 778. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-09022-5>

Geay L., 2023. Expérimenter la plasticité de la sensibilité et des traits d’histoire de vie chez *Gammarus fossarum* en réponse à une exposition chronique au cadmium. Rapport de stage de BUT2. IUT Lyon 1.

Geffard, A., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., 2002. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* 7, 123–137. <https://doi.org/10.1080/13547500110091292>

Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C., 2001. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. *Biomarkers* 6, 91–107. <https://doi.org/10.1080/13547500010000860>

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, 822–829. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.051>

Geffard, O., Coquery, M., Recoura-Massaquant, R., Perceval, O., Bolzan, D., Bourrain, X., Rebillard, J.P., Navarro, L., Nicolai, M., Casterot, B., Ferreol, M., Villeneuve, B., Chaumot, A., 2021. La biosurveillance active pour le suivi de l'état chimique des cours d'eau continentaux. *Sciences Eaux & Territoires* 82–87. <https://doi.org/10.14758/SET-REVUE.2021.4.15>

Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2249–2259. <https://doi.org/10.1002/etc.268>

Gerencser, G.A. (Ed.), 2010. *Epithelial Transport Physiology*. Humana Press, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-229-2>

Gestin, O., 2022. Organotropisme, toxico-cinétique et devenir des contaminants métalliques chez une espèce sentinelle d'eau douce *Gammarus fossarum*. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard, Lyon.

Gestin, O., Lacoue-Labarthe, T., Coquery, M., Delorme, N., Garnero, L., Dherret, L., Ciccia, T., Geffard, O., Lopes, C., 2021. One and multi-compartments toxico-kinetic modeling to understand metals' organotropism and fate in *Gammarus fossarum*. *Environment International* 156, 106625. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106625>

Gestin, O., Lopes, C., Delorme, N., Garnero, L., Geffard, O., Lacoue-Labarthe, T., 2022. Organ-specific accumulation of cadmium and zinc in *Gammarus fossarum* exposed to environmentally relevant metal concentrations. *Environmental Pollution* 308, 119625. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119625>

Ghemari, C., Ayari, A., Ghribi, F., Nasri-Ammar, K., 2019. Changes in life history characteristics of *Porcellio laevis* (Isopoda: Oniscidea) along a cadmium pollution gradient in Sfax (Central Tunisia). *Biologia* 74, 1475–1487. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00252-9>

Gismondi, E., Thomé, J.-P., Urien, N., Uher, E., Baiwir, D., Mazzucchelli, G., De Pauw, E., Fechner, L.C., Lebrun, J.D., 2017. Ecotoxicoproteomic assessment of the functional alterations caused by chronic metallic exposures in gammarids. *Environmental Pollution* 225, 428–438. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.006>

Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., Cristobal, S., Sheehan, D., Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., 2019. Ecotoxicoproteomics: A decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. *Journal of Proteomics, 10 Year Anniversary of Proteomics* 198, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.001>

Gouveia, D., Chaumot, A., Charnot, A., Almunia, C., François, A., Navarro, L., Armengaud, J., Salvador, A., Geffard, O., 2017. Ecotoxicoproteomics for Aquatic Environmental Monitoring: First *in Situ* Application of a New Proteomics-Based Multibiomarker Assay Using Caged Amphipods. *Environ. Sci. Technol.* 51, 13417–13426. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03736>

Grenier, S., Barre, P., Litrico, I., 2016. Phenotypic Plasticity and Selection: Nonexclusive Mechanisms of Adaptation. *Scientifica* 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/7021701>

Grethlein, M., Pelikan, L., Dombrowski, A., Kabus, J., Oehlmann, J., Weigand, A., Jourdan, J., 2022. Small-scale population structuring results in differential susceptibility to pesticide exposure. *Environmental Sciences Europe* 34, 113. <https://doi.org/10.1186/s12302-022-00690-4>

Groenendijk, D., Lücker, S.M.G., Plans, M., Kraak, M.H.S., Admiraal, W., 2002. Dynamics of metal adaptation in riverine chironomids. *Environmental Pollution* 117, 101–109. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00154-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00154-3)

Groenendijk, D., Opzeeland, B.V., Pires, L.M.D., Postma, J.F., 1999. Fluctuating Life-History Parameters Indicating Temporal Variability in Metal Adaptation in Riverine Chironomids. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 175–181. <https://doi.org/10.1007/s002449900503>

Grzywacz, A., Gdula-Argasińska, J., Muszyńska, B., Tyszka-Czochara, M., Librowski, T., Opoka, W., 2015. Metal responsive transcription factor 1 (MTF-1) regulates zinc dependent cellular processes at the molecular level. *Acta Biochim Pol* 62, 491–498. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1038

Guan, R., Wang, W.-X., 2006a. Comparison between two clones of *Daphnia magna*: Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics. *Aquatic Toxicology* 76, 217–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.10.003>

Guan, R., Wang, W.-X., 2006b. Multigenerational cadmium acclimation and biokinetics in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* 141, 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.036>

Gunn, A.P., McLean, C.A., Crouch, P.J., Roberts, B.R., 2021. Quantification of metallothionein-III in brain tissues using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 630, 114326. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114326>

Gunning, P.W., Hardeman, E.C., 2018. Isoforms: Fundamental differences. *eLife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife>

Günther, V., Lindert, U., Schaffner, W., 2012. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochimica et Biophysica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.005>

Guo, L., Desneux, N., Sonoda, S., Liang, P., Han, P., Gao, X.-W., 2013. Sublethal and transgenerational effects of chlorantraniliprole on biological traits of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *Crop Protection* 48, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.009>

Hammock, B.G., Lesmeister, S., Flores, I., Bradburd, G.S., Hammock, F.H., Teh, S.J., 2016. Low Food Availability Narrows the Tolerance of the Copepod *Eurytemora affinis* to Salinity, but Not to Temperature. *Estuaries and Coasts* 39, 189–200. <https://doi.org/10.1007/s12237-015-9988-5>

Hargeby, A., Petersen Jr, R.C., 1988. Effects of low pH and humus on the survivorship, growth and feeding of *Gammarus pulex* (L.) (amphipoda). *Freshwater Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1988.tb00345.x>

Hawes, N.A., Amadoru, A., Tremblay, L.A., Pochon, X., Dunphy, B., Fidler, A.E., Smith, K.F., 2019. Epigenetic patterns associated with an ascidian invasion: a comparison of closely related clades in their native and introduced ranges. *Sci Rep* 9, 14275. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49813-7>

Heim, J.R., Weston, D.P., Major, K., Poynton, H., Huff Hartz, K.E., Lydy, M.J., 2018. Are there fitness costs of adaptive pyrethroid resistance in the amphipod, *Hyaella azteca*? *Environ Pollut* 235, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.043>

Henry, R.P., Lucu, Č., Onken, H., Weihrauch, D., 2012. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front. Physio.* 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00431>

Hispard, F., Schuler, D., De Vaufleury, A., Scheifler, R., Badot, P.-M., Dallinger, R., 2008. Metal distribution and metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* (gastropoda, pulmonata). *Environ Toxicol Chem* 27, 1533. <https://doi.org/10.1897/07-232.1>

Ho, D.H., Burggren, W.W., 2010. Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective. *Journal of Experimental Biology* 213, 3–16. <https://doi.org/10.1242/jeb.019752>

Hoffmann, A.A., Hercus, M.J., 2000. Environmental Stress as an Evolutionary Force. *BioScience* 50, 217. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2000\)050\[0217:ESAAEF\]2.3.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2000)050[0217:ESAAEF]2.3.CO;2)

Hyne, R.V., 2011. Review of the reproductive biology of amphipods and their endocrine regulation: Identification of mechanistic pathways for reproductive toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2647–2657. <https://doi.org/10.1002/etc.673>

Idrus, F.A., Basri, M.M., Rahim, K.A.A., Rahim, N.S.A., Chong, M.D., 2018. Concentrations of Cadmium, Copper, and Zinc in *Macrobrachium rosenbergii* (Giant Freshwater Prawn) from Natural Environment. *Bull Environ Contam Toxicol* 100, 350–355. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2270-3>

IPBES, 2019. Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3553579>

Isani, G., Carpenè, E., 2014. Metallothioneins, Unconventional Proteins from Unconventional Animals: A Long Journey from Nematodes to Mammals. *Biomolecules* 4, 435–457. <https://doi.org/10.3390/biom4020435>

Janssens, T.K.S., Roelofs, D., van Straalen, N.M., 2009. Molecular mechanisms of heavy metal tolerance and evolution in invertebrates. *Insect Science* 16, 3–18. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2009.00249.x>

Jeremias, G., Veloso, T., Gonçalves, F.J.M., Van Nieuwerburgh, F., Pereira, J.L., Asselman, J., 2022. Multigenerational DNA methylation responses to copper exposure in *Daphnia*: Potential targets for epigenetic biomarkers? *Chemosphere* 308, 136231. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136231>

Johnston, E., 2011. Tolerance to contaminants: evidence from chronically-exposed populations of aquatic organisms, in: *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, pp. 25–46.

Jones, D.T., Hopkin, S.P., 1998. Reduced survival and body size in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* from a metal-polluted environment. *Environmental Pollution* 99, 215–223. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(97\)00188-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00188-7)

Jørgensen, C., Enberg, K., Dunlop, E.S., Arlinghaus, R., Boukal, D.S., Brander, K., Ernande, B., Gårdmark, A.G., Johnston, F., Matsumura, S., Pardoe, H., Raab, K., Silva, A., Vainikka, A., Dieckmann, U., Heino, M., Rijnsdorp, A.D., 2007. Ecology: Managing Evolving Fish Stocks. *Science* 318, 1247–1248. <https://doi.org/10.1126/science.1148089>

Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2012. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. *IJMS* 13, 3145–3175. <https://doi.org/10.3390/ijms13033145>

Kadiene, E.U., Meng, P.-J., Hwang, J.-S., Souissi, S., 2019. Acute and chronic toxicity of cadmium on the copepod *Pseudodiaptomus annandalei*: A life history traits approach. *Chemosphere* 233, 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.220>

Kadiene, E.U., Ouddane, B., Gong, H.-Y., Hwang, J.-S., Souissi, S., 2022. Multigenerational study of life history traits, bioaccumulation, and molecular responses of *Pseudodiaptomus annandalei* to cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 230, 113171. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113171>

Kafel, A., Rozpędek, K., Szulińska, E., Zawisza-Raszka, A., Migula, P., 2014. The effects of cadmium or zinc multigenerational exposure on metal tolerance of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ Sci Pollut Res* 21, 4705–4715. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2409-z>

Kappeler, L., Meaney, M.J., 2010. Epigenetics and parental effects. *Bioessays* 32, 818–827. <https://doi.org/10.1002/bies.201000015>

Kelly, S.A., Panhuis, T.M., Stoehr, A.M., 2012. Phenotypic Plasticity: Molecular Mechanisms and Adaptive Significance, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. Wiley, pp. 1417–1439. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110008>

Kenig, B., Stamenković-Radak, M., Anđelković, M., 2013. Population specific fitness response of *Drosophila subobscura* to lead pollution. *Insect Science* 20, 245–253. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01501.x>

Kestrup, Å., Ricciardi, A., 2010. Influence of conductivity on life history traits of exotic and native amphipods in the St. Lawrence River. *Fundam Appl Limnol* 176, 249–262. <https://doi.org/10.1127/1863-9135/2010/0176-0249>

Khan, A.T., Weis, J.S., D'Andrea, L., 1988. Studies of cadmium tolerance in two populations of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Bull Environ Contam Toxicol* 40, 30–34. <https://doi.org/10.1007/BF01689382>

Khan, F.R., Bury, N.R., Hogstrand, C., 2010. Cadmium bound to metal rich granules and exoskeleton from *Gammarus pulex* causes increased gut lipid peroxidation in zebrafish following single dietary exposure. *Aquatic Toxicology* 96, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.010>

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, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.001>

Kille, P., Andre, J., Anderson, C., Ang, H.N., Bruford, M.W., Bundy, J.G., Donnelly, R., Hodson, M.E., Juma, G., Lahive, E., Morgan, A.J., Stürzenbaum, S.R., Spurgeon, D.J., 2013. DNA sequence variation and methylation in an arsenic tolerant earthworm population. *Soil Biology and Biochemistry* 57, 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.10.014>

Kimberly, D.A., Salice, C.J., 2015. Multigenerational contaminant exposures produce non-monotonic, transgenerational responses in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* 207, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.09.020>

Klerks, P.L., 2002. Adaptation, Ecological Impacts, and Risk Assessment: Insights from Research at Foundry Cove, Bayou Trepagnier, and Pass Fourchon. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8, 971–982. <https://doi.org/10.1080/1080-700291905774>

Klerks, P.L., 1999. Acclimation to Contaminants by the Grass Shrimp *Palaemonetes pugio*: Individual Contaminants vs. Mixtures. *Ecotoxicology* 8, 277–286. <https://doi.org/10.1023/A:1008929215781>

Klerks, P.L., Lentz, S.A., 1998. Resistance to lead and zinc in the western mosquitofish *Gambusia affinis* inhabiting contaminated Bayou Trepagnier. *Ecotoxicology* 7, 11–17. <https://doi.org/10.1023/A:1008851516544>

Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review. *Environmental Pollution* 45, 173–205. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(87\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0269-7491(87)90057-1)

Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A., 2010. *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests, in: Whitacre, D.M. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 205. Springer New York, New York, NY, pp. 1–76. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5623-1_1

Kwok, K.W.H., Grist, E.P.M., Leung, K.M.Y., 2009. Acclimation effect and fitness cost of copper resistance in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. Ecotoxicology and Environmental Safety 72, 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.03.014>

Lalouette, A., Degli Esposti, D., Garnero, L., Allibert, M., Dherret, L., Dabrin, A., Delorme, N., Recoura-Massaquant, R., Chaumot, A., 2023. Acclimation and transgenerational plasticity support increased cadmium tolerance in *Gammarus* populations exposed to natural metal contamination in headwater streams. Science of The Total Environment 903. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166216>

Le, T.T.Y., Zimmermann, S., Sures, B., 2016. How does the metallothionein induction in bivalves meet the criteria for biomarkers of metal exposure? Environmental Pollution 212, 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.070>

Lebrun, J.D., Perret, M., Uher, E., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.04.011>

Lebrun, J.D., Uher, E., Fechner, L.C., 2017. Behavioural and biochemical responses to metals tested alone or in mixture (Cd-Cu-Ni-Pb-Zn) in *Gammarus fossarum*: From a multi-biomarker approach to modelling metal mixture toxicity. Aquat Toxicol 193, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.018>

Lépeule L., 2022. Etude de l'organostropisme des métallothionéines et du rôle de leur expression dans l'acquisition de la tolérance au cadmium chez l'espèce *Gammarus fossarum*. Rapport de stage de master 2. Université de Bordeaux.

Leprêtre, M., Chaumot, A., Aboud, R., Delorme, N., Espeyte, A., Salvador, A., Ayciriex, S., Armengaud, J., Coquery, M., Geffard, O., Degli-Esposti, D., 2023. Dynamic Multiple Reaction Monitoring of amphipod *Gammarus fossarum* caeca expands molecular information for understanding the impact of contaminants. Science of The Total Environment 893, 164875. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164875>

Leprêtre, M., Geffard, A., Palos Ladeiro, M., Dedourge-Geffard, O., David, E., Delahaut, L., Bonnard, I., Barjhoux, I., Nicolai, M., Noury, P., Espeyte, A., Chaumot, A., Degli-Esposti, D., Geffard, O., Lopes, C., 2022a. Determination of biomarkers threshold values and illustration of their use for the diagnostic in large-scale freshwater biomonitoring surveys. Environmental Sciences Europe 34, 115. <https://doi.org/10.1186/s12302-022-00692-2>

Leprêtre, M., Geffard, O., Espeyte, A., Faugere, J., Ayciriex, S., Salvador, A., Delorme, N., Chaumot, A., Degli-Esposti, D., 2022b. Multiple reaction monitoring mass spectrometry for the discovery of environmentally modulated proteins in an aquatic invertebrate sentinel species, *Gammarus fossarum*. *Environmental Pollution* 315, 120393. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120393>

Levinton, J.S., Suatoni, E., Wallace, W., Junkins, R., Kelaher, B., Allen, B.J., 2003. Rapid loss of genetically based resistance to metals after the cleanup of a Superfund site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9889–9891. <https://doi.org/10.1073/pnas.1731446100>

Li, H., Shi, L., Wang, D., Wang, M., 2015. Impacts of mercury exposure on life history traits of *Tigriopus japonicus*: Multigeneration effects and recovery from pollution. *Aquatic Toxicology* 166, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.015>

Li, S., Sheng, L., Xu, J., Tong, H., Jiang, H., 2016. The induction of metallothioneins during pulsed cadmium exposure to *Daphnia magna*: Recovery and trans-generational effect. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.015>

Li, Y., Yang, H., Liu, N., Luo, J., Wang, Q., Wang, L., 2015. Cadmium Accumulation and Metallothionein Biosynthesis in Cadmium-Treated Freshwater Mussel *Anodonta woodiana*. *PLoS ONE* 10, e0117037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117037>

Lin, H.C., Hsu, S.C., Hwang, P.P., 2000. Maternal transfer of cadmium tolerance in larval *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* 57, 239–248. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb00789.x>

Liu, X., Jiang, H., Ye, B., Qian, H., Guo, Z., Bai, H., Gong, J., Feng, J., Ma, K., 2021. Comparative transcriptome analysis of the gills and hepatopancreas from *Macrobrachium rosenbergii* exposed to the heavy metal Cadmium (Cd²⁺). *Sci Rep* 11, 16140. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95709-w>

Liu, Y., Du, C., Lin, C., Gao, X., Zhu, J., Zhang, C., 2022. Characterization of Copper/Zinc Superoxide Dismutase Activity on *Phascolosoma esculenta* (Sipuncula: Phascolosomatidea) and Its Protection from Oxidative Stress Induced by Cadmium. *IJMS* 23, 12136. <https://doi.org/10.3390/ijms232012136>

Lloyd, V., 2000. Parental Imprinting in *Drosophila*. *Genetika* 109, 35–44. <https://doi.org/10.1023/a:1026592318341>

Lopes, I., Baird, D.J., Ribeiro, R., 2006. Genetic adaptation to metal stress by natural populations of *Daphnia longispina*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.12.015>

Lopes, I., Baird, D.J., Ribeiro, R., 2004. Genetic Determination of Tolerance to Lethal and Sublethal Copper Concentrations in Field Populations of *Daphnia longispina*. *Arch Environ Contam Toxicol* 46, 43–51. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-2143-5>

- Luo, M.**, Finet, C., Cong, H., Wei, H., Chung, H., 2020. The evolution of insect metallothioneins. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 287. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2189>
- Luoma, S.N.**, 1977. Detection of Trace Contaminant Effects in Aquatic Ecosystems. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 34, 436–439. <https://doi.org/10.1139/f77-072>
- Luoma, S.N.**, Cain, D.J., Ho, K., Hutchinson, A., 1983. Variable tolerance to Copper in two species from San Francisco bay. *Marine Environmental Research* 10, 209–222. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(83\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0141-1136(83)90002-8)
- Ma, W.**, Wang, L., He, Y., Yan, Y., 2008. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanens* during acute exposure to waterborne cadmium. *Environmental toxicology* 23, 393–400. <https://doi.org/10.1002/tox.20339>
- Mackie, J.A.**, Levinton, J.S., Przeslawski, R., Delambert, D., Wallace, W., 2010. Loss of evolutionary resistance by the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* to a toxic substance--cost or gene flow? *Evolution* 64, 152–165. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00806.x>
- Macneil, C.**, Dick, J.T.A., Elwood, R.W., 2007. The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (crustacean : amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews* 72, 349–364. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1997.tb00017.x>
- Mahmood, K.**, Yang, J.-S., Chen, D., Wang, M., Yang, F., Yang, W.-J., 2009. Response of metallothionein gene-1 to laboratory exposure to heavy metals and thermal stress in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Hazardous Materials* 167, 523–530. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.029>
- Major, K.M.**, Weston, D.P., Lydy, M.J., Huff Hartz, K.E., Wellborn, G.A., Manny, A.R., Poynton, H.C., 2020. The G119S ace-1 mutation confers adaptive organophosphate resistance in a nontarget amphipod. *Evol Appl* 13, 620–635. <https://doi.org/10.1111/eva.12888>
- Major, K.M.**, Weston, D.P., Wellborn, G.A., Lydy, M.J., Poynton, H.C., 2022. Predicting Resistance: Quantifying the Relationship between Urban Development, Agricultural Pesticide Use, and Pesticide Resistance in a Nontarget Amphipod. *Environ. Sci. Technol.* 56, 14649–14659. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c04245>
- Maltby, L.**, 1991. Pollution as a Probe of Life-History Adaptation in *Asellus aquaticus* (Isopoda). *Oikos* 61, 11. <https://doi.org/10.2307/3545402>
- Maltby, L.**, Crane, M., 1994. Responses of *Gammarus pulex* (amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution* 84, 45–52. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(94\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0269-7491(94)90069-8)
- Mao, H.**, Wang, D.-H., Yang, W.-X., 2012. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquatic Toxicology* 110–111, 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.018>

Martinez, M., Ramo, J.D., Torreblanca, A., Pastor, A., Diaz-Mayans, J., 1996. Cadmium toxicity, accumulation and metallothionein induction in *Echinogammarus echinosetosus*. Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology 31, 1605–1617. <https://doi.org/10.1080/10934529609376445>

Martins, C., Jesus, F.T., Nogueira, A.J.A., 2017. The effects of Copper and Zinc on survival, growth and reproduction of the cladoceran *Daphnia longispina*: introducing new data in an “old” issue. Ecotoxicology 26, 1157–1169. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1841-0>

Martins, N., Lopes, I., Guilhermino, L., Bebianno, M.J., Ribeiro, R., 2005. Lack of Evidence for Metallothionein Role in Tolerance to Copper by Natural Populations of *Daphnia longispina*. Bull Environ Contam Toxicol 74, 761–768. <https://doi.org/10.1007/s00128-005-0647-6>

Masala, O., O’Brien, P., Rainbow, P.S., 2004. Analysis of metal-containing granules in the barnacle *Tetraclita squamosa*. Journal of Inorganic Biochemistry 98, 1095–1102. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.03.004>

Massamba-N’Siala, G., Prevedelli, D., Simonini, R., 2014. Trans-generational plasticity in physiological thermal tolerance is modulated by maternal pre-reproductive environment in the polychaete *Ophryotrocha labronica*. Journal of Experimental Biology jeb.094474. <https://doi.org/10.1242/jeb.094474>

Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., Poggiale, J.-C., 2010. Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. Aquatic Toxicology 99, 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.006>

Mažuran, N., Hršak, V., Kovačević, G., 2022. Fitness recovery and two-generation phenotypic plasticity in the freshwater snail *Planorbis corneus* L. exposed to hyperosmotic solutions. Period Biol 124, 29–40. <https://doi.org/10.18054/pb.v124i1-2.11623>

McEachern, L.A., Bartlett, N.J., Lloyd, V.K., 2014. Endogenously imprinted genes in *Drosophila melanogaster*. Mol Genet Genomics 289, 653–673. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0840-6>

McGee, B.L., Wright, D.A., Fisher, D.J., 1998. Biotic Factors Modifying Acute Toxicity of Aqueous Cadmium to Estuarine Amphipod *Leptocheirus plumulosus*. Arch Environ Contam Toxicol 34, 34–40. <https://doi.org/10.1007/s002449900283>

McNamara, J.C., Faria, S.C., 2012. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. J Comp Physiol B 182, 997–1014. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0665-8>

Medina, M.H., Correa, J.A., Barata, C., 2007. Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. Chemosphere 67, 2105–2114. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.024>

Mehus, A.A., Muhonen, W.W., Garrett, S.H., Somji, S., Sens, D.A., Shabb, J.B., 2014. Quantitation of Human Metallothionein Isoforms: A Family of Small, Highly Conserved, Cysteine-rich Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* 13, 1020–1033. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.033373>

Merritt, T.J.S., Bewick, A.J., 2017. Genetic Diversity in Insect Metal Tolerance. *Front. Genet.* 8, 172. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00172>

Mireji, P.O., Keating, J., Hassanali, A., Impoinvil, D.E., Mbogo, C.M., Muturi, M.N., Nyambaka, H., Kenya, E.U., Githure, J.I., Beier, J.C., 2010. Expression of metallothionein and α -tubulin in heavy metal-tolerant *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.08.004>

Morgan, A.J., Kille, P., Stürzenbaum, S.R., 2007. Microevolution and Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1085–1096. <https://doi.org/10.1021/es061992x>

Morimoto, J., 2022. Parental ecological history can differentially modulate parental age effects on offspring physiological traits in *Drosophila*. *Current Zoology* 68, 391–399. <https://doi.org/10.1093/cz/zoab081>

Mousseau, T., Fox, C.W., 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution* 13, 403–407. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01472-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01472-4)

Munkittrick, K.R., Dixon, D.G., 1988. Evidence for a maternal yolk factor associated with increased tolerance and resistance of feral white sucker (*Catostomus commersoni*) to waterborne copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 15, 7–20. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(88\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0147-6513(88)90038-3)

Muyssen, B.T.A., Janssen, C.R., 2001. Multigeneration zinc acclimation and tolerance in *Daphnia magna*: Implications for water-quality guidelines and ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 20, 2053–2060. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200926>

Nassiri, Y., Rainbow, P.S., Amiard-Triquet, C., Rainglet, F., Smith, B.D., 2000. Trace-metal detoxification in the ventral caeca of *Orchestia gammarellus* (Crustacea: Amphipoda). *Marine Biology* 136, 477–484. <https://doi.org/10.1007/s002270050707>

Neuparth, T., Costa, F.O., Costa, M.H., 2001. Effects of Temperature and Salinity on Life History of the Marine Amphipod *Gammarus locusta*. Implications for Ecotoxicological Testing. <https://doi.org/10.1023/A:1013797130740>

Norouzitallab, P., Baruah, K., Vandegheuchte, M., Van Stappen, G., Catania, F., Bussche, J.V., Vanhaecke, L., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2014. Environmental heat stress induces epigenetic transgenerational inheritance of robustness in parthenogenetic *Artemia* model. *The FASEB Journal* 28, 3552–3563. <https://doi.org/10.1096/fj.14-252049>

Nunez-Nogueira, G., Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S., 2006. Subcellular distribution of zinc and cadmium in the hepatopancreas and gills of the decapod crustacean *Penaeus indicus*. *Mar Biol* 150, 197–211. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0350-0>

Nylin, S., Gotthard, K., 1998. Plasticity in Life-History Traits. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 63–83. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.63>

O'Connor, C.M., Cooke, S.J., 2015. Ecological carryover effects complicate conservation. *Ambio* 44, 582–591. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0630-3>

Oguma, A.Y., Klerks, P.L., 2017. Pollution-induced community tolerance in benthic macroinvertebrates of a mildly lead-contaminated lake. *Environ Sci Pollut Res* 24, 19076–19085. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9553-9>

Ogunlaja, A., Sharma, V., Lin, J., 2020. Ex-situ induction of Metallothionein gene in *Lybiodrilus violaceus* post cadmium and zinc exposure. *Gene Reports* 20, 100701. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100701>

Oppold, A., Kreß, A., Vanden Bussche, J., Diogo, J.B., Kuch, U., Oehlmann, J., Vandegehuchte, M.B., Müller, R., 2015. Epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.036>

Osborne, R.K., Gillis, P.L., Prosser, R.S., 2020. Transgenerational Effects of Copper on a Freshwater Gastropod, *Planorbella pilsbryi*. *Freshwater Mollusk Biology and Conservation* 23, 42. <https://doi.org/10.31931/fmbc.v22i2.2020.42-54>

Otero-Fariña, A., Rétif, J., Métais, I., Poirier, L., Châtel, A., 2022. Relevance of cell subcompartmentalization techniques to predict adverse effects of metals in bivalves and fish. *Ecological Indicators* 144, 109491. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109491>

Oziolor, E.M., De Schampelaere, K., Matson, C.W., 2016. Evolutionary toxicology: Meta-analysis of evolutionary events in response to chemical stressors. *Ecotoxicology* 25, 1858–1866. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1735-6>

Oziolor, E.M., DeSchampelaere, K., Lyon, D., Nacci, D., Poynton, H., 2020. Evolutionary Toxicology—An Informational Tool for Chemical Regulation? *Environ Toxicol Chem* 39, 257–268. <https://doi.org/10.1002/etc.4611>

Pakyari, H., Enkegaard, A., 2015. Sublethal and Transgenerational Effects of Abamectin on the Biological Performance of the Predatory Thrips *Scolothrips longicornis* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology* 108, 559–565. <https://doi.org/10.1093/jee/tou098>

Palacios, Ò., Atrian, S., Capdevila, M., 2011. Zn- and Cu-thioneins: a functional classification for metallothioneins? *J Biol Inorg Chem* 16, 991–1009. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0827-2>

Pane, E.F., McGeer, J.C., Wood, C.M., 2004. Effects of chronic waterborne nickel exposure on two successive generations of *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 23, 1051. <https://doi.org/10.1897/03-208>

Park, J.C., Hagiwara, A., Park, H.G., Lee, J.-S., 2020. The glutathione S-transferase genes in marine rotifers and copepods: Identification of GSTs and applications for

ecotoxicological studies. *Marine Pollution Bulletin* 156, 111080. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111080>

Paul, J.S., Small, B.C., 2021. Chronic exposure to environmental cadmium affects growth and survival, cellular stress, and glucose metabolism in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquatic Toxicology* 230, 105705. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105705>

Pedrosa, J., Campos, D., Cocchiararo, B., Nowak, C., Soares, A.M.V.M., Barata, C., L. T. Pestana, J., 2017a. Evolutionary consequences of historical metal contamination for natural populations of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Ecotoxicology* 26, 534–546. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1784-5>

Pedrosa, J., Gravato, C., Campos, D., Cardoso, P., Figueira, E., Nowak, C., Soares, A.M.V.M., Barata, C., Pestana, J.L.T., 2017b. Investigating heritability of cadmium tolerance in *Chironomus riparius* natural populations: A physiological approach. *Chemosphere* 170, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.008>

Pellet, B., Geffard, O., Lacour, C., Kermaol, 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. *Environ Toxicol Chem* 28, 2434. <https://doi.org/10.1897/09-042.1>

Pereira Righi, B.D., Abujamara, L.D., Barcarolli, I.F., Jorge, M.B., Zebral, Y.D., Costa, P.G., dos Reis Martinez, C.B., Bianchini, A., 2022. Response of biomarkers to metals, hydrocarbons and organochlorine pesticides contamination in crabs (*Callinectes ornatus* and *C. bocourti*) from two tropical estuaries (São José and São Marcos bays) of the Maranhão State (northeastern Brazil). *Chemosphere* 288, 132649. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132649>

Persson, L., Carney Almroth, B.M., Collins, C.D., Cornell, S., De Wit, C.A., Diamond, M.L., Fantke, P., Hassellöv, M., MacLeod, M., Ryberg, M.W., Søgaaard Jørgensen, P., Villarrubia-Gómez, P., Wang, Z., Hauschild, M.Z., 2022. Outside the Safe Operating Space of the Planetary Boundary for Novel Entities. *Environ. Sci. Technol.* 56, 1510–1521. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04158>

Pfennig, D.W., 2021. *Phenotypic Plasticity & Evolution: Causes, Consequences, Controversies*, 1st ed. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9780429343001>

Pham, H.T., Dinh, K.V., Hoang, T.-H.T., 2021. Reversible and irreversible transgenerational effects of metal exposure on nine generations of a tropical micro-crustacean. *Environmental Pollution* 276, 116631. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116631>

Piersma, T., Drent, J., 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 228–233. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00036-3)

Piironen, S., Boman, S., Lyytinen, A., Mappes, J., Lindström, L., 2014. Sublethal effects of deltamethrin exposure of parental generations on physiological traits and overwintering in *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Applied Entomology* 138, 149–158. <https://doi.org/10.1111/jen.12088>

Pike, R.G., Redding, T.E., Schwarz, C.J., 2016. Development and testing of a modified transparent velocity-head rod for stream discharge measurements. *Canadian Water Resources Journal / Revue canadienne des ressources hydriques* 41, 372–384. <https://doi.org/10.1080/07011784.2015.1127776>

Pinto, P.I., Anjos, L., Estêvão, M.D., Santos, S., Santa, C., Manadas, B., Monsinjon, T., Canário, A.V.M., Power, D.M., 2022. Proteomics of sea bass skin-scales exposed to the emerging pollutant fluoxetine compared to estradiol. *Science of The Total Environment* 814, 152671. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152671>

Piscart, C., Bollache, L., 2012. Crustacés amphipodes de surface (Gammarus d'eau douce), Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales de France. Association Française de Limnologie (AFL), Thonon-les-Bains.

Plautz, S.C., Guest, T., Funkhouser, M.A., Salice, C.J., 2013. Transgenerational cross-tolerance to stress: parental exposure to predators increases offspring contaminant tolerance. *Ecotoxicology* 22, 854–861. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1056-y>

Plautz, S.C., Salice, C.J., 2013. Plasticity in offspring contaminant tolerance traits: developmental cadmium exposure trumps parental effects. *Ecotoxicology* 22, 847–853. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1076-7>

Pöckl, M., 1992. Effects of temperature, age and body size on moulting and growth in the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. *Freshwater Biol* 27, 211–225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1992.tb00534.x>

Posthuma, L., Van Straalen, N.M., 1993. Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 106, 11–38. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90251-F](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90251-F)

Posthuma, L., Verweij, R.A., Widianarko, B., Zonneveld, C., 1993. Life-History Patterns in Metal-Adapted Collembola. *Oikos* 67, 235. <https://doi.org/10.2307/3545468>

Postma, J.F., Davids, C., 1995. Tolerance induction and life cycle changes in cadmium-exposed *Chironomus riparius* (Diptera) during Consecutive Generations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30, 195–202. <https://doi.org/10.1006/eesa.1995.1024>

Postma, J.F., Van Kleunen, A., Admiraal, W., 1995. Alterations in life-history traits of *Chironomus riparius* (diptera) obtained from metal contaminated rivers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 469–475. <https://doi.org/10.1007/BF00208376>

Potet, M., Giambérini, L., Pain-Devin, S., Louis, F., Bertrand, C., Devin, S., 2018. Differential tolerance to nickel between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* populations. *Sci Rep* 8, 700. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19228-x>

Poynton, H.C., Hasenbein, S., Benoit, J.B., Sepulveda, M.S., Poelchau, M.F., Hughes, D.S.T., Murali, S.C., Chen, S., Glastad, K.M., Goodisman, M.A.D., Werren, J.H., Vineis, J.H., Bowen, J.L., Friedrich, M., Jones, J., Robertson, H.M., Feyereisen, R., Mechler-Hickson, A., Mathers, N., Lee, C.E., Colbourne, J.K., Biales, A., Johnston, J.S., Wellborn, G.A., Rosendale, A.J., Cridge, A.G., Munoz-Torres, M.C., Bain, P.A., Manny, A.R., Major, K.M., Lambert, F.N., Vulpe, C.D., Tuck, P., Blalock, B.J., Lin, Y.-Y., Smith, M.E., Ochoa-Acuña, H., Chen, M.-J.M., Childers, C.P., Qu, J., Dugan, S., Lee, S.L., Chao, H., Dinh, H., Han, Y., Doddapaneni, H., Worley, K.C., Muzny, D.M., Gibbs, R.A., Richards, S., 2018. The Toxicogenome of *Hyalella azteca*: A Model for Sediment Ecotoxicology and Evolutionary Toxicology. *Environ. Sci. Technol.* 52, 6009–6022. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00837>

Prato, E., Biandolino, F., Scardicchio, C., 2008. Implications for toxicity tests with amphipod *Gammarus aequicauda*: effects of temperature and salinity on life cycle. *Environmental Technology* 29, 1349–1356. <https://doi.org/10.1080/09593330802379482>

Prato, E., Fabbrocini, A., Libralato, G., Migliore, L., Parlapiano, I., D’Adamo, R., Rotini, A., Manfra, L., Lofrano, G., Carraturo, F., Trifuoggi, M., Biandolino, F., 2021. Comparative toxicity of ionic and nanoparticulate zinc in the species *Cymodoce truncata*, *Gammarus aequicauda* and *Paracentrotus lividus*. *Environ Sci Pollut Res* 28, 42891–42900. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13712-0>

Prud’homme, S.M., Chaumot, A., Cassar, E., David, J.-P., Reynaud, S., 2017. Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito *Aedes aegypti*: On the relevance of transgenerational studies. *Environmental Pollution* 220, 242–254. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.056>

Quintaneiro, C., Ranville, J., Nogueira, A.J.A., 2015. Effects of the essential metals copper and zinc in two freshwater detritivores species: Biochemical approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 118, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.006>

Rackliffe, D.R., Hoverman, J.T., 2022. Population-level variation in pesticide tolerance predicts survival under field conditions in mayflies. *Ecotoxicology* 31, 1477–1484. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02603-w>

Rainbow, P.S., 2007. Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. *Environment International* 33, 576–582. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.007>

Reátegui-Zirena, E.G., Fidler, B.N., Olson, A.D., Dawson, D.E., Bilbo, T.R., Salice, C.J., 2017. Transgenerational endpoints provide increased sensitivity and insight into multigenerational responses of *Lymnaea stagnalis* exposed to cadmium. *Environmental Pollution* 224, 572–580. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.02.040>

Reinwald, H., Alvincz, J., Salinas, G., Schäfers, C., Hollert, H., Eilebrecht, S., 2022. Toxicogenomic profiling after sublethal exposure to nerve- and muscle-targeting insecticides reveals cardiac and neuronal developmental effects in zebrafish embryos. *Chemosphere* 291, 132746. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132746>

Rivera, H.E., Aichelman, H.E., Fifer, J.E., Kriefall, N.G., Wuitchik, D.M., Wuitchik, S.J.S., Davies, S.W., 2021a. A framework for understanding gene expression plasticity and its influence on stress tolerance. *Mol Ecol* 30, 1381–1397. <https://doi.org/10.1111/mec.15820>

Rivera, H.E., Chen, C.-Y., Gibson, M.C., Tarrant, A.M., 2021b. Plasticity in parental effects confers rapid larval thermal tolerance in the estuarine anemone *Nematostella vectensis*. *Journal of Experimental Biology* 224, jeb236745. <https://doi.org/10.1242/jeb.236745>

Rocha, T.L., Bilbao, E., Cardoso, C., Soto, M., Bebianno, M.J., 2018. Changes in metallothionein transcription levels in the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to CdTe quantum dots. *Ecotoxicology* 27, 402–410. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1903-y>

Roelofs, D., Janssens, T.K.S., Timmermans, M.J.T.N., Nota, B., Mariën, J., Bochdanovits, Z., Ylstra, B., Van Straalen, N.M., 2009. Adaptive differences in gene expression associated with heavy metal tolerance in the soil arthropod *Orchesella cincta*. *Molecular Ecology* 18, 3227–3239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04261.x>

Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 22, 81–114. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90026-J](https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90026-J)

Rollin, M., Coulaud, R., Danger, M., Sohm, B., Flayac, J., Bec, A., Chaumot, A., Geffard, O., Felten, V., 2018. Additive effect of calcium depletion and low resource quality on *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) life history traits. *Environ Sci Pollut Res* 25, 11264–11280. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9390-x>

Romero-Blanco, A., Alonso, Á., 2022. Laboratory versus wild populations: the importance of population origin in aquatic ecotoxicology. *Environ Sci Pollut Res* 29, 22798–22808. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17370-0>

Rosabal, M., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2012. Subcellular metal partitioning in larvae of the insect *Chaoborus* collected along an environmental metal exposure gradient (Cd, Cu, Ni and Zn). *Aquatic Toxicology* 120–121, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.05.001>

Rožen, A., 2006. Effect of cadmium on life-history parameters in *Dendrobaena octaedra* (Lumbricidae: Oligochaeta) populations originating from forests differently polluted with heavy metals. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 489–503. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.003>

Ruiz, T., Koussoroplis, A.-M., Felten, V., Bec, A., 2022. Nutritional context modulates the salinity tolerance of freshwater invertebrates. *Aquat Ecol* 56, 905–915. <https://doi.org/10.1007/s10452-022-09975-5>

Rukke, N.A., 2002. Effects of low calcium concentrations on two common freshwater crustaceans, *Gammarus lacustris* and *Astacus astacus*: Calcium limitation in crustaceans. *Functional Ecology* 16, 357–366. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2002.00637.x>

Sarkis, N., Geffard, O., Souchon, Y., Chandesris, A., Ferréol, M., Valette, L., Alric, B., François, A., Piffady, J., Chaumot, A., Villeneuve, B., 2020. How to quantify the links between bioavailable contamination in watercourses and pressures of anthropogenic land cover, contamination sources and hydromorphology at multiple scales? *Science of The Total Environment* 735, 139492. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139492>

Schneeweiss, A., Schreiner, V.C., Liess, M., Röder, N., Schwenk, K., Schäfer, R.B., 2023. Population structure and insecticide response of *Gammarus* spp. in agricultural and upstream forested sites of small streams. *Environ Sci Eur* 35, 41. <https://doi.org/10.1186/s12302-023-00747-y>

Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., Von Gunten, U., Wehrli, B., 2006. The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science* 313, 1072–1077. <https://doi.org/10.1126/science.1127291>

Sellin, M.K., Kolok, A.S., 2006. Maternally derived Cu tolerance in larval fathead minnows: how long does it persist? *Journal Fish Biology* 69, 1570–1574. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01210.x>

Sever, H.C., Heim, J.R., Lydy, V.R., Fung, C.Y., Huff Hartz, K.E., Giroux, M.S., Andrzejczyk, N., Major, K.M., Poynton, H.C., Lydy, M.J., 2020. Recessivity of pyrethroid resistance and limited interspecies hybridization across *Hyaella* clades supports rapid and independent origins of resistance. *Environ Pollut* 266, 115074. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115074>

Sha, Y., Hansson, L., 2022. Ancestral environment determines the current reaction to ultraviolet radiation in *Daphnia magna*. *Evolution* 76, 1821–1835. <https://doi.org/10.1111/evo.14555>

Shahid, N., Becker, J.M., Krauss, M., Brack, W., Liess, M., 2018a. Adaptation of *Gammarus pulex* to agricultural insecticide contamination in streams. *Science of The Total Environment* 621, 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.220>

Shahid, N., Becker, J.M., Krauss, M., Brack, W., Liess, M., 2018b. Pesticide Body Burden of the Crustacean *Gammarus pulex* as a Measure of Toxic Pressure in Agricultural Streams. *Environ. Sci. Technol.* 52, 7823–7832. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01751>

Shaw, J.R., Colbourne, J.K., Glaholt, S.P., Turner, E., Folt, C.L., Chen, C.Y., 2019. Dynamics of Cadmium Acclimation in *Daphnia pulex*: Linking Fitness Costs, Cross-Tolerance, and Hyper-Induction of Metallothionein. *Environ. Sci. Technol.* 53, 14670–14678. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05006>

Siddique, A., Liess, M., Shahid, N., Becker, J.M., 2020. Insecticides in agricultural streams exert pressure for adaptation but impair performance in *Gammarus pulex* at regulatory acceptable concentrations. *Science of The Total Environment* 722, 137750. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137750>

Siddique, A., Shahid, N., Liess, M., 2021. Multiple Stress Reduces the Advantage of Pesticide Adaptation. *Environ. Sci. Technol.* 55, 15100–15109. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02669>

Sigmund, G., Ågerstrand, M., Antonelli, A., Backhaus, T., Brodin, T., Diamond, M.L., Erdelen, W.R., Evers, D.C., Hofmann, T., Hueffer, T., Lai, A., Torres, J.P.M., Mueller, L., Perrigo, A.L., Rillig, M.C., Schaeffer, A., Scherlinger, M., Schirmer, K., Tlili, A., Soehl, A., Triebkorn, R., Vlahos, P., vom Berg, C., Wang, Z., Groh, K.J., 2023. Addressing chemical pollution in biodiversity research. *Global Change Biology* 29, 3240–3255. <https://doi.org/10.1111/gcb.16689>

Skinner, M.K., Nilsson, E.E., 2018. Epigenetic Transgenerational Inheritance Across Species, in: *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier, pp. 442–445. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64512-9>

Slobodian, M.R., Petahtegoose, J.D., Wallis, A.L., Levesque, D.C., Merritt, T.J.S., 2021. The Effects of Essential and Non-Essential Metal Toxicity in the *Drosophila melanogaster*. Insect Model: A Review. *Toxics* 9, 269. <https://doi.org/10.3390/toxics9100269>

Šrut, M., 2021. Ecotoxicological epigenetics in invertebrates: Emerging tool for the evaluation of present and past pollution burden. *Chemosphere* 282, 131026. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131026>

Stearns, S.C., 1992. *The Evolution of Life Histories*. Oxford Univ. Press.

Sterenborg, I., Roelofs, D., 2003. Field-selected cadmium tolerance in the springtail *Orchesella cincta* is correlated with increased metallothionein mRNA expression. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 741–747. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(03\)00070-5](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(03)00070-5)

Sterling, K.M., Mandal, P.K., Roggenbeck, B.A., Ahearn, S.E., Gerencser, G.A., Ahearn, G.A., 2007. Heavy metal detoxification in crustacean epithelial lysosomes: role of anions in the compartmentalization process. *Journal of Experimental Biology* 210, 3484–3493. <https://doi.org/10.1242/jeb.008300>

Stohs, S., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 321–336. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H)

Straub, L., Strobl, V., Neumann, P., 2020. The need for an evolutionary approach to ecotoxicology. *Nat Ecol Evol* 4, 895. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1194-6>

Stuhlbacher, A., Maltby, L., 1992. Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22. <https://doi.org/10.1007/BF00212093>

Sun, P.Y., Foley, H.B., Handschumacher, L., Suzuki, A., Karamanukyan, T., Edmands, S., 2014. Acclimation and adaptation to common marine pollutants in the copepod *Tigriopus californicus*. *Chemosphere* 112, 465–471. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.023>

Švara, V., Krauss, M., Michalski, S.G., Altenburger, R., Brack, W., Luckenbach, T., 2021. Chemical Pollution Levels in a River Explain Site-Specific Sensitivities to Micropollutants within a Genetically Homogeneous Population of Freshwater Amphipods. *Environ. Sci. Technol.* 55, 6087–6096. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07839>

Tanaka, Y., Tatsuta, H., 2013. Retrospective estimation of population-level effect of pollutants based on local adaptation and fitness cost of tolerance. *Ecotoxicology* 22, 795–802. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1081-x>

Tang, S., Wu, Y., Ryan, C.N., Yu, S., Qin, G., Edwards, D.S., Mayer, G.D., 2015. Distinct expression profiles of stress defense and DNA repair genes in *Daphnia pulex* exposed to cadmium, zinc, and quantum dots. *Chemosphere* 120, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.011>

Tariel, J., Plénet, S., Luquet, É., 2020. Transgenerational plasticity of inducible defences: Combined effects of grand-parental, parental and current environments. *Ecol Evol* 10, 2367–2376. <https://doi.org/10.1002/ece3.6046>

Tarnawska, M., Kafel, A., Augustyniak, M., Rost-Roszkowska, M., Babczyńska, A., 2019. Microevolution or wide tolerance? Level of stress proteins in the beet armyworm *Spodoptera eqigua* hübner (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to cadmium for over 150 generations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 178, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.017>

Teperek, M., Miyamoto, K., 2013. Nuclear reprogramming of sperm and somatic nuclei in eggs and oocytes. *Reprod Med Biol* 12, 133–149. <https://doi.org/10.1007/s12522-013-0155-z>

Teperek, M., Simeone, A., Gaggioli, V., Miyamoto, K., Allen, G.E., Erkek, S., Kwon, T., Marcotte, E.M., Zegerman, P., Bradshaw, C.R., Peters, A.H.F.M., Gurdon, J.B., Jullien, J., 2016. Sperm is epigenetically programmed to regulate gene transcription in embryos. *Genome Res* 26, 1034–1046. <https://doi.org/10.1101/gr.201541.115>

Timmermans, M.J.T.N., Ellers, J., Roelofs, D., van Straalen, N.M., 2005. Metallothionein mRNA Expression and Cadmium Tolerance in Metal-stressed and Reference Populations of the Springtail *Orchesella cincta*. *Ecotoxicology* 14, 727–739. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0020-x>

Tsui, M.T.K., Wang, W.-X., 2005. Influences of maternal exposure on the tolerance and physiological performance of *Daphnia magna* under mercury stress. *Environ Toxicol Chem* 24, 1228. <https://doi.org/10.1897/04-190R.1>

Uller, T., 2008. Developmental plasticity and the evolution of parental effects. *Trends in Ecology & Evolution* 23, 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.04.005>

Unsal, V., Dalkıran, T., Çiçek, M., Kölükcü, E., 2020. The Role of Natural Antioxidants Against Reactive Oxygen Species Produced by Cadmium Toxicity: A Review. *Adv Pharm Bull* 10, 184–202. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.023>

Urien, N., Lebrun, J.D., Fechner, L.C., Uher, E., François, A., Quéau, H., Coquery, M., Chaumot, A., Geffard, O., 2016. Environmental relevance of laboratory-derived kinetic models to predict trace metal bioaccumulation in gammarids: Field experimentation at a large spatial scale (France). *Water Research* 95, 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.023>

Urien, N., Uher, E., Billoir, E., Geffard, O., Fechner, L.C., Lebrun, J.D., 2015. A biodynamic model predicting waterborne lead bioaccumulation in *Gammarus pulex*: Influence of water chemistry and in situ validation. *Environmental Pollution* 203, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.045>

Väinölä, R., Witt, J.D.S., Grabowski, M., Bradbury, J.H., Jazdzewski, K., Sket, B., 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 241–255. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9020-6>

van Straalen, N.M., 2003. Peer Reviewed: Ecotoxicology Becomes Stress Ecology. *Environmental Science & Technology* 37, 324–330. <https://doi.org/10.1021/es0325720>

van Straalen, N.M., Hoffmann, A.A., 2000. Review of experimental evidence for physiological costs of tolerance to toxicants., in: *Demography in Ecotoxicology*. John Wiley and Sons, pp. 115–124.

van Straalen, N.M., Timmermans, M.J.T.N., 2002. Genetic Variation in Toxicant-Stressed Populations: An Evaluation of the “Genetic Erosion” Hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8, 983–1002. <https://doi.org/10.1080/1080-700291905783>

Vardhan, K.H., Kumar, P.S., Panda, R.C., 2019. A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. *Journal of Molecular Liquids* 290, 111197. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111197>

Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research* 44, 69–84. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00103-1)

Vignerot, A., 2015. Capacités d’adaptation des populations naturelles à la contamination des milieux aquatiques : cas d’étude du cadmium chez le crustacé *Gammarus fossarum*. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard, Lyon.

Vignerot, A., Geffard, O., Coquery, M., François, A., Quéau, H., Chaumot, A., 2015. Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a *Gammarus fossarum* population inhabiting a low-level contaminated stream. *Ecotoxicology* 24, 1239–1249. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1491-z>

Vignerot, A., Geffard, O., Quéau, H., Chaumot, A., 2016. Mothers and not genes determine inherited differences in cadmium sensitivities within unexposed populations of the freshwater crustacean *Gammarus fossarum*. *Evol Appl* 9, 355–366. <https://doi.org/10.1111/eva.12327>

Vignerot, A., Geffard, O., Quéau, H., François, A., Chaumot, A., 2019. Nongenetic inheritance of increased Cd tolerance in a field *Gammarus fossarum* population: Parental exposure steers offspring sensitivity. *Aquatic Toxicology* 209, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.001>

Vijver, M.G., van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 2004. Internal Metal Sequestration and Its Ecotoxicological Relevance: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4705–4712. <https://doi.org/10.1021/es040354g>

Vogt, C., Heß, M., Nowak, C., Diogo, J.B., Oehlmann, J., Oetken, M., 2010. Effects of cadmium on life-cycle parameters in a multi-generation study with *Chironomus riparius* following a pre-exposure of populations to two different tributyltin concentrations for several generations. *Ecotoxicology* 19, 1174–1182. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0501-4>

Vogt, C., Nowak, C., Diogo, J.B., Oetken, M., Schwenk, K., Oehlmann, J., 2007. Multi-generation studies with *Chironomus riparius* – Effects of low tributyltin concentrations on life history parameters and genetic diversity. *Chemosphere* 67, 2192–2200. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.025>

Vogt, G., 2021. Epigenetic variation in animal populations: Sources, extent, phenotypic implications, and ecological and evolutionary relevance. *J Biosci* 46, 24. <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00138-6>

von der Ohe, P.C., Liess, M., 2004. Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. *Environ Toxicol Chem* 23, 150–156. <https://doi.org/10.1897/02-577>

Walker, G., Rainbow, P.S., Foster, P., Holland, D.L., 1975. Zinc phosphate granules in tissue surrounding the midgut of the barnacle *Balanus balanoides*. *Marine Biology* 33, 161–166. <https://doi.org/10.1007/BF00390721>

Wallace, W., Lee, B., Luoma, S., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249, 183–197. <https://doi.org/10.3354/meps249183>

Wallace, W., Lopez, G., Levinton, J., 1998. Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 172, 225–237. <https://doi.org/10.3354/meps172225>

Walsh, M.R., Whittington, D., Funkhouser, C., 2014. Thermal Transgenerational Plasticity in Natural Populations of *Daphnia*. *Integrative and Comparative Biology* 54, 822–829. <https://doi.org/10.1093/icb/icu078>

Wattier, R., Mamos, T., Copilaş-Ciocianu, D., Jelić, M., Ollivier, A., Chaumot, A., Danger, M., Felten, V., Piscart, C., Žganec, K., Rewicz, T., Wysocka, A., Rigaud, T., Grabowski, M., 2020. Continental-scale patterns of hyper-cryptic diversity within the freshwater model taxon *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Sci Rep* 10, 16536. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73739-0>

Weeks, J.M., 1992. Copper-rich granules in the ventral caeca of talitrid amphipods (Crustacea; amphipoda: Talitridae). *Ophelia* 36, 119–133. <https://doi.org/10.1080/00785326.1992.10430363>

Weng, N., Wang, W.-X., 2014. Improved tolerance of metals in contaminated oyster larvae. *Aquatic Toxicology* 146, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.036>

Weston, D.P., Poynton, H.C., Wellborn, G.A., Lydy, M.J., Blalock, B.J., Sepulveda, M.S., Colbourne, J.K., 2013. Multiple origins of pyrethroid insecticide resistance across the species complex of a nontarget aquatic crustacean, *Hyalella azteca*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 16532–16537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302023110>

Wilson, J.B., 1988. The Cost of Heavy-Metal Tolerance: An Example. Evolution 42, 408. <https://doi.org/10.2307/2409246>

Wright, G.M., Black, J.C., 2023. Genomic Redistribution of Metal-Response Transcription Factor-1 (MTF-1) in Cadmium Resistant Cells. Cells 12, 953. <https://doi.org/10.3390/cells12060953>

Wu, D., Liu, Z., Cai, M., Jiao, Y., Li, Y., Chen, Q., Zhao, Y., 2019. Molecular characterisation of cytochrome P450 enzymes in waterflea (*Daphnia pulex*) and their expression regulation by polystyrene nanoplastics. Aquatic Toxicology 217, 105350. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105350>

Wu, S.M., Lin, H., Yang, W., 2008. The effects of maternal Cd on the metallothionein expression in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae. Aquatic Toxicology 87, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.02.012>

Wu, S.M., Tsai, P.R., Yan, C.J., 2012. Maternal cadmium exposure induces mt2 and smtB mRNA expression in zebrafish (*Danio rerio*) females and their offspring. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 156, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.02.001>

Xie, L., Klerks, P.L., 2004. Fitness cost of resistance to cadmium in the least killifish (*Heterandria formosa*). Environ Toxicol Chem 23, 1499. <https://doi.org/10.1897/03-96>

Xie, L., Klerks, P.L., 2003. Responses to selection for cadmium resistance in the least killifish, *Heterandria formosa*. Environ Toxicol Chem 22, 313–320. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220211>

Xu, J., Ke, X., Krogh, P.H., Wang, Y., Luo, Y.-M., Song, J., 2009. Evaluation of growth and reproduction as indicators of soil metal toxicity to the Collembolan, *Sinella curviseta*. Insect Science 16, 57–63. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2009.00254.x>

Xu, K., Wang, H., Li, P., 2021. The cadmium toxicity in gills of *Mytilus coruscus* was accentuated by benzo(a)pyrene of higher dose but not lower dose. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 249, 109128. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109128>

Yang, J., Roy, A., Zhang, Y., 2013. Protein–ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. Bioinformatics 29, 2588–2595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt447>

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nat Methods 12, 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>

Yang, X., Han, Y., Mu, Y., Yang, P., Gu, W., Zhang, M., 2020. Multigenerational effects of cadmium on the lifespan and fertility of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere* 245, 125533. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125533>

Yiwen, W., Xiaohan, T., Chunfeng, Z., Xiaoyu, Y., Yaodong, M., Huanhuan, Q., 2022. Genetics of metallothioneins in *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere* 288, 132562. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132562>

Yu, Z., Zhang, J., Yin, D., 2016. Multigenerational Effects of Heavy Metals on Feeding, Growth, Initial Reproduction and Antioxidants in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 11, e0154529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154529>

Zhang, C., Freddolino, P.L., Zhang, Y., 2017. COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein–protein interaction information. *Nucleic Acids Research* 45, W291–W299. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx366>

Zheng, L., Tan, M., Yan, S., Jiang, D., 2023. Cadmium exposure-triggered growth retardation in *Hyphantria cunea* larvae involves disturbances in food utilization and energy metabolism. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 256, 114886. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114886>

Ziller, A., Fraissinet-Tachet, L., 2018. Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein. *Metallomics* 10. <https://doi.org/10.1039/C8MT00165K>

Annexes

Annexe 1 : Protocole employé pour l'extraction d'ARN dans les organes et les nouveau-nés à partir du Kit Rneasy® Fibrous Tissue MiniKit (Qiagen)

- Au préalable, les gammares ou les organes doivent être mis dans les tubes aux bouchons bleus.
- Ajouter 300 µL de buffer RLT dans tous les échantillons (directement dans les tubes).
- Broyage (20 secondes)
 - Organisme entier (adulte) : billes en acier (→ penser à les enlever).
 - Organes et nouveau-nés : mettre environ 100 µL de billes en verres (0.1 à 0.25 mm).
- Mettre le bain marie à chauffer à 55°C.
- Centrifuger les échantillons pour faire retomber les billes (10 000g qq secondes). Transférer le surnageant (300 µL) dans de nouveaux tubes.
- Ajouter 590 µL de RNase free water (cône à filtre) + 10 µL de protéinase K (bien lavé le cône dans la solution). Vortexer et incubé à 55°C pendant 10 min + agitateur à 300.

Vérifier si on a encore de la solution DNase stock et en re-préparer s'il n'y en a plus. Suivre la préparation écrit sur le tube (ajouter 550 µL d'eau) et préparer des aliquots (120 µL par aliquot).

Préparer le mix 10 µL DNase + 70 µL buffer RDD (par échantillon).

- Centrifuger 3 min à 10 000g.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube eppendorf (~900 µL) (*nb : pas obligé s'il ne reste pas de billes en verre*). Ajouter 0.5 volume (~450 µL) d'éthanol 96-100% et vortexer.
- Transférer 700 µL dans une RNeasy Mini colonne placée sur un collection tube de 2mL. Centrifuger 15sec à ≥ 8 000g. Vider les collection tubes. → Répéter cette étape
- Ajouter 350 µL de Buffer RW1 sur la colonne. Centrifuger 15sec à ≥ 8 000g. Vider les collection tubes.
- Ajouter sur la membrane 75 µL de mix DNase + Buffer RDD pour chaque échantillon. Laisser incubé à température ambiante (20-30°C) pendant 15 min.
- Ajouter 350 µL de Buffer RW1. Centrifuger 15sec à ≥ 8 000g. Vider les collection tubes.
- Ajouter 500 µL de Buffer RPE. Centrifuger 15sec à ≥ 8 000g. Vider les collection tubes (*nb : 450 µL suffisent*).
- Ajouter 500 µL de Buffer RPE. Centrifuger 2min à ≥ 8 000g. Vider les collection tubes. (*nb : 450 µL suffisent*).
 - Placer la colonne dans un nouveau collection tube et centrifuger encore une fois fullspeed (10 000g) pendant 1min sans tampon.
- Placer la colonne dans un tube eppendorf collecteur (1.5 mL).

- Ajouter :
 - Organisme entier : 50 µL de RNase free water
 - Organes ou néonates : 23 µL de RNase free water
- Centrifuger à $\geq 8\ 000g$ pendant 1min.
- Mettre les échantillons au congélateur à $-80^{\circ}C$.

Annexe 2 : Protocole employé pour la rétrotranscription inverse à partir du kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems)

*Pour 20 µL de réaction : 10 µL de mix + 10 µL (d'input ARN + RNase free water)

*Préparation du mix **RT+** / **RT-** :

Réactifs	Volume (µL)	
	Avec RNase Inhibitor (input<500 ng)	Sans RNase Inhibitor (input>500 ng)
Nuclease Free water	3.2 / 4.2	4.2 / 5.2
10X RT Buffer	2	2
10X RT Randoms Primers	2	2
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 / 0	1 / 0
RNase Inhibitor* = RNase Out	1	-
25X dNTP mix (100 mM)	0.8	0.8
Total per reaction	10 µL	10 µL

*du Kit Superscript® III First Strand

Vortexer les mixes

- Déterminer la quantité d'ARN à ajouter dans chaque tube (max 10 µL) :
 - Organisme entier : ~500 ng
 - Organe : ~100 à 200 ng
- Préparer le mix (préparer pour 2 tubes supplémentaires).
- Ajouter la quantité d'eau pour chaque échantillon puis ajouter l'ARN.
- Ajouter 10 µL de mix, centrifuger.
- Bien fermer les tubes et les placer dans la Thermocycler. Sélectionner le programme **RT_AB (Applied Biosystem)**. Run (~2h).
- A la fin du programme, ajouter 1µL de RNase H* dans chaque échantillon. Lancer le programme **RNase H** (~20 min). *La RNase H peut être remplacée par du RNase Cocktail (mélange de RNase A et RNase T1).*

→ A conserver au congélateur à $-20^{\circ}C$

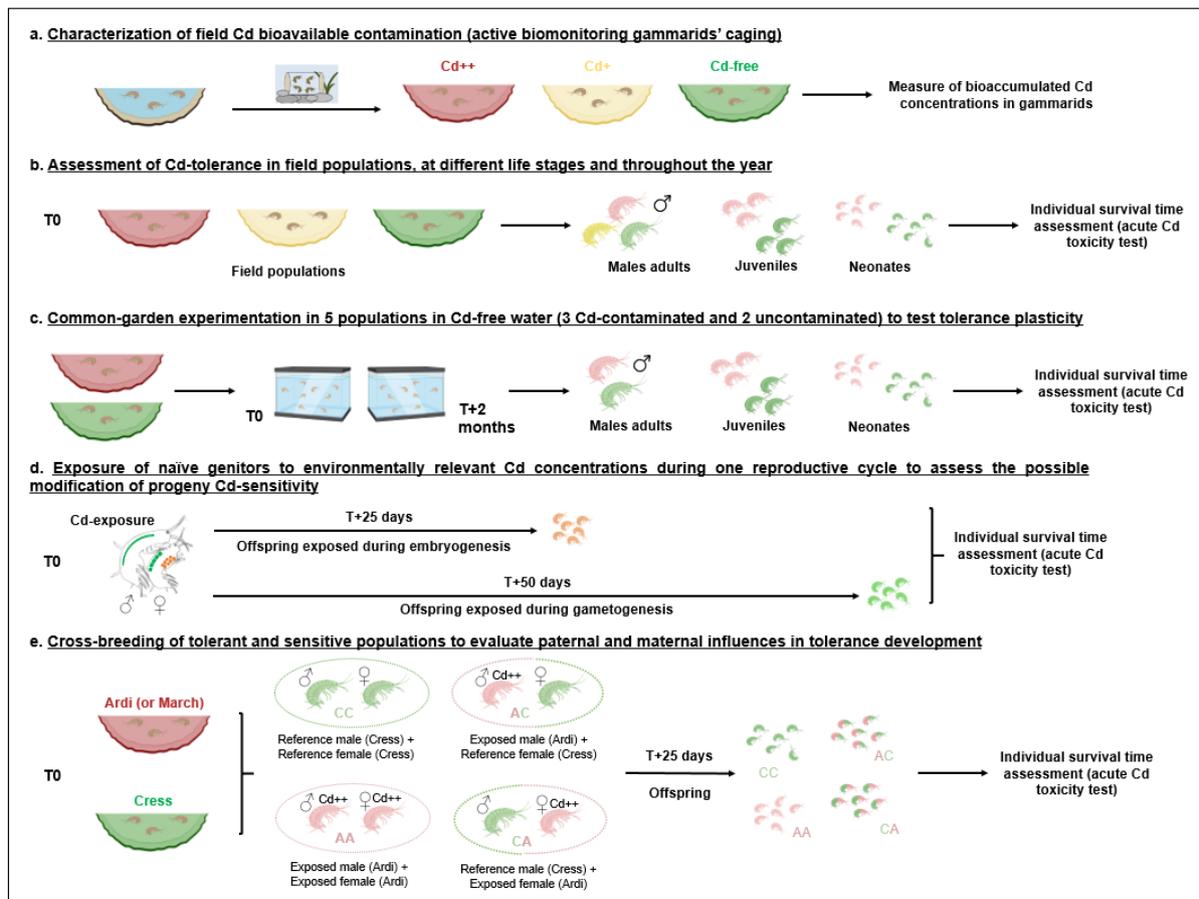
Annexe 3: Protocole employé pour la réalisation de la qPCR afin de quantifier l'expression de gène des métallothionéines

- Diluer les cDNA : *prendre en compte le volume final nécessaire pour la plaque*
 - Organisme entier et embryons : au 10^{ème}
 - Organes : au 5^{ème}
- On prépare 1 plaque *G. fossarum mt1* et 1 plaque EF avec 3 répliquas techniques.
- Mix PCR: ONEGreen® FAST qPCR Premix

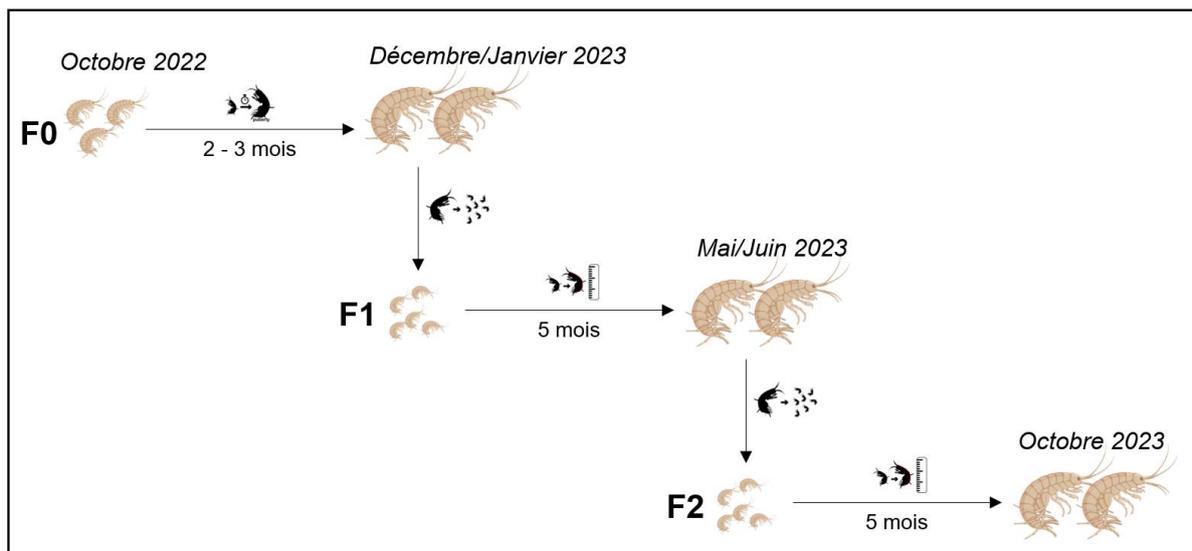
Réactifs	Volume (µL)
ONE GREEN	5
RNase free water	2.6
Amorce Forward	0.2
Amorce Reverse	0.2
Total per reaction	8

- Ajouter 8 µL de mix + 2 µL de cDNA dilué par puits.
- Couvrir la plaque d'un film plastique + aluminium pour protéger de la lumière. A conserver au frigo max 24h.

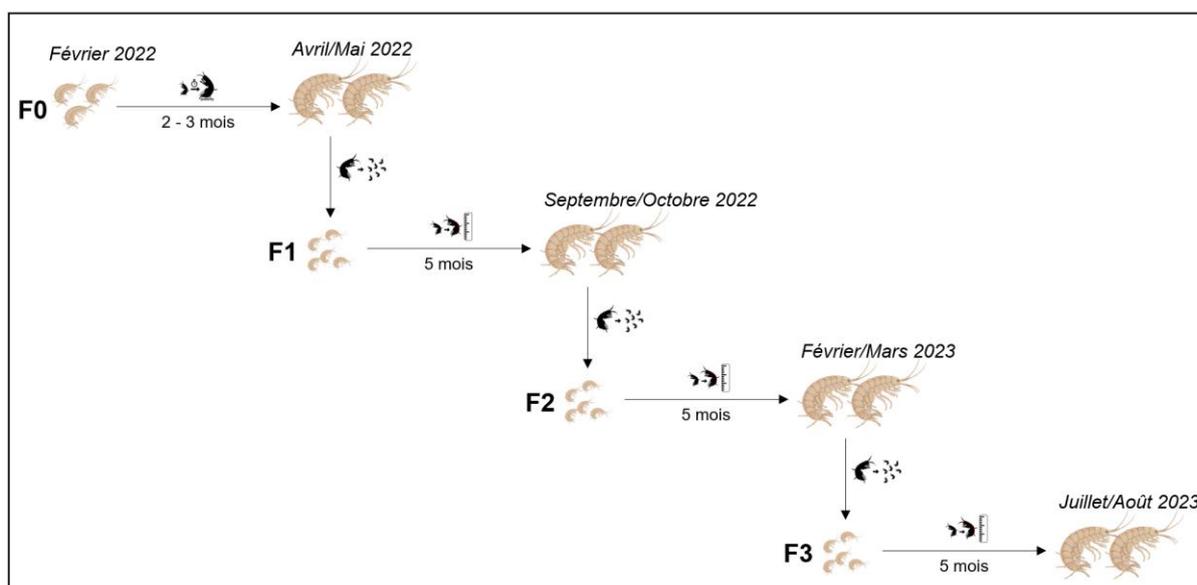
Figures



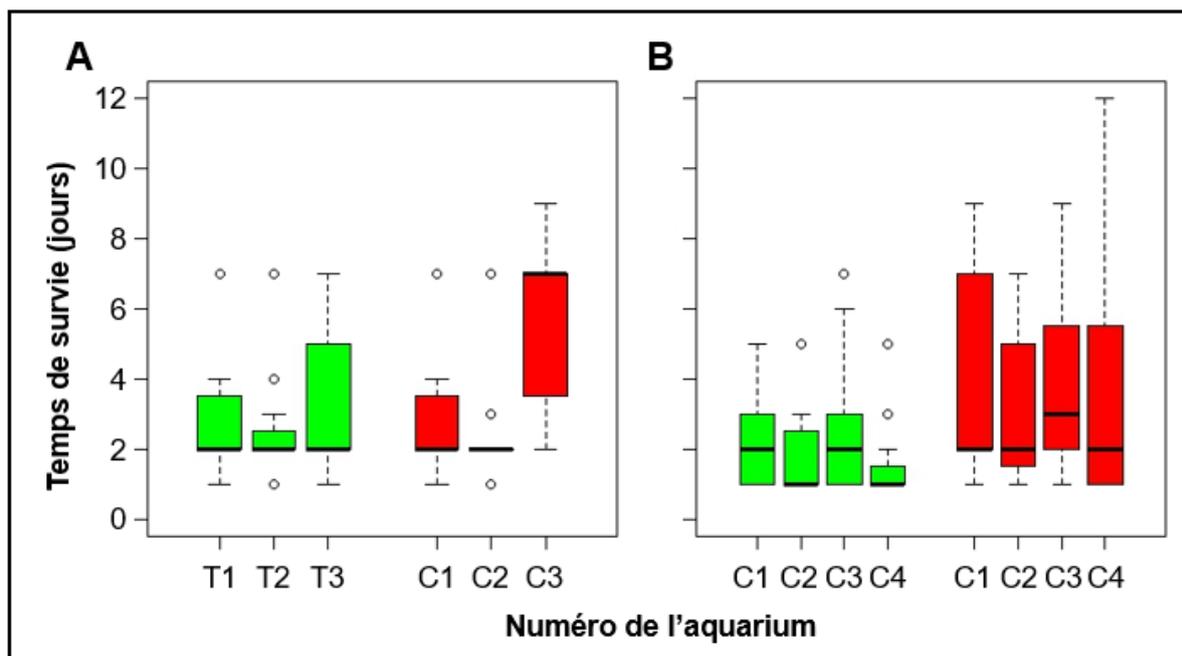
Annexe F1 : Vue d'ensemble des différentes expérimentations menées dans le cadre de la publication n°1. Les expérimentations (a) et (b) ont été menées pour confirmer le développement d'une tolérance accrue au Cd chez des populations de terrain vivant dans des contextes naturels présentant des niveaux contrastés de biodisponibilité en Cd (objectif 1) et pour documenter la variabilité de la tolérance dans le temps et entre les classes d'âge au sein des populations tolérantes (objectif 2). L'expérience (c) a été menée pour comprendre la nature de la tolérance (objectif 3) et les expérimentations (d) et (e) ont étudié les mécanismes de transmission entre les générations (objectif 4). Les couleurs rouge, jaune et verte correspondent respectivement au statut contaminé, intermédiaire et non contaminé des populations.



Annexe F2 : Détermination des générations en fonction du temps d'exposition pour le lot du 03 octobre 2022 lors de l'exposition multigénérationnelle réalisée au laboratoire à 15.6°C. La correspondance des générations a été estimée grâce à la connaissance du cycle de reproduction (entrée en reproduction à une taille d'environ 5-6 mm) et des taux de croissance (les gammarus grandissent d'environ 1 mm par mois) pour cette espèce (Coulaud, 2012; Chaumot et al., 2020). La génération F0 correspond aux jeunes pêchés au Séran (taille d'environ 3.5 mm).



Annexe F3 : Détermination des générations en fonction du temps d'exposition pour le lot du 22 février 2022 lors de l'exposition multigénérationnelle réalisée au laboratoire à 15.6°C. La correspondance des générations a été estimée grâce à la connaissance du cycle de reproduction (entrée en reproduction à une taille d'environ 5-6 mm) et des taux de croissance (les gammarus grandissent d'environ 1 mm par mois) pour cette espèce (Coulaud, 2012; Chaumot et al., 2020). La génération F0 correspond aux jeunes pêchés au Séran (taille d'environ 3.5 mm).



Annexe F4 : Evolution de la tolérance au Cd (distribution des temps de survie individuels pendant l'exposition à 20 µg/L de Cd) chez les nouveau-nés du lot du 22 février 2022 au cours de l'exposition multigénérationnelle. La sensibilité au Cd a été testée (**A**) en février 2023 (F2/F3) et (**B**) en mai 2023 (F3). Les couleurs rouge et verte correspondent au statut de contamination de l'aquarium (rouge : contaminé ; vert : non contaminé).

Tableaux

Annexe T1 : Caractérisation de la contamination métallique biodisponible dans les sites habités par les quinze populations étudiés au cours de cette thèse. La contamination biodisponible a été évaluée par les concentrations de métaux accumulés en $\mu\text{g/g dw}$ (poids sec ; dw : dry weight) dans les gammars encagés sur les sites d'études pendant 7 jours (organismes transplantés à partir de la population de référence du laboratoire), entre avril 2013 et juillet 2022. Le protocole détaillé et la détermination des BBAC sont rapportés dans Besse et al. (2013) et Ciliberti et al. (2017). Les concentrations en métaux supérieures à la BBAC sont indiquées en gras.

Site	Ag	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
	BBAC = 0.21	BBAC = 0.30	BBAC = 1.08	BBAC = 84.0	BBAC = 1.18	BBAC = 0.69	BBAC = 78.9
Ardillats 04/2013	0.13	0.50	0.64	66.80	-	1.17	62.28
Ardillats 06/2013	0.18	0.96	0.39	0.39	-	0.86	62.18
Ardillats 10/2013	0.15	0.62	0.71	56.02	-	0.81	69.42
Ardillats 06/2014	0.13	0.88	0.41	73.10	-	0.77	67.40
Ardillats 10/2014	-	0.54	0.74	63.20	0.48	1.11	79.90
Ardillats 11/2015	0.10	0.57	1.46	63.60	0.75	2.28	60.40
Ardillats 01/2020	0.06	0.64	0.40	52.20	0.2	0.47	52.00
Ardillats 06/2022	0.05	0.77	0.35	50.20	0.36	0.35	60.30
Ardillats 07/2022	0.07	0.64	0.57	70.90	0.41	0.82	60.80
Cressonnière 11/2015	0.04	0.07	0.4	62.3	0.33	0.22	54.5
Cressonnière 06/2022	0.05	0.05	0.17	85.2	0.25	-	71.9
Cressonnière 07/2022	0.04	0.03	0.21	67.3	<LQ	0.09	50.6
Doulonne 06/2022	0.04	0.16	0.58	74.3	0.63	<LQ	64.8
Katlen 06/2022	0.07	0.09	0.36	69.2	0.79	<LQ	55.8
Marchampt 11/2015	0.09	0.45	1.37	61.80	0.75	2.3	56.00
Marchampt 01/2020	0.07	0.49	0.33	67.60	0.24	0.44	53.20
Marchampt 06/2022	0.04	0.24	0.42	60.10	0.41	0.54	61.90
Marchampt 07/2022	0.07	0.36	0.24	71.60	<LQ	0.21	56.10
Morcille 03/2013	0.11	0.19	0.49	80.8	-	0.42	59.04
Morcille 11/2015	0.07	0.19	2.56	66.3	1.55	2.42	61.1
Morcille 06/2022	0.06	0.25	1.14	91.1	1.12	0.90	69.1
Ognon 07/2015	0.10	0.12	0.82	-	0.59	0.58	54.70
Ognon 11/2015	0.32	0.11	0.90	52.50	0.69	0.44	66.90
Poye 11/2015	0.06	0.25	1.11	54.50	0.57	1.40	53.20
Poye 06/2022	0.04	0.22	0.46	71.50	0.29	0.48	57.00
Rauenthal 07/2015	-	0.29	0.71	71.00	2.4	2.13	59.00
Rauenthal 06/2022	0.13	0.18	0.19	50.40	0.92	0.40	44.00
Reigne 06/2022	0.09	0.15	0.49	74.5	0.66	1.19	70.9
Rombach 06/2022	0.05	0.11	0.80	60.4	0.59	<LQ	58.9
Seine 06/2022	0.04	0.09	0.36	64	0.41	<LQ	67.7
Séran 08/2013	0.12	0.10	0.36	84.39	-	0.16	58.62
Séran 11/2015	0.07	0.09	0.73	73.10	0.57	0.35	56.80
Séran 01/2020	0.06	0.09	0.38	60.00	0.35	0.10	52.90
Séran 06/2022	0.05	0.06	0.41	67.10	0.46	-	68.80
Strenbach 06/2022	0.05	0.29	0.16	50.4	0.30	0.27	104
Vancelle 07/2015	0	0.07	0.52	-	0.43	0.27	51.20
Vancelle 06/2022	0.04	0.06	0.14	56.10	0.30	-	48.60
Vernay 11/2015	0.07	0.41	0.78	55.30	0.46	1.52	54.00
Vernay 06/2022	0.04	0.45	0.30	53.70	0.23	0.54	49.40
Vernay 07/2022	0.08	0.70	0.60	75.40	0.41	1.16	61.10

Annexe T2 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les adultes mâles des huit populations en sortie de terrain après exposition à 80 µg/L de Cd en laboratoire (printemps 2017), un jour après leur collecte sur le terrain. Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (voir Chapitre III - 1.1).

Population	Number of adults	Median survival time LT50 (days) [95% confidence interval]	25 th percentile of adults survival time (days)	75 th Percentile of adults survival time (days)	% of adults with survival time ≤ 6 days
Ardillats	45	14 [8 ; NA]	6	15	28.8
Marchampt	45	9 [8 ; 11]	6	15	28.8
Vernay	45	9 [7 ; 15]	6	15	31.1
Rauenthal	45	8 [7 ; 9]	5	11	26.6
Poye	45	5 [4 ; 7]	3	10	62.2
Ognon	45	5 [4 ; 6]	4	7	71.1
Séran	45	6 [6 ; 8]	4	8	57.7
Vancelle	45	4 [4 ; 7]	3	7	66.6

Annexe T3 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les adultes mâles provenant des populations Ardillats, Marchampt, Séran et Cressonnière après exposition à 80 µg/L de Cd en laboratoire à différentes dates de prélèvements dans l'année (entre février 2021 et octobre 2022). Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (voir Chapitre III - 1.1).

	Population	Number of adults	Median survival time LT50 (days) [95% confidence interval]	25 th percentile of adults survival time (days)	75 th Percentile of adults survival time (days)	% of adults with survival time ≤ 6 days
February 2021	Ardillats	45	12 [10 ; 15]	9	15	11.1
	Marchampt	45	11 [8 ; 13]	6	14	28.9
	Séran	45	8 [6 ; 9]	5	9	42.2
	Cressonnière	45	7 [5 ; 9]	4	10	44.4
April 2021	Ardillats	45	14 [13 ; 17]	12	17	6.7
	Séran	45	10 [8 ; 11]	7	11	20
	Cressonnière	45	7 [5 ; 8]	4	11	48.9
June 2021	Ardillats	45	12 [10 ; 15]	8	15	13.3
	Marchampt	45	11 [10 ; 13]	6	13	26.7
	Séran	45	9 [7 ; 11]	6	12	26.7
October 2021	Ardillats	45	14 [11 ; NA]	9	15	11.1
	Séran	45	9 [8 ; 11]	7	12	20
	Cressonnière	45	6 [5 ; 9]	4	10	53.3
December 2021	Ardillats	45	15 [13 ; NA]	10	15	6.7
	Séran	45	10 [7 ; 11]	7	11	17.8
	Cressonnière	45	5 [4 ; 8]	3	10	55.5
October 2022	Ardillats	45	12 [9 ; NA]	7	17	15.5
	Marchampt	45	6 [5 ; 9]	4	10	55.5
	Séran	45	8 [7 ; 9]	6	9	28.8
	Cressonnière	45	8 [7 ; 11]	6	12	31.1

Annexe T4 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les juvéniles et les nouveau-nés des populations Ardillats, Marchampt, Séran et Cressonnière après qu'ils aient été exposés au laboratoire et à différentes dates de prélèvement dans l'année (entre février 2021 et octobre 2022). Les juvéniles ont été exposés à 80 µg/L de Cd et les nouveau-nés à 20 µg/L au laboratoire un jour après leur collecte sur le terrain ou un jour après leur sortie du marsupium maternel au laboratoire pour les nouveau-nés. Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (voir Chapitre III - 1.1).

	Population	Number of juveniles or neonates	Median survival time LT50 (days) [95% confidence interval]	25th percentile of survival (days)	75th Percentile of offspring survival time (days)	% of offspring with survival time ≤ 3 days
<i>Results for juveniles</i>						
February 2021	Ardillats	45	7 [6 ; 8]	4	9	17.8
	Marchampt	45	5 [4 ; 7]	4	7	24.4
	Cressonnière	45	2 [2 ; 2]	2	2	88.9
April 2021	Ardillats	45	8 [7 ; 11]	5	12	8.9
	Séran	45	2 [2 ; 5]	2	5	64.4
	Cressonnière	45	3 [2 ; 4]	2	5	60
June 2021	Ardillats	45	5 [3 ; 6]	3	7	40
	Marchampt	45	5 [5 ; 6]	3	6	28.9
	Séran	45	2 [2 ; 3]	2	4	71.1
October 2021	Ardillats	45	7 [5 ; 9]	4	10	15.6
	Séran	45	4 [3 ; 6]	2	7	48.9
	Cressonnière	45	3 [2 ; 4]	2	4	53.3
December 2021	Ardillats	45	8 [6 ; 10]	5	10	6.7
	Séran	45	6 [5 ; 8]	3	10	28.9
	Cressonnière	45	2 [2 ; 3]	2	4	53.3
October 2022	Ardillats	45	7 [6 ; 12]	5	12	17.7
	Marchampt	45	5 [5 ; 7]	4	8	15.5
	Séran	45	5 [4 ; 6]	4	8	24.4
Cressonnière	45	4 [2 ; 6]	2	7	48.8	
<i>Results for neonates</i>						
February 2021	Ardillats	10	6.5 [5 ; NA]	5	10	0
	Marchampt	10	7.5 [6 ; NA]	6.25	10	10
	Séran	10	3.5 [1 ; NA]	1.5	10	50
	Cressonnière	10	2 [1 ; NA]	1.25	8	70
June 2021	Ardillats	24	7 [6 ; 8]	5.75	9	8.3
	Marchampt	24	4 [3 ; 6]	3	9	37.5
	Séran	24	2.5 [2 ; 5]	2	9	58.3
October 2021	Ardillats	24	6 [5 ; 7]	4.75	8	8.3
	Séran	24	4.5 [4 ; 5]	3	7	33.3
	Cressonnière	20	4 [3 ; 6]	3	7	35
December 2021	Ardillats	24	7 [5 ; 8]	5	10	4.2
	Séran	24	3.5 [3 ; 5]	2.75	8	50
	Cressonnière	24	4.5 [4 ; 6]	3.75	8	25
October 2022	Ardillats	24	6 [6 ; 7]	5	7	0
	Marchampt	24	5 [4 ; 6]	4	6	20.8
	Séran	24	2 [2 ; 2]	2	2.25	79.2
Cressonnière	24	2 [2 ; 3]	2	3.25	75	

Annexe T5 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les adultes mâles provenant des populations Ardillats, Marchampt, Vernay, Séran et Cressonnière après prélèvement sur le terrain (T0) et après leur maintien au laboratoire pendant 2 mois dans de l'eau exempt de Cd (T2). Les adultes ont été exposés à 80 µg/L de Cd. L'expérimentation a été conduite à quatre dates différentes (un tableau par date d'échantillonnage). Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (Chapitre III - 1.1) et de la Publication n°4 (Chapitre IV – 2.1).

	Population	Number of adults	Median survival time LT50 (days) [95% confidence interval]	25th percentile of adults survival time (days)	75th Percentile of adults survival time (days)	% of adults with survival time ≤ 6 days
April 2021	Ardillats-T0	45	14 [13 ; 17]	12	17	6.7
	Séran-T0	45	10 [8 ; 11]	7	11	20
	Cressonnière-T0	45	7 [5 ; 8]	4	11	48.9
	Ardillats-T2	45	7 [5 ; 10]	4	10	48.8
	Séran-T2	45	5 [4 ; 6]	4	7	73.3
	Cressonnière-T2	45	4 [4 ; 5]	3	5	93.3
June 2021	Ardillats-T0	45	12 [10 ; 15]	8	15	13.3
	Marchampt-T0	45	11 [10 ; 13]	6	13	26.7
	Séran-T0	45	9 [7 ; 11]	6	12	26.7
	Ardillats-T2	45	7 [7 ; 9]	5	10	35.5
	Marchampt-T2	45	8 [7 ; 9]	6	9	33.3
	Séran-T2	45	5 [5 ; 6]	5	7	73.3
December 2021	Ardillats-T0	45	15 [13 ; NA]	10	15	6.7
	Vernay-T0	45	18 [16 ; 23]	13	25	13.3
	Séran-T0	45	10 [7 ; 11]	7	11	17.8
	Cressonnière-T0	45	5 [4 ; 8]	3	10	55.5
	Ardillats-T2	45	5 [5 ; 7]	4	7	66.6
	Vernay-T2	45	6 [5 ; 8]	4	9	53.3
	Séran-T2	45	3 [3 ; 5]	2	6	86.6
	Cressonnière-T2	45	4 [3 ; 5]	3	6	80
October 2022	Ardillats-T0	45	12 [9 ; 18]	7	17	15.5
	Vernay-T0	45	18 [13 ; 21]	9	21	13.3
	Marchampt-T0	45	6 [5 ; 9]	4	10	55.5
	Séran-T0	45	8 [7 ; 9]	6	9	28.8
	Doulonne-T0	45	7 [6 ; 10]	5	11	37.7
	Cressonnière-T0	45	8 [7 ; 11]	6	12	31.1
	Ardillats-T2	45	8 [6 ; 14]	5	14	40
	Vernay-T2	45	7 [6 ; 9]	5	10	44.4
	Marchampt-T2	45	7 [6 ; 9]	5	10	42.2
	Séran-T2	45	6 [5 ; 7]	4	7	62.2
	Doulonne-T2	45	8 [7 ; 9]	6	10	26.6
	Cressonnière-T2	45	6 [4 ; 8]	4	9	57.7

Annexe T6 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez trois cohortes successives de nouveau-nés produit au laboratoire en condition propre (exempt de Cd) par des géniteurs prélevés dans les populations Ardillats, Marchampt, Vernay, Sérán et Cressonnière. Les nouveau-nés ont été exposés individuellement au Cd (20 µg/L) un jour après leur sortie du marsupium maternel. Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (Chapitre III - 1.1) et de la Publication n°4 (Chapitre IV – 2.1).

Condition		Number of neonates	Median survival time LT50 (days) [95% confidence interval]	25 th percentile of neonates survival time (days)	75 th Percentile of neonates survival time (days)	% of neonates with survival time ≤ 3 days
Cohort 1	Ardillats	24	6 [6 ; 7]	5	7	0
	Vernay	24	6 [6 ; 7]	5	7.25	4.2
	Marchampt	24	5 [4 ; 6]	4	6	20.8
	Sérán	24	2 [2 ; 2]	2	2.25	79.2
	Doulonne	24	2 [2 ; 3]	1	3.25	75
	Cressonnière	24	2 [2 ; 3]	2	3.25	75
Cohort 2	Ardillats	24	7 [5 ; 7]	4	7	0
	Vernay	24	4 [4 ; 5]	3.75	5	25
	Marchampt	24	3 [3 ; 4]	3	4	66.6
	Sérán	24	2 [2 ; 3]	2	3	95.8
	Doulonne	24	2 [2 ; 3]	1.75	3	83.3
	Cressonnière	24	2 [1 ; 2]	1	2	100
Cohort 3	Ardillats	24	4 [3 ; 8]	2	8	45.8
	Vernay	24	4 [4 ; 5]	3	5.25	29.2
	Marchampt	24	4 [3 ; 5]	3	5.25	37.5
	Sérán	24	2 [1 ; 3]	1	3.25	75
	Doulonne	24	3 [3 ; 4]	2	4	66.7
	Cressonnière	24	2 [2 ; 3]	1	2.25	83.3

Annexe T7 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd de la première (exposés durant l'embryogénèse) et de la deuxième ponte (exposés durant la gamétogénèse) de nouveau-nés issus de géniteurs Sérán exposés au Cd pendant un cycle de reproduction en laboratoire. Les nouveau-nés ont été exposés individuellement au Cd (20 µg/L) un jour après leur sortie du marsupium maternel. Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (Chapitre III - 1.1).

Condition		Number of neonates	Median survival time LT50 (days) [95% confidence interval]	25 th percentile of neonates survival time (days)	75 th Percentile of neonates survival time (days)	% of neonates with survival time ≤ 3 days
Exposed during embryogenesis	Control	50	4 [4;5]	3	5	38
	Exposed at 0.1 µg/L of Cd	50	4 [3;5]	3	5	40
	Exposed at 1 µg/L of Cd	50	3.5 [3;4]	2	4.75	50
Exposed during gametogenesis	Control	87	3 [3;4]	2	5	50.6
	Exposed at 0.1 µg/L of Cd	106	3 [2;4]	2	4	51.9

Annexe T8 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les nouveau-nés issus des populations tolérantes au Cd (AA, MM), de la population de référence (CC) et des croisements de populations (AC, CA, MC, CM). Pour la légende des différentes conditions (notation : ♂/♀), la première lettre majuscule correspond à la première lettre de la population du mâle et la deuxième lettre majuscule correspond à la première de la population de la femelle (par exemple, la condition AC correspond au croisement entre un mâle Ardillats et une femelle Cressonnière). Les nouveau-nés ont été exposés individuellement au Cd (20 µg/L) un jour après leur sortie du marsupium maternel. Ce tableau vient en complément de la Publication n°1 (Chapitre III - 1.1).

Condition	Number of neonates	Median survival time LT50 (days) [95% confidence interval]	25 th percentile of neonates survival time (days)	75 th Percentile of neonates survival time (days)	% of neonates with survival time ≤ 3 days
<i>Results for neonates born with the same parents</i>					
AA	20	5 [5 ;6]	4	6	20
MM	20	4 [3 ;5]	3	5	35
CC	20	2 [2 ;3]	2	2.25	90
<i>Results for neonates born after crossing between populations</i>					
AC	10	3 [2 ;NA]	2	4.75	60
CA	20	4.5 [3 ;NA]	2.75	5.25	35
MC	20	3 [3 ;5]	2	5	55
CM	20	4 [3 ;NA]	3	4.25	35

Annexe T9 : Caractérisation des paramètres d'habitats des 13 sites d'études de la Publication n°2 (Chapitre III – 2.1).

Site	Slope (%)	Distance to source (km)	Full width (LpB) (m)	Flow rate (m ³ /s)	Lotic facies (%)	Natural area (%)	Substrate diversity (SIDI)	Strahler rank
Ardillats	4.8	3.1	4.8	0.18	90	99	0.79	2
Doulonne	0.7	4.7	3.8	0.08	78	100	0.69	2
Katlen	4.4	2.4	4.7	0.03	100	100	0.82	2
Marchampt	7.8	1.4	4.7	0.03	95	98	0.80	1
Morcille	4.5	0.8	4.7	0.03	100	74	0.75	1
Poye	10.7	0.4	1	0.02	100	100	0.62	1
Raental	7.6	3.9	6.7	0.08	89	100	0.71	2
Reigne	0.2	15.2	10.6	0.59	54	73	0.44	4
Seine	0.8	5.7	6.5	0.04	14	63	0.77	1
Séran	0.1	32.9	23.6	5.49	90	77	0.32	4
Strenbach	10.7	1.3	3.7	0.05	100	89	0.82	1
Vancelle	9.8	1.3	2.1	0.01	87	90	0.77	1
Vernay	7.6	1.2	4	0.04	79	94	0.83	1

Annexe T10 : Résumé des paramètres physicochimiques mesurés dans les 13 populations d'études de la Publication n°2 (voir Chapitre III – 2.1).

Site	Temperature (°C)	Conductivity (µs/cm)	pH	O2 (mg/L)
Ardillats	9.6	101	7.8	11
Doulonne	10.2	175	8.3	10
Katlen	9.9	101	7.5	9.6
Marchampt	8.7	44	7.4	11.6
Morcille	8.7	104	7.4	11.3
Poye	10.9	69	7.5	10.1
Raenthal	6.7	82	7.6	11.5
Reigne	11.6	167	7.3	10.3
Seine	8.5	290	8.4	11.4
Seran	9.5	373	8.2	12.2
Strenbach	12.3	31	8.0	9.1
Vancelle	11.9	149	7.2	8.5
Vernay	12	67	7.4	10

Annexe T11 : Synthèse statistique de la distribution de taille des femelles 13 populations d'études de la Publication n°2 (voir Chapitre III – 2.1).

Population	Number of female	Median size (mm)	25 th percentile (mm)	75 th percentile (mm)	% of female with size ≤ 6.50 mm
Ardillats	93	6.53	6.14	7.25	49.5
Doulonne	75	7.57	6.92	8.09	5.3
Katlen	74	6.89	7.27	7.90	14.9
Marchampt	164	6.78	6.38	7.35	34.1
Morcille	73	7.21	6.67	8.12	19.2
Poye	65	7.55	6.69	8.34	18.5
Raenthal	102	7.40	6.83	8.06	16.7
Reigne	99	7.37	6.91	8.06	10.1
Seine	65	8.91	8.20	9.47	0
Séran	123	8.11	7.32	8.75	4.9
Strengbach	52	7.37	6.76	7.65	11.5
Vancelle	61	7.57	6.91	8.59	13.1
Vernay	77	6.51	6.09	7.17	49.4

Annexe T12 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les adultes mâles des douze populations en sortie de terrain après exposition à 80 µg/L de Cd en laboratoire, un jour après leur collecte sur le terrain. Ce tableau vient en complément de la Publication n°4 (Chapitre IV – 2.1).

Population	Number of adults	Median survival time LT50 (days) [95% confidence interval]	25 th percentile of adults survival time (days)	75 th Percentile of adults survival time (days)	% of adults with survival time ≤ 6 days
Ardillats (A)	45	11 [9;13]	7	20	20
Marchampt (B)	45	13 [11;14]	8	14	20
Vernay (C)	45	18 [16;23]	13	25	13.3
Strenbach (D)	45	11 [10;13]	9	14	17.7
Raumental (E)	45	11 [10 ;13]	10	14	13.3
Morcille (F)	45	11 [9;5]	8	17	20
Seran (G)	45	10 [8 ;11]	6	12	26.7
Doulonne (H)	45	7 [6 ;11]	5	11	44.6
Katlen (I)	45	5 [5 ;7]	4	9	55.5
Reigne (J)	45	5 [4 ;7]	3	7	64.4
Vancelle (K)	45	6 [5 ;9]	4	10	55.5
Rombach (L)	45	6 [6 ; 9]	3	9	51.1

Annexe T13 : Synthèse statistique de la tolérance au Cd chez les nouveau-nés issus de l'exposition multigénérationnelle au Cd pour les lots du 22 février 2022 et du 03 octobre 2022 lors de différents tests réalisés au cours du temps (Chapitre V – 2.2). Les nouveau-nés ont été exposés individuellement au Cd (20 µg/L).

Date testée	Condition de l'aquarium	Effectif	LT50	LT75	% de nouveau-nés avec un temps de survie ≤ 3 jours
<i>Résultats pour le lot du 22 février 2022</i>					
Avril 2022	Non exposé	50	2	4	60
	Exposé	50	2	4.75	60
Novembre 2022	Non exposé	45	2	3	76
	Exposé	40	2.5	4	70
Février 2023	Non exposé	45	2	3	75
	Exposé	45	2	7	64
Mai 2023	Non exposé	60	1	3	85
	Exposé	60	2	6	63
<i>Résultats pour le lot du 03 octobre 2022</i>					
Février 2023	Non exposé	30	2	3	77
	Exposé	30	2	3	83
Mai 2023	Non exposé	28	2	3.5	75
	Exposé	29	2	3	76

Résumé

Malgré les préoccupations relatives à la contamination de l'environnement, la prise en compte des effets longs termes induits par des expositions chroniques au contaminant des populations sur plusieurs générations demeure limitée dans les études écotoxicologiques et dans le domaine de l'évaluation du risque écologique. De même, dans les milieux naturels, les preuves que l'exposition multigénérationnelle influence la sensibilité des organismes sont encore rares, et les mécanismes doivent encore être élucidés. Ainsi, face au manque de connaissances sur l'importance des effets multigénérationnels de la contamination chimique sur les populations aquatiques, ce projet de thèse interroge le rôle de la plasticité dans la variabilité de la sensibilité et des traits d'histoire de vie chez des populations naturelles de *Gammarus fossarum* lors d'exposition chronique au cadmium. Pour cela, deux types d'approches ont été mises en œuvre : (1) une approche comparative entre une quinzaine de populations naturellement exposées ou non du fait du contexte géochimique local (exposition évaluée par des mesures de bioaccumulation lors d'encagements *in situ*), s'appuyant sur des mesures de tolérance et traits d'histoire de vie en sortie de terrain, ou après maintien sur plusieurs mois en eau non contaminée de quelques populations, en incluant la descendance issue de croisements entre géniteurs de différentes populations, et (2) une approche d'exposition multigénérationnelle contrôlée au cadmium (0.3 µg/L) sur 18 mois d'une population de gammars initialement non exposée dans son milieu d'origine. Pour chacune des deux approches, des mesures de la sensibilité au cadmium et des traits d'histoire de vie (taux de croissance, taille, taille à la puberté, taux d'alimentation...) ont été réalisées à différents temps d'exposition ou de déacclimatation. Ces suivis ont démontré (1) une influence marquée des niveaux de contamination naturelle biodisponible sur les niveaux de tolérance et l'histoire de vie des populations, (2) une plasticité marquée de ces caractères individuels et populationnels quand l'exposition cadmique est stoppée, et (3) une transmission non génétique à la descendance de la tolérance en fonction des conditions d'exposition des géniteurs, l'ensemble évoquant l'implication possible de processus épigénétiques dans la modification de la sensibilité. De plus, l'étude de la dynamique d'expression d'une métallothionéine répondant fortement à une exposition cadmique a été réalisée dans deux organes impliqués dans la gestion des métaux chez le gammare (branchies, caeca) ainsi que chez la descendance, ceci au regard des variations de la tolérance cadmique observée entre populations et au cours des expérimentations d'exposition et de déacclimatation. Les résultats ont montré une covariation des niveaux d'expression de la métallothionéine avec la tolérance au Cd et suggèrent un rôle des processus transgénérationnels adaptatifs survenant au cours d'une exposition chronique des populations. Ces résultats soutenant l'hypothèse d'un rôle de l'épigénétique dans la plasticité de la tolérance au Cd observée chez les populations de *G. fossarum*. Ces travaux de thèse soulignent le rôle important de la plasticité et de la transmission non génétique de la tolérance toxicologique au cours d'une exposition à long terme des populations naturelles à la contamination environnementale et montrent ainsi l'intérêt de mener des études multigénérationnelles chez des espèces environnementales non modèles de laboratoire pour améliorer la compréhension des réponses populationnelles à la contamination.

Mots clés : Ecotoxicologie évolutive, Plasticité, Effets parentaux, Multigénération, *Gammarus fossarum*, Populations naturelles, Tolérance, Traits d'histoire de vie, Métallothionéines

Abstract

Despite concerns about environmental contamination, the consideration of long-term effects induced by chronic exposure to contaminants in populations over several generations remains limited in ecotoxicological studies and risk assessment. Similarly, in natural environments, evidence that multigenerational exposure influences the sensitivity of organisms is still scarce, and the mechanisms have yet to be elucidated. Given the lack of knowledge about the importance of the multigenerational effects of chemical contamination in aquatic populations, this work aimed to investigate the role of plasticity in the variability of sensitivity and life-history traits in natural populations of *Gammarus fossarum* during chronic exposure to cadmium. For that, two types of approach were used: (1) a comparative approach between fifteen populations naturally exposed or not due to the local geochemical context (exposure assessed by bioaccumulation biotests by *in situ* gammarids' caging), based on measurements of tolerance and life history traits after sampled in the field, or after keeping a few populations in uncontaminated water for several months in the lab (common-garden), including offspring from crosses between genitors from different populations, and (2) a controlled multigenerational exposure to cadmium (0.3 µg/L) over 18 months from a gammarid population that was initially unexposed in its native environment. For both approaches, cadmium sensitivity and life history traits (growth rate, size, size at puberty, feeding rates, etc.) were measured at different times of exposure or de-acclimation. This work demonstrated (1) a strong influence of the levels of bioavailable natural contamination on the tolerance levels and life history of the populations, (2) a plasticity of these individual and population characteristics when cadmium exposure is stopped, and (3) non-genetic transmission of tolerance to the offspring depending on the exposure conditions of the progenitors, all of which suggests the possible involvement of epigenetic processes in the modification of sensitivity. In addition, the dynamics of the expression of a metallothionein that responds strongly to cadmium exposure was studied in two organs involved in metal accumulation or detoxification in gammarids (gills, caeca) and in the offspring, with regard to the variations in cadmium tolerance observed between populations and during exposure and common-garden experiments. The results showed a covariation in metallothionein expression levels with Cd tolerance and suggest a role for adaptive transgenerational processes occurring during chronic exposure of populations. These results support the hypothesis of the role of epigenetics in the plasticity of Cd tolerance observed in *G. fossarum* populations. Thus, this work underlines the important role of plasticity and non-genetic transmission of toxicological tolerance during long-term exposure of natural populations to environmental contamination and thus demonstrates the value of conducting multigenerational studies in environmental species that are not laboratory models in order to improve our understanding of population responses to contamination.

Key words: Evolutionary ecotoxicology, Plasticity, Parental effects, Multigeneration, *Gammarus fossarum*, Natural populations, Tolerance, Life History Trait, Metallothionein