



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie,
Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE)
UMR CNRS 7146
Metz



Ecole doctorale Sciences et Ingénierie
Ressources Procédés Produits Environnement
(RP2E) ED N°410
Nancy

THESE

En vue de l'obtention du grade de :

DOCTEUR

Spécialité : ECOTOXICOLOGIE, BIODIVERSITE, ECOSYSTEMES

Délivré par :

Université de Lorraine (UFR Sciences Fondamentales et Appliquées)

Soutenue par :

Céline VELLINGER

Effets d'expositions métalliques simples ou multiples à différentes températures chez *Gammarus pulex*: *Approche multi-marqueurs et perspectives en bioévaluation*

Le 13 Décembre 2012 devant la commission d'examen :

Directeur de thèse	Philippe USSEGLIO-POLATERA	<i>Professeur (Université de Lorraine)</i>
Co-directeur de thèse	Marc PARANT	<i>MCF (Université de Lorraine)</i>
Rapporteurs	Jeanne GARRIC	<i>Directeur de Recherche (Irstea, Lyon)</i>
	Alain GEFFARD	<i>Professeur (Université de Reims)</i>
Examineurs	Jean-Pierre THOME	<i>Professeur (Université de Liège)</i>
	Pierre TABERLET	<i>Directeur de Recherche (CNRS, Grenoble)</i>

« Etre Docteur ou Savant n'est pas en soi un état exceptionnel
Le progrès est l'œuvre de chacun dans l'ombre de soi-même
Il n'est nul besoin de briller au grand jour et d'être admiré
Ce qui compte, jour après jour, c'est sa certitude d'avoir avancé »

Extrait de « *Bios Logos* » par Noëlle VELLINGER

A la mémoire de Marie-Louise VELLINGER,

SOMMAIRE

Remerciements	
Liste des Figures	
Liste des Tableaux	
Liste des publications et communications	

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

Chapitre I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
---	---

1. MODELE BIOLOGIQUE : <i>GAMMARUS PULEX</i> (LINNAEUS, 1758)	9
---	---

1.1. SYSTEMATIQUE ET ECOLOGIE DU GENRE <i>GAMMARUS</i>	9
1.2. CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DU GENRE <i>GAMMARUS</i>	11
1.2.1. <i>Prosoma</i>	11
1.2.2. <i>Mesosoma</i>	11
1.2.3. <i>Métasoma</i>	13
1.2.4. <i>Urosoma</i>	13
1.3. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DU GENRE <i>GAMMARUS</i>	14
1.3.1. <i>Développement</i>	14
1.3.2. <i>Reproduction</i>	14
1.3.3. <i>Les rôles biologiques et physiologiques de l'hémolymph et des branchies</i>	16
1.3.3.1. L'hémolymph	16
1.3.3.1.1. Rôles de l'hémolymph	16
1.3.3.1.2. Composition générale de l'hémolymph	17
1.3.3.1.3. Pression et régulation osmotique	17
1.3.3.2. Les branchies	17
1.3.3.2.1. Caractéristiques et rôles des branchies	17
1.3.3.2.2. Place des branchies dans les processus d'absorption	18
1.3.3.2.3. Les cellules à chlorures et les mécanismes d'échange ioniques	18
• Absorption du calcium (Ca^{2+})	19
• Absorption du sodium Na^+ et des chlorures Cl^-	19
• Mécanisme d'absorption et de sécrétion acide	19
• Mécanisme d'excrétion de l'ammoniaque	21
1.4. IDENTIFICATION DE L'ESPECE <i>G. PULEX</i> (LINNAEUS, 1758)	21
1.5. CHOIX DU GAMMARE COMME ORGANISME MODELE	22

2. STRESS OXYDANT, DEFENSES ANTI-TOXIQUES ET DOMMAGES CELLULAIRES	23
---	----

2.1. LES METALLOTHIONEINES, PIEGEURS DE METAUX	23
2.1.1. <i>Structure et particularités des métallothionéines</i>	23
2.1.2. <i>L'induction des métallothionéines</i>	24
2.1.3. <i>Rôles des métallothionéines</i>	25
2.2. LE STRESS OXYDANT ET LES SYSTEMES DE DEFENSE ANTI-OXYDANTS	26
2.2.1. <i>Le glutathion réduit (GSH) : Un anti-oxydant non- enzymatique</i>	27
2.2.1.1. Structure et biosynthèse du glutathion	27
2.2.1.2. Rôles du glutathion	28
2.2.2. <i>Les anti-oxydants enzymatiques</i>	28

2.2.2.1. Superoxydes dismutases.....	29
2.2.2.2. Les catalases	30
2.2.2.3. Les glutathion peroxydases (GPx)	30
2.2.2.5. Les glutathion réductases (GSR)	31
2.3. LA LIPOPEROXYDATION MEMBRANAIRE.....	31
3. LE METABOLISME ENERGETIQUE ET LES RESERVES ENERGETIQUES.....	33
3.1. LE GLYCOGENE, UNE RESERVE ENERGETIQUE FACILEMENT MOBILISABLE	34
3.2. LES LIPIDES : LES RESERVES ENERGETIQUES LES PLUS EFFICACES.....	35
3.3. LES PROTEINES : DES RESERVES ENERGETIQUES MOBILISABLES LORS D'UN STRESS SEVERE.....	36
4. LA PROTEOMIQUE: UNE APPROCHE EMERGENTE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT.....	38
4.1. ECOTOXICOPROTEOMIQUE ET PROTEOMIQUE COMPARATIVE	38
4.2. METHODES DE QUANTIFICATION ET D'IDENTIFICATION DES PROTEINES.....	43
4.2.1. L'électrophorèse de gel bidimensionnelle classique (2-D GE).....	43
4.2.1.1. 1 ^{ère} dimension : isoélectrofocalisation.....	43
4.2.1.2. 2 ^{ème} dimension : Migration électrophorétique SDS PAGE	44
4.2.1.3. Coloration, repiquage et spectrométrie de masse	44
4.2.1.4. Inconvénients de la 2D-GE classique.....	45
4.2.3. Electrophorèse bidimensionnelle en gel différentiel (DiGE).....	45
5. LES METAUX ETUDIES ET LEUR TOXICITE	49
5.1. ARSENIC.....	49
5.1.1. Généralités	49
5.1.2. Toxicité de l'arsenic	50
5.2. LE CADMIUM.....	54
5.2.1. Généralités	54
5.2.2. Toxicité du cadmium.....	54
5.3. MELANGES D'ARSENIC ET DE CADMIUM.....	60
 Chapitre II. MATERIELS ET METHODES.....	 63
1. SITE D'ETUDE.....	63
1.1. CARACTERISTIQUES DE LA MEHOLLE	63
1.2. QUALITE ECOLOGIQUE ET CHIMIQUE DE LA MEHOLLE	64
2. TECHNIQUES DE PRELEVEMENT ET DE TRI DE <i>G. PULEX</i>.....	68
2.1. PRELEVEMENTS DE <i>G. PULEX</i>	68
2.2. TRI DE <i>G. PULEX</i>	69
2.2.1. Tri des tailles	69
2.2.2. Tri des mâles	70
2.2.3. Précautions particulières appliquées.....	71
2.2.4. Transport au laboratoire	71
3. CONCEPTION EXPERIMENTALE EN LABORATOIRE	71
3.1. ACCLIMATATION DES INDIVIDUS	71
3.2. EXPOSITION DES INDIVIDUS	72
3.3. SELS DE METAUX UTILISES	75
4. MESURE DE BIOMARQUEURS	75
4.1. MORTALITE	75
4.1.1. Détermination des concentrations létales.....	75
4.1.2. Evaluation du mode d'interaction des mélanges sur la mortalité	75
4.2. BIOMARQUEURS PHYSIOLOGIQUES	76

4.2.1. Bioconcentration	76
4.2.2. Pression osmotique et mesure de Na ⁺ et Cl ⁻ dans l'hémolymphe.....	77
4.2.2.1. Mesure des concentrations en Na ⁺ et Cl ⁻ dans l'hémolymphe.	77
4.2.2.2. Pression osmotique totale	77
4.3. MESURES DES RESERVES ENERGETIQUES, DES SYSTEMES DE DEFENSE ANTITOXIQUES ET DU MALONDIALDEHYDE (MDA)	78
4.3.1. Préparation de l'homogénat	78
4.3.2. Dosage des réserves énergétiques	79
4.3.2.1. Dosage du glycogène	79
4.3.2.2. Dosage des teneurs en lipides totaux	80
4.3.2.3. Dosages des protéines	80
4.3.3. Mesure des capacités de défenses antitoxiques.....	81
4.3.3.1. Dosage des concentrations en glutathion réduit (GSH).....	82
4.3.3.2. Dosage de l'activité γ-glutamylcystéine ligase (GCL)	82
4.3.3.3. Dosage des concentrations en métallothionéines (MT)	83
4.3.4. Peroxydation lipidique	84
4.4. BIOMARQUEURS COMPORTEMENTAUX.....	85
4.4.1. Activité ventilatoire	85
4.4.2. Activité locomotrice.....	85
5. METHODES D'ANALYSES PROTEOMIQUES DIFFERENTIELLES (DIGE)	86
5.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS	86
5.1.1. Dissection du gammare	86
5.1.2. Extraction des protéines	87
5.1.3. Purification de l'extrait protéique brut.....	89
5.1.4. Dosage des protéines	89
5.1.5. Electrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)	91
5.2. MARQUAGE DES PROTEINES.....	93
5.2.1. Préparation des extraits protéiques avant le marquage	93
5.2.2. Plan de marquage	93
5.2.3. Reconstitution des cyanines et marquage des échantillons	94
5.2.4.1. Reconstitution de CyDye2.....	95
5.2.4.2. Reconstitution de CyDye3 et CyDye5.....	95
5.2.5. Marquage des extraits protéiques	96
5.2.5.1. Marquage avec CyDye2	96
5.2.5.2. Marquage avec CyDye3 et 5	96
5.3. ANALYSE 2-DE	97
5.3.1. Première dimension : focalisation iso-électrique (IEF).....	97
5.3.1.1. Réhydratation des strips	97
5.3.1.2. Focalisation iso-électrique	97
5.3.2. Deuxième dimension : Migration électrophorétique.....	98
5.3.2.1. Reduction/ alkylation.....	98
5.3.2.2. SDS-PAGE multiple sur système vertical	98
5.3.2.3. Fixation des gels et scan	99
5.4. ANALYSE DIFFERENTIELLE QUANTITATIVE SUR SAMESPOT.....	99
5.5. ANALYSES QUALITATIVES DES SPOTS D'INTERETS.....	100
5.5.1. Gels préparatifs	100
5.5.2. Prélèvement des spots.....	101
5.5.3. Identification des spots.....	101

Chapitre III. RESULTATS DES TRAVAUX.....103

Partie I. Etudes des effets individuels et combinés de l'arséniate et du cadmium sur *G. pulex*, avec ou sans changement de la température à l'aide de tests et de biomarqueurs classiquement utilisés en écotoxicologie.....103

Article 1.

Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (Gammarus pulex).....105

Article 2.

Antagonistic toxicity of arsenate and cadmium in a freshwater amphipod (Gammarus pulex).....131

Article 3.

Single and combined effects of Cadmium and Arsenate in Gammarus pulex (Crustacea, Amphipoda): understanding the links between physiological and behavioural responses.....155

Article 4.

Behavioural and Physiological Responses of Gammarus pulex Exposed to Cadmium and Arsenate at Three Temperatures: Individual and Combined Effects.....193

Partie II. La protéomique: Un outil de détection précoce d'une contamination métallique ?.....233

Chapitre IV. DISCUSSION TRANSVERSALE.....251

1. EFFETS ISOLES DE L'ARSENATE ET DU CADMIUM..... 251

1.1. BIOCONCENTRATION ET VOIES D'ENTREE..... 251

1.2. REPONSES SIMILAIRES OBSERVEES ENTRE LES DEUX METAUX CHEZ *G. PULEX* 252

1.3. REPONSES DISTINCTES OBSERVEES ENTRE LES DEUX METAUX CHEZ *G. PULEX* 258

1.3.1. Une différence de voie d'entrée...synonyme de réponses distinctes ?..... 258

1.3.2. La ventilation..... 259

1.3.3. L'iono-osmorégulation 260

1.3.4. Les réserves énergétiques 260

1.3.5. Analyse du protéome 261

2. MELANGE D'ARSENATE ET DE CADMIUM 262

3. EFFETS DE LA TEMPERATURE..... 262

3.1. EFFETS DE LA TEMPERATURE SUR DES INDIVIDUS *G. PULEX* TEMOINS..... 262

3.2. EFFETS DE LA TEMPERATURE SUR DES INDIVIDUS EXPOSES A DE L'ARSENATE ET/OU DU CADMIUM..... 265

3.3. PROTEOMIQUE 267

CONCLUSION ET PERSPECTIVES269

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....277

ANNEXES.....317

RESUMES FRANÇAIS ET ANGLAIS

REMERCIEMENTS

Tout comme un écosystème a besoin de biodiversité pour bien fonctionner, un travail de thèse nécessite des interactions dynamiques entre les personnes pour être bien mené. C'est pourquoi, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à ces travaux de recherche...

Je tiens particulièrement à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, **Philippe Usseglio-Polatera**, et à mon co-directeur de thèse, **Marc Parant**, sans qui ce projet de thèse n'aurait jamais vu le jour. Merci à vous deux de m'avoir fait confiance et de m'avoir accompagnée durant ces trois années.

Je tiens également à adresser mes remerciements à toute la direction du LIEBE (**Jean-françois Ferard, Pascale Bauda et Laure Giamberini**) pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Par la même occasion, il m'est indispensable d'exprimer ma reconnaissance à mes encadrants de M1R (**Jean-François Ferard**) et de M2R (**Jean-Nicolas Beisel**), qui m'ont permis de découvrir le monde de la recherche (*ce dont je rêvais depuis l'enfance*) et qui m'ont confortée dans l'idée de continuer en thèse.

Mes plus sincères remerciements à **Jeanne Garric, Alain Geffard, Jean-Pierre Thomé et Pierre Taberlet** pour le privilège qu'ils m'ont accordé en acceptant d'évaluer ce travail.

Merci également à toutes les personnes qui ont travaillé avec moi et dont le savoir-faire m'a été d'une grande aide :

- Pour la partie « protéomique », je remercie particulièrement **Françoise Immel**, qui m'a enseigné l'aspect pratique de cette technique moléculaire. Je remercie également **Marc Parant** et **Bénédicte Sohm-Rederstorff** pour tous leurs conseils avisés.
- Un petit message spécial pour toi, qui dit toujours que « personne n'est à l'abri d'une réussite ». Je tiens à ce que tu saches, **Philippe** (alias **PUP**) que si cette thèse se solde par une réussite, ce sera en grande partie grâce à toi. *Je ne te remercierai jamais assez pour les nombreuses heures (week-end compris, désolée) que tu as passées pour réaliser les méticuleuses corrections*

inhérentes à ce travail de thèse. Tu as su trouver les mots justes pour m'épauler dans ce grand périple et tu as fait preuve d'une grande écoute à mon égard. Outre tes incontestables qualités de chercheur, tu as également fait preuve de très jolies qualités humaines. Je te remercie du fond du cœur pour tout ce que tu m'as apporté.

- C'est avec **Vincent Felten, Eric Gismondi, Philippe Rousselle, et Pascal Sornom** que le mot « collaboration » a pris un véritable sens à mes yeux. J'ai éprouvé un réel plaisir à travailler avec vous. Merci d'avoir participé à mes expérimentations et merci d'avoir partagé avec moi votre savoir et vos compétences d'analyse qui ont été essentiels à la bonne réalisation de cette thèse. J'ai apprécié votre efficacité, votre bonne humeur et j'ai passé d'agréables moments en votre compagnie. J'espère que notre collaboration ne s'arrêtera pas là...

- Merci à **Philippe Wagner, PUP (encore !!!), et Jonathan Bouquerel** pour la partie « macroinvertébrés benthiques ». Même si cette partie ne figure pas dans ce manuscrit, ce travail sera, sans aucun doute, valorisé prochainement. Jonathan, un grand merci pour ton aide dans le tri et la détermination. Philippe W., et PUP, merci de m'avoir fait découvrir les joies du terrain. *Qu'est-ce qu'on était bien en Alsace, qu'il vente, pleuve ouneige !!! Je me rappellerai toujours de la fameuse sortie « reconnaissance de sites alsaciens » en plein mois de février (je n'ai pas résisté à l'envie irrésistible de mettre les photos, hi).*



Reconnaissance de sites en Alsace (Février 2010)

Grâce à vous, je garde de très bons souvenirs passés à vos côtés. Soyons honnêtes, vous m'avez tout de même vexée une fois... quand je suis tombée à l'eau (ou dans la neige, sans commentaires...) et que vous avez ri (??!!)... Heureusement que vous m'avez empêchée de réitérer ce type d'expérience par la suite. Allez, vous êtes pardonnés... et de surcroît, je vous remercie encore une fois.

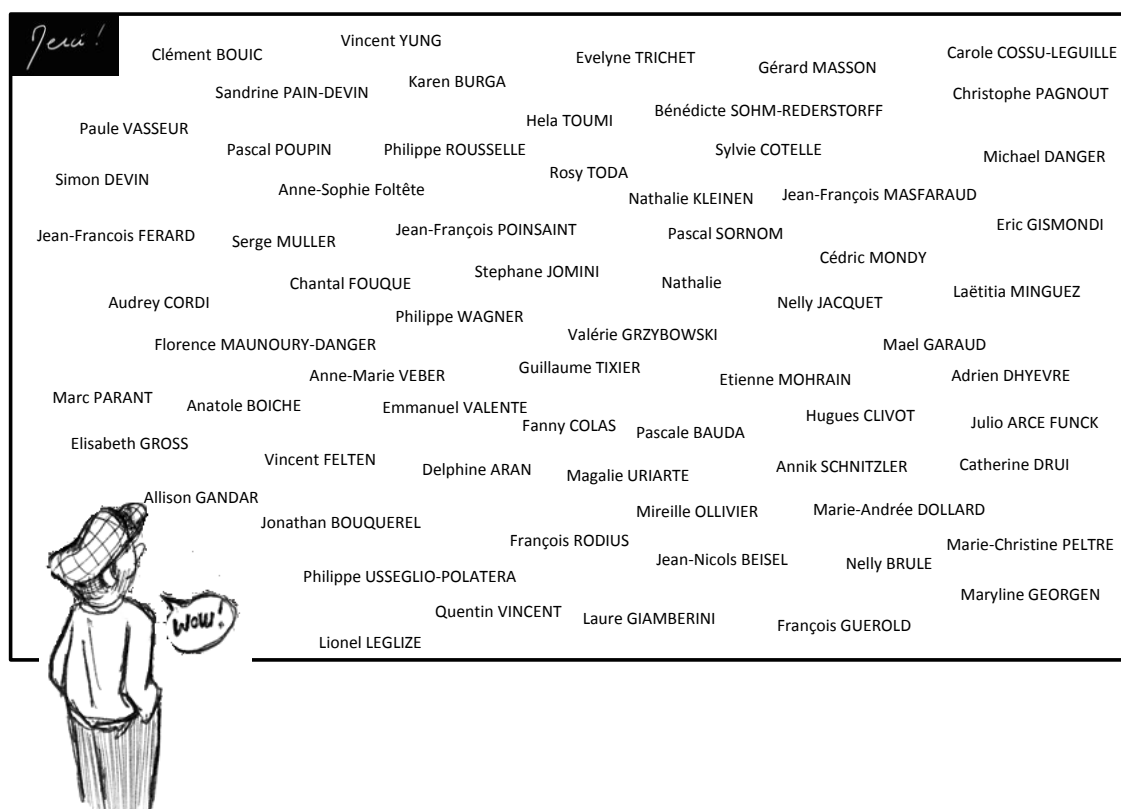
- Pour toutes les aides administratives, je tiens à remercier **Catherine Drui** et **Maryline Goergen**. Ces remerciements ne seraient pas complets sans y mentionner **Nathalie Kleinen**,

qui partage le même bureau qu'elles. Parallèlement, je remercie **Mireille Ollivier**, notre documentaliste. *Outre le professionnalisme dont vous faites preuve, j'ai apprécié toutes les discussions et les échanges que nous avons pu avoir...*

- J'en profite également pour remercier **Etienne Mohrain** et **Jean-François Poinssaint**, qui m'ont « dépannée » lorsqu'il me manquait du matériel, et qui m'ont rendu de multiples autres services. *Vous m'avez toujours accueillie avec le sourire, ce qui m'a toujours émue. Surtout, restez tels que vous êtes...*

- **Nathalie Nauer**, je tenais vraiment à t'exprimer toute ma sympathie. *Merci pour tous les cafés que tu m'as offert le matin à mon arrivée. Tu as eu tout plein de petits gestes, de petits mots réconfortant envers moi et cela m'a énormément touchée. Tu as illuminé mes journées par ta gentillesse (tu vois je l'ai marqué...). Mille fois merci... Je te souhaite vraiment tout plein de bonheur.*

- Je tiens aussi faire part de mes remerciements, et non des moindres, à toutes les autres personnes que j'ai pu côtoyer au sein du laboratoire (quel que soit leur statut), et qui m'ont apporté de la bienveillance, de la sympathie, du réconfort, des fous-rires ou bien d'autres choses.



Puisque la thèse n'est pas un long fleuve tranquille, les amis et la famille sont essentiels au maintien de notre équilibre:

- C'est pourquoi, je suis vraiment reconnaissante à **Christine, Julie, Mathieu, Ti-Dav, Christiane et Cyrille** (et Lucas) d'avoir été à mes côtés. Merci pour toutes les mémorables soirées où les rires étaient toujours au rendez-vous. Sans vous, mes « moments détente » auraient manqué de saveur. J'en profite également pour remercier **Pascal**, qui, bien plus qu'un simple collègue de bureau, est devenu mon confident, mon ami. Sans oublier **Nathalie**, sa femme, qui est tout simplement extraordinaire. Un grand merci à vous tous.
- Merci également à toutes les personnes qui m'ont longuement écouté parler de mon sujet de thèse, en acquiesçant, même sans en comprendre un mot... (*Qui se sent concerné? Tata martine ? Nadia ? Patricia ?...*)
- Merci à ma nouvelle famille, belle-maman **Gaby** (*hummm... les bons petits plats*) et beau-papa **Marcel** (*ouah, les beaux et bons légumes (bio ?) du jardin...*); sans oublier **Julien** (*trop forte la blague...*), **Jérémy** (*mon petit cœur ? ...*) et **Emilie** (*Jolie...*). Merci de m'avoir acceptée dans votre vie, de contribuer chaque jour un peu plus à mon bonheur. Et du fond du cœur, c'est avec un **Max** d'amour, que je tiens à te remercier, toi, mon petit ange. *Je t'aime.*
- Enfin, mes derniers remerciements sont destinés à ma famille de toujours. Merci à **Pierre-Marie** et **Aurélie**, mon frère et ma sœur, ainsi que qu'à leurs conjoints respectifs, **Sandra** et **Kimmy**, d'être présents quoi qu'il arrive. Merci aussi à mon « coocky » et à ma « vanillette » pour les moments de décompression. Pour finir, je remercie mes parents, **Noëlle** et **Laurent**, qui ont financé mes études, qui ont toujours cru en moi et qui m'ont toujours encouragée même lorsque j'avais perdu toute confiance en moi. Je n'ai pas de mots assez forts pour vous exprimer ce que je ressens. **Je vous aime.**

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION.....	1
Figure 1. Schéma général des effets en cascade de l'exposition d'organismes à des xénobiotiques (Modifié d'après Lagadic et al., 1997; Van der Oost, 2003 ; Amiard et Amiard-Triquet, 2008).....	2
Figure 2. Changements d'échelle et outils d'étude des xénobiotiques au sein des écosystèmes.....	4
 Chapitre I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
Figure I.1. Principales caractéristiques du genre <i>Gammarus</i> en fonction de sa systématique (Adapté de Tachet et al., 2000).....	10
Figure I.2. Morphologie d'un individu <i>Gammarus pulex</i> mâle (Vue latérale, adaptée de Roux, 1970 ; Chevreux & Fage, 1970 et Gledhill et al., 1993). Pe 1-7: Pérériomères 1 à 7 ; pe: pérériopodes ; Pc 1-7: Plaques coxales 1 à 7; Pl 1-3: Pléomères 1 à 3 ; Ur1-3: Uromères 1 à 3.....	12
Figure I.3. Appareil génital des amphipodes femelles (oostégites) et mâles (Papilles péniennes, Adapté de Piscart et Bollache, 2012).....	13
Figure I.4. Gammares mâle et femelle en amplexus (D'après Piscart et Bollache, 2012).....	15
Figure I.5. Mécanisme de transport ionique intervenant dans les mécanismes de régulation ionique, de régulation acide-base et d'excrétion ammoniacale à travers les cellules à chlorures localisées dans les branchies. A) Absorption de Ca^{2+} ; B) Absorption de Na^{+} et Cl^{-} ; C+D) Modèle hypothétique de la sécrétion acide (C) ou de l'absorption acide (D) comme outil de l'homéostasie du pH cellulaire ; (E) Excrétion ammoniacale (adapté de Onken et Riestenpatt, 1998 ; Wheatly et al., 2002 ; <u>Onken et al., 2003</u> ; Ahearn et al., 2004; Weihrauch et al., 2004; Freire et al., 2008).....	20
Figure I.6: Représentation schématique de la structure d'une métallothionéine dans le cas du piégeage du cadmium (Klaassen et al., 1999).....	24
Figure I.7. Formule semi-développée du glutathion réduit et synthèse de ce tripeptide (Source : Université de Rouen, France).....	28

Figure I.8. Transformation des ROS par les enzymes anti-oxydantes (adapté de Chabot et al., 1998; Afonso et al., 2007). O ₂ : oxygène moléculaire ; O ₂ • ⁻ : Anion superoxyde ; H ₂ O ₂ : Peroxyde d'hydrogène ; OH• : Radical hydroxyl ; GSH : Glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé ; IndSeGPx ; Glutathion peroxydase Sélénium-indépendant ; SeGPx ; Glutathion peroxydase Sélénium-dépendant ; GSR: Glutathion réductase; GST: Glutathion-S-transférase; SOD : Superoxyde dismutase.....	29
Figure I.9. Les trois phases du processus de lipoperoxydation membranaire (adapté de Porter et al., 1995; De Zwart et al., 1999; Valko et al., 2007).....	32
Figure I.10. Dégradation du glycogène dans les cellules hépatiques et musculaires.....	35
Figure I.11. Voies de transformation des réserves énergétiques en ATP et interconversion des substrats énergétiques (adapté de Pratt et Cornely, 2012).....	37
Figure I.12. Représentation schématique des gels 2D montrant des modifications d'expression des spots de protéines engendrées par un traitement particulier par comparaison à un témoin. A) Protéines sur- et sous-exprimées ; B) Protéines réprimées et induites et C) Représentation montrant que c'est la combinaison des modifications d'expression de protéines et non la modification d'une protéine singulière (pouvant être commune à plusieurs traitements) qui est spécifique de chaque traitement. Ces protéines dont l'expression est modifiée sont appelées « PES ». (d'après Shepard et Bradley., 2000).....	42
Figure I.13. Electrophorèse bidimensionnelle 2D-GE.....	43
Figure I.14. Marquage d'une protéine par un marqueur fluorescent CyDye. A) Cas du marquage par saturation ou « saturation labelling ». Les protéines subissent d'abord une étape de réduction en présence de TCEP [(tris-2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride] et d'une hausse de la température. Puis, le groupement réactif maleimide de CyDye se lie aux groupements thiols des résidus cystéine de la protéine. B) Cas du marquage minimal ou « minimal labelling ». Le marqueur fluorescent est composé d'un groupe réactif ester qui se fixe aux résidus lysine d'une protéine (modifié d'après le guide Cydye DiGE- GE Healthcare Amersham).....	46
Figure I.15. Illustration des étapes successives de la DiGE, du marquage à l'acquisition d'image.....	48

Chapitre II. MATERIELS ET METHODES.....63

Figure II.1. La Méholle à Void-Vacon en Meuse (Source : Quentin VINCENT).

A) Photographie de la Méholle. **B)** Cartographie au 1/25000^{ème} de la Méholle à Void-Vacon (Meuse, France). La cible rouge représente les coordonnées de prélèvement des gammarès [Lambert II E(X) 841244; Lambert II E(Y) 2412346].....63

Figure II.2. Occupation des sols sur le bassin versant de la Méholle (D'après le SIERM).....64

Figure II.3. Illustration de la technique de prélèvement de *G. pulex* sur la Méholle à Void-Vacon à l'aide de substrats artificiels (Source des photographies: Jean-Nicolas BEISEL et Philippe WAGNER).....68

Figure II.4. Illustration des deux étapes de mesure de la taille des *G. pulex* mâles avec le logiciel ImageJ, version 1.42q. **A)** Première étape. La ligne (en jaune) est tracée le long de 10 carreaux, représentant une distance connue de 10 cm. La distance connue est reportée manuellement dans une boîte de dialogue du logiciel. **B)** Deuxième étape. Une ligne segmentée est tracée de l'extrémité antérieure du céphalothorax à l'extrémité postérieure du telson (ligne jaune) et la longueur correspondante est calculée directement par le logiciel.....70

Figure II.5. Photographies des dispositifs expérimentaux. Vue d'ensemble des boîtes de Petri placées dans une armoire thermostatée. (B) Vue de dessus d'une boîte de Petri contenant des gammarès, des billes de verre et une solution métallique. (Photographies: P. Wagner).....72

Figure II.6. Protocole de préparation de l'homogénat et répartition du volume total entre les différents dosages de défenses antitoxiques (GSH, GCL, MT), de réserves énergétiques (glycogène, lipides et protéines) ou de mesure des dommages cellulaires (MDA).....79

Figure II.7. Vue d'ensemble du protocole de protéomique en DiGE utilisé, de la préparation des échantillons à l'identification des protéines.....87

Figure II.8. Protocole schématisé pour l'extraction des protéines. 5 réplicats au minimum ont été réalisés par condition d'exposition (As1, Cd1, As1Cd1) et pour chaque température (5, 10, 15°C).....87

Figure II.9. Protocole schématisé de purification des protéines grâce au kit ReadyPrep™ 2-D Cleanup (D'après BIO-RAD, Catalog #163-2130)..... 88

Figure II.10. Protéines séparées par électrophorèse monodimensionnelle et colorées au bleu de Coomassie. Exemple obtenu pour les 5 réplicats (R1 à R5) de *G. pulex* exposés durant 96h à 26,9 ($\pm$ 0,9) $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cadmium à la température de 10°C.....90

Figure II.11. Plan de marquage des différents extraits protéiques. Les différentes conditions d'exposition métallique (« T » = Témoin ; « As1 » = 1213,9 ($\pm$ 104,9) $\mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$; « As2 » = 1694,6 ($\pm$ 120,2) $\mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$; « Cd1 » = 26,9 ($\pm$ 0,9) $\mu\text{g}_{\text{Cd}}\cdot\text{L}^{-1}$; « As1Cd1 » = 1213,9 ($\pm$ 104,9) $\mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$ et 26,9 ($\pm$ 0,9) $\mu\text{g}_{\text{Cd}}\cdot\text{L}^{-1}$), la température d'exposition (5- 10 ou 15 °C) et le numéro de réplicat (R1 à R8) de l'extrait protéique sont mentionnés dans ce tableau.....	94
Figure II.12. Vue d'ensemble du marquage DiGE (source: INSERM, Marseille).....	95
Figure II.13. Réalignement des spots d'un gel sur une image de « référence ». Les vecteurs bleus représentent les vecteurs ajoutés automatiquement par le logiciel Samespot. Les vecteurs rouges correspondent aux vecteurs ajoutés de manière manuelle.....	100

Chapitre III. RESULTATS DES TRAVAUX.....103

Partie I. Etudes des effets individuels et combinés de l'arséniate et du cadmium sur *G. pulex*, avec ou sans changement de la température à l'aide de tests et de biomarqueurs classiquement utilisés en écotoxicologie.....

Article 1.

Figure 1. Dose-mortality curves after 240-h arsenate (A) or cadmium (B) exposure for <i>Gammarus pulex</i> . The dotted lines represent the values of LC50s ($\pm$ 95 % confidence interval). An Abbott's correction was realized because mean mortality rate in the controls was about 22 %.....	113
Figure 2. Kinetics analysis of the arsenate and cadmium toxicity for <i>Gammarus pulex</i> . LC50 values ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and their 95% confidence intervals (dotted lines) were estimated using REGTOX (Vindimian et al., 1999; Isnard et al., 2001).....	114
Figure 3. Relationship between metal concentration in <i>Gammarus pulex</i> body tissues after 240-h exposure ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight) and (A) arsenate or (B) cadmium concentration in water during exposure [Cw _i]. Significant differences are marked by different letters (Tukey HSD test; $p < 0.05$).....	115
Figure 4. Relationship between mean ($\pm$ s.d.) bioconcentration factor (BCF) in <i>Gammarus pulex</i> after 240-h exposure and (A) arsenate or (B) cadmium water concentration during exposure [Cw]. Significant differences were marked by different letters (Tukey HSD test, $p < 0.05$).....	116

Figure 5. Mean pleopod beat frequency (MPBF $\pm$ s.d.) of *Gammarus pulex* exposed for 240 h to various arsenate (A) or cadmium (B) concentrations. Significant differences were represented by different letters (n = 15 for each metal concentration; One way-ANOVA and Tukey HSD test; $p < 0.05$).....117

Article 2.

Figure 1. Experiment design and mean real concentrations ($\mu\text{g L}^{-1} \pm$ s.d) of arsenate and cadmium tested (n = 3) during the experiments. Values were measured by graphite furnace atomic-absorption spectrophotometry (AAS Varian SpectrAA-330, detection limits: $2 \mu\text{g}_{\text{As}} \text{L}^{-1}$ and $0.1 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$) or by flame atomic-absorption spectrophotometry (AAS PERKIN ELMER AAnalyst 100, detection limits: $20 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$)..... 136

Figure 2. Comparison of the *Gammarus pulex* mean mortality ($\pm$ error type) observed at four arsenate or cadmium concentrations (A to D) after 240h exposure. Letters (a1 to b1 for cadmium and a2 to c2 for arsenate) were used as labels to illustrate significant differences in mortality mean values, for each metal independently (one-way ANOVAs + HSD – Tukey's post hoc tests, at $p < 0.05$ level of significance)..... 139

Figure 3. Comparison of the mean ($\pm$ s.d.) observed mortality of *Gammarus pulex* after a 240 h exposure to (i) a single metal (arsenate or cadmium) vs. (ii) a binary mixture (arsenate and cadmium). **A:** arsenate concentration gradient effect on *G. pulex* mortality at four cadmium concentrations in mixtures. **B:** cadmium concentration gradient effect on *G. pulex* mortality at four arsenate concentrations in mixtures. Letters (a to c) were used as labels to illustrate significant differences in mortality mean values within each series of experiments performed at a given concentration of cadmium (A) or arsenate (B) (one-way ANOVAs + HSD-Tukey's post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).....141

Figure 4. Comparison between 'theoretically expected' and 'observed' combined effects of different cadmium/arsenate binary mixtures on the mean mortality ($\pm$ s.d.) of *Gammarus pulex* after 240 h exposure. Asterisks indicated significant differences between observed and expected values for each binary mixture (Student's t test, * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). Exact p-values are provided in table 2.....142

Figure 5. Comparison of mean ($\pm$ s.d.) metal concentrations (in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) in *Gammarus pulex* body tissues after 240 h exposure between the dishes with a single metal (cadmium or arsenic) and dishes with binary mixtures. **A:** arsenate concentration gradient

effect on *G. pulex* cadmium concentration at four cadmium concentrations in mixtures, **B**: cadmium concentration gradient effect on *G. pulex* arsenate concentration at four arsenate concentrations in mixtures. Metal concentration in body tissues was not evaluated for the 1502 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ exposure, due to a too high mortality of *G. pulex* in this experimental condition. Letters (a & b) were used as labels to illustrate significant differences in the mean values of metal concentrations in body tissues for each series of experiments performed at a given concentration of cadmium (A) or arsenate (B) (ANOVAs + HSD-Tukey's post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).....143

Figure 6. Response surface (3D-modelling spline) illustrating the relationship between the mortality rate (%) of *Gammarus pulex* after 240 h exposure to various AsV and Cd binary mixtures and each metal concentration in the mixture. Modelling was performed using mortality raw data from five replicates per tested concentration.....148

Article 3.

Figure 1. Mortality of *G. pulex* after a 240-hour exposure to different concentrations of AsV and/or Cd. **A**) Comparison of the mean observed mortality ($\% \pm \text{s.d.}$) of *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1 and As2) or cadmium (Cd1 and Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). Letters (a to c) were used as labels to illustrate significant differences in mean mortality values (one-way ANOVA and HSD Tukey post hoc test after arcsin root square transformation; at $p < 0.05$ level of significance, $n=8$). **B**) Comparison of the 'theoretically expected' with the 'observed' combined effects of different cadmium/arsenate binary mixtures on the mortality ($\pm \text{s.d.}$) of *G. pulex* after a 240-hour exposure. Asterisks indicated significant differences between the observed and expected value distributions for each binary mixture (Mann-Whitney U-test; at $p < 0.05$ level of significance).....168

Figure 2. Mean osmolality level ($\text{mOsm kg}^{-1} \pm \text{s.d.}$) of *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1, As2) and cadmium (Cd1, Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). Letters (a to e) illustrate significant differences (Kruskal-Wallis test; at $p < 0.05$ level of significance; $n=10$).....169

Figure 3. **(A)** Mean GSH concentration ($\text{nmol mg protein}^{-1} \pm \text{s.d.}$) and **(B)** mean GCL activity ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1} \pm \text{s.d.}$) in *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1, As2) and cadmium (Cd1, Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). Letters (a to d) illustrate significant

differences (one way-ANOVA and HSD Tukey post hoc test at $p < 0.05$ level of significance, $n = 6$).....170

Figure 4. Mean MT concentrations (nmol mg protein⁻¹; $\pm$ s.d.) in *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1, As2) and cadmium (Cd1, Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). Letters (a to d) illustrate significant differences (one way-ANOVA and HSD Tukey post hoc test at $p < 0.05$ level of significance, $n = 6$).....171

Figure 5. MDA level in *G. pulex* after a 240-hour exposure to different concentrations of AsV and/or Cd. **A)** Mean MDA level ($\pm$ s.d.) in *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1 and As2) or cadmium (Cd1 and Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). Letters (a to c) were used as labels to illustrate significant differences in mean MDA level (one-way ANOVA and HSD Tukey post hoc test; at $p < 0.05$ level of significance; $n = 6$). **B)** Comparison of the 'theoretically expected' effect with the 'observed' effect of different cadmium/arsenate binary mixtures on the MDA level ($\pm$ s.d.) in *G. pulex* after a 240-hour exposure. Asterisks indicated significant differences between the observed and the expected value distributions for each binary mixture (Mann-Whitney U-test; at $p < 0.05$ level of significance; $n = 6$).....172

Figure 6. Mean energy reserve concentrations ($\pm$ s.d.) of *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1, As2) and cadmium (Cd1, Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). **A)** Mean protein concentration (mg mL⁻¹; $\pm$ s.d.). **B)** Mean total lipid content (mg mL⁻¹ ; $\pm$ s.d.). **C)** Mean glycogen content (μ g mg tissues⁻¹; $\pm$ s.d.). Letters (a to e) illustrate significant differences (one way-ANOVA and HSD Tukey post hoc test at $p < 0.05$ level of significance; $n = 6$).....174

Figure 7. Behavioural responses of *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1, As2) and cadmium (Cd1, Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). **A)** Mean percentage of moving *G. pulex* ($\pm$ s.d.). Letters (a to e) illustrate significant differences (one way-ANOVA and HSD Tukey post hoc test after arcsin root square transformation; at $p < 0.05$ level of significance; $n = 35$). **B)** Mean pleopod beat frequency (number.min⁻¹; $\pm$ s.d.). Only one group: "a" (i.e. no significant difference among experimental exposures) was identified with a non parametric Kruskal-Wallis test at $p < 0.05$ level of significance; $n = 10$)..... 176

Article 4.

Figure 1. Experimental design and mean real concentrations of arsenate and/or cadmium tested during the experiments. Values ($\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{s.d.}$) were measured by graphite furnace atomic - absorption spectrophotometry (AAS Varian SpectrAA-330, detection limits: $2 \mu\text{g}_{\text{As}} \text{L}^{-1}$ and $0.1 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$) or by flame atomic - absorption spectrophotometry (AAS PERKIN ELMER AAnalyst 100, detection limits: $20 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$) Mean real concentrations were based on $n=12$ for control and $n=36$ for all the combined “temperature x tested conditions” 199

Figure 2. Mean mortality (%) in *Gammarus pulex* exposed to different conditions at three temperatures (5-10-15°C).

The different conditions were “control”, “arsenate”, “cadmium” and four binary mixtures.

- a) Temperature x condition effect. Mean mortality for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.
- b) Condition effect: Weighted mean mortality for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.
- c) Temperature effect: Weighted mean mortality for each temperature (results for all the tested conditions were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to g) were used as labels to illustrate significant differences in mean mortality values (two-way ANOVAs + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).204

Figure 3. Comparison of mean mortality ($\pm \text{s.d.}$) between ‘theoretically expected’ and ‘observed’ combined effects. Mean mortality of different cadmium/arsenate binary mixtures in *Gammarus pulex* after 96-hour exposure. An asterics indicated significant differences between the observed and expected values for each binary mixture (Student-t test, $p < 0.05$).....205

Figure 4. Mean arsenate concentrations in *G. pulex* body tissues ($\mu\text{g. g dry weight}^{-1}$).

Concentrations obtained for individuals exposed 96 h to different conditions (control, arsenate, cadmium and four binary mixtures) at three temperatures (5-10-15°C).

- a) Temperature x condition effect. Mean internal arsenate concentration in *G. pulex* for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.

- b)** Condition effect: Weighted mean concentration of internal arsenate for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.
- c)** Temperature effect: Weighted mean concentration of internal arsenate concentrations for each temperature (results for all the tested conditions were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to f) were used as labels to illustrate significant differences in mean [AsV] values (two-way ANOVAs + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).....206

Figure 5. Mean cadmium concentrations in *G. pulex* body tissues ($\mu\text{g. g dry weight}^{-1}$).

Concentrations obtained for individuals exposed 96 h to different conditions (control, arsenate, cadmium and four binary mixtures) at three temperatures (5-10-15°C).

- a)** Temperature x condition effect. Mean internal Cd concentrations in *G. pulex* for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.
- b)** Condition effect: Weighted mean concentration of internal Cd for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.
- c)** Temperature effect: Weighted mean concentration of internal Cd for each temperature (results for all the tested conditions were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to g) were used as labels to illustrate significant differences in mean [Cd] values (two-way ANOVAs + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).....208

Figure 6. Mean mobility of *Gammarus pulex* (in %) exposed to different conditions.

Mobility obtained for individuals exposed 96 h to different conditions (control, arsenate, cadmium and four binary mixtures) at three temperatures (5-10-15°C).

- a)** Temperature x condition effect. Mean mobility (%) for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.
- b)** Condition effect: Weighted mean locomotor activity for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.
- c)** Temperature effect: Weighted mean locomotor activity for each temperature (results for all the tested conditions were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to q) were used as labels to illustrate significant differences in mean mobility values (two-way ANOVAs + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).....211

Figure 7. Mean pleopod beat frequency (MPBF) of *Gammarus pulex*.

MPBF obtained for individuals exposed 96h to different conditions (control, arsenate, cadmium and four binary mixtures) at three temperatures (5-10-15°C).

- a) Temperature x condition effect. Mean MPBF for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.
- b) Condition effect: Weighted mean MPBF for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.
- c) Temperature effect: Weighted mean MPBF for each temperature (results for all the tested conditions were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to l) were used as labels to illustrate significant differences in MPBF values (two-ways ANOVA + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).....212

Figure 8. Mean concentrations of haemolymphatic $[Na^+]$ (mmol L⁻¹) in *Gammarus pulex*.

Concentrations obtained for individuals exposed 96 h to different conditions (control, arsenate, cadmium and four binary mixtures) at three temperatures (5-10-15°C).

- a) Temperature x condition effect. Mean haemolymphatic $[Na^+]$ for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.
- b) Condition effect: Weighted mean haemolymphatic $[Na^+]$ for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.
- c) Temperature effect: Weighted mean haemolymphatic $[Na^+]$ for each temperature (results for all the tested conditions were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to e) were used as labels to illustrate significant differences in values of mean haemolymphatic $[Na^+]$ (two-way ANOVAs + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance)..... 214

Figure 9. Mean concentrations of haemolymphatic $[Cl^-]$ (mmol L⁻¹) in *Gammarus pulex*.

Concentrations obtained for individuals exposed 96 h to different conditions (control, arsenate, cadmium and four binary mixtures) at three temperatures (5-10-15°C).

- a) Temperature x condition effect. Mean haemolymphatic [Cl⁻] for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.
- b) Condition effect: Weighted mean haemolymphatic [Cl⁻] for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.
- c) Temperature effect: Weighted mean haemolymphatic [Cl⁻] for each temperature (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to g) were used as labels to illustrate significant differences in values of mean haemolymphatic [Cl⁻] (two-way ANOVAs + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).....216

Figure 10. Global physiological model of individual and interactive effects of temperature, arsenate and cadmium in *Gammarus*.

A dotted line represents a lower effect than a full one.....223

Partie II. La protéomique: Un outil de détection précoce d'une contamination métallique ?.....233

Figure III.1. Démarche utilisée pour catégoriser les protéines de manière à identifier celles susceptibles de mettre en évidence les effets des métaux (par comparaison aux témoins) indépendamment de l'effet de la température. La démarche est appliquée à chaque protéine.....238

Figure III. 2. Numéros des spots de protéine sélectionnés à l'issue de la synthèse des résultats fournis par l'analyse du facteur « condition » dans chacune des ANOVA II et associés à un effet significatif pour au moins une température compte tenu des résultats fournis par les ANOVA I réalisées par température testée. Le chiffre entre parenthèses est le code numérique assigné au groupe d'appartenance dans la catégorisation décrite dans la figure 1. La signification de chaque code (combinaison des résultats obtenus) est décrite dans le tableau I. Les groupes d'appartenance des spots (A, B, C, D, E) sont décrits dans le tableau III. 3.....241

Figure III.3. Numéros des spots exprimés significativement et simultanément dans les effets « condition et température » des ANOVA II et exprimés de manière significative au sein de chaque groupe à l'issue des ANOVA I réalisées pour chaque température. Le chiffre entre parenthèses est le code numérique assigné à l'issue de la catégorisation décrite dans la figure 1. La signification de chaque code (combinaison des résultats obtenus) est décrite dans le tableau I. Les groupes d'appartenance des spots (A, B, C, D, E) sont décrits au sein du tableau III.3.....242

Chapitre IV. DISCUSSION TRANSVERSALE.....251

Figure IV.1. Représentation simplifiée des réponses des biomarqueurs chez les individus *G. pulex* exposés à de l'arsénite ou du cadmium seul.....255

Figure IV.2. Modalités d'exposition des individus de *G. pulex* à 10°C dans les expériences présentées dans les articles 2, 3 et 4 (+protéomique) et résultats obtenus sur le mode interactif du mélange binaire d'arsénite et de cadmium sur la mortalité de ces individus.....263

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
Tableau I.1. Systématique du genre <i>Gammarus</i>	9
Tableau I.2. Synthèse et effets des principales espèces réactives de l'oxygène.....	26
Tableau I.3. Etudes rapportant des données de protéomique comparative sur des invertébrés aquatiques.....	41
Tableau I.4. Etudes de laboratoire rapportant des données de toxicité des espèces inorganiques de l'arsenic sur des invertébrés d'eau douce.....	52
Tableau I.5. Etudes de laboratoire fournissant des données de toxicité du cadmium sur des amphipodes.....	57
Chapitre II. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	63
Tableau II.1. Caractéristiques physico-chimiques et dosages des substances chimiques dangereuses sur l'eau et les sédiments de la Méholle à Void-Vacon en Avril 2010. Les classes de qualité sont représentées avec des couleurs différentes, selon le SeQ-EauV2: Bleu= « très bonne » ; Vert= « bonne » ; Jaune=« moyenne » ; Orange=« médiocre », Rouge= « mauvaise ».....	66
Tableau II.2. Caractéristiques physico-chimiques de la Méholle et dosage des micropolluants minéraux sur l'eau brute ($\mu\text{g.L}^{-1}$) et sur les sédiments (mg.kg^{-1}) à différentes dates de prélèvements. Les classes de qualité sont représentées avec des couleurs différentes, selon le SeQ-EauV2: Bleu= « très bonne » ; Vert= « bonne » ; Jaune= « moyenne » ; Orange= « médiocre », Rouge= « mauvaise ».....	67
Tableau II.3. Recapitulatif des conditions expérimentales pour chaque expérience réalisée..	74
Tableau II.4. Composition du tampon d'homogénéisation et rôles des différents composants.....	78
Tableau II.5. Conditions expérimentales des analyses par HPLC (Source: Thèse de Gismondi, 2012).....	82
Tableau II.6. Composition du cocktail d'incubation utilisé pour le dosage de l'activité γ -glutamylcystéine ligase.....	83
Tableau II.7. Composition du cocktail d'incubation utilisé pour le dosage des métallothionéines.....	84
Tableau II.8. Composition du tampon d'extraction.....	87

Tableau II.9. Composition du tampon de réhydratation.....	96
Tableau II.10 : Etapes successives de l'isoélectrofocalisation (IEF) des protéines sur bandelettes d'acrylamide 24 cm, pH 4-7 (GE Healthcare).....	97

Chapitre III. RESULTATS DES TRAVAUX.....103

Partie I. Etudes des effets individuels et combinés de l'arséniate et du cadmium sur <i>G. pulex</i> , avec ou sans changement de la température à l'aide de tests et de biomarqueurs classiquement utilisés en écotoxicologie.....	103
--	-----

Article 1.

Table 1. Mean ($\pm$ s.d.) real concentrations ($\mu\text{g.L}^{-1}$) of AsV and Cd tested for the experiments ($n=3$). Values were measured by graphite furnace atomic-absorption spectrophotometry (AAS Varian SpectrAA-330, detection limit = $2\mu\text{g}_{\text{As}}.\text{L}^{-1}$ and detection limit = $0.1\mu\text{g}_{\text{Cd}}.\text{L}^{-1}$) or by flame atomic-absorption spectrophotometry (AAS PERKIN ELMER AAnalyst 100, detection limit = $5\mu\text{g}_{\text{As}}.\text{L}^{-1}$ and detection limit = $20\mu\text{g}_{\text{Cd}}.\text{L}^{-1}$).....	111
--	-----

Table 2. LC50 values with 95 % confidence intervals for <i>Gammarus pulex</i> between 24-h and 240-h arsenate or cadmium exposure.....	113
---	-----

Tableau III.1. Cinétique des concentrations létales d'arsenate (A) et de cadmium (B) entraînant 10, 25, 50 et 75 % de mortalité chez <i>G. pulex</i> exposés à 10°C.....	130
---	-----

Article 2.

Table 1. Mean LC10, LC25, LC50 and LC75 values ($\mu\text{g L}^{-1} \pm 95\%$ confidence intervals) estimated for <i>Gammarus pulex</i> after 240 h of arsenate or cadmium exposure using REGTOX Excel macro (Vindimian et al., 1983) based on Hill model.....	137
--	-----

Table 2. Synthesis of the <i>Gammarus pulex</i> bioconcentration and mortality results in binary mixtures when compared to those observed for single exposure of cadmium or arsenate, respectively. All the results were observed after 240 h exposure. The interactive mode of action between the two metals and p-values for the [expected – observed] mortalities are also mentioned (t-test).	
--	--

'NE': No effect '-': significant decrease; '+': significant increase; 'T-': decrease tendency (but not significant); 'T+': increase tendency (but not significant); 'UD': unavailable data.....	145
---	-----

Article 3.

Table 1. Synthesis of the *Gammarus pulex* biomarker responses (excluding MDA and mortality) in binary mixtures compared to those for single exposure to Cd or AsV. All the results were observed after 240-hour exposure. 'NE': No significant effect '↗': significant increase; '↘': significant decrease.....182

Article 4.

Table 1. Mean LC10 and LC25 values ($\mu\text{g L}^{-1} \pm 95\%$ confidence intervals) estimated for *Gammarus pulex* after 96-hour of arsenate or cadmium exposure using REGTOX Excel macro (Vindimian et al., 1983) based on Hill model.....200

Table 2. Results of the two-way ANOVAs (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) testing the homogeneity of the physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* after 96h exposure at 5, 10 and 15°C (temperature effect) to different concentrations of arsenate; cadmium and binary mixtures of these two metals (condition effect).....203

Table 3. Synthesis of the physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* in binary mixtures in comparison to single corresponding concentrations of arsenate or cadmium (results for all the tested temperatures were combined). 'NE': No effect; '↘': significant decrease; '↗': significant increase; 'T↘': decrease tendency (but not significant); 'T↗': increase tendency (but not significant).....221

Partie II. La protéomique: Un outil de détection précoce d'une contamination métallique?.....233

Tableau III.2. Catégories de combinaisons de résultats obtenues lors de l'analyse des spots d'intérêt potentiel (Tests HSD de Tukey sur le facteur « Condition » des ANOVA II). Chaque colonne présente les résultats de la comparaison de deux conditions d'exposition. Une flèche désigne un sens de variation significatif des volumes normalisés de spots (exemple : As1/control : ↗ signifie que le spot dans As1 est surexprimé par rapport au témoin). NE : non significatif. Chaque type identifié a été codé de 1 à 24.....239

Tableau III. 3. Regroupement des spots en fonction de la (ou des) condition(s) métallique(s) où l'expression du spot est significativement différente du témoin. Les groupes ainsi obtenus sont désignés par les lettres A, B, C, D et E. La différenciation de ces groupes repose sur la (i) sur-, (ii) sous- ou (iii) non-expression différenciée du spot par rapport au témoin dans les expositions métalliques simples ou dans le mélange binaire. Les deux dernières colonnes

précisent (i) si le spot est exprimé de la même façon dans les expositions simples et en mélange par comparaison au témoin, (ii) si le spot est significativement différent entre As1 et Cd1.....240

Tableau III.4. Exemples d'identification de 23 spots de protéine obtenus à l'issue d'une sélection basée sur une réponse significative à l'un ou l'autre des effets isolés ou des interactions testées lors de l'application d'une analyse de variance à trois facteurs de classification (i.e. facteurs « température », « arséniate » et « cadmium ») aux volumes normalisés des spots de protéines obtenus en DiGE-2D. Les résultats obtenus font abstraction de la contamination due aux peptides de myosine, d'actine et/ou d'hémocyanine.....246

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

- **Publications internationales**

VELLINGER C., PARANT M., ROUSSELLE P., IMMEL F., WAGNER P., USSEGLIO-POLATERA P., 2012. Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*). *Environmental Pollution*, **160** (1): 66-73.

VELLINGER C., PARANT M., ROUSSELLE P., USSEGLIO-POLATERA P., 2012. Antagonistic toxicity of arsenate and cadmium in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*). *Ecotoxicology*, **21** (7): 1817-1827.

VELLINGER C., GISMONDI E., FELTEN V., ROUSSELLE P., MEHENNAOUI K., PARANT M., USSEGLIO-POLATERA P. Single and combined effects of cadmium and arsenate in *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda): Understanding the links between physiological and behavioural responses. *Accepté dans Aquatic Toxicology sous réserve de corrections.*

VELLINGER C., FELTEN V., SORNOM P., ROUSSELLE P., BEISEL J.-N., USSEGLIO-POLATERA P., 2012. Behavioural and physiological responses of *Gammarus pulex* exposed to cadmium and arsenate at three temperatures: Individual and combined effects. *PLoS ONE*, **7**(6): e39153.

- **Collaborations-publications internationales**

SORNOM P., GISMONDI E., VELLINGER C., DEVIN S., FÉRARD J.-F., BEISEL J.-N., 2012. Effects of sublethal cadmium exposure on antipredator behavioural and antitoxic responses in the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*. *PLoS ONE*, **7**(8): e42435 (résumé en Annexe I).

MARCHAL B., PAIN-DEVIN S., VELLINGER C., MEHENNAOUI K., FELTEN V., Multi-xenobiotic resistance activity, osmoregulation and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda) exposed to realistic cadmium concentrations. (En preparation)

- **Communications orales**

VELLINGER C., PARANT M., ROUSSELLE P., USSEGLIO-POLATERA P., 2012. Is multiple contamination systematically increasing environmental risk: a case study based on arsenate and cadmium interaction in a freshwater amphipod *Gammarus pulex*. 7th Annual International Symposium on Environment. Athens, Greece, 14-17/05/2012.

- **Communications affichées**

VELLINGER C., FELTEN V., SORNOM P., ROUSSELLE P., BEISEL J.-N., USSEGLIO-POLATERA P., 2012. Le problème de l'évaluation des risques toxiques associés à des facteurs de stress multiples : le cas d'un amphipode d'eau douce, *Gammarus pulex*, soumis à des expositions métalliques simples et combinées dans un contexte de changements climatiques.

Colloque national du réseau ANTIOPEs. Ecotoxicologie et Toxicologie environnementale : nouveaux concepts, nouveaux outils. Avignon, 18-19/03/2012.

VELLINGER C., IMMEL F., PARANT M., USSEGLIO-POLATERA P., 2011. Utilisation de la protéomique comme outil de diagnostic d'une contamination métallique sur un amphipode d'eau douce *Gammarus pulex* (Linnaeus, 1758). *Séminaire de l'Ecole doctorale RP2E*. Nancy, 20/01/2011.

BEISEL J.-N., **VELLINGER C.**, GIAMBÉRINI L., 2009. Impact of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) on native unionid bivalves in European ecosystems. ICAIS. 16th International conference on aquatic invasive species. Montréal, Canada, 19-23/04/2009.

VELLINGER C., ROUSSELLE P., GIAMBÉRINI L., BEISEL J.-N., 2009. Les mollusques de la famille des Unionidae sont aujourd'hui affectés par la présence de la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*, Dp), espèce invasive qui se fixe sur leurs coquilles. 9èmes Journées Internationales de Limnologie. Luxembourg, 06-09/04/2009

Introduction

Les activités humaines, incluant l'industrialisation, l'urbanisation et les pratiques agricoles, sont responsables de l'introduction d'une centaine de milliers de xénobiotiques dans les écosystèmes (Depledge et Galloway, 2005). Ces substances se distribuent au sein des différents compartiments environnementaux en interaction : lithosphère, hydrosphère et atmosphère. Parmi les contaminants principaux figurent les hydrocarbures, les polychlorobiphényles, les pesticides, les métaux lourds ainsi que les rejets pharmaceutiques que l'on retrouve souvent en combinaisons au sein des écosystèmes terrestres et aquatiques.

Lorsqu'il y a exposition d'un organisme, seule une fraction des composés est disponible, c'est ce qu'on appelle la fraction biodisponible, qui va conditionner les effets biologiques. L'absorption se réalise de manière cutanée, respiratoire et/ou digestive (Bayne et al., 1985) mais elle peut être limitée grâce à des phénomènes physiques (*e.g.* dilution entre l'amont et l'aval de la source de contamination), des réactions chimiques (*e.g.* des transformations comme la chélation, l'hydrolyse, la complexation, la photodégradation, la biodégradation), ou des barrières biologiques (membranes, carapaces, tégument, coquilles...) (Amiard et Amiard-Triquet, 2008; Figure 1). Ainsi, une exposition des organismes aquatiques ne va pas systématiquement induire une accumulation des composés chimiques au sein de ces organismes.

La toxicité dépend des propriétés du composé chimique, de sa concentration interne mais aussi du temps d'exposition. Jusqu'à un certain seuil de concentration interne, des mécanismes de compensation (*e.g.* détoxification, biotransformation, excrétion) sont mis en place par les organismes pour assurer leur homéostasie (Depledge, 1994), permettant ainsi de tolérer la pollution. La biotransformation d'un xénobiotique peut générer des métabolites plus toxiques que les composés initiaux (bioactivation). Au-delà d'une certaine concentration interne de substances chimiques (*i.e.* dose biologique efficace), les mécanismes de compensation sont dépassés et les effets toxiques apparaissent, altérant les performances individuelles de l'espèce considérée comme la croissance, le développement ou le succès reproducteur. Par effet de cascade, les populations pourront alors être impactées ; puis la structure et la dynamique des communautés et enfin le fonctionnement et la structure de l'écosystème dans son ensemble (Figure 1). Bien que les écosystèmes aient une capacité de résilience souvent considérée comme importante, ces perturbations peuvent aboutir à un impact non négligeable sur les biens et les services écosystémiques (Daily, 1997). Il est important de garder à l'esprit que les composés liposolubles ne sont peu ou pas biodégradables, qu'ils s'accumulent plus facilement dans les graisses et qu'ils sont plus difficilement éliminables que les autres composés. Parfois, une bioamplification des toxiques

le long des chaînes trophiques peut apparaître, susceptible de poser de sérieux problèmes de santé publique, comme par exemple la catastrophe de Minamata (1953) au Japon due à une contamination des eaux par le mercure (Hosokawa, 1993).

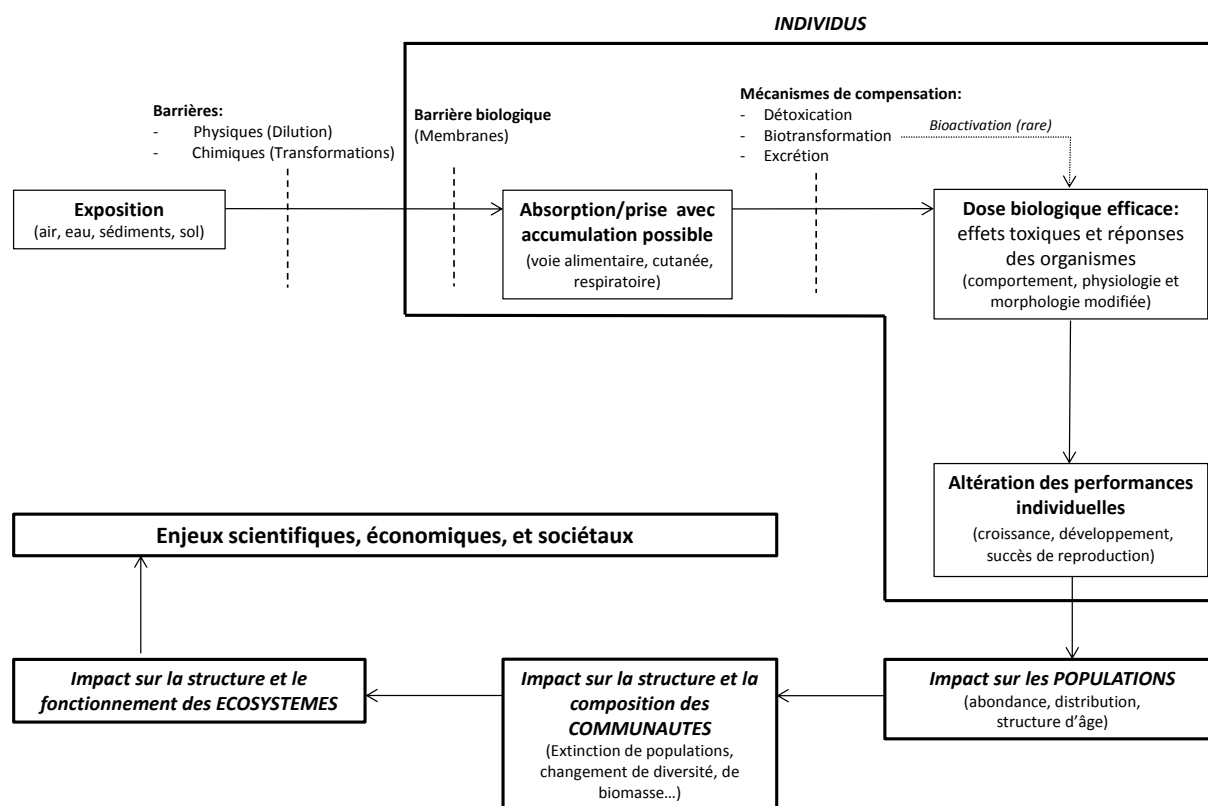


Figure 1. Schéma général des effets en cascade de l'exposition d'organismes à des xénobiotiques (Modifié d'après Lagadic et al., 1997 ; Van der Oost, 2003 ; Amiard et Amiard-Triquet, 2008).

La préservation et la restauration des écosystèmes aquatiques sont devenues des défis majeurs compte tenus des enjeux à la fois scientifiques, économiques et sociétaux relatifs à ces écosystèmes. Dans ce contexte, une Directive Cadre Européenne sur l'eau (DCE, 2000/60/CE) a été publiée en 2000. Son objectif majeur est l'atteinte, d'ici à 2015, du « bon état » chimique et écologique pour toutes les masses d'eau naturelles des pays européens, sur la base de méthodes de bioévaluation correspondant à un cahier des charges précis.

L'évaluation globale de la qualité des eaux de surface a longtemps reposé essentiellement sur des analyses physico-chimiques de l'eau et des sédiments. Des indicateurs biologiques observés à l'échelle des communautés (Rosenberg et Resh, 1993) ont ensuite été associés à cette évaluation, compte tenu du fait que des modifications de conditions environnementales sont connues pour engendrer des changements dans les communautés faunistiques et/ou floristiques (Macan, 1974). Plusieurs indices biologiques

ont fait l'objet d'une normalisation à l'échelle nationale, comme l'Indice Biologique Global Normalisé (IBGN ; norme NF T 90-150 ; 2004), l'Indice Poisson Rivière (IPR; norme NF T 90-344; 2004), l'indice Biologique Macrophytique en Rivière (IBMR; norme NF T 90-395; 2003), l'Indice Biologique Diatomées (IBD; norme NF T 90-354; 2000) ainsi que l'Indice Oligochètes de Bioindication des Sédiments (IOBS; norme NF T 90-390; 2002). Ces différents indices sont basés sur la structure taxonomique des peuplements (*e.g* indices de diversité ou de richesse), des groupes taxonomiques indicateurs (indices biotiques), ou sur la fréquence d'apparition de caractéristiques biologiques ou écologiques sélectionnées par les espèces au sein de la communauté, qui permettent, en combinaisons, de fournir une note représentative de l'état écologique global du milieu. Cependant, ces indices présentent des inconvénients majeurs, liés à leur incapacité à (i) discriminer la nature exacte de la perturbation (physique, biologique ou chimique ?), (ii) discriminer la nature exacte du stress toxique, et (iii) renseigner sur les mécanismes d'action des polluants et les stratégies de réponses des organismes exposés (Archaimbault, 2003; Ducrot, 2005). De plus, ces indices biotiques répondent rarement de manière précoce (Attrill et Depledge, 1997), et rendent donc plutôt compte des contaminations passées. En conséquence, le développement de nouveaux outils de bioindication palliant ces inconvénients est nécessaire pour satisfaire aux exigences de la DCE (2000/60/CE).

L'écotoxicologie est une discipline permettant de mieux comprendre les effets d'agents à caractère polluant sur l'ensemble des organismes vivants afin de mieux prédire leurs effets et mieux assurer leur surveillance. Cette discipline est applicable à tous les niveaux d'organisation biologique (Figure 2). Deux approches complémentaires peuvent être considérées : (i) une approche *bottom-up*, qui consiste à étudier les effets néfastes observables au niveau individuel à l'aide de biomarqueurs, afin de prédire l'impact des toxiques aux niveaux biologiques supérieurs comme la population, la communauté ou l'écosystème et (ii) une approche *top-down* qui consiste à d'abord étudier les différences observées au niveau communautaire et populationnel, pour ensuite tenter de les expliquer par des processus mis en jeu au niveau individuel.

Parmi les outils disponibles pour étudier les modifications engendrées par les perturbations à l'échelle populationnelle ou communautaire, les traits d'histoire de vie des macroinvertébrés benthiques ont fait preuve de leur efficacité. Ces traits d'histoire de vie ont été définis comme un jeu de caractéristiques biologiques ou écologiques coadaptées par la sélection naturelle, pour résoudre un problème écologique particulier (Stearns, 1992). Ils

représentent l'ensemble des informations qualitatives et quantitatives associées à la biologie et à l'écologie des macroinvertébrés benthiques. L'observation des traits biologiques permet de prendre en compte des informations sur le cycle de vie, les potentialités de résistance et/ou de résilience, mais aussi des caractéristiques morphologiques, physiologiques ou comportementales des taxons dans le diagnostic écologique. La prise en compte des traits écologiques ajoute au diagnostic écologique des informations sur (i) l'affinité des taxons pour différentes caractéristiques de l'habitat (*e.g.* distribution spatiale à différentes échelles d'observation), (ii) leurs préférences en matière de mésohabitat (nature du substrat, vitesse du courant, température, pH, salinité, statut trophique) ou (iii) leur sensibilité à la pollution organique (*e.g.* leur valeur saprobiale). Il s'avère que les contaminations toxiques sont les plus difficiles à mettre en évidence par cette combinaison de métriques (*e.g.* Archambault, 2003).

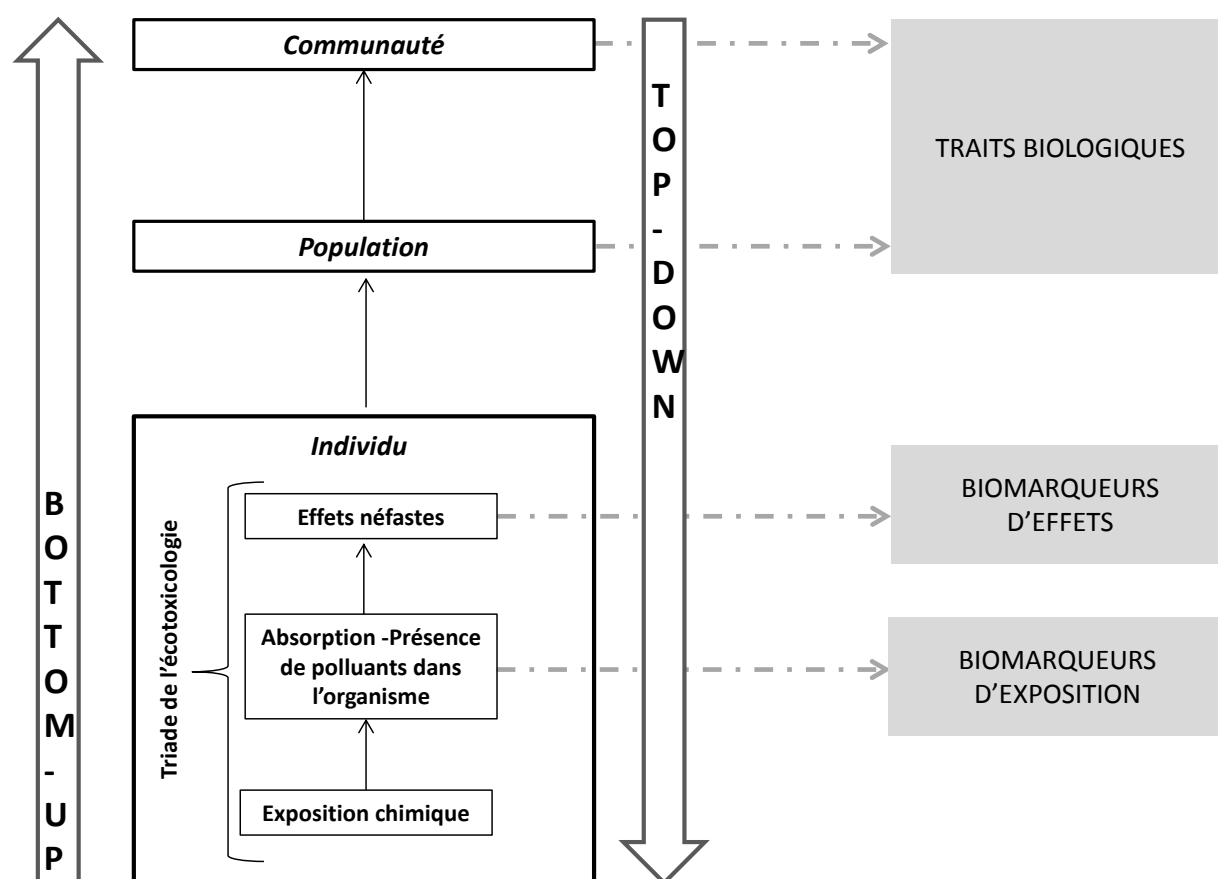


Figure 2. Changements d'échelle et outils d'étude des xénobiotiques au sein des écosystèmes.

Au niveau individuel, une part prépondérante de l'écotoxicologie a été consacrée à l'utilisation de biomarqueurs (Ramade, 2002). Depuis son apparition dans les années 1980, le concept de biomarqueur n'a pas cessé d'évoluer. Les premières définitions de ce terme étant assez controversées dans la littérature, nous avons adopté la définition de Lagadic et al. (1997) qui décrivent un biomarqueur comme étant « *tout changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant* ». Les biomarqueurs ont été classés en deux groupes (Schlenk, 1999) ou trois groupes (Livingstone, 1993 ; Lagadic et al., 1997 ; Manahan, 2003) en fonction de l'information apportée: (i) les biomarqueurs d'exposition, qui sont le résultat de l'interaction du polluant avec les molécules biologiques au sein de l'organisme exposé, traduisant une entrée actuelle ou passée du polluant à l'intérieur de cet organisme, (ii) les biomarqueurs d'effets, mettant en évidence un ou plusieurs effets toxiques subis par un organisme suite à une exposition à au moins une substance à caractère polluant et (iii) les biomarqueurs de sensibilité, mettant en évidence une variation de la résistance des organismes d'origine génétique (modifications géniques acquises d'une génération à l'autre). La distinction entre les deux premiers groupes pouvant porter à confusion, une autre classification a été proposée par De Lafontaine et al. (2000) qui distinguent les biomarqueurs de défense et les biomarqueurs de dommages, les deux groupes étant capables de montrer une exposition de l'individu à un toxique.

Les biomarqueurs fournissent des réponses intégrées en ne prenant en compte que la fraction biodisponible du toxique. De plus, ils apportent des informations précoces sur les stratégies de réponse des organismes face à la pollution. Sous conditions contrôlées en laboratoire, leur utilisation permet d'évaluer les effets directs de l'exposition d'un organisme à un ou plusieurs toxique(s), d'en extraire les effets mécanistiques spécifiques du ou des polluant(s) et de prédire les risques environnementaux. De telles études en laboratoire permettent par conséquent de répondre au cadre réglementaire pour la gestion des substances chimiques (ex : REACH).

Toutefois, pour les études *in situ*, de nombreux auteurs ont souligné la complexité d'utiliser les biomarqueurs dans les études d'évaluation de la qualité des eaux (biomonitoring). En effet, les réponses des biomarqueurs peuvent être également induites par des facteurs autres que les toxiques, ce qui peut conduire à une interprétation erronée des réponses observées. Ces facteurs, qualifiés de facteurs « confondants », comprennent (i) les facteurs biotiques tels

que le statut physiologique, l'alimentation, les interactions biotiques (parasitisme, compétition, ...), et (ii) les facteurs abiotiques tels que la température, la salinité ou le pH (Olsen et al., 2001; Correia et al., 2003; Van der Oost et al., 2003; Geffard et al., 2005, 2007; Sroda et Cossu-Leguille, 2011; Gismondi et al., 2012). De plus, les écosystèmes étant souvent multi-contaminés, les mélanges de contaminants peuvent induire des réponses difficiles à interpréter. En conséquence, il n'existe pas de biomarqueur idéal et l'utilisation d'une batterie de biomarqueurs permettant d'intégrer la diversité des réponses (Integrated Biomarker Response) est fortement recommandée lors d'études de biomonitoring (Beliaeff et Burgeot, 2009).

C'est dans ce contexte qu'une attention croissante est actuellement portée aux méthodes -omiques (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique) qui sont des approches moléculaires puissantes (Merrick et Tomer, 2003; Boverhoff et Zacharewski, 2006; Dowling et Sheehan, 2006; Nesatyy et Suter, 2007; Benninghoff, 2007). La protéomique est définie comme *« l'ensemble des méthodes permettant la séparation, l'identification et la caractérisation de l'ensemble des protéines relatives à un génome dans des conditions particulières et à un moment précis »*. Cette définition intègre la capacité du protéome à être une entité dynamique, s'exprimant différemment selon les conditions du milieu. Ainsi la protéomique pourrait répondre au besoin de mettre en évidence un ensemble de biomarqueurs au niveau moléculaire pour révéler de manière précoce une exposition des organismes à des doses sublétales de toxique. En procédant à l'identification des protéines modifiées, appelées *« protéines d'intérêt »*, cet outil permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'action des polluants au niveau moléculaire mais aussi les réponses physiologiques des organismes au stress toxique.

Envisageant la protéomique comme support à un outil de bioindication, nous avons examiné les possibilités d'obtenir des combinaisons de protéines modifiées qui soient des signatures singulières d'une exposition métallique et ce, indépendamment d'un facteur confondant abiotique: la température. De plus, nous nous sommes interrogés sur l'existence d'une signature d'expression des protéines propre à chaque métal. Pour éliminer au maximum les effets potentiels de facteurs confondants et tester ces hypothèses de travail, nous avons choisi de travailler en laboratoire sous des conditions contrôlées, plus reproductibles. Cependant, pour simuler une situation environnementale vraisemblable, nous avons exposé des organismes aquatiques ectothermes fréquents dans les cours d'eaux

(le crustacé *Gammarus pulex*) à deux éléments métalliques (cadmium et arséniate) seuls mais aussi en mélange, et avec ou sans influence d'un changement de température.

Avant d'entamer la recherche de nouveaux biomarqueurs susceptibles d'être utilisés dans les programmes de biomonitoring, il paraissait nécessaire de caractériser au préalable les effets de la température et la sensibilité des organismes à chacun des deux éléments métalliques considérés. De plus, pour plus de réalisme écologique, il paraissait nécessaire d'étudier toutes les interactions possibles entre les différentes variables étudiées (température, concentration en arséniate, concentration en cadmium).

Dans ce contexte, les objectifs de cette étude doctorale étaient triples :

- Evaluer les effets de deux éléments métalliques (cadmium et arséniate) seuls ou en mélange binaire sur des organismes exposés en conditions contrôlées,
- Appréhender les effets de la température en tant que facteur confondant potentiel des réponses mesurées,
- Rechercher une éventuelle réponse singulière du protéome chez les individus exposés aux éléments métalliques seuls ou en mélange, et ce, aux différentes températures testées, pour établir les bases d'un outil de bioindication précoce d'une contamination métallique à l'aide de cet outil moléculaire.

Le but ultime de cette recherche était donc d'explorer la possibilité d'utiliser l'outil protéomique pour révéler spécifiquement une contamination métallique, que ce métal soit isolé ou en mélange.

Pour atteindre les objectifs fixés, nous avons d'abord caractérisé les concentrations létales ainsi que la concentration métallique interne des organismes aquatiques ectothermes (*Gammarus pulex*) exposés à l'un ou l'autre des deux métaux étudiés, pendant 240 h à 10 °C (article 1). Puis, nous avons exploré, dans les mêmes conditions de durée et de température d'exposition, les effets de l'interaction entre ces deux métaux (antagonisme, additivité ou synergisme) sur la mortalité et la bioconcentration dans l'espèce modèle (article 2). Suite à ces premières investigations, nous avons procédé à l'étude d'une batterie de biomarqueurs pour appréhender un ensemble de réponses comportementales, physiologiques et cellulaires des organismes soumis au stress métallique simple ou en mélange binaire (article 3). Ces mesures réunissaient des biomarqueurs physiologiques (mortalité, pression osmotique), des biomarqueurs comportementaux (fréquence de battement de pléopodes, activité locomotrice), des biomarqueurs des défenses anti-toxiques (métallothionéines), des

biomarqueurs anti-oxydants (glutathion réduit et activité γ -glutamyl-cystéine ligase), des biomarqueurs de dommages cellulaires (malondialdéhyde) et des mesures des réserves énergétiques (lipides, glycogène, protéines). Un effort particulier a été dévolu à l'étude des effets de la température sur un ensemble de paramètres mesurés chez *G. pulex* soumis à une exposition métallique simple ou binaire (article 4). Enfin, pour déterminer (i) si une signature singulière du protéome révèle un stress métallique, (ii) si celui-ci est spécifique de la nature du métal, et (iii) si la réponse des organismes est dépendante ou indépendante de la température d'exposition, nous avons réalisé des cartographies d'expression des protéines à l'aide d'une approche de protéomique comparative (chapitre 4).

Ces différentes expériences et résultats originaux sont présentés à la suite d'une synthèse bibliographique (chapitre I) sur le modèle biologique utilisé, les deux éléments métalliques testés, les biomarqueurs mesurés ainsi que les fondements de l'approche protéomique pour une utilisation en écotoxicologie. Le chapitre 2 rapporte de manière détaillée le matériel et les méthodes d'investigation utilisées. Le chapitre 3 est divisé en 2 parties. La première est consacrée à l'étude écotoxicologique des effets des deux éléments métalliques par des outils et des biomarqueurs classiques (articles 1 à 4). La deuxième partie est dévolue à l'approche protéomique et à son utilisation potentielle en tant qu'outil de bioindication. La discussion générale et transversale de ce travail constitue le 4^{ème} chapitre et la conclusion générale le 5^{ème} et dernier chapitre de ce mémoire.

Chapitre I.

Synthèse Bibliographique

1. Modèle biologique : *Gammarus pulex* (Linnaeus, 1758)

1.1. Systématique et Ecologie du genre *Gammarus*

Les crustacés Gammaridea sont les amphipodes les plus représentés avec plus de 4500 espèces répertoriées (Bousfield, 1973). Contrairement aux autres sous-ordres d'amphipodes (i.e. Hyperiidea, Ingolfiellidea, et Caprellidea), les Gammaridea sont distribués au sein d'habitats variés comme le milieu marin mais aussi les eaux douces et le milieu terrestre (Bousfield, 1973; Lincoln, 1979). La majorité des amphipodes natifs des régions paléarctiques sont de la superfamille des Gammaroidea dans laquelle la famille des Gammaridae est la plus diversifiée avec 292 espèces décrites (Väinölä et al., 2008). Le genre *Gammarus* est le plus fréquent dans les eaux douces (Karaman et Pinkster, 1979; Barnard et Barnard, 1983), avec plus d'une centaine d'espèces décrites (Shaw 1979; MacNeil et al. 1997). La systématique du genre *Gammarus* est illustrée dans le tableau I.1.

Tableau I.1. Systématique du genre *Gammarus*

Embranchement	<i>Arthropode</i>
Super-Classe	<i>Crustacés</i>
Classe	<i>Malacostracés</i>
Sous-classe	<i>Eumalacostracés</i>
Super-Ordre	<i>Péracaride</i>
Ordre	<i>Amphipode</i>
Sous-ordre	<i>Gammaridea</i>
Super-famille	<i>Gammaroidea</i>
Famille	<i>Gammaridae</i>
Genre	<i>Gammarus</i>

Les facteurs abiotiques comme la température, la salinité, le taux d'oxygénation de l'eau, ainsi que la pollution affectent la distribution des espèces du genre *Gammarus* (Whitehurst et Lindsey, 1990). Ces derniers affectionnent tout particulièrement les substrats minéraux grossiers comme les blocs, les galets, les graviers mais sont également retrouvés en abondance au sein d'habitats organiques (Fitter et Manuel, 1994). Ces substrats leur assurent un refuge, les protégeant contre les prédateurs comme certains autres macroinvertébrés (e.g. Plecoptera, Odonata), les poissons, les amphibiens et les oiseaux (MacNeil et al., 1997). Les amphipodes sont considérés comme des organismes opportunistes puisque d'après des analyses isotopiques (de carbone et d'azote) et des dosages d'acide gras, ils seraient capables

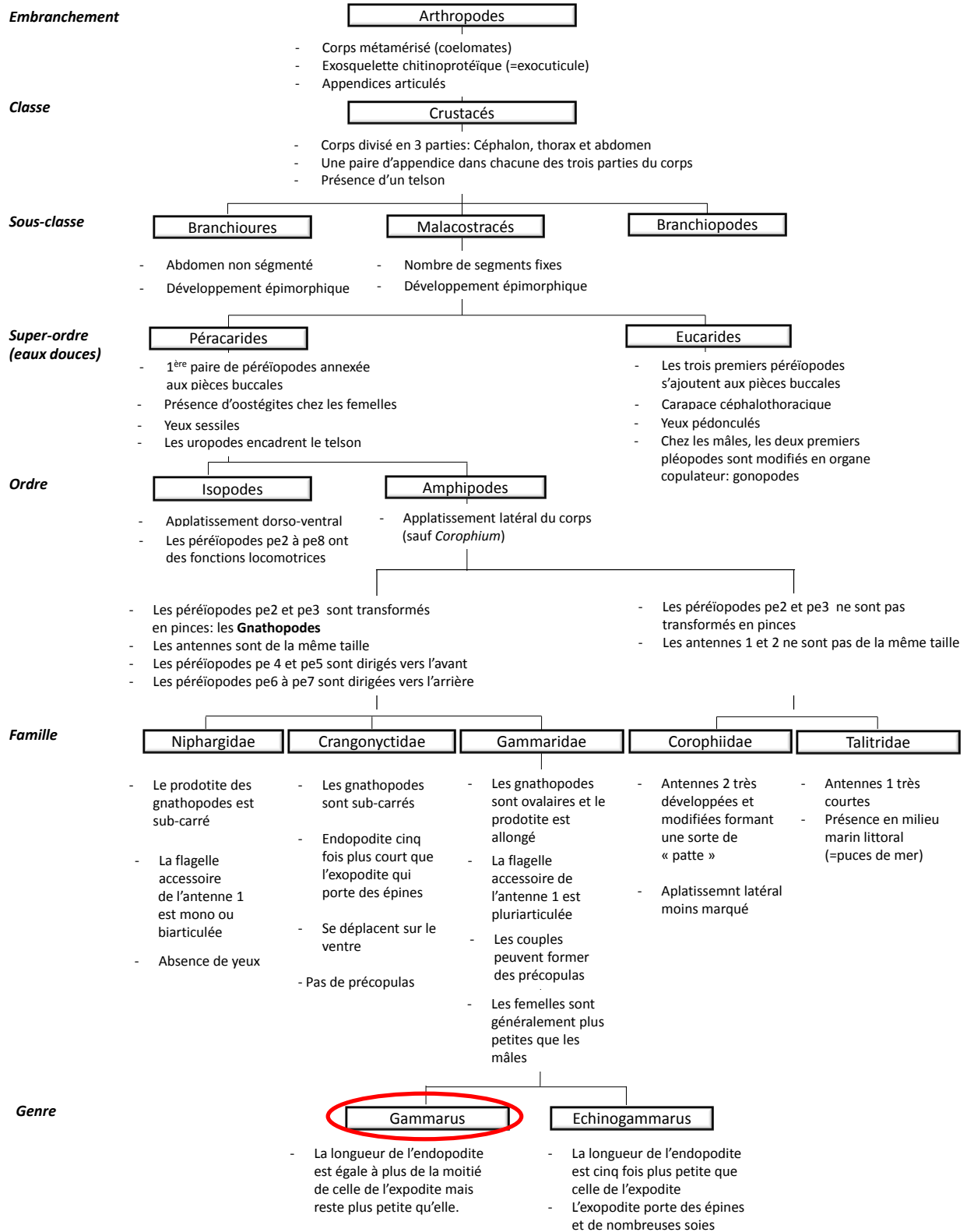


Figure I.1. Principales caractéristiques du genre *Gammarus* en fonction de sa systématique (Adapté de Tachet et al., 2000).

d'utiliser quasiment toutes les ressources de nourriture organique au sein du cours d'eau (Maazouzi et al., 2009; Médoc et al., 2011; Piscart et al., 2011).

Leur plasticité dans les sources de nourriture consommées assure le succès colonisateur des amphipodes, et pour certaines espèces, leur succès invasif. Cependant, les individus du genre *Gammarus* sont surtout considérés comme étant des phytophages détritivores (Dangles et Guérold, 2001; Kelly et al., 2002) mais aussi des omnivores (MacNeil et al., 1997; Fielding et al., 2003). Des comportements cannibales ont également pu être observés sur leur lieu de vie (MacNeil et al., 1997).

1.2. Caractéristiques phénotypiques du genre *Gammarus*

Le genre *Gammarus* se caractérise principalement par (i) une symétrie bilatérale, (ii) des appendices articulés, (iii) un aplatissement latéral du corps, (iv) la présence d'un exosquelette calcifié constitué de chitine (= cuticule) recouvrant le corps, (v) la présence de gnathopodes ovalaires, (vi) des yeux composés, (vii) deux paires d'antennes de taille homologue, (viii) un nombre de segments corporels fixe, (ix) la présence d'oostégites chez les femelles et (x) un endopodite de longueur supérieure à la moitié de celle de l'exopodite (sauf *G. fossarum*; Figure I.1). Le corps se compose de 4 parties fonctionnelles principales: le prosoma, le mésosoma, le métasoma et l'urosoma (Chevreux et Fage, 1970; Figure I.2). Les femelles sont en général plus petites que les mâles au même stade de développement (Tachet et al., 2000) et la taille maximale des individus ne dépasse généralement pas les 20mm.

1.2.1. Prosoma

Le prosoma représente la région céphalique. Il est constitué d'un métamère (céphalon), d'yeux (ocelles), de deux paires d'appendices sensoriels (antennes) et de quatre paires d'appendices masticateurs (pièces buccales) permettant la prise de nourriture. Les ocelles sont réniformes et sessiles et les deux paires d'antenne sont de taille similaire. Le flagelle accessoire de l'antenne 1 est pluri-articulé chez les individus de la famille des Gammaridae, ce qui permet de les différencier des individus de la famille Niphargidae (Tachet et al., 2000).

1.2.2. Mesosoma

Le mesosoma représente la région thoracique. Il est composé de sept métamères articulés (périomères), sur lesquels sont soudées les plaques coxales portant chacune une paire

d'appendices uniramés et articulés appelés péréiopodes. Les branchies et l'appareil génital des individus sont fixés sous ces plaques coxales. Un dimorphisme sexuel est présent chez les amphipodes, les oostégites représentant l'appareil génital femelle et les papilles pénienues correspondant à l'appareil génital mâle. Les oostégites se situent entre les péréiopodes 2 et 5 alors que papilles pénienues se situent au niveau du péréiopode 7 (Figure I.3).

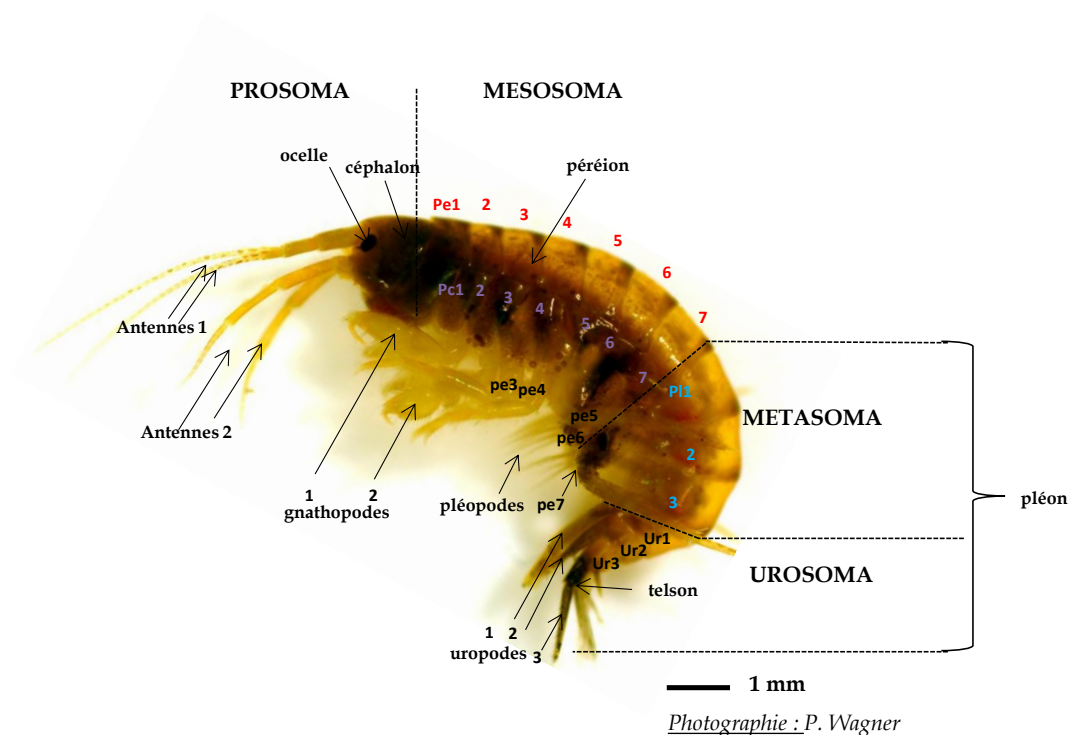


Figure I.2. Morphologie d'un individu *Gammarus pulex* mâle (Vue latérale, adaptée de Roux, 1970 ; Chevreux & Fage, 1970 et Gledhill et al., 1993). **Pe 1-7: Péréiomères 1 à 7 ; pe: péréiopodes ; Pc 1-7: Plaques coxales 1 à 7 ; Pl 1-3: Pléomères 1 à 3 ; Ur1-3: Uromères 1 à 3.**

Tous les péréiopodes ont un rôle locomoteur mais les quatre premières paires, et particulièrement les deux premières, ont un rôle préhenseur additionnel. De l'avant vers l'arrière du corps, les deux premiers péréiopodes sont transformés en pinces de forme ovale chez les amphipodes Gammaridae, Niphargidae et Crangonyctidae : ce sont les gnathopodes. Les gnathopodes permettent l'adhésion des mâles aux femelles lors de la phase de gardiennage précopulatoire (ou amplexus; c.f. §1.3.2 et Figure I.4). Ainsi, il n'est pas surprenant que les mâles présentent des gnathopodes plus développés que les femelles, autre critère de dimorphisme sexuel qui est largement pris en considération pour le sexage

des individus (Costa et Costa, 1999 pour *Gammarus locusta*; Bollache et al., 2001 pour *G. pulex*; Devin et al., 2003 pour *Dikerogammarus villosus*).

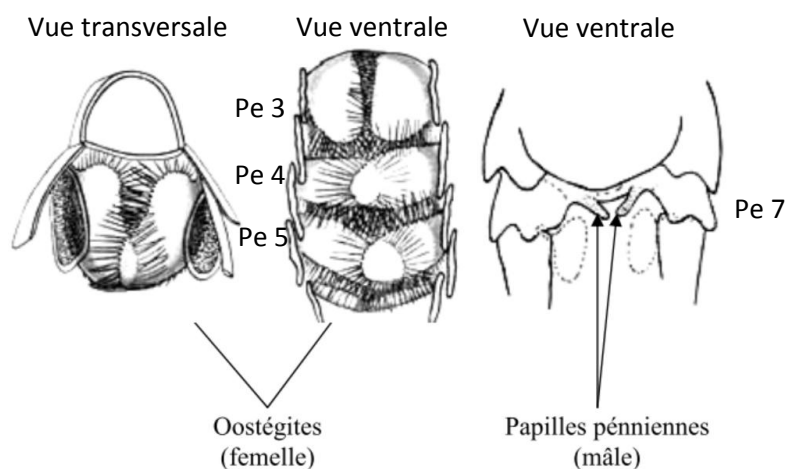


Figure I.3. Appareil génital des amphipodes femelles (oostégites) et mâles (Papille pénienne, Adapté de Piscart et Bollache, 2012).

1.2.3. Métasoma

Le métasoma représente la région abdominale du corps. Il porte trois paires de pléopodes. Les pléopodes sont des appendices multiarticulés qui servent non seulement à la nage de l'individu mais aussi à la régénération du flux d'eau sur la surface branchiale (Grassé et al., 1961 ; Hervant, 1996), ce qui explique qu'ils soient continuellement en mouvement. Selon Quetin et al. (1978) et Lawrence et Poulter (1998) une relation étroite peut être établie entre l'activité ventilatoire et l'absorption d'oxygène (O_2). Ainsi, des mesures des fréquences de battements des pléopodes ont déjà été utilisées dans les études écotoxicologiques comme un indicateur du taux d'oxygénation, une hyperventilation (i.e. une augmentation de la fréquence des battements) étant reliée à une hausse de l'absorption d' O_2 et une hypoventilation à une baisse de l'absorption d' O_2 (Felten et al., 2008; Sornom et al., 2010).

1.2.4. Urosoma

L'urosoma est constitué de trois segments, appelés uromères, portant chacun une paire d'uropodes biramés, permettant au gammare de se déplacer de manière saccadée. Chaque uropode est constitué d'un pédoncule et de deux branches : la branche interne (endopodite) et la branche externe (exopodite). La forme et la taille de l'uropode 3 sont généralement

différentes de celles des deux premiers, caractère qui est utilisé pour discriminer le genre *Gammarus* du genre *Echinogammarus* mais aussi pour identifier certaines espèces.

Chez les individus du genre *Gammarus*, la longueur de l'endopodite des uropodes 3 est toujours de taille supérieure à la moitié de l'exopodite mais reste de taille inférieure à celui-ci. De plus, l'exopodite ne comporte ni soies, ni épines alors que chez les individus du genre *Echinogammarus*, l'endopodite représente seulement 1/5^{ème} de l'exopodite, ce dernier comportant des soies et des épines (Figure I.1). Le dernier segment de l'urosoma se termine par un telson.

1.3. Caractéristiques biologiques et physiologiques du genre *Gammarus*

1.3.1. Développement

La croissance des gammares s'effectue par mues successives, la présence d'une cuticule ne leur permettant pas d'avoir une croissance continue (Sutcliffe, 1992). Un cycle de mue se déroule sur plusieurs semaines, suivant la température de l'eau (ex : environ 4 semaines à 12°C). Ce cycle comporte 6 phases différentes :

- 2 phases de pré-mue successives (1-3 jours chacune), qui conduisent à un épaissement de la cuticule en place.
- 2 phases d'inter-mue successives (9 jours chacune), qui conduisent au rejet de la cuticule, qui finit par se décrocher totalement.
- 2 phases de post-mue successives (3 et 5 jours respectivement), qui conduisent à l'apparition de la nouvelle cuticule.

Comme la cuticule est très imperméable à l'eau et aux toxiques (Rainbow, 1995; 1997), les stades « inter-mues » peuvent représenter un moment critique pour les gammares. Par exemple, Lockwood et Inman (1973) ont montré que le décollement de la cuticule était associé à un doublement de la perméabilité du gammare à l'eau. Ainsi, il n'est pas spéculatif de penser que lors de ce stade, les individus devront mettre plus d'énergie dans le fonctionnement des systèmes d'osmorégulation et si besoin, dans les systèmes de défense antitoxiques.

1.3.2. Reproduction

La reproduction des gammares est sexuée et ovovivipare. Le sex-ratio opérationnel, c'est-à-dire la proportion de mâles et de femelles disponibles pour la reproduction, est déséquilibré (Kunz et al., 2010). En effet, les mâles sont capables de se reproduire à n'importe quel

moment de l'année, à l'exception d'une petite période lors de leur mue, alors que les femelles ne peuvent le faire que pendant une courte période intervenant dans le cycle de mue (Danchin et al., 2005). Ainsi, bien que le sexe-ratio soit généralement assez équilibré, les mâles entrent en compétition pour accéder à la reproduction à cause d'un nombre plus faible de femelles en période de mue (Bollache et al., 2001). La stratégie comportementale de cette compétition repose sur une phase de gardiennage précopulatoire, pendant laquelle le mâle s'accroche à la femelle grâce à ses gnathopodes hypertrophiés. Le mâle se retrouve donc au-dessus de la femelle qui continue à nager. Le couple formé constitue un « amplexus », plus familièrement appelé « précopulat » (Figure I.4).

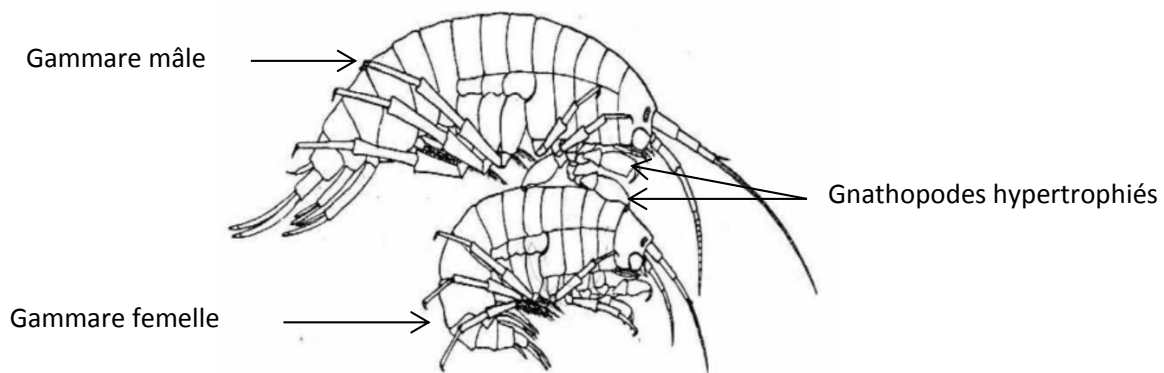


Figure I.4. *Gammarus* mâle et femelle en amplexus (D'après Piscart et Bollache, 2012)

Le mâle est plus grand que la femelle au sein de l'amplexus (Adam et Greenwood, 1983). Des relations linéaires entre la taille des mâles et des femelles ont été mises en évidence, les grands mâles s'accrochant aux grandes femelles: on parle d'homogamie pour la taille. L'ovulation des femelles intervient précipitamment après le début de leur mue et la phase de gardiennage commence quelques jours avant cette période. Il a cependant été démontré que l'ovulation n'apparaissait chez la femelle que lorsqu'elle avait été fécondée (Borowsky, 1991). Lors de la fécondation, le mâle doit retourner la femelle sans la lâcher, de façon à ce que ces papilles génitales (situées au niveau de la partie ventrale du péréionère 7) se retrouvent en face des oviductes de la femelle (situés sous les plaques coxales au niveau du péréionère 5). Le sperme est alors déposé sur la surface ventrale de la femelle. La femelle se détache alors du mâle, marquant la fin de la phase de gardiennage. Avant que la cuticule ne durcisse, les œufs sont pondus dans le marsupium formé par les oostégites, dans lequel ils seront

fécondés, pourront se développer et éclore. Les juvéniles sont enfin relâchés dans le milieu extérieur lors de la mue suivante (Bollache, 2001).

La reproduction peut avoir lieu tout au long de l'année, mais intervient plus fréquemment pendant les saisons chaudes comme le printemps ou l'été (Pöckl, 1992). La femelle ne peut se reproduire que pendant la période de mue et effectue dans sa vie (1 an), entre six à neuf pontes (Kunz et al., 2010). La maturité sexuelle, mais aussi la durée d'incubation des œufs dans le marsupium, dépendent de la température de l'eau (Sexton, 1924; Pöckl, 1992). En effet, il a été démontré que des eaux chaudes permettaient (i) l'atteinte d'une maturité sexuelle plus précoce (une centaine de jours à 20°C contre 300 à 400 jours à 8°C, toutes espèces confondues) mais aussi (ii) une durée d'incubation des œufs réduite (2-3 semaines en été et jusqu'à 3 mois en hiver). Une relation linéaire entre la taille des femelles et le nombre d'œufs produits a été mise en évidence, les plus grandes femelles étant les plus fécondes (Bollache et al., 2001).

1.3.3. Les rôles biologiques et physiologiques de l'hémolymphe et des branchies

1.3.3.1. L'hémolymphe

1.3.3.1.1. Rôles de l'hémolymphe

L'hémolymphe est un fluide extracellulaire, homologue du « sang » chez les vertébrés. Les rôles principaux de l'hémolymphe, associés à la circulation hémolymphatique sont:

- le transport d'éléments nutritifs puisés dans le canal alimentaire ou les tissus de stockage vers les organes les métabolisant,
- le transport des produits d'excrétion (acide allantoïque, ammoniac, acide urique) vers les reins, et particulièrement les tubules de Malpighi des néphrons, et
- le transport des hormones à partir des glandes endocrines vers leur site d'action (Chapman, 1998). Cette fonction est essentielle puisque ces hormones sont nécessaires au bon déroulement de nombreuses fonctions physiologiques comme la mue, la croissance, la différenciation du sexe ou le développement des gonades.

L'hémolymphe intervient aussi comme « fluide de stockage » des réserves énergétiques telles que les lipides, les protéines et le glycogène.

Pour assurer la circulation de l'hémolymphe, le péricarde (cœur) puise l'hémolymphe dans le sac hémolymphatique qui l'entoure (appelé aussi « cavité péricardique »), et la propulse vers les différentes régions du corps (Chapman, 1998). Le système est dit « ouvert » puisque l'hémolymphe ne circule pas en permanence à travers les vaisseaux sanguins mais constitue le fluide dans lequel baignent les organes internes. Dans l'hémolymphe des gammarés, des

pigments respiratoires tels que l'hémocyanine permettent la fixation et facilitent le transport de l'oxygène et du gaz carbonique de l'hémolymph vers les organes respiratoires (Taylor et al., 1998 ; Taylor et Anstiss, 1999). Cependant, leur système trachéen est suffisamment efficace pour qu'ils puissent se passer de ces protéines.

1.3.3.1.2. Composition générale de l'hémolymph

Hormis les cellules sanguines, les produits d'excrétion et les éléments nutritifs, de nombreux ions inorganiques composent l'hémolymph. Parmi ces derniers, les cations majeurs sont le sodium, le calcium, le potassium et le magnésium alors que les anions majeurs sont les ions chlorures (Chapman, 1998). Ces ions inorganiques jouent un rôle important dans le contrôle du contenu cellulaire en eau et la répartition des ions (Chapman, 1998; Lignot et al., 2000). L'osmolarité de l'hémolymph est comprise entre 300 et 500 mOsmol selon le stade de développement des organismes.

1.3.3.1.3. Pression et régulation osmotique

L'hémolymph des gammarés, comme des autres organismes aquatiques, est hypertonique par rapport à leur milieu aqueux environnant. Ainsi, ils tendent à s'hydrater et à perdre leurs ions de manière passive. Pour leur survie, il est nécessaire que les gammarés régulent leur pression osmotique. Selon Péqueux (1995), les gammarés peuvent envisager deux solutions:

- Produire de l'urine diluée par filtration de l'hémolymph pour éliminer l'excès d'eau tout en réabsorbant les ions (Tyson, 1968). Cette production se fait par les reins, bien développés chez les gammarés.
- Absorber activement des ions à partir de l'eau grâce aux branchies (cellules à chlorures ; *c.f.* paragraphe 1.3.3.2.3).

Sutcliffe (1984) estime que environ 11% du budget énergétique de *G. pulex* est dépensé pour l'osmorégulation.

1.3.3.2. Les branchies

1.3.3.2.1. Caractéristiques et rôles des branchies

Les branchies sont des surfaces d'échanges qui sont des expansions latérales des péréiopodes. Les branchies interviennent dans plusieurs processus :

- la respiration, en puisant l'oxygène de l'eau
- la circulation, en réalisant des échanges gazeux avec l'hémolymph (McMahon et Wilkens, 1983)

- l'absorption active d'ions, qui conditionne de nombreuses fonctions physiologiques essentielles, comme l'osmorégulation, l'homéostasie du calcium, l'excrétion des composés azotés et la régulation du pH intracellulaire (Potts et Parry, 1964; Mantel et Farmer, 1983; Péqueux et al., 1989; Onken et Riestenpatt, 1998; Kirschner, 2004).

1.3.3.2.2. Place des branchies dans les processus d'absorption

L'absorption d'ions chez un organisme d'eau douce peut se faire selon trois voies. La première voie est liée à l'introduction directe d'ions *via* l'eau de boisson ou la nourriture. La deuxième voie est une simple diffusion à travers la cuticule et la troisième voie par diffusion à travers les surfaces d'échanges via différents processus.

Comme les gammares sont des arthropodes, ils ont un exosquelette épais composé de chitine calcifiée qui recouvre entièrement leur corps. La structure de cet exosquelette est considérée comme relativement imperméable à de nombreux éléments (Krogh, 1938; Rainbow, 1997), ce qui réduit les possibilités d'échanges cuticulaires. Cependant, cette imperméabilité de la cuticule est réduite au niveau des branchies. En effet, ces dernières présentent des cellules à chlorures (Schmitz, 1992; Péqueux, 1995; Tsubokura et al., 1998; Lignot et al., 2000) sur lesquelles la cuticule est souvent perforée (Chapman, 1998). Ainsi, les deux voies d'absorption les plus probables chez les gammares sont l'eau de boisson ou la nourriture et les échanges par diffusion au niveau branchial.

1.3.3.2.3. Les cellules à chlorures et les mécanismes d'échange ioniques

Les branchies contiennent des cellules à chlorure qui, comme toutes les cellules, sont composées de nombreux organites cytoplasmiques (lysosomes, réticulum endoplasmique lisse ou rugueux...). Cependant, la présence de nombreuses invaginations des membranes plasmiques mais aussi de nombreuses mitochondries, sont les caractéristiques principales de ces cellules, qui justifient le nom de « mitochondrial-rich cells » qui leur a été attribué. Leur rôle dans les mécanismes physiologiques comme l'osmorégulation, l'homéostasie du calcium, l'excrétion des composés azotés et la régulation du pH intracellulaire a largement été démontré (Potts et Parry, 1964; Mantel et Farmer, 1983; Péqueux, 1995; Onken et Riestenpatt, 1998). Krogh (1938) a été le premier scientifique à réaliser une analyse mécanistique du transport d'ions chez les crustacés. Depuis, de nombreuses études ont entrepris d'élucider au mieux ces mécanismes. Cependant, certains des mécanismes envisagés restent encore hypothétiques (Figure I.5).

- *Absorption du calcium (Ca^{2+})*

Les pertes de Ca^{2+} sont généralement faibles chez les crustacés et sont dues aux périodes d'« inter-mue », lors desquelles la cuticule calcifiée se décroche. Bien que le Ca^{2+} puisse être réabsorbé par la nouvelle cuticule, cette réabsorption ne suffit pas à combler les pertes d'ions. Des mécanismes d'absorption doivent être mis en place par les branchies ou l'hépatopancréas lors de ces périodes d'inter-mue. Dans les branchies, l'absorption de Ca^{2+} à travers la membrane apicale se fait par des pompes à Ca^{2+} ou par des échanges $\text{Ca}^{2+} / \text{H}^+$ (Wheatly et al., 2002 ; Figure I.5). Puis, les ions Ca^{2+} sont transportés activement à travers la membrane baso-latérale grâce à des pompes à Ca^{2+} -ATPase ou des échangeurs $\text{Ca}^{2+} / \text{Na}^+$ liés à des Na^+ / K^+ -ATPase.

- *Absorption du sodium Na^+ et des chlorures Cl^-*

L'absorption des ions Na^+ et Cl^- a un rôle non négligeable dans la régulation iono-osmotique de l'hémolymphe.

Le modèle de transport de Na^+ et Cl^- a été décrit par Onken et Riestenpatt (1998) pour les crustacés d'eau douce (Figure I.5B). Des canaux Na^+ / H^+ et des échangeurs $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ présents dans la membrane apicale sont respectivement les éléments clés de l'absorption de Na^+ et de Cl^- . L'échangeur $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ est entraîné par une pompe H^+ et est dépendant du fonctionnement de l'anhydrase carbonique cytoplasmique (Onken et al., 1991). La présence de HCO_3^- provient des régulations acide-base, du mécanisme d'excrétion mais aussi de la respiration cellulaire (Cooper, 1994). Le transport du sodium se réalise de manière active à travers la membrane baso-latérale grâce à des transporteurs membranaires tels la Na^+ / K^+ -ATPase (Zeiske et al., 1992) ou par des échanges $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (figure I.5.A). Il est à préciser que les modèles de sécrétion du sodium et des ions chlorures ne sont pas connus chez les crustacés d'eau douce (Freire et al., 2008).

- *Mécanisme d'absorption et de sécrétion acide.*

Les mécanismes d'absorption et de sécrétion acides chez les crustacés sont encore mal connus et restent spéculatifs (Figures I.5C et I.5D). Cependant, il semblerait que la régulation

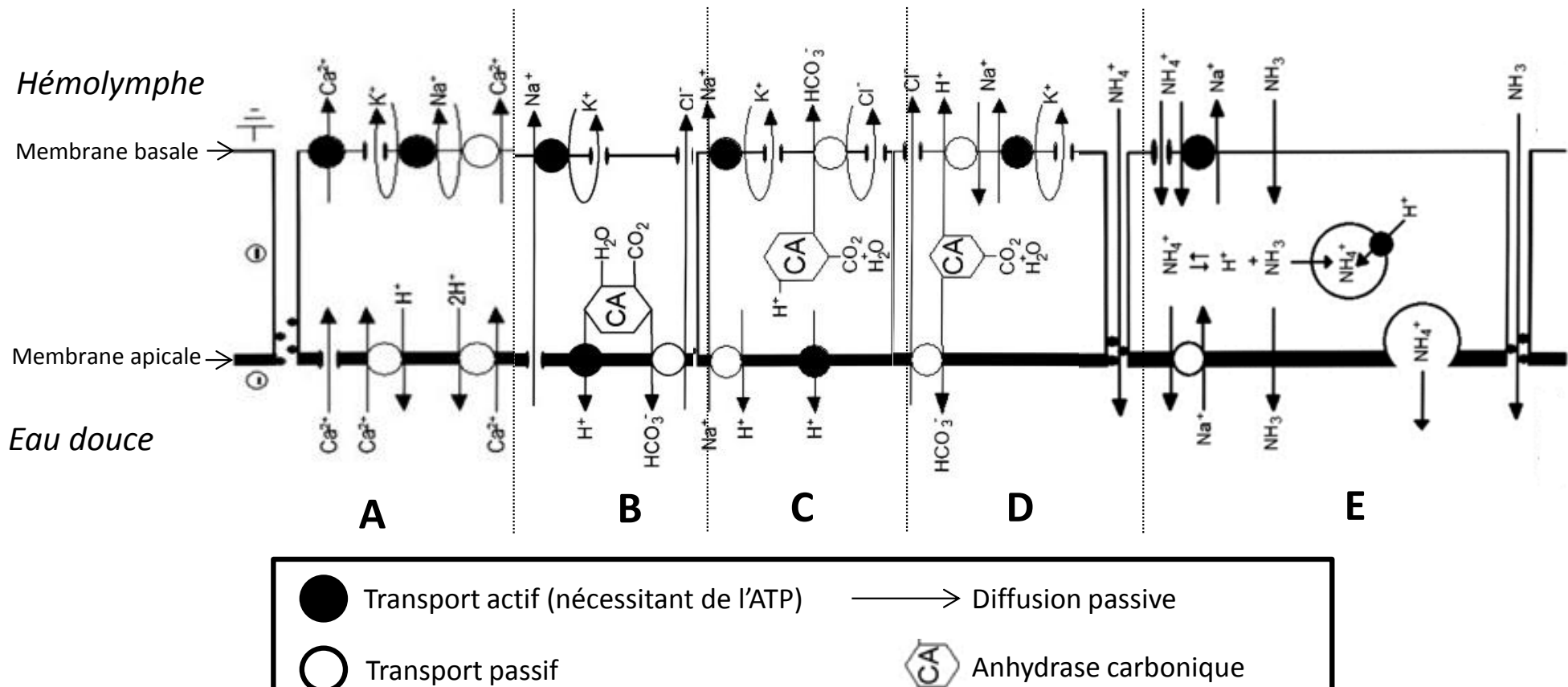


Figure 1.5. Mécanisme de transport ionique intervenant dans les mécanismes de régulation ionique, de régulation acide-base et d'excrétion ammoniacale à travers les cellules à chlorures localisées dans les branchies. A) Absorption de Ca^{2+} ; B) Absorption de Na^+ et Cl^- ; C+D) Modèle hypothétique de la sécrétion acide (C) ou de l'absorption acide (D) comme outil de l'homéostasie du pH cellulaire ; (E) Excrétion ammoniacale (adapté de Onken et Riestenpatt, 1998; Wheatly et al., 2002; Onken et al., 2003; Ahearn et al., 2004; Weihrach et al., 2004; Freire et al., 2008).

acide/base soit couplée à la régulation de Na^+ et Cl^- . Les perturbations acide/base sont le résultat d'une altération dans la concentration en ions extracellulaires (Wheatly, 1989), ou sont causés par un changement de salinité ou de température (Cameron, 1986). Il semblerait que le mécanisme de régulation acide/base fasse intervenir l'anhydrase carbonique (Lucu et Siebers, 1995), couplée avec des échanges Na^+/H^+ via les échangeurs H^+ -ATPase et les canaux Na^+ mais aussi les échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$.

- *Mécanisme d'excrétion de l'ammoniaque*

Les crustacés doivent excréter les composés azotés, qui sont les produits finaux résultant du catabolisme des protéines et des acides aminés. Weihrauch et al. (2004) ont réalisé une étude complète sur ce sujet. L'excrétion des composés se fait en général au niveau des glandes rénales qui sont bien développées chez les crustacés. Cependant, les branchies sont considérées comme étant les voies majeures d'excrétion pour les composés azotés (Greenaway and Nakamura, 1991; Wolcott, 1991). Dans les cellules branchiales, l'ammoniaque peut passer par diffusion passive à travers les membranes baso-latérales et apicales (Figure I.5E). Les ions ammonium peuvent également entrer dans les cellules contre le gradient chimique, en remplacement de K^+ sur la Na^+/K^+ -ATPase et à l'aide de canaux K^+ . Une fois à l'intérieur, l'ammonium est (i) soit retransformé en ammoniaque, qui peut traverser la membrane apicale par diffusion simple, (ii) soit piégé dans des vésicules qui le libéreront dans le milieu extérieur par exocytose de la membrane apicale, (iii) soit excrété en remplacement de H^+ dans les échangeurs Na^+/H^+ .

1.4. Identification de l'espèce *G. pulex* (Linnaeus, 1758)

Comme *Gammarus pulex* est l'espèce du genre *Gammarus* ayant localement la plus forte biomasse en eau douce (Shaw 1979; MacNeil et al. 1997) et étant largement répartie en Europe (Karaman et Pinkster, 1977), elle a été sélectionnée comme modèle biologique dans ce travail de thèse.

L'identification des espèces du genre *Gammarus* ne peut se faire que chez des individus matures et de préférence avec des mâles, qui présentent des caractères morphologiques spécifiques plus facilement reconnaissables que les femelles (Piscart et Bollache, 2012). Une exception à cela concerne *G. roeseli* et *Dikerogammarus spp*, qui sont aisément reconnaissables et différenciables des autres espèces grâce à leur carène dorsale composée de 3 spicules ou à leurs 2 expansions dorsales sur les derniers segments dorsaux, respectivement.

Une clé de détermination de *G. pulex* est présentée en Annexe II. Cette dernière montre que la morphologie des antennes, la présence ou l'absence de soies dans la partie antérieure du corps et la forme du céphalon permettent une bonne distinction entre *G. pulex* ou *G. fossarum* et les autres espèces de gammare. Cependant, la distinction entre *G. pulex* et *G. fossarum* est souvent délicate. En effet, ces deux espèces sont toutes les deux caractérisées par (i) une paire d'antennules de taille similaire à celle des antennes, (ii) une partie antérieure du corps dépourvue de soies, (iii) une forme du céphalon dite « émoussée », et (iv) des petits ocelles ovalaires. La distinction entre *G. pulex* et *G. fossarum* réside essentiellement dans la taille de l'endopodite du troisième uropode par comparaison à celle de l'exopodite associé. En effet, un endopodite de taille égale aux 2/3 de la taille de l'exopodite permet l'identification de l'espèce *G. pulex* alors qu'un endopodite plus petit, correspondant à 1/3 de l'exopodite permet l'identification de *G. fossarum*.

1.5. Choix du gammare comme organisme modèle

Les crustacés, et particulièrement les amphipodes, sont largement utilisés comme bioindicateurs et biomoniteurs dans les systèmes aquatiques (Rinderhagen et al., 2000; Kunz et al., 2010). En effet, les amphipodes sont (1) très abondants, (2) largement distribués (environnement marin, terrestre, mais aussi d'eau douce). Ils sont, de ce fait, faciles à collecter et représentent d'excellents candidats aux études comparatives. De plus, les amphipodes sont (3) faciles à identifier au niveau spécifique, (4) caractérisés par un dimorphisme sexuel, (5) sensibles à de nombreux stress, (6) couramment utilisés dans les tests écotoxicologiques, (7) considérés comme une importante réserve de nourriture pour les macroinvertébrés benthiques, les poissons, les oiseaux et les amphibiens (MacNeil et al., 1997), (8) connus pour jouer un rôle majeur dans les processus de dégradation de la litière (détritivores) et donc dans la chaîne alimentaire entière (Forrow et Maltby, 2000). Un bon indicateur biologique doit: (i) être sensible à un stress, (ii) fournir une réponse biochimique ou physiologique significative aux contaminants anthropiques, et (iii) fournir des réponses prédictives de l'effet des contaminants aux niveaux supérieurs de l'organisation biologique (populations, communautés, écosystèmes). De plus, la biologie et la physiologie de l'espèce doit être connue (Huggett et al., 1992). Les caractéristiques des amphipodes énumérées ci-dessus (et donc des gammares), respectent les critères de choix d'un bon indicateur biologique. De surcroît, Garric et Geffard (2007) ont montré que les gammares pouvaient être utilisés pour les études de bioaccumulation et de biodisponibilité, en particulier des métaux.

2. Stress oxydant, défenses anti-toxiques et dommages cellulaires

Une fois le métal absorbé au niveau cellulaire, l'organisme doit impérativement se défendre pour tolérer et/ou résister à la présence de cet « agresseur ». L'organisme doit donc se détoxifier du métal. Selon Mason et Jenkins (1995), la détoxification des métaux par un organisme regroupe l'ensemble des processus, stratégies, ou mécanismes permettant de réduire les interactions nuisibles entre le métal et les macromolécules essentielles. L'induction des métallothionéines ou des protéines de stress ainsi que les systèmes anti-oxydants figurent parmi les biomarqueurs d'exposition les plus couramment utilisés lors d'une exposition métallique. Lorsque les mécanismes de défense cellulaires sont débordés du fait de leur insuffisance et/ou de leur saturation, les xénobiotiques sont en mesure d'exercer leurs effets toxiques sur l'organisme. Toute mesure permettant une mise en évidence significative de tels effets chez l'organisme exposé est alors considérée comme étant un biomarqueur cellulaire d'effet (Schlenk, 1999). En cas de débordement cellulaire lié à la formation excessive de ROS, des dommages cellulaires irréversibles pourront apparaître chez les organismes (Gutteridge et Halliwell, 1990; Stegeman et al., 1992), parmi lesquels la peroxydation lipidique de la membrane, encore appelée lipoperoxydation (De Zwart et al., 1999; Regoli, 2000).

2.1. Les métallothionéines, piègeurs de métaux

2.1.1. Structure et particularités des métallothionéines

Les métallothionéines (MT) sont des protéines de faibles poids moléculaire (6-7kDa), qui ne possèdent pas d'activité enzymatique et qui sont dérivées d'une protéine riche en soufre : la thionéine. Les particularités de ces protéines hautement conservées résident dans leur forte teneur en cystéine (33% des acides aminés totaux) mais aussi dans l'absence de ponts disulfures, d'histidines et d'acides aminés aromatiques ou hétérocycliques (Kojima, 1991; Roesijadi, 1992; Kägi, 1993; Stillman, 1995). Ces protéines présentent une grande stabilité thermique ainsi qu'une grande capacité de résistance aux attaques acides (Roesijadi, 1992). Les MTs sont essentiellement cytoplasmiques, mais des études ont montré qu'elles pouvaient être également accumulées dans les lysosomes et transportées vers le noyau et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie (Ye et al., 2001). L'isolation de ces protéines a été réalisée pour la première fois dans le rein de cheval par Margoshes et Vallee (1957). Depuis, leur présence a été démontrée chez tous les vertébrés et invertébrés (Roesijadi, 1981; Olsson et al., 1998; Roeva et al., 1999). La structure primaire des MTs est composée de deux domaines

globulaires α et β (Figure I.6), liés entre eux par deux lysines. Ces deux domaines comportent différents isoformes composées d'alignements de séquences Cys-Cys, Cys-X-Cys, et Cys-X-X-Cys où X représente un acide aminé autre que la cystéine (Fowler et al., 1987). Sur la base de leur composition en acides aminés et sur leur mode de formation, les MTs sont divisées en trois classes distinctes (Fowler et al., 1987). Toutes les MTs ont cependant une caractéristique commune qui réside dans leur capacité à fixer les ions métalliques en les liant aux atomes de soufre présents sur les résidus cystéine (fonction thiolate Cys-S). Cette fixation est responsable d'un repliement réversible des deux sous-unités α et β autour du métal, permettant sa séquestration (Figure I.6). Le domaine α comporte 11 cystéines alors que le domaine β en comporte 9 (Stillman, 1995 ; Pelletier et al., 2004) et ces deux domaines sembleraient avoir des affinités différentes selon les métaux et pourraient être occupés par des ions métalliques différents sur une même molécule (Amiard et Cosson, 1997). D'après Stillman (1995), l'affinité des métaux pour les MTs décroît dans l'ordre $\text{Hg (II)} > \text{Ag(I)} \sim \text{Cu(I)} > \text{Cu(II)} > \text{Zn(II)}$.

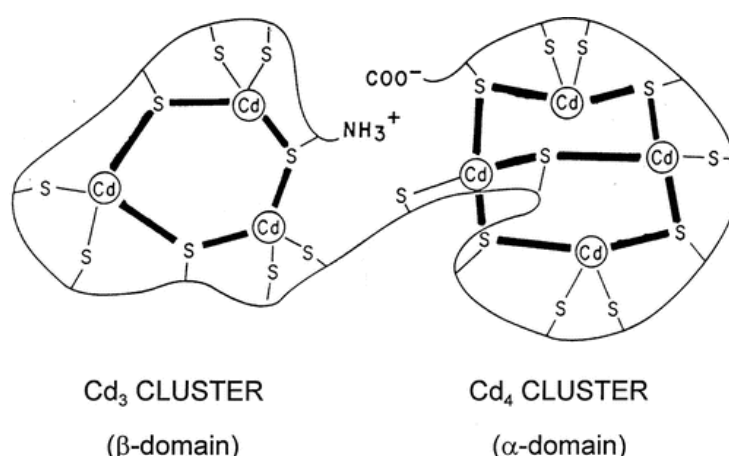


Figure I.6: Représentation schématique de la structure d'une métallothionéine dans le cas du piégeage du cadmium (Klaassen et al., 1999)

2.1.2. L'induction des métallothionéines

Les gènes codant pour les MTs pouvant être induits par la présence de métaux (Roesijadi, 1994 ; Mason et Jenkins, 1995 ; Pelletier et al., 2004), la synthèse et la concentration de ces protéines est censée augmenter lors d'une contamination métallique. Ainsi, la détection et le dosage des MTs sont souvent considérés comme des biomarqueurs d'exposition métallique (Cosson et Amiard, 2000; Geffard et al. 2002a, b; 2005; Pinel-Alloul et al., 2004; Berthet et al., 2005; Amiard et al., 2006) et font l'objet d'une attention particulière dans les programmes de

surveillance (Mathiessen, 2000). Malheureusement, une telle utilisation des MTs reste sujette à controverse. En effet, même si le niveau d'expression des MTs est généralement dose-dépendant et augmente avec une hausse de la concentration métallique, à partir d'un certain seuil de concentration métallique, cette corrélation ne serait plus aussi claire (Cheung et al., 2004). De plus, quelques données de la littérature révèlent que certaines espèces exposées à de fortes pollutions métalliques n'ont pas réagi par un taux accru de MTs dans certains de leurs organes (Pedersen et Lundebye, 1996 ; Berthet et al., 2003). Enfin, comme certains facteurs (agents oxydants, antibiotiques, hormones, xénobiotiques organiques aromatiques) sont également capables d'induire les MTs (Cousins, 1985 ; Onasaka et al., 1987; Palmiter, 1998), la contamination métallique ne peut être exclusivement identifiée par une hausse de la concentration de ces protéines chez les organismes.

2.1.3. Rôles des métallothionéines

Les MTs sont connues pour jouer un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme en métaux essentiels. Cette régulation passe par le stockage de ces métaux traces qui permet de constituer une réserve intracellulaire facilement mobilisable pour les besoins enzymatiques et les exigences métaboliques (Viarengo and Nott, 1993; Roesijadi, 1996; Mao et al., 2012). Lorsque les concentrations en métaux traces essentiels sont trop élevées ou lors de la présence de métaux traces non-essentiels, les MTs peuvent aussi jouer un rôle de détoxification (Mason et Jenkins, 1995; Klaassen et al., 1999; Park et al., 2001; Frayssé et al., 2006). En effet, les MTs sont capables de séquestrer ces métaux et de les rendre non-disponibles, ce qui les empêchent d'exercer leur toxicité (Roesijadi et Fellingham, 1987; Palmiter, 1998). Cependant, la tolérance de l'organisme au métal *via* ce système de détoxification est limitée à la disponibilité des liaisons thiols présentes sur les MTs et de nombreuses études ont suggéré que le débordement cellulaire est à l'origine des effets toxiques des métaux (George et Olsson, 1994; Geffard et al., 2002a). Il faut toutefois noter que lorsque des métaux non-essentiels entrent dans une cellule, ils entrent en compétition de manière inévitable avec les métaux essentiels pour se lier sur les MTs intracellulaires. L'affinité de la liaison *in vitro* serait plus grande avec les métaux non-essentiels, le rôle de détoxification étant privilégié par rapport à celui du maintien homéostatique (Vasak, 1991; Amiard et al., 2006). D'autres rôles des MTs existent, comme ceux de protection contre les radiations ionisantes (Cai et al., 1999) ou plus généralement contre le stress oxydant (Viarengo et al., 2000; Cavaletto et al., 2002; Correia et al., 2002; Rodriguez-Ortega et al., 2002; Valavanidis et al., 2006).

2.2. Le stress oxydant et les systèmes de défense anti-oxydants

Pour assurer un bon fonctionnement de leur métabolisme et leur production d'énergie, les organismes aérobies ont besoin d'oxygène moléculaire (O_2) dans leurs cellules. Cependant, 1 à 3 % de l'oxygène consommé aboutit, lors des processus métaboliques endogènes, à la formation d'espèces radicalaires libres (anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$; radical hydroxyle $OH^{\cdot}$) ou d'espèces non radicalaires (peroxyde d'hydrogène H_2O_2) hautement réactives, plus connues sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Livingstone, 2001; 2003; Valavanidis et al., 2006). Le tableau I.2 récapitule la synthèse et les effets néfastes des principales espèces réactives de l'oxygène.

Tableau I.2. Synthèse et effets des principales espèces réactives de l'oxygène.

Nom de l'espèce réactive de l'oxygène	Synthèse et Effets	Références
Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	- Résulte de la réduction de l'oxygène moléculaire grâce aux enzymes NAD(P)H oxydases ou xanthine oxydases ou de manière non enzymatique par des composés redox comme la semi-ubiquinone de la chaîne de transport des électrons. - Dommages cellulaires liés à son incapacité à traverser la membrane lipidique. - Peut générer des ROS secondaires comme le peroxyde d'hydrogène par la dismutation suivante, catalysée par la superoxyde dismutase: $2 O_2^{\cdot-} + 2 H_2O \longrightarrow H_2O_2 + O_2 + 2 OH^-$ - Génère du fer ferreux selon la réaction D' Haber-Weiss: $O_2^{\cdot-} + Fe^{3+} \longrightarrow O_2 + Fe^{2+}$ - peut se combiner avec l'oxyde nitrique pour former du peroxynitrite (ONOO-), cytotoxique et provoquant l'oxydation des protéines, lipides et ADN	Miller et al., 1990 Cadenas et Sies, 1998 Fridovich, 1975 Valko et al., 2007 Liochev et Fridovich, 2002 Afonso et al., 2007 Chabot et al., 1998
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	- Est formé par la dismutation de l'anion superoxyde - Franchit la barrière membranaire par diffusion puis se décompose en ion hydroxyde (OH^-) et en radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) par la présence d'ions ferreux Fe^{2+} selon la réaction de Fenton suivante: $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{3+}$	
Radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$)	- Espèce la plus réactive et la plus instable, formé par la réaction d'Haber-Weiss suivante: $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^-$ - Lipoperoxydation, adduits à l'ADN, perturbe la synthèse des protéines en créant des erreurs de transcription	Sies, 1991 Liochev et Fridovich, 2002 Halliwell et Gutteridge, 1984

Leur synthèse se situe essentiellement au niveau de la membrane mitochondriale, lors du transfert des électrons dans la chaîne respiratoire (Stanek et Nohl, 2000). Il n'est donc pas anormal de retrouver une concentration « basale » de ces ROS chez les organismes aérobies (Pelletier et al., 2004). Bien que certains ROS interviennent comme intermédiaires dans des processus physiologiques normaux (Dröge, 2003; Valko et al., 2007), toute augmentation anormale de ces ROS peut conduire à un stress oxydant sur les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Collén et al., 2003; Monteil et al., 2004). De nombreux polluants (PCBs, HAPs, métaux...) peuvent induire la production de ces ROS (Livingstone, 2001; 2003), notamment par l'intermédiaire de composés à potentiel redox (Otto et Moon, 1996). D'autres sources environnementales (milieu hypoxique ou hyperoxique, ozonation de l'eau) peuvent

également être à l'origine d'un accroissement de ROS (Livingstone, 2003). Le stress oxydatif pouvant conduire à la peroxydation lipidique des membranes, à l'oxydation des groupements thiols de certaines enzymes ou coenzymes ou encore à la formation d'adduits à l'ADN (Gutteridge et Halliwell, 1990; Stegeman et al., 1992), les organismes ont développé des systèmes de défense anti-oxydants, enzymatiques ou non.

2.2.1. Le glutathion réduit (GSH) : Un anti-oxydant non- enzymatique

Les anti-oxydants non enzymatiques comme le glutathion (GSH), les vitamines A et E, l'acide ascorbique, le β -carotène, l'interféron β ou les oses simples ont la capacité de fixer ou de détruire les espèces radicalaires (Cossu et al., 1997a,b). Le glutathion étant considéré comme le plus puissant des anti-oxydants, seul ce dernier sera détaillé dans cette partie.

2.2.1.1. Structure et biosynthèse du glutathion

Le L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine, plus couramment nommé glutathion, est un thiol non protéique de faible masse moléculaire, présent en abondance dans les cellules eucaryotes (Penninckx, 2000). Comme son nom scientifique le suggère, le glutathion est composé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (Figure I.7).

La biosynthèse de ce tripeptide se réalise à l'aide de deux réactions enzymatiques consécutives, chacune d'entre elles nécessitant la présence d'une molécule d'ATP (Meister, 1994). La première réaction permet de lier le glutamate à la cystéine pour former du γ -Glu-Cys. Cette réaction est catalysée par la γ -glutamyl-cystéine ligase (γ -GCL), enzyme hétérodimérique composée d'une sous-unité catalytique (GCLc) de 73 kDa et d'une sous-unité de régulation (GCLm) de 27.7 kDa (Seelig et al., 1984; Coffinet et al., 2008; Ventura-Lima et al., 2009).

La deuxième réaction, catalysée par la glutathion synthétase, permet de lier la γ -Glu-Cys avec de la Glycine pour former le glutathion réduit (Figure I.7).

Il a été montré que le glutathion était lui-même capable de réguler sa biosynthèse, en inhibant ou en stimulant l'activité de la GCL (Richman et Meister, 1975; Iles et Liu, 2005). Cependant, de nombreux facteurs peuvent limiter sa biosynthèse, comme la concentration en GCL (Griffith, 1999 ; Chen et al., 2005), ainsi que la disponibilité des substrats comme l'ATP, la Cystéine, le Glutamate, ou encore la Glycine.

Le glutathion est retrouvé en abondance dans le cytoplasme des cellules, et particulièrement dans les hépatocytes, dans lesquels il peut être présent sous sa forme oxydée (GSSG) ou

réduite (GSH). Selon Meister (1988), la forme réduite, qui représente la forme active, est dominante à 90%.

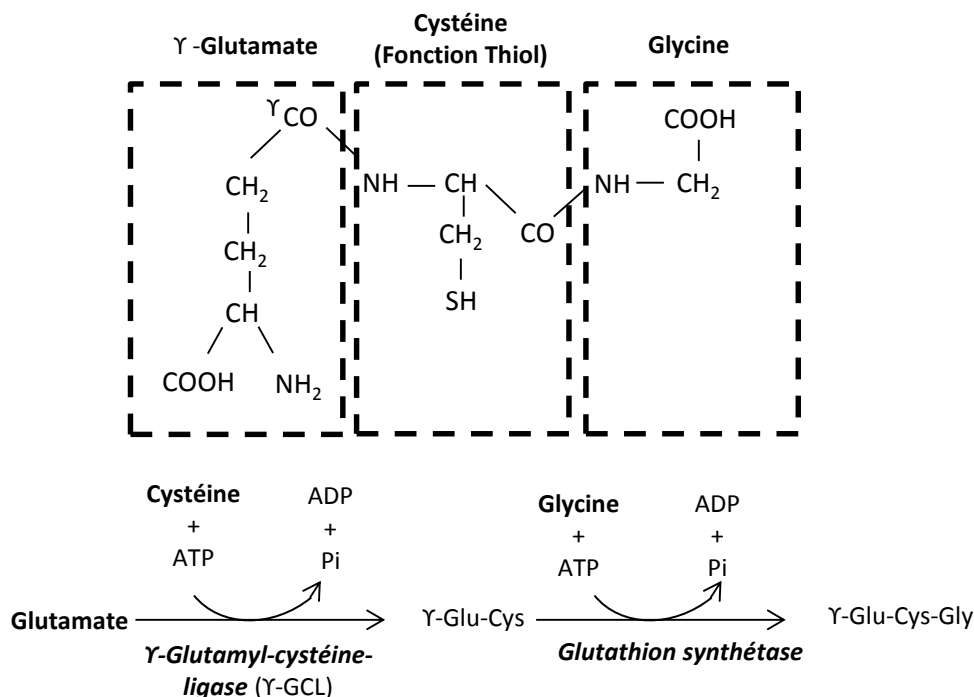
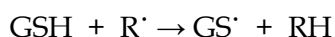


Figure I.7. Formule semi-développée du glutathion réduit et synthèse de ce tripeptide (Source : Université de Rouen, France)

2.2.1.2. Rôles du glutathion

Le glutathion, à l'état réduit (GSH), intervient en tant que donneur d'électrons dans les processus de défense antioxydants (Valko et al., 2007). Grâce à son groupement thiol (-SH) présent sur le résidu cystéinyl, le GSH est capable d'inactiver de manière directe les espèces radicalaires en les neutralisant. Cette « neutralisation » se réalise par un simple transfert d'électrons selon la réaction suivante (DeLeve et Kaplowitz, 1991; Luperchio et al., 1996):



De manière plus indirecte, le GSH intervient également comme substrat pour de nombreuses enzymes anti-oxydantes comme les glutathion peroxydases ou les glutathion S-transférases (cf. § 3.2.2.3 et § 3.2.2.4).

2.2.2. Les anti-oxydants enzymatiques

Les enzymes anti-oxydantes comme les superoxydes dismutases (SOD), les catalases (CAT), les glutathion peroxydases (GPx), S-transférases (GST) et réductases (GSR), permettent

généralement la transformation des ROS en composés moins réactifs ou totalement inertes (Cossu et al., 1997a,b; Livingstone, 2003; Pelletier et al., 2004; Figure I.8), facilement éliminables par excrétion (Ketterer et al., 1983).

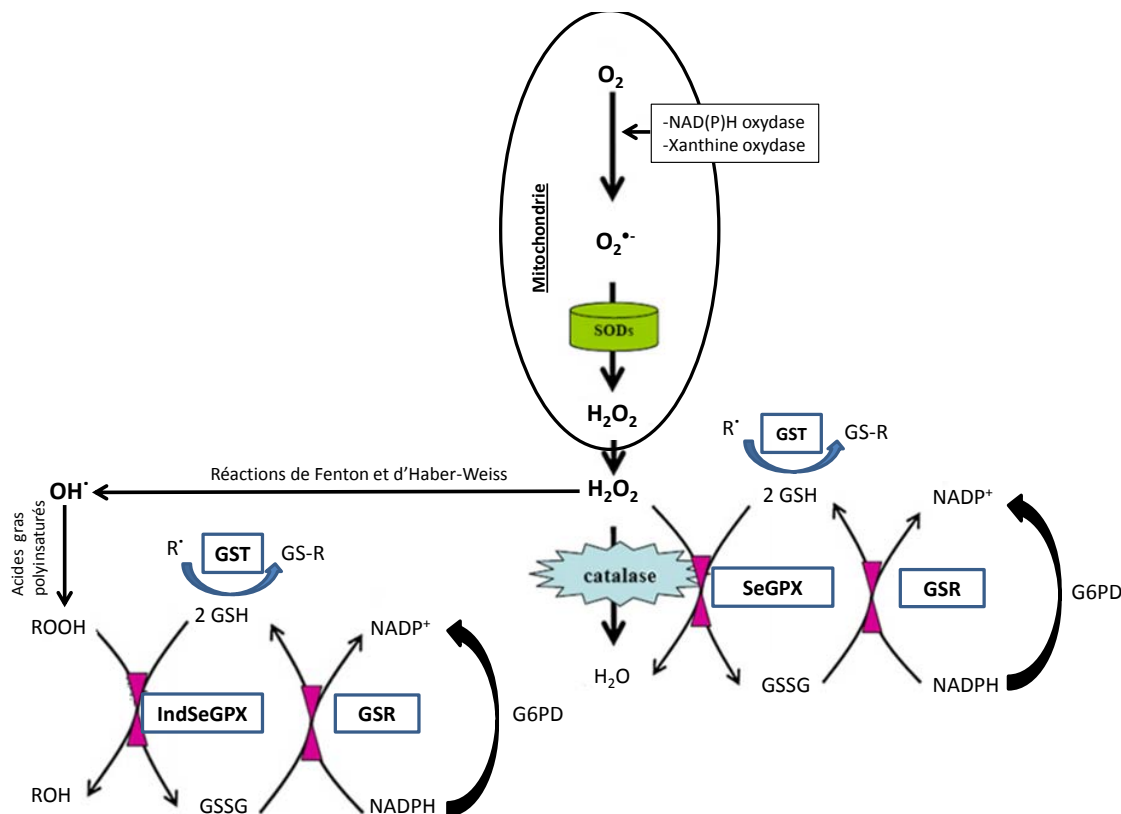


Figure I.8. Transformation des ROS par les enzymes anti-oxydantes (adapté de Chabot et al., 1998; Afonso et al., 2007). O_2 : oxygène moléculaire ; $O_2^{\bullet-}$: Anion superoxyde ; H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène ; $OH^{\bullet}$: Radical hydroxyl ; GSH : Glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé ; IndSeGPx ; Glutathion peroxydase Sélénium-indépendant ; SeGPx ; Glutathion peroxydase Sélénium-dépendant ; GSR : Glutathion réductase ; GST : Glutathion-S-transférase ; SOD : Superoxyde dismutase.

2.2.2.1. Superoxydes dismutases

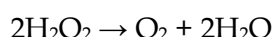
Les superoxydes dismutases, tout comme l'anion superoxyde, ne traversent pas les membranes et sont donc produites de manière endogène dans toutes les cellules aérobies. Ces métallo-enzymes sont synthétisées abondamment lorsque la présence d'anion superoxyde, le premier ROS à apparaître, est détectée dans la cellule. Ces enzymes sont connues pour réduire la concentration du $O_2^{\bullet-}$ et limiter sa toxicité en catalysant très

rapidement la dismutation du $O_2^{\bullet -}$ en O_2 et H_2O_2 (Fridovich, 1975; Valko et al., 2007) selon la réaction suivante :



2.2.2.2. Les catalases

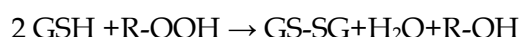
Les catalases sont des enzymes localisées essentiellement dans les peroxysomes des cellules eucaryotes. Ces enzymes neutralisent le peroxyde d'hydrogène en catalysant sa dismutation en oxygène moléculaire et en eau selon la réaction suivante:



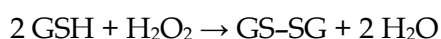
Cette dismutation permet d'empêcher la réaction d'Haber-Weiss (Tableau I.2.) entre l'anion peroxyde et le peroxyde d'hydrogène, évitant la formation de radical hydroxyle très réactif (Halliwell et Gutteridge, 1984).

2.2.2.3. Les glutathion peroxydases (GPx)

Les glutathion peroxydases (GPx) sont des enzymes présentes dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries. Ces enzymes sont présentes sous deux formes: la forme sélénium-dépendante (SeGPx) et la forme sélénium-indépendante (IndSeGPx). Les deux formes ont la capacité, grâce à la présence du GSH, de détoxifier les peroxydes organiques (lipidiques surtout) de type R-OOH en R-OH selon la réaction suivante (Mills, 1957):

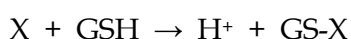


Cependant, seule la forme SeGPx est capable de prendre en charge la détoxification du peroxyde d'hydrogène en le réduisant en eau, grâce à la présence de GSH, selon la réaction :



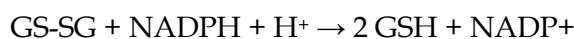
2.2.2.4. Les glutathion S-transférases (GST)

Les Glutathion transférases (GST) sont localisées principalement dans le cytosol mais sont retrouvées aussi dans la mitochondrie et les microsomes hépatiques (Friedberg et al., 1979; Morgenstern et al., 1979). Ces enzymes catalysent la conjugaison initiale des composés électrophiles ou des métaux avec le GSH (Habig et al., 1974). La réaction est la suivante :



2.2.2.5. Les glutathion réductases (GSR)

Après avoir servi comme substrat aux réactions enzymatiques catalysées par les GST et GPx, le glutathion se retrouve dans son état oxydé (GSSG). L'enzyme glutathion réductase (GSR) permet alors de compléter le cycle, en recyclant en permanence le GSSG en GSH, selon la réaction suivante (Penninckx, 2000) :



Toutefois, il est important de mentionner que le recyclage du glutathion oxydé en glutathion réduit, comme toutes les réactions enzymatiques, ne peut se réaliser que si les substrats sont en quantité suffisante. Ainsi un déficit en NADPH ne permettra pas de réduire le glutathion. La quantité de NADPH disponible pour que cette réaction ait lieu dépend elle-même de la qualité de la réaction enzymatique catalysée par la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD), permettant l'oxydation du glucose 6-phosphate en 6-phosphogluconate et la conversion du NADP⁺ en NADPH (Kosower et Kosower, 1978).

2.3. La lipoperoxydation membranaire

La peroxydation lipidique se réalise en 3 phases: Initiation, Propagation et Terminaison (Figure I.9).

La phase d'initiation débute par la capture d'un atome hydrogène d'un acide gras polyinsaturé (LH) par une espèce réactive d'oxygène (souvent OH[•]), ce qui donne lieu à un radical lipidique L[•] (Valko et al., 2007). Comme cette déshydrogénation peut se produire à différents endroits de la chaîne, le radical lipidique obtenu va subir un réarrangement moléculaire afin de devenir plus stable (Porter et al., 1995). Si celui-ci n'est pas réduit par les antioxydants, la propagation du processus de peroxydation lipidique se poursuit. Durant la phase de propagation, le radical lipidique obtenu va réagir avec l'oxygène moléculaire (O₂) pour former un radical peroxy lipidique (LOO[•]), lui conférant une forte réactivité et ainsi, la capacité de jouer un rôle similaire à celui de l'espèce réactive d'oxygène de départ. En effet, ce radical peroxy lipidique va se transformer en hydroperoxyde lipidique en capturant l'atome d'hydrogène d'un lipide membranaire adjacent (Figure I.9). Cette capture conduit à la formation d'un nouveau radical lipidique, ce qui réamorce un nouveau cycle. Cette cascade de réactions suit rapidement une vitesse exponentielle et ne peut être stoppée que lorsque deux radicaux lipidiques se dimérisent. Cependant, la probabilité de rencontre de

deux molécules lipidiques étant très faible, la fin du processus de lipoperoxydation est souvent retardée. Les hydroperoxydes lipidiques formés vont, durant la phase de terminaison, se décomposer en composés secondaires qui peuvent être des radicaux lipidiques, des alcanes, des acides ou encore des aldéhydes (Wade et Van Rij, 1985).

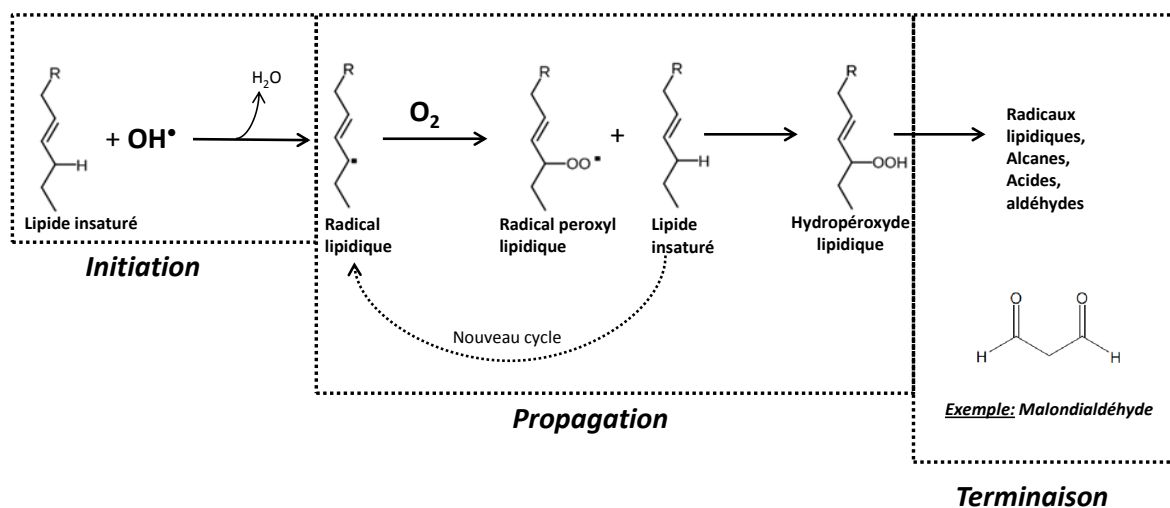


Figure I.9. Les trois phases du processus de lipoperoxydation membranaire (adapté de Porter et al., 1995; De Zwart et al., 1999; Valko et al., 2007)

Le processus de lipoperoxydation aboutit au déficit des fonctions membranaires comme la perte de fluidité des membranes, l'inactivation des récepteurs et des enzymes membranaires mais aussi l'augmentation de la perméabilité aux ions calciques (Gutteridge et Halliwell, 1990). La lipoperoxydation engendre généralement la lyse des organites cellulaires endommagés (mitochondries, peroxysomes...), cette lyse étant suivie d'une libération d'enzymes catalysant l'hydrolyse des protéines, des acides nucléiques ou des polysaccharides cellulaires (Cossu et al., 1997b).

Cependant, la cytotoxicité est également liée à la formation de produits secondaires du fait de la décomposition ou de la transformation des hydroperoxydes lipidiques. Par exemple, le malondialdéhyde (MDA) ou encore le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sont les représentants les plus abondants et les plus réactifs des aldéhydes formés. Le 4-HNE est connu pour inhiber la synthèse des protéines et des acides nucléiques mais aussi pour bloquer la prolifération cellulaire (Esterbauer et Cheeseman, 1990; Esterbauer, 1993). Le MDA est également très réactif vis-à-vis des macromolécules comme les protéines, l'ARN ou l'ADN (Valenzuela, 1991). De nombreuses études ont montré que cet aldéhyde pouvait se complexer avec les résidus cystéinyl des protéines ou même du glutathion (Pilz et al., 2000). De plus, le MDA a

été suggéré comme fortement mutagène à cause de sa capacité à former des adduits à l'ADN (Marnett, 1999). Pour toutes ces raisons, le dosage de ce type de produit est souvent utilisé comme biomarqueur d'effets (Del Rio et al., 2005), des taux élevés signant une lipoperoxydation cellulaire importante.

3. Le métabolisme énergétique et les réserves énergétiques

Pour assurer le bon fonctionnement de leur métabolisme basal, les individus ont besoin d'énergie sous forme d'ATP. Les substrats énergétiques comme les acides aminés, les acides gras et le glucose jouent un rôle essentiel dans ce maintien homéostatique en satisfaisant les besoins immédiats en ATP grâce à l'oxydation de ces substrats dans le cycle de Krebs. Un organisme dans un bon état physiologique a une balance énergétique positive, correspondant à un ratio [disponibilité énergétique/demande énergétique] positif. Le surplus d'énergie (non consommée) est stocké sous forme de réserves énergétiques comprenant les lipides, les protéines et le glycogène. Ces réserves seront déstockées en cas de stress (*e.g.* jeun, stress chimique) pour fournir l'énergie nécessaire liée à la mise en place de mécanismes de compensation physiologique (Le Gal et al., 1997). Ainsi, la quantification des réserves énergétiques au sein des populations exposées est souvent utilisée dans les études écotoxicologiques comme biomarqueur précoce d'une perturbation environnementale (Lagadic, 2002). De plus, comme de nombreux auteurs ont montré une corrélation positive entre les réserves énergétiques et le succès reproducteur ou encore la croissance des organismes (Maltby et Naylor, 1990; Stoeckmann et Garton, 1992; De Coen et Janssen, 2003), les études des réserves énergétiques ont été considérées comme des biomarqueurs prédictifs d'effets sur la dynamique et la structure des populations d'invertébrés (Le Gal et al., 1997; Scott-Fordsmand et Weeks, 2000). La quantification des différentes formes de réserves énergétiques permet également de compléter les connaissances sur les stratégies de réponse d'une espèce face à une perturbation, le choix du substrat utilisé étant souvent dépendant de la réponse apportée (Holmstrup et al., 2010). Selon Thomasson et al. (2003), les individus exposés à un stress chimique réduisent au maximum le coût énergétique lié à des activités non vitales pour le réallouer à des mécanismes d'excrétion, de détoxification et/ou de réparation cellulaire. L'étude quantitative des réserves énergétiques représente donc, dans le cadre d'une contamination métallique, des informations complémentaires non négligeables aux biomarqueurs liés aux systèmes de défense ou aux comportements des individus.

3.1. Le glycogène, une réserve énergétique facilement mobilisable

Le glycogène est un polysaccharide constitué de plusieurs chaînes de résidus glucose, ces derniers étant liés entre eux par des liaisons glycosidiques α -1,4 et les chaînes de glucose étant reliées entre elles par des liaisons α -1,6. De par sa composition, le glycogène représente la forme de stockage du glucose, facilement et la plus immédiatement mobilisable chez les humains ou les animaux en cas de demande énergétique. Le glycogène est situé dans le cytosol du foie (ou hépatopancréas) ou des muscles squelettiques dans lesquels il est présent sous forme de granules. Les enzymes catalysant sa synthèse, sa dégradation et sa régulation cohabitent avec le glycogène dans ces granules. Le glycogène est d'abord dégradé en glucose 1-P par l'enzyme glycogène phosphorylase (Figure I.10). Ensuite, le glucose 1-P est transformé en glucose 6-P grâce à une phosphoglucomutase. Le glucose sous forme phosphorylée ne peut pas circuler librement à l'extérieur des cellules. Ainsi, dans l'hépatopancréas, l'enzyme glucose 6-phosphatase permet la déphosphorylation du glucose 6-P en glucose. Il est important de mentionner que cet organe permet également la formation de glucose à partir de précurseurs comme les acides aminés, le glycérol ou l'acide lactique produits par d'autres organes (néoglucogenèse). Dans les muscles, l'enzyme glucose 6-phosphatase est absente, laissant le glucose sous sa forme phosphorylée et le piégeant dans la cellule dans laquelle il se situe.

Le glucose, grâce à la glycolyse, au cycle de Krebs et à la chaîne de transport des électrons permet la production d'énergie, sous forme d'ATP, utilisable par la cellule (Figure I.11). La transformation du glucose en ribose par la voie des pentoses phosphate n'est pas négligeable et permet de produire des molécules de NADPH nécessaires aux réactions biosynthétiques comme la synthèse des acides gras ou encore aux processus d'oxydo-réduction comme la réduction de GSSG en GSH. Le glycogène est généralement utilisé pour les besoins énergétiques à court terme et de faible intensité. Cela réside dans le fait que les réserves en glycogène sont assez limitées. Ainsi, le glycogène est généralement utilisé pour les activités locomotrices et ventilatoires, les processus d'osmorégulation, de croissance, de reproduction, l'activité neuronale ou lors de carences nutritives (Kucharski et Da Silva, 1991a,b; Swanson, 1992; Sparkes et al., 1996; Rosa et Nunes, 2003; Oliveira et al., 2004).

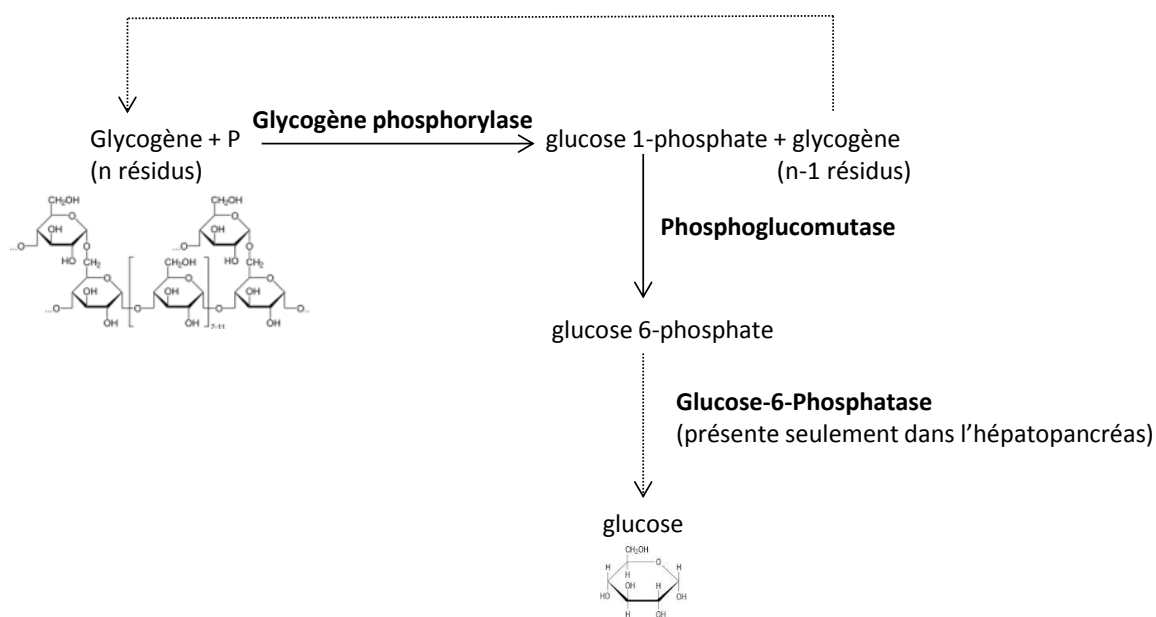


Figure I.10. Dégradation du glycogène dans les cellules hépatiques et musculaires.

3.2. Les lipides : les réserves énergétiques les plus efficaces

Il est nécessaire de bien distinguer les lipides de structure et les lipides de réserves, qui n'ont pas le même rôle énergétique. Les lipides structuraux, entrant dans la composition de la membrane cellulaire, sont principalement constitués de phospholipides et de cholestérol. Cependant, ils ne constituent en rien un substrat énergétique, bien que les phospholipides puissent être partiellement mobilisés au cours d'un jeûne prolongé (Cherel et al., 1992).

Les lipides de réserves sont principalement constitués de triglycérides. Entre six à huit fois plus caloriques que le glycogène ou les protéines, les réserves lipidiques sont considérées comme les réserves énergétiques les plus efficaces, fournissant l'énergie nécessaire à la survie de la cellule (De Coen et Janssen, 1997). Les lipides de réserves sont stockés en majorité dans les adipocytes mais sont aussi retrouvés en faible proportion dans les cellules hépatiques et musculaires.

Afin d'apporter de l'énergie à l'organisme, les triglycérides vont subir un phénomène de lipolyse. Ce phénomène consiste à hydrolyser les lipides (triglycérides) en acides gras, ces derniers subissant une étape de β -oxydation ou de cétogenèse. La β -oxydation permet la transformation des triglycérides à n carbones en triglycérides à $n-1$ carbones et permet la libération d'acétylCoA qui pourra entrer dans le cycle de Krebs (Figure I. 11). Les organismes sont incapables d'utiliser directement les acides gras pour fournir l'énergie

nécessaire à l'activité neuronale. Les lipides peuvent cependant être hydrolysés en glycérol et les acides gras peuvent fournir des corps cétoniques, qui sont des sources d'énergie directement utilisables par la cellule. Cependant, ce phénomène ne se réalise qu'en dernier recours, souvent lorsque les réserves glucidiques sont épuisées. Cette cétogenèse est également utilisée dans les cellules hépatiques lorsque le cycle de Krebs ne peut pas utiliser l'AcétylCoA provenant de la β -oxydation. C'est le cas par exemple lors d'un jeun sévère qui mobilise l'oxaloacétate pour la néoglucogenèse, le rendant indisponible pour le bon fonctionnement du cycle de Krebs.

Les réserves énergétiques lipidiques ne sont généralement utilisées que lors de stress sévères (Witter et Cuthill, 1993). La reproduction et les périodes de jeun prolongés ont été décrites comme étant les principaux paramètres capables d'induire la lipolyse (O'Connor et Gilbert, 1968). Des différences dans la quantité de réserves lipidiques chez les mâles et les femelles ont souvent été mises en évidence chez les crustacés (Dutra et al., 2007; Sroda et Cossu-Leguille, 2011), suggérant un plus grand investissement des femelles dans la reproduction. Selon O'Connor et Gilbert (1968), la quantité de réserves énergétiques et ses variations dépendent à la fois de l'environnement extérieur et d'un contrôle interne par l'organisme.

3.3. Les protéines : des réserves énergétiques mobilisables lors d'un stress sévère

Bien qu'elles soient retrouvées en abondance dans les muscles squelettiques (Le Maho et al., 1981), les protéines constituent le matériel de base de tous les tissus de l'organisme dans lesquels elles assurent différentes fonctions : enzymatiques, contractiles, structurales et de transport. Leur rôle dans le métabolisme énergétique n'est pas principal en dépit de leur capacité à produire une quantité d'énergie supérieure à celle du glycogène (De Coen et Janssen, 1997). Cependant, les protéines restent mobilisables en cas de stress majeur (Durou et al., 2008). La forme circulante est représentée par les acides aminés (Figure I.11). Les protéines sont fragmentées en acides aminés lors de la protéolyse, sous l'action de protéases. Certains acides aminés sont glucoformateurs et participent ainsi à la néoglucogenèse. D'autres conduisent à l'AcétylCoA de manière plus ou moins directe et, de ce fait, participent à la production d'ATP *via* le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons.

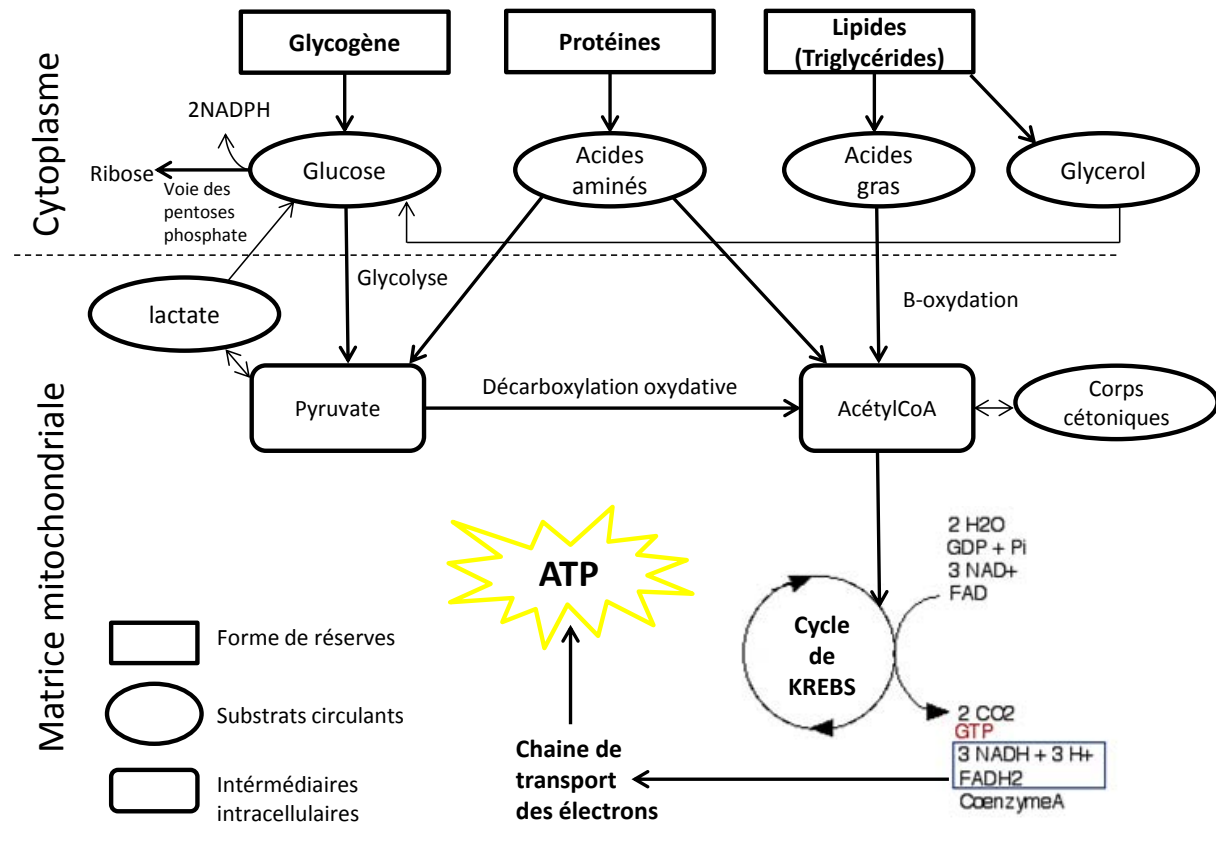


Figure I.11. Voies de transformation des réserves énergétiques en ATP et interconversion des substrats énergétiques (adapté de Pratt et Cornely, 2012).

4. La protéomique: une approche émergente en sciences de l'environnement

Les technologies dites « -omiques » ont révolutionné la biologie ces dernières années, en générant une augmentation claire des connaissances fondamentales grâce au développement de nouvelles méthodes pour quantifier les familles de molécules cellulaires, comme les gènes (génomique), l'ARN (transcriptomique), les protéines (protéomique) et les métabolites intermédiaires (métabolomique) (Gomiero et al., 2006). La puissance de ces approches moléculaires fait l'objet de discussions intenses concernant leur possible utilisation dans les programmes de surveillance et d'évaluation des risques environnementaux (Merrick et Tomer, 2003; Boverhof et Zacharewski, 2006; Dowling et Sheehan, 2006; Benninghoff, 2007; Nesatyy et Suter, 2007).

4.1. Ecotoxicoprotéomique et protéomique comparative

Le mot « protéome » (complément de PROTEine exprimée par un génOME) présenté par Wilkins et al. (1996) définit le jeu complet de protéines exprimées et modifiées après leur expression par un génome. Ainsi, la protéomique est souvent assimilée à la génomique fonctionnelle et est souvent considérée comme une approche complémentaire aux autres techniques « -omiques », chacune d'entre elles apportant des informations uniques (Haynes et al., 1998; Gomiero et al., 2006). Par exemple, des études ont montré qu'il n'existait pas de corrélation entre le taux d'ARN messagers (ARNm) et le taux de protéines (Gygi et al., 1999a). La position de la protéomique au sein des autres techniques « -omiques » est cependant controversée. Certains auteurs pensent en effet que la protéomique est plus informative que la génomique ou la transcriptomique, (i) d'une part parce que le génome est une unité statique alors que le protéome est variable, s'exprimant différemment selon le stade de développement, le tissu, le stade physiologique et les conditions environnementales (Shepard et al., 2000; Barrett et al., 2005); (ii) d'autre part, parce que les protéines sont régulées et modulées par des réactions post-traductionnelles qui ne peuvent être appréhendées par des approches génomiques ou transcriptomiques (Aardema et Mac Gregor., 2002; Bandara et Kennedy., 2002; Barrett et al., 2005; Fröhlich et al., 2009).

Jusqu'à récemment, les études protéiques avaient surtout pour objectif la découverte de nouveaux médicaments, l'identification de biomarqueurs ou l'étude des interactions protéines-protéines dans les processus des maladies humaines (Hanash, 2003; Walgren et

Thompson, 2004; Hoeben et al., 2006; Sinha et al., 2007), où elles ont fait preuve d'une grande réussite.

Depuis ces dernières années, la protéomique a pris une place centrale dans la réflexion scientifique en sciences environnementales (Sanchez et al., 2011). En effet, la recherche de nouveaux biomarqueurs ainsi qu'une meilleure connaissance des mécanismes d'action des toxiques environnementaux ont motivé la naissance d'une discipline appelée « écotoxicoprotéomique ». Cette discipline se base essentiellement sur la protéomique comparative, qui, comme son nom l'indique, compare la cartographie d'expression de protéines dans les tissus, les cellules ou autres liquides corporels dans une condition définie par rapport à une condition témoin, permettant non seulement d'aboutir à une vue d'ensemble des protéines clés impliquées dans les voies physiologiques normales mais aussi de celles impliquées lors de pathologies (Williams et al., 1997; Blackstock et Weir, 1999). Un des avantages de la protéomique comparative, par rapport aux biomarqueurs conventionnels, repose sur le fait que cette technique peut être utilisée sans connaissance préalable des mécanismes d'action des polluants.

Plusieurs études de protéomique comparative en toxicologie aquatique ont déjà été conduites en laboratoire, majoritairement en utilisant des organismes marins comme modèle biologique. Parmi ces modèles, on compte beaucoup d'études sur les poissons, peu sur les invertébrés (Tableau I.3). La plupart des résultats ont montré que l'analyse des protéines pouvait fournir une « empreinte » spécifique directement reliable à l'exposition et/ou aux effets de certaines classes de produits chimiques, mais aussi aux différentes concentrations de produits chimiques testées (Shepard et Bradley, 2000; Meiller et Bradley, 2002; Rodriguez-Ortega et al., 2003). Des études sur les effets de la salinité et de la température sur les branchies de poisson ont montré des résultats similaires (Kultz et Somero, 1996). Les lots de protéines dont l'expression est modifiée suite à un stress ont été nommés « Protein expression signatures (PESs) » par Shepard et Bradley (2000). Ces signatures d'expression protéiniques sont concrètement des combinaisons de protéines induites ou réprimées, sur-exprimées ou sous-exprimées dans un traitement par rapport à un témoin (Figure I.12). De plus, ces PESs peuvent contenir des protéines spécifiques d'un stresser ou communes à plusieurs stressers. Quelques études réalisées sur les invertébrés aquatiques ont montré des résultats prometteurs quant à l'utilisation de la protéomique dans l'évaluation des risques et les programmes de surveillance. Par ailleurs, Bradley et al. (2002) ont montré que les PES générées par trois perturbateurs endocriniens chez la truite *Onchorhynchus mykiss* pouvaient

être détectées dans les eaux usées. De plus, Romero-Ruiz et al. (2006) ont montré que les PES chez les bivalves *Scrobicularia plana* prélevés sur des sites pollués aux métaux variaient en nombre mais aussi en intensité le long d'un gradient de concentration métallique. Enfin, Amelina et al. (2007) ont montré que la mise en évidence de PESs chez la moule *Mytilus edulis* permettait de discriminer les zones portuaires polluées des zones marines non-polluées.

Comme l'altération de l'expression des protéines est souvent indicatrice d'une exposition à des toxiques et de ses effets, la détection de PESs spécifiques aux stress environnementaux (protéomique quantitative) peut être utilisée pour la recherche de nouveaux biomarqueurs (Stagg, 1998; Shepard et Bradley, 2000), alors que leur identification (protéomique qualitative) permet de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces stressseurs sur les organismes exposés (Silvestre et al., 2006; Leroy et al., 2009). Toutefois, un inconvénient majeur à l'utilisation des invertébrés aquatiques dans les recherches protéiques réside dans le fait que leurs génomes ne sont pas entièrement séquencés, ce qui rend l'identification des protéines d'intérêt difficile. A l'heure actuelle, seul le génome de *Daphnia* est entièrement séquencé.

Tableau I.3. Etudes rapportant des données de protéomique comparative sur des invertébrés aquatiques.

Espèce aquatique	Toxique	Temps d'exposition et conditions expérimentales	Observations	Références
Bivalve <i>Mytilus edulis</i>	Phtalate de diallyl (DAP) Ether de biphényle polybromé (PBDE -47) Bisphénol A	• Exposition de 3 semaines	• Signatures d'expression des protéines spécifiques du polluant • Quelques signatures d'expressions de protéine communes aux trois traitements • Bonne discrimination des individus exposés aux différents toxiques par analyse multivariée	<i>Apraiz et al., 2006</i>
Larve de <i>Chironomus riparius</i>	Cadmium (Cd)	• Exposition de 24 heures	• Il existe des protéines qui répondent de manière spécifique au cadmium dans l'hémolymph • le Cd induit des changements majeurs dans les profils protéiques spécifiques des tissus étudiés (branchie et glande digestive)	<i>Choi et al., 2009</i>
Bivalve <i>Ruditapes decussatus</i>	Cadmium (Cd)	• Exposition de 21 jours	• Une diminution globale des spots protéiques est reliée à la hausse de la bioconcentration	<i>Chora et al., 2009</i>
Crabe de mer <i>Hyas araneus</i>	Phtalate de diallyl (DAP) Bisphénol A (BPA) Ether de biphényle polybromé (PBDE -47)	• 3 semaines d'exposition	<i>Carcinus maeanas</i>: • ↗ des perturbations dans l'expression des protéines dans les mélanges <i>Hyas araneus</i> et <i>Carcinus maeanas</i>: • Réponse protéique différente selon les polluants • Nombre d'altérations de protéines moins marqué pour <i>Carcinus maeanas</i> que pour <i>Hyas araneus</i> • ↗ du nombre de protéines altérées chez les femelles par comparaison aux mâles • Bonne discrimination entre les deux genres mais aussi entre les traitements	<i>Gomiero et al., 2006</i>
Crabe de rivage <i>Carcinus maeanas</i>	Pétrole seul Pétrole dopé aux Alkylphénols (APs) Pétrole dopé au 4-nonylphénol (4-NP)			
Morue de l'atlantique <i>Gadus morhua</i> Turbot <i>Scotphthalus maximus</i>	4-nonylphénol (4-NP) bisphenol A (BPA)	• Exposition de 3 semaines • Comparaison des mâles et des femelles	• Réponse protéique au traitement spécifique des espèces • beaucoup de protéines altérées sont communes aux deux traitements, et ce, pour chaque espèce • Quelques protéines altérées spécifiques de chaque perturbateur endocrinien • 77 % des réponses sont communes entre les mâles et les femelles chez la morue • 21% des réponses sont communes entre les mâles et les femelles chez le turbot	<i>Larsen et al., 2006</i>
Larve de <i>Chironomus riparius</i>	Cadmium (Cd)	• Exposition de 48h et 96h • Plusieurs concentrations testées: 0, 250, 750 et 1000 mg.L ⁻¹ pour 48 h d'exposition 0, 100, 200, 300, 400 mg.L ⁻¹ pour 96 h d'exposition	• Réponse protéique dépendante de la dose et du temps d'exposition • Quelques protéines altérées communes au temps d'exposition • Quelques protéines altérées communes à la dose d'exposition	<i>Lee et al., 2006</i>
Amphipode <i>Gammarus pulex</i>	PCBs coplanaires (PCB77 et PCB169)	• 144 heures d'exposition	• Différences du niveau d'expression des protéines selon le congénère, traduisant des modes d'action différents des deux congénères de PCBs.	<i>Leroy et al., 2010</i>
4 bivalves: Pétoncle <i>Chlamys nobilis</i> Palourde <i>Ruditapes philippinarum</i> Moule <i>Perna viridis</i> Huitre <i>Saccostrea cucullata</i>	Cadmium (Cd), à deux concentrations	• Exposition de 2 semaines	• Réponse protéique dépendante de la dose • Quelques spots altérés communs aux deux doses de cadmium testées 4 espèces modèles testées • Différences inter-espèces clairement observées dans l'altération des protéines	<i>Liu et al., 2012</i>
Huitre	Zinc (Zn), à plusieurs concentrations	• Exposition de 48h	• Signatures d'expression des protéines spécifiques de la concentration • Quelques signatures d'expression des protéines communes entre les concentrations	<i>Meiller et Bradley, 2002</i>
Huitre	Metaux: Plomb (Pb), Zinc (Zn), Cuivre (Cu)	• Exposition de 96h	• Il existe des signatures d'expression de protéines spécifiques de chaque métal • Il existe des signatures d'expression de protéines communes à chaque métal	<i>Muralidharan et al., 2012</i>
Amphipode <i>Hyalalella azteca</i> Amphipode <i>Diporeia spp</i>	Atrazine (ATZ) Desethylatrazine (DEA)	• Exposition de 21 jours pour <i>Diporeia spp</i> • Exposition de 42 jours pour <i>H. azteca</i> • Comparaison des sexes pour <i>Hyalalella azteca</i> exposé à ATZ • Concentration de toxique plus grande pour <i>H. azteca</i> que pour <i>Diporeia spp</i> à cause de la sensibilité plus grande de <i>Diporeia spp</i> .	• Les deux espèces ont des profils protéiques similaires après exposition à l'atrazine et à son métabolite DEA • Grandes différences dans les expressions de protéines entre les sexes, en réponse à l'ATZ: Les femelles <i>H. azteca</i> produisent un plus grand nombre de protéine différentielle par rapport au témoin que les mâles	<i>Ralston-Hooper et al., 2010</i>
Moule zébrée <i>Dreissena polymorpha</i>	Benzo(a)pyrene	• Exposition de 7 jours • Deux concentrations testées	• aucune signature d'expression de protéine ne varie identiquement entre les deux concentrations de benzo(a)pyrene	<i>Riva et al., 2011</i>
Bivalve <i>Chamaelea gallina</i>	Arachlor 1254 Cuivre (Cu) Tributyltin (TBT) Arsenic (As)	• Différentes concentrations en toxiques	• Signatures d'expression des protéines spécifiques du polluant • Certaines protéines sur-réglées sont communes à tous les traitements • Pour chaque type de polluant, il existe des protéines dont l'expression est modifiée de la même manière quelque soit la dose testée	<i>Rodriguez-Ortega et al., 2003</i>
Bivalve <i>Mytilus edulis</i>	PCB (Arachlor) Cuivre	• 7 jours d'exposition	• Les différents stressseurs produisent des réponses d'expression différentes des protéines: Mise en évidence de lots de protéines spécifiques des stressseurs.	<i>Shepard et al., 2000</i>
Bivalve <i>Mytilus edulis</i>	Cuivre	• Exposition de 24h • Différentes concentrations testées	• Il existe des signatures d'expression de protéines spécifiques à chaque dosage • Certaines expression de protéines sont communes aux trois dosages.	<i>Shepard et Bradley, 2000</i>
Crabe chinois <i>Eriocheir sinensis</i>	Cadmium (Cd)	• Exposition aiguë (500µg Cd.L ⁻¹ pendant 3 jours) • Exposition chronique (50 µg Cd.L ⁻¹ pendant 30 jours)	• Exposition aiguë et chronique au cadmium induisent des réponses différentes du niveau d'expression des protéines.	<i>Silvestre et al., 2006</i>
Ormeau <i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	Bisphénol A Phtalate de diallyl (DAP)	• Exposition de 3 mois	• Bonne discrimination des profils protéiques entre les deux traitements. • Signatures d'expression de protéine spécifique du traitement	<i>Zhou et al., 2010</i>

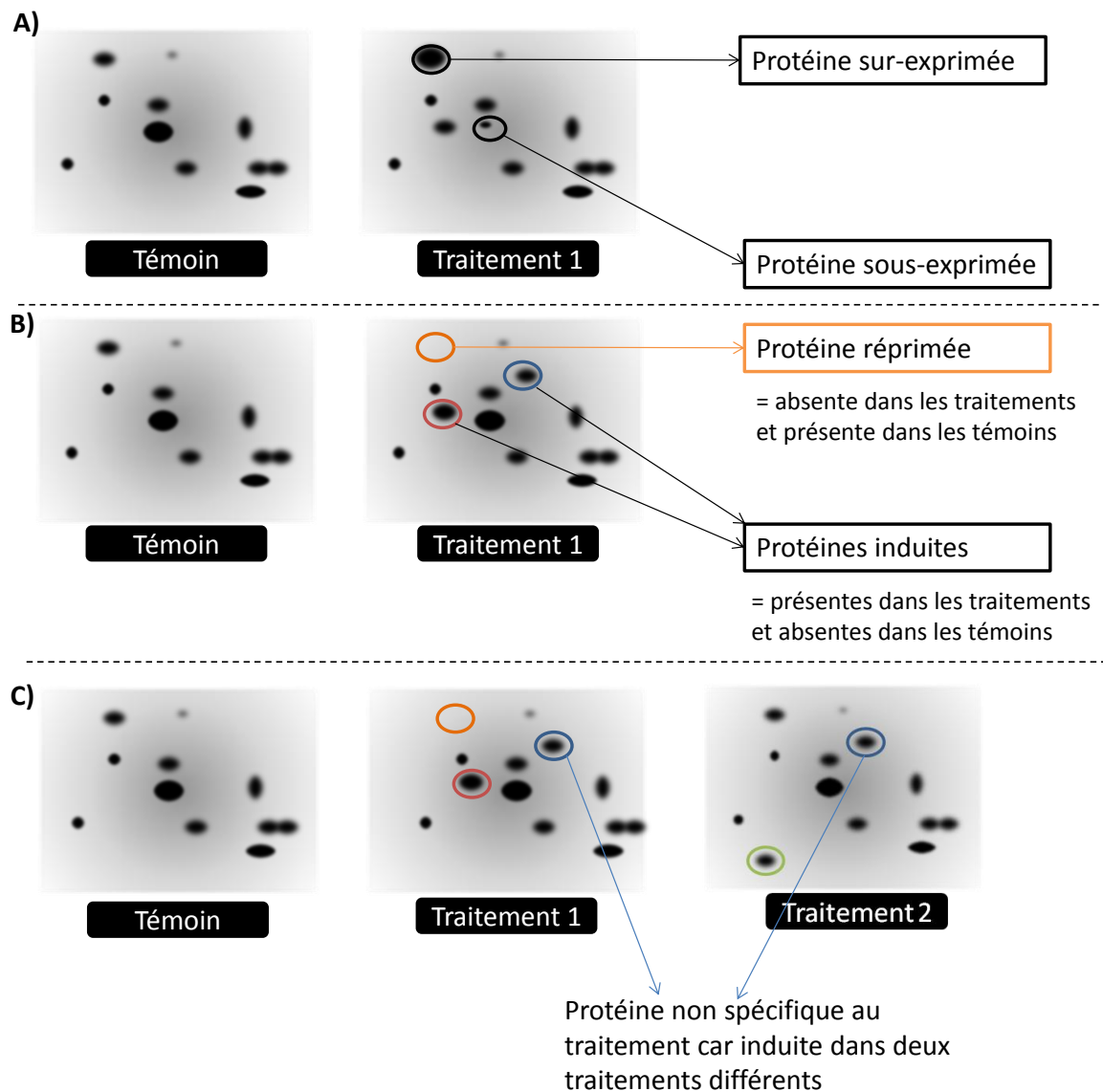


Figure I.12. Représentation schématique des gels 2D montrant des modifications d'expression des spots de protéines engendrées par un traitement particulier par comparaison à un témoin. A) Protéines sur- et sous-exprimées ; B) Protéines réprimées et induites et C) Représentation montrant que c'est la combinaison des modifications d'expression de protéines et non la modification d'une protéine singulière (pouvant être commune à plusieurs traitements) qui est spécifique de chaque traitement. Ces protéines dont l'expression est modifiée sont appelées « PES ». (d'après Shepard et Bradley., 2000).

4.2. Méthodes de quantification et d'identification des protéines

4.2.1. L'électrophorèse de gel bidimensionnelle classique (2-D GE)

La 2-D GE est la technique la plus utilisée pour permettre la caractérisation de milliers de protéines (O'Farrell, 1975; Yates, 1998; Görg et al., 2000; Lilley et al., 2002). Quelle que soit la technique de protéomique utilisée, la première étape consiste toujours en l'extraction, la solubilisation et la purification de protéines à partir d'échantillons biologiques (tissus, cellules isolées, liquides physiologiques, individus entiers) à l'aide de tampons appropriés, constitués de divers agents réducteurs, détergents, voire des solvants organiques. Lors de la 2-D GE classique, les extraits protéiques subissent deux dimensions successives (Figure I.13): l'isoélectrofocalisation (ou focalisation isoélectrique, 1^{ère} dimension) suivie de l'électrophorèse bidimensionnelle SDS -PAGE (sodium-dodécyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, 2^{ème} dimension). Ces deux dimensions assurent une séparation de 10 à 20 fois plus de protéines qu'en gel monodimensionnel 1D.

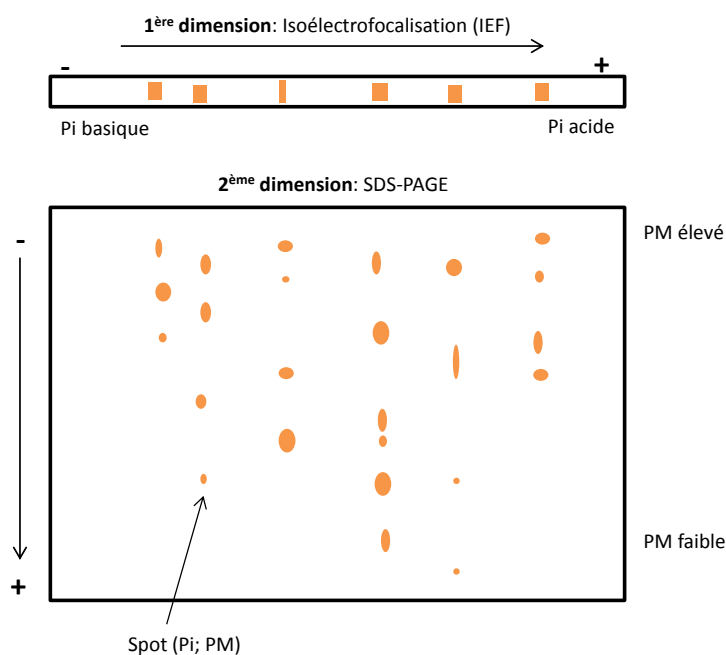


Figure I.13. Electrophorèse bidimensionnelle 2D-GE

4.2.1.1. 1^{ère} dimension : isoélectrofocalisation

Hormis les hétéroprotéines, les protéines sont généralement uniquement composées de chaînes d'acides aminés qui contribuent à la charge ionique globale. Cette charge ionique nette est différente selon les propriétés des acides aminés constitutives de la chaîne protéique et est nulle à un pH bien défini, nommé point isoélectrique (pI). Tant que leur charge n'est

pas nulle, les protéines peuvent migrer dans un champ électrique. Basée sur ces propriétés, la focalisation isoélectrique permet, sous l'influence d'un champ électrique, une première séparation des protéines en les faisant migrer sur une bandelette de polyacrylamide contenant un gradient de pH jusqu'à leur immobilisation lorsqu'elles atteignent leur pI. A l'origine, le gradient de pH était établi après la polymérisation du gel d'acrylamide dans un champ électrique de « carrier ampholyte » (CA), et dépendait de la tension appliquée sur le gel, ce qui posait des problèmes de reproductibilité (O'Farrel, 1975). Bien que cette technique soit encore utilisée, l'utilisation de gradients de pH immobilisés (IPG), au sein du gel, est largement recommandée (Hanash, 2000).

4.2.1.2. 2^{ème} dimension : Migration électrophorétique SDS PAGE

La deuxième dimension, généralement menée dans une direction perpendiculaire à la première, consiste à séparer les protéines uniquement selon leur masse moléculaire (Haynes et Yates, 2000), en déposant la bandelette de polyacrylamide le long d'un gel SDS-PAGE. Pour cela, seule la structure primaire de la protéine doit être gardée pour contrôler la densité de charge des protéines, ce qui nécessite leur dénaturation. Le sodium dodécyl-sulfate (SDS) est un puissant détergent, qui contient de nombreuses charges négatives (détergent anionique). Ce composé permet, par la dissolution des molécules hydrophobes, de dénaturer les protéines et de les recouvrir de charges négatives. Quelle que soit leur taille, les protéines dénaturées, chargées négativement, migrent toutes à la même vitesse de l'anode vers la cathode sous l'influence d'un champ électrique. L'utilisation d'un gel de polyacrylamide permet de corrélérer la vitesse de migration électrophorétique à la taille des protéines, permettant une meilleure séparation des protéines selon leurs masses moléculaires. Les protéines sont séparées par tamisage moléculaire, leur vitesse de migration étant inversement corrélée à leur taille. Les gels peuvent avoir une concentration d'acrylamide homogène ou en gradient. Les gels homogènes séparent plus finement les protéines de masses moléculaires proches alors que les gels en gradient (plus grande concentration d'acrylamide à la base du gel qu'au sommet) permettent une séparation optimale pour des protéines avec des masses moléculaires plus éloignées.

4.2.1.3. Coloration, repiquage et spectrométrie de masse

Chaque extrait protéique constitue un gel. Chaque gel est fixé pour éviter la diffusion des protéines sur le gel puis est coloré afin de visualiser la migration et les spots de protéines. Bien que la coloration par le nitrate d'argent soit la plus sensible (limite de détection 10 ng),

elle est difficile à réussir et nécessite des produits et des solvants de haute qualité. En conséquence, la coloration la plus souvent utilisée est le bleu de Coomassie, qui est moins sensible (limite de détection 100 ng) mais plus facile à mettre en œuvre. Les spots de protéines sont ensuite repiqués et identifiés. La spectrométrie de masse est la technique la plus utilisée pour permettre l'identification rapide des spots de protéines (O'Farrell, 1975; Yates, 1998; Görg et al., 2000; Lilley et al., 2002). Cette technique est très sensible et permet de déterminer précisément la masse des molécules. L'identification est réalisée à l'aide de banques de données (SwissProt, UniProt par exemple).

4.2.1.4. Inconvénients de la 2D-GE classique

La technique 2D-GE classique présente de nombreux inconvénients, liés à sa faible reproductibilité et à sa faible sensibilité pour détecter des protéines peu abondantes (Gygi et al., 2000; Rodland, 2004). Par exemple, la superposition de deux gels 2D comportant le profil protéique d'un même échantillon n'est pas systématiquement réalisable avec cette technique de séparation. Ainsi, beaucoup de gels « élémentaires » doivent être réalisés pour obtenir une image « moyennée » du gel et permettre une comparaison plus aisée entre deux ou plusieurs gels. De plus, les colorants utilisés pour visualiser les protéines sur les gels ne sont pas assez sensibles (Patton, 2002) et ne permettent de mettre en évidence que les protéines hautement abondantes dans un protéome. Pour pallier ces inconvénients, d'autres techniques couplées à la spectrométrie de masse ont été développées (Caputo et al., 2003, 2005), parmi lesquelles le marquage d'isotopes d'affinité codée (ICAT; Gygi et al., 1999b), l'exposition en gel différentiel (DifExpo; Monribot-Espagne, 2002) ou encore l'électrophorèse bidimensionnelle en gel différentiel (DiGE, Ünlü et al., 1997; Viswanathan et al., 2006).

4.2.2. Electrophorèse bidimensionnelle en gel différentiel (DiGE)

La technique DiGE (2-Dimensional Differential in-Gel Electrophoresis), tout comme la technique DifExpo, consiste en un pré-marquage séparé des extraits protéiques, avant de les mélanger et de les soumettre à une séparation électrophorétique 2D sur un même gel (Ünlü et al., 1997; Monribot-Espagne, 2002; Viswanathan et al., 2006). Le fait de faire migrer plusieurs échantillons sur un même gel contourne la nécessité d'obtenir un gel « moyenné » et augmente nettement la reproductibilité de l'opération en permettant de faire des comparaisons intra-gel. La quantification de l'expression différentielle des protéines entre les différents échantillons est simplement réalisée en comparant la différence d'intensité de marquage sur un même spot.

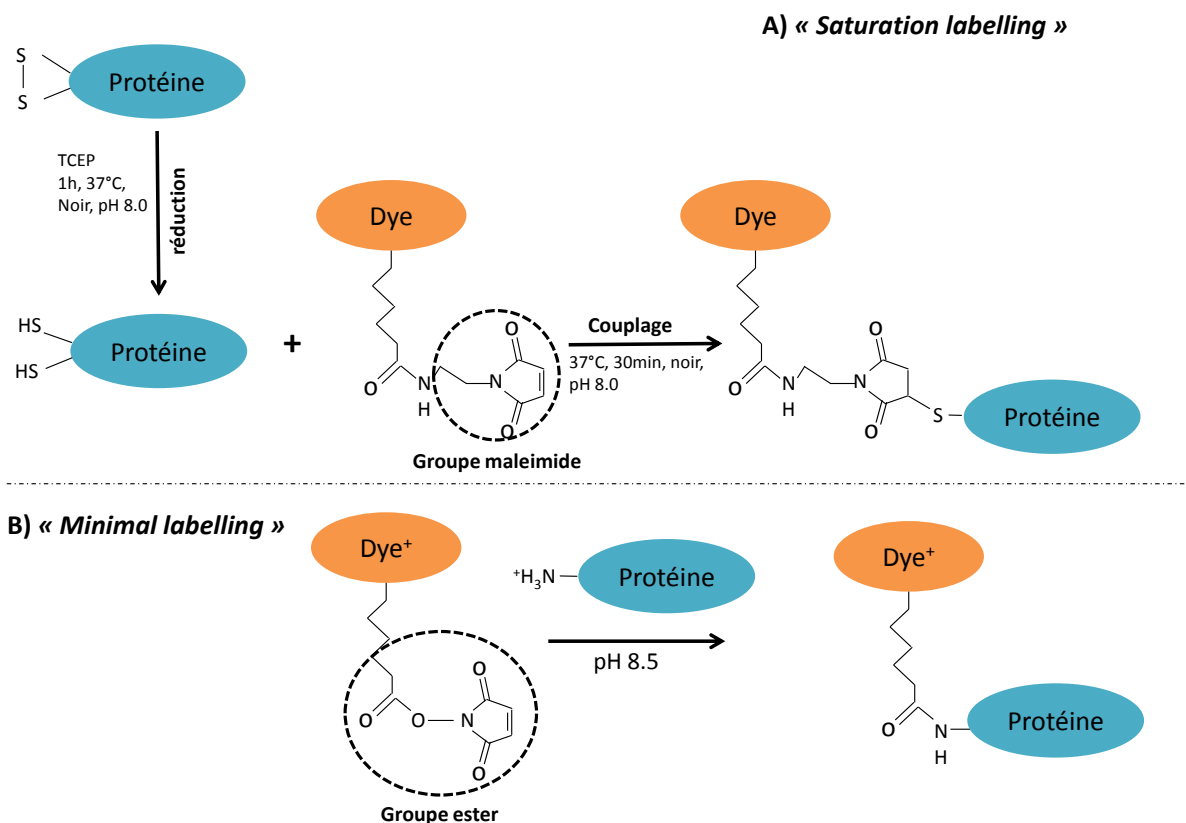


Figure I.14. Marquage d'une protéine par un marqueur fluorescent CyDye. A) Cas du marquage par saturation ou « saturation labelling ». Les protéines subissent d'abord une étape de réduction en présence de TCEP [(tris-2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride] et d'une hausse de la température. Puis, le groupement réactif maleimide de CyDye se lie aux groupements thiols des résidus cystéine de la protéine. B) Cas du marquage minimal ou « minimal labelling ». Le marqueur fluorescent est composé d'un groupe réactif ester qui se fixe aux résidus lysine d'une protéine (modifié d'après le guide Cydye DiGE- GE Healthcare Amersham).

D'un point de vue pratique, le marquage en DiGe se réalise grâce à trois cyanines fluorescentes, les CyDyes (CyDye2, CyDye5 et CyDye3), qui présentent l'avantage d'être moins dangereuses pour l'expérimentateur que les radio-isotopes utilisés dans la technique DiExpo. Les marqueurs fluorescents ou radioactifs permettent des quantifications plus sensibles que les colorants habituellement utilisés en 2D conventionnelle. Les CyDye peuvent être utilisées soit en quantité limitante ('minimal labelling') lorsque les échantillons sont abondants, soit en quantité saturante ('saturation labelling') lorsque les échantillons sont limités. Les cyanines fluorescentes ont des propriétés remarquables : (1) elles se lient avec la même affinité aux résidus protéiques, (2) elles ont la même masse et la même charge, mais

sont (3) discernables spectralement. Dans le cas du « minimal labelling », les cyanines fluorescentes se fixent aux résidus lysines des protéines alors que dans le cas du « saturation labelling », elles se fixent sur les groupements thiols des résidus cystéines des protéines etaturent toutes les cystéines (Figure I.14).

Deux extraits protéiques différents peuvent ainsi être marqués avec des sondes différentes (Cy3 et Cy5). De plus, un standard interne, constitué d'un mélange en quantité égale des protéines de tous les extraits à comparer, est marqué avec la troisième sonde fluorescente (Cy2) et est incorporé au gel (Figure I.15). Le standard interne permet une normalisation des volumes des spots entre les différents gels, pour permettre ensuite une analyse statistique fiable. Après séparation des protéines grâce à une électrophorèse 2D, les gels sont scannés aux 3 longueurs d'onde correspondant aux trois CyDye. Un logiciel (*e.g.* Decyder, SameSpot) va permettre la détection des spots présentant une différence de fluorescence entre les différentes conditions testées. Contrairement aux autres colorations visibles, il existe une relation linéaire entre la quantité de protéines présentes sur le gel et l'intensité du marquage, permettant de qualifier les protéines de sous- ou sur-exprimées et non plus seulement de décrire une simple absence ou une présence de celles-ci. Des centaines de spots peuvent ainsi être analysés simultanément et rapidement. Les spots d'intérêt sont excisés à partir d'un gel préparatif contenant tous les échantillons à analyser.

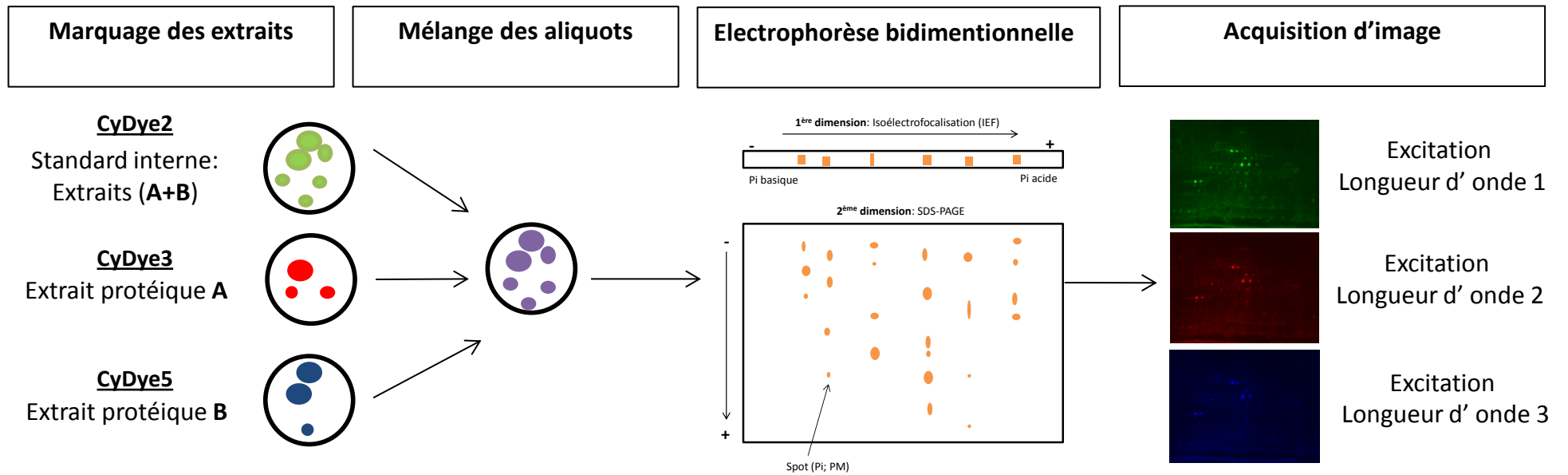


Figure 1.15. Illustration des étapes successives de la DiGE, du marquage à l'acquisition d'image.

5. Les métaux étudiés et leur toxicité

5.1. Arsenic

5.1.1. Généralités

L'arsenic (As) est un métalloïde* de nombre atomique 33, qui est largement présent dans l'environnement. Ses sources d'émission peuvent être d'origine naturelle (feux de forêt, activités volcaniques et biologiques) mais ce sont les activités anthropiques, principalement liées à l'industrie et à l'agriculture, qui contribuent le plus à sa présence dans l'environnement. Parmi ces dernières, on peut citer l'émanation de fumées provenant des industries de production d' As_2O_3 , la combustion de produits fossiles (Cullen et Reimer, 1989) mais aussi l'usage de pesticides et des herbicides arsenicaux (Bissen et Frimmel, 2003a, b; Morin et Calas, 2006). L'arsenic présent dans la croûte terrestre est retrouvé principalement dans les roches, sous forme de minerais. L'érosion des roches, le lessivage des sols, les réactions d'oxydo-réduction ainsi que les précipitations sont tout autant de phénomènes qui redistribuent l'arsenic vers les compartiments aquatiques et atmosphériques. L'arsenic est le 20^{ème} élément le plus abondant dans la croûte terrestre (Woolson, 1975) et le 14^{ème} dans l'eau de mer (Mandal et Suzuki, 2002) mais son abondance relative en eau douce n'est pas connue. Si les valeurs maximales en arsenic atteignent $65 \mu\text{g}_{\text{As}}\cdot\text{L}^{-1}$ dans les cours d'eau français (Ministère de la santé et de la protection sociale, 2003), des concentrations allant jusqu'à $3.7 \text{mg}_{\text{As}}\cdot\text{L}^{-1}$ sont retrouvées dans certains districts d'Inde (Chatterjee et al., 1995). L'arsenic existe principalement sous quatre stades d'oxydation: l'arséniate (ou arsenate, As^{V}), l'arsenite (As^{III}), l'arsenic (As^0) et l'arsine ($\text{As}^{-\text{III}}$) (Sharma et Sohn, 2009). La forme inorganique pentavalente est thermodynamiquement plus stable que la forme trivalente, laquelle est prédominante dans les milieux redox réduits seulement. Chez les humains, ces deux formes (As^{V} et As^{III}) sont inter-converties à travers des réactions d'oxydo-réduction puis sont transformées en dérivés mono- (MMA) ou di-méthylés (DMA; Vahter, 1994; 2002; Thomas et al., 2001). Cette transformation se réalise d'une part grâce à la S-adénosyl-méthionine (SAM) qui agit en tant que donneur de méthyl, et d'autre part grâce au glutathion réduit (GSH) qui agit comme co-facteur essentiel (Vahter, 1994; Gregus et Nemeti, 2007). Le même processus de spéciation de l'arsenic a été montré dans des microorganismes aquatiques du phytoplancton et des bactéries (Hanaoka et al., 1995; Francesconi et Edmonds, 1996), ce qui confère à ces organismes un rôle important dans la distribution et le cycle de l'arsenic dans le milieu aquatique. Cependant, la réalisation de ce processus de spéciation est moins évidente chez les autres organismes aquatiques, les formes inorganiques de l'arsenic étant les espèces

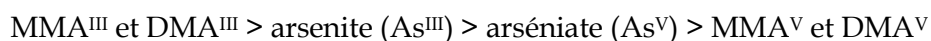
*Par soucis de simplicité, bien que l'arsenic soit un métalloïde, nous l'associerons à un métal dans la suite de ce travail de thèse

majeures retrouvées dans leur corps (Rahman et al., 2012). Chez les animaux marins, et en particulier les poissons, d'autres formes de spéciation de l'arsenic comme l'arsenobetaine (AsB) et l'arsenocholine (AcH) ont été mises en évidence (Ng, 2005; Zhang et al., 2012). Cependant, ces formes semblent absentes chez les vertébrés et invertébrés d'eau douce (Schaeffer et al., 2006; Rahman et al., 2012), montrant des différences dans la spéciation de l'arsenic dans le corps des individus d'eau douce d'une part et marins d'autre part.

5.1.2. Toxicité de l'arsenic

L'arsenic est considéré comme étant un élément ultra-trace essentiel chez certains animaux comme le rat, le poulet, ou encore les hamsters (Nielsen, 1980; Uthus, 1992). Cependant, aucun rôle essentiel ne lui a été octroyé dans un quelconque processus biochimique chez l'homme (NRC, 1999). Bien au contraire, l'agence internationale de recherche contre le cancer (IARC) a, en 1969, classé l'arsenic dans les substances cancérogènes chez l'homme.

La toxicité de l'arsenic dépend de sa spéciation, de sa biodisponibilité mais aussi de la capacité des organismes exposés à l'absorber. La forme trivalente de l'arsenic est généralement plus toxique que la forme pentavalente (Bissen and Frimmel, 2003a,b; Ventura-Lima et al., 2011). Selon de récentes études, l'ordre relatif de toxicité de l'arsenic serait le suivant (Petrick et al., 2000; Mass et al., 2001; Meharg et Hartley-Whitaker, 2002) :



Au niveau biochimique, l'arséniate peut entrer en compétition avec le phosphate dans de nombreuses réactions dont celles du métabolisme énergétique. Ainsi, l'arséniate peut inhiber la synthèse de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP). L'arsenite peut quant à lui, réagir avec le groupement thiol des protéines et inhiber leur activité (Hugues, 2002).

Les principales études rapportant des effets toxiques de l'arsenic inorganique chez les organismes aquatiques se sont jusqu'alors focalisées sur les poissons. Peu d'études existent sur les invertébrés d'eau douce (Tableau I.4). Chez les poissons et les organismes marins, la bioaccumulation des composés arsenicaux a été largement démontrée, le facteur de bioconcentration (BCF) variant entre 14 et 500. Cependant, il semblerait qu'il n'y ait pas de bioamplification de l'arsenic le long de la chaîne trophique (Woolson, 1975). Zhang et al. (2012) ont confirmé ce résultat en montrant que le taux interne d'arsenic chez les poissons

(prédateurs) était moins élevé que chez les proies (copépodes), sans que le comportement de prise alimentaire ne soit affecté.

Parmi les effets de l'arsenic chez les poissons et autres organismes marins, on peut citer une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), une hausse de la peroxydation lipidique, des dommages histologiques dans de nombreux tissus, et des effets tératogènes (Schlenk et al., 1997; Pedlar et al., 2002; Chakraborty et al., 2010). Les branchies peuvent subir des dommages histologiques, et les fonctions branchiales comme les échanges de gaz, la filtration et la respiration, peuvent être altérées chez les poissons suite à une exposition à ce métalloïde (Chakraborty et al., 2010).

Chez les invertébrés d'eau douce (Tableau I.4), certaines études ont montré que la bioaccumulation de l'arsenic n'était pas systématique, dépendant des organismes modèles étudiés (Spehar et al., 1980 ; Canivet et al., 2001). Les études montrant une accumulation de l'arsenic chez de tels organismes ont révélé (i) une corrélation positive entre bioaccumulation et concentration d'exposition (Spehar et al., 1980; Ansaldo et al., 2006; Norwood et al., 2006; Santos et al., 2007; Mogren et al., 2012); (ii) une concentration interne d'arsenic dépendant du stade de vie de l'organisme, les juvéniles accumulant plus que les adultes (Mogren et al., 2012); et (iii) une bioaccumulation dépendant de l'organisme modèle choisi (Spehar et al., 1980; Canivet et al., 2001). La mortalité est corrélée positivement avec la bioaccumulation au sein d'une même espèce. Cependant, les concentrations létales entraînant 50% de mortalité (LC50) sont, pour une même durée d'exposition, dépendantes de l'espèce considérée en lien avec son niveau de tolérance. Par exemple, Canivet et al. (2001) ont montré que les amphipodes *G. fossarum* et *Niphargus rhenorhodanensis* avaient une bioaccumulation similaire après 24h d'exposition à l'arsenic alors que la 24h-LC50 de *G. fossarum* était presque 4 fois plus faible que celle de *N. rhenorhodanensis*.

En réponse à une exposition à l'arsenic, certaines espèces induisent des métallothionéines (Bouskill et al., 2006; Santos et al., 2007) et/ou augmentent l'activité de la Na⁺/K⁺-ATPase (Bouskill et al., 2006). L'arsenic a été montré comme étant un élément capable d'engendrer des peroxydations lipidiques (Bouskill et al., 2006), une baisse de la teneur en glycogène dans différentes régions corporelles (Ansaldo et al., 2006) ainsi qu'un stress hématopoïétique chez les invertébrés d'eau douce (Chakraborty et al., 2012). De plus, des effets toxiques sur leur reproduction ont été rapportés, avec (i) une baisse du nombre d'œufs, (ii) une baisse de la survie des œufs, (iii) une hausse du temps d'incubation des œufs, et (iv) une vitellogenèse ou une spermatogenèse retardée (Ansaldo et al., 2009; Mogren et al., 2012; Yamagutchi et al., 2012). Enfin, des retards de développement ont été évoqués (Mogren et al., 2012 ; Tab.I.4.).

Tableau I.4. Etudes de laboratoire rapportant des données de toxicité des espèces inorganiques de l'arsenic sur des invertébrés d'eau douce.

Espèces	Forme de l'arsenic	Conditions expérimentales	Paramètres étudiés	Observations	Références
• Gastéropode <i>Biomphalaria glabrata</i>	Arsenite (As_2O_3)	0; 0.5; 0.1, 0.05 $mg_{As} \cdot L^{-1}$ 96h d'exposition	- Bioaccumulation - Teneur en glycogène - Différentes régions corporelles: "Céphalopédale" "Pulmonaire" "Digestive" "Gonadique"	- Correlation positive entre bioaccumulation et concentration d'exposition dans toutes les régions testées - Teneur en glycogène corrélée négativement à la bioconcentration pour les régions pulmonaire, digestive et gonadale - Pas de baisse du glycogène dans la région céphalopédale	<i>Ansaldi et al., 2006</i>
• Gastéropode <i>Biomphalaria glabrata</i>	Arsenite (As_2O_3)	0; 0.5; 0.1, 0.05 $mg_{As} \cdot L^{-1}$ 96h d'exposition	Reproduction	↘ du nombre d'œufs à toutes les concentrations d'exposition ↗ du temps d'incubation des œufs de 50% à toutes les concentrations d'exposition ↘ de la survie des œufs à la plus forte concentration d'As seulement	<i>Ansaldi et al., 2009</i>
• Isopode <i>Asellus aquaticus</i> • Moule zébrée <i>Dreissena polymorpha</i>	Arsenite de sodium ($NaAsO_2$)	[$NaAsO_2$]= 80 $\mu g \cdot L^{-1}$ - Température= 16°C 3 et 7 jours d'exposition	- Concentrations en MT - Péroxidation lipidique - Activité Na^+/K^+ ATPase	↗ de la [MT] pour <i>A. aquaticus</i> qui est significative seulement après 7 jours d'exposition - Pas d'effet sur [MT] pour <i>D. polymorpha</i> ↗ de la peroxidation lipidique pour <i>A. aquaticus</i> après 3 et 7 jours d'exposition - Pas de ↗ de peroxidation lipidique pour <i>D. polymorpha</i> - Pas d'effet sur l'activité Na^+/K^+ ATPase pour <i>A. aquaticus</i> ↗ de l'activité Na^+/K^+ ATPase pour <i>D. polymorpha</i> qui est significative seulement après 3 jours d'exposition	<i>Bouskill et al., 2006</i>
• Mollusque <i>Physa fontinalis</i> • Isopode <i>Asellus aquaticus</i> • Amphipode <i>Gammarus fossarum</i> • Amphipode <i>Niphargus rhenorhodanensis</i> • Trichoptère <i>Hydropsyche pellucidula</i> • Ephemeroptère <i>Heptagenia sulfurea</i>	Arsenite de sodium ($NaAsO_2$)	- Gamme de concentration entre 0 et 4.2 $mg \cdot L^{-1}$ - Exposition de 240h - Température constante à 12 ±2°C - pH 8.0	240h- LC50	240h-LC50 pour <i>P. fontinalis</i>: 2.2 $mg \cdot L^{-1}$ 240h- LC50 pour <i>A. aquaticus</i>: 2.31 $mg \cdot L^{-1}$ 240h-LC50 pour <i>G. fossarum</i>: 0.2 $mg \cdot L^{-1}$ 240h- LC50 pour <i>N. rhenorhodanensis</i>: 3.97 $mg \cdot L^{-1}$ 240h- LC50 pour <i>H. pellucidula</i>: 2.4 $mg \cdot L^{-1}$ 240h- LC50 pour <i>H. sulfurea</i>: 1.6 $mg \cdot L^{-1}$ - Seules 2 espèces n'ont pas bioaccumulé l'arsenic: <i>H. sulfurea</i> et <i>P. fontinalis</i> - Les deux amphipodes ont une bioaccumulation similaire (20 $\mu g \cdot g^{-1}$ de poids sec)	<i>Canivet et al., 2001</i>
• Bivalve <i>Lamellidens marginalis</i>	Arsenite de sodium ($NaAsO_2$)	- Concentrations testées: 0 et 100 $\mu g \cdot L^{-1}$ - Exposition de 240h 0; 1; 2; 3; 4; 5 ppm 30 jours d'exposition - Température constante à 26°C	- Tissu cardiaque: Activité AChE - Nombre d'hémocytes	- Inflammation et destruction du tissu cardiaque - L'exposition à l'arsenic supprime l'activité AChE ↘ du nombre d'hémocyte dans l'hémolymphe, suggérant le développement d'un stress hématopoïétique	<i>Chakraborty et al., 2012</i>
• Cladocère <i>Daphnia magna</i>	Arsenate	- Exposition de 48 h - Température constante de 20°C - pH: 6.15-7.9	48 ou 96h-LC 50	<i>D. magna</i>: 48h-LC50= 44.66 $mg \cdot L^{-1}$	<i>Fargasova, 1994</i>
• Oligochete <i>Tubifex tubifex</i>	Na_3AsO_3	- Température constante de 30°C - Exposition de 96h - pH: 7.6	96h-LC50	96h-LC50: 8.87 $mg \cdot L^{-1}$	<i>Khangarot, 1991</i>
• Larves de <i>Chironomus riparius</i>	Arsenate	0; 0.1; 2.0; 5.3; et 13 $\mu mol_{As} \cdot L^{-1}$ avec et sans ajout de phosphate (KH_2PO_4) - Exposition des des larves jusqu'à l'émergence	- Reproduction - Développement - bioconcentration - Ajout de phosphate	↘ du nombre d'œufs par masse équivalente avec la plus forte concentration d'As ↗ du temps d'émergence de deux jours en moyenne ↗ de la bioconcentration en As avec la hausse de la concentration d'exposition ↘ de la bioconcentration en As entre le stade larvaire et le stade adulte - Aucun effet d'un ajout de phosphate sur tous les paramètres étudiés	<i>Mogren et al., 2012</i>
• Amphipode <i>Hyaella azteca</i>	Arsenate de sodium ($Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$)	0; 10; 100; 1000 et 10000 $nmol_{As} \cdot L^{-1}$ - pH: 8,3 - Température constante de 25°C - Exposition de 4 semaines	- Bioaccumulation - Taux d'élimination	- Correlation positive entre la bioaccumulation et la concentration d'exposition - Pas de corrélation entre le taux d'élimination et la bioaccumulation	<i>Norwood et al., 2006</i>
• Bivalve <i>Corbicula fluminea</i>	Arsenite	0; 100; 300; 500; and 1000 $\mu g \cdot L^{-1}$. - Exposition de 7 jours	- Bioaccumulation - Induction de métallothionéines (MT)	- Les organismes exposés à 300 et 1000 accumulent plus d'As dans les tissus - Induction de MT mise en évidence dans toutes les concentrations testées	<i>Santos et al., 2007</i>

Tableau I.4 (Suite).Etudes de laboratoire rapportant des données de toxicité des espèces inorganiques de l'arsenic sur des invertébrés d'eau douce.

• Plécoptère <i>Pteronarcys dorsata</i> • Mollusque <i>Helisorna campanulata</i> • Mollusque <i>Stagnicola emarginata</i> • Amphipode <i>Gammarus pseudolimnaeus</i> • Cladocère <i>Daphnia magna</i>	Arsenite (As203), Arsenate (3As₂O₅·5H₂O) Arsenate de sodium diméthyl [(CH₃)₂AsO(ONa)](SDMA) Arsenate de disodium méthyl [CH₃AsO(ONa)₂·6H₂O] (DMSA)	• Exposition de 21 et 28 jours • Exposition à 0; 100; 1000 µg.L⁻¹ • Survie • Bioaccumulation	<i>P. dorsata</i>,<i>H. campanulata</i>,<i>S. emarginata</i>: • Pas d'effets significatif des composés arsenicaux sur la survie des individus après 28 jours d'exposition <i>G. pseudolimnaeus</i> et <i>D. magna</i>: • ∞ de 20% la survie après 7 jours d'exposition à l'arsenite, et de 100% après 14 jours • ∞ de 20 à 40 % de la survie après 28 jours d'exposition aux autres composés arsenicaux <i>D. magna</i>: Pas d'effets des composés arsenicaux sur la survie après 21 jours d'exposition <i>P. dorsata</i>: • La bioaccumulation est similaire pour toutes les expositions arsenicales à 1000 µg.L⁻¹ avec un BCF compris entre 33 et 45 après 28 jours d'exposition. <i>D. magna</i>: • Corrélation positive entre bioaccumulation et concentration d'arsenic • BCF de 50 à la plus haute concentration d'arsenite après 21 jours d'exposition • BCF de 219 à la plus faible concentration d'arsenite après 21 jours d'exposition <i>H. campanulata</i>: • L'exposition à la plus forte concentration d' arsenite provoque la plus haute bioaccumulation, avec un BCF de 83 après 28 jours d'exposition • L'exposition à la plus faible concentration d' arsenate engendre une biaccumulation de 8.8 µg.g⁻¹ de poids sec et un BCF de 99 après 28 jours d'exposition <i>S. emarginata</i>: • Accumulation similaire pour les expositions d'arsenite, d'arsenate et de DMSA à la plus forte concentration. Le BCF est de 16-17 après 28 jours d'exposition. . <i>G. pseudolimnaeus</i>: • Pas de bioaccumulation après une exposition à l'arsenate après 28 jours <i>Spehar et al., 1980</i> • Crabe <i>Somanniathelphusa pax</i> • Crabe <i>Geothelphusa dehaani</i> Arsenate Nourriture dopée en arsenate • Reproduction • Bioaccumulation Vitellogenèse retardée chez la femelle Retard de spermatogenèse chez les mâles Pas de corrélation entre développement des testicules et la bioaccumulation chez les mâles Corrélation positive entre retard de vitellogenèse et bioaccumulation dans l'hépatopancréas <i>Yamagutchi et al., 2008</i>
--	--	---	---

5.2. Le cadmium

5.2.1. Généralités

Le cadmium est un élément métallique non essentiel de transition, qui est classé parmi les 17 substances « dangereuses prioritaires » définies par la DCE selon la décision 2455/2001/EC. Le cadmium, à l'état naturel est relativement rare et est réparti uniformément dans la croûte terrestre où sa concentration varie de 0,5 à 0,20 mg.kg⁻¹ (Fleischer et al., 1974; Hiatt, 1975). Le cadmium responsable de la contamination de l'environnement résulte d'un sous-produit de la métallurgie du zinc qui est utilisé pour diverses autres applications comme par exemple pour protéger l'acier de la corrosion, pour la fabrication de batteries, pour servir de stabilisant pour les plastiques ou encore comme pigment pour les peintures. Ces diverses utilisations constituent plus de 85 % des rejets industriels de cadmium. Ces rejets étant diffus, ils constituent la première voie d'apport du métal dans les écosystèmes aquatiques. Dans les cours d'eau non impactés par l'homme, les concentrations en cadmium dissous sont généralement inférieures à 0,1 µg_{Cd}.L⁻¹. Dans les cours d'eau anthropisés, les concentrations en cadmium dissous sont largement plus élevées et peuvent même atteindre l'ordre du milligramme par litre (Topalian et al., 1999: 1.7 mg_{Cd}.L⁻¹ en Argentine; Bervoets et al., 2005: 67 µg_{Cd}.L⁻¹ en Belgique; Canadian Environmental Protection Act, 1994: > 300 µg_{Cd}.L⁻¹). De ce fait, l'utilisation du cadmium a fait l'objet de plusieurs réglementations au sein de l'UE en commençant par son interdiction dans la plupart des matières plastiques en 1992, puis des équipements électriques et électroniques en 2004. Depuis décembre 2011, et grâce à la découverte de nouveaux substituts, l'utilisation du cadmium est strictement interdite dans la totalité des matières plastiques mais aussi dans les bijoux ou encore les baguettes de brasage (Directive 76/769/EEC de l'annexe XVII du règlement de la commission européenne REACH N° 1907/2006 du 18 décembre 2006). Grâce à toutes ces restrictions et interdictions, l'usage intentionnel du cadmium est en fort déclin. Cependant, à cause de sa persistance dans l'environnement et de son utilisation importante au cours des activités industrielles passées, il semble difficile de supprimer le cadmium des masses d'eau pour satisfaire aux exigences de la Directive Cadre sur l'Eau (2000/60/CE) d'ici à l'horizon 2015.

5.2.2. Toxicité du cadmium

La toxicité du cadmium a été mise en exergue en 1955 au Japon, lors de l'accident de Toyama, plus connu sous le nom de « maladie Itai-Itai ». Les rejets massifs de cadmium dans les rivières japonaises, dont l'eau servait à l'irrigation des champs de riz, ont été responsables

de l'intoxication des populations humaines au cadmium, entraînant des insuffisances rénales, des lésions hépatiques et des problèmes osseux. Dès lors, la toxicité du cadmium a été considérée avec attention, aussi bien dans les études relatives à la santé humaine qu'en écotoxicologie.

Le cadmium sous sa forme Cd^{2+} , est, selon le modèle de l'activité de l'ion libre (FIAM ; Morel, 1983), la forme la plus biodisponible et par conséquent la plus toxique pour les êtres vivants. Les organismes aquatiques accumulent facilement le cadmium, généralement du fait de sa forte solubilité (Taylor, 1983). Les BCF sont compris entre 1636 et 23143 pour les algues, entre 396 et 17560 pour les invertébrés et entre 0,5 et 6484 pour les poissons (Bisson et al., 2011).

Chez les amphipodes, les effets du cadmium sont bien documentés (Tableau I.5). Par exemple, Sundelin (1983) a mis en évidence un impact du cadmium sur la reproduction et la croissance de *Pontoporeia affinis* exposé durant 265 jours au cadmium. Le nombre d'œufs malformés était augmenté et la mortalité des juvéniles était accentuée en présence de ce métal. Cependant, aucune différence dans le nombre d'œufs chez les femelles adultes n'a été observée et la maturation sexuelle des juvéniles était normale. D'autres travaux ont reporté des problèmes de reproduction ou de fécondité mais aussi des anomalies de développements chez d'autres espèces aquatiques exposées au cadmium, causant des problèmes au niveau populationnel (Biesinger et Christensen, 1972; Rombough et Garside, 1982; Toudal et Riisgard, 1987).

Au niveau individuel, les études ont montré que l'accumulation du cadmium était corrélée positivement à la concentration d'exposition et se réalisait principalement dans la fraction cytosolique (Abel et Bärlocher, 1988; Rainbow et White, 1989; Stuhlbacher et Matby, 1992; Felten et al., 2008; Geffard et al., 2010). Chez la plupart des organismes d'eau douce, les branchies représentent le site majeur de pénétration et de concentration des métaux (Wicklund-Glynn et al., 1994). Issartel et al. (2010) ont indiqué que le cadmium modifiait la structure des branchies et créait des dommages branchiaux chez *G. fossarum*. Au regard des fonctions des branchies (c.f. § 1.3.3.2.2), il n'est pas surprenant qu'une hausse de la concentration de cadmium puisse entraîner un impact sur l'osmorégulation (Felten et al., 2008; Issartel et al., 2010) et sur la ventilation (Felten et al., 2008; Alonso et al., 2009a) chez les gammarés. De plus, il est connu que le cadmium (Cd^{2+}) entre en compétition avec le calcium (Ca^{2+}), puisque la taille et l'état d'oxydation de ces deux ions sont similaires. En conséquence, le cadmium est capable d'interférer avec le métabolisme et le transport du calcium (Rainbow, 1995). Cette propriété accentue l'effet négatif du cadmium sur l'osmolalité de l'hémolymphe

et explique la baisse de concentration en Ca^{2+} dans l'hémolymphe de *G. pulex* exposé au cadmium (Felten et al. 2008). De surcroît, ce processus explique pourquoi un ajout de calcium chez les individus exposés au cadmium augmente leur survie (Wright et Frain, 1981). Des modifications du comportement alimentaire (Pestana et al., 2007; Felten et al., 2008) et de l'activité locomotrice (Wallace et Estephan, 2004; Felten et al., 2008; Marillo-Velarde, 2011) ont également été mises en évidence chez les amphipodes exposés au moins 24h au cadmium ; la prise de nourriture et la locomotion étant diminuées. Le cadmium peut causer chez les amphipodes une surproduction de ROS, causant des dommages cellulaires comme la lipoperoxydation (Gismondi et al., 2012b; Sornom et al., 2012) et induisant la production de protéines de stress HSP (Heat Shock Proteins; Timofeyev et al., 2008). Les réponses antitoxiques et anti-oxydantes ne sont pas toujours similaires selon les organismes testés. Par exemple, Gismondi et al. (2012b) ont mis en évidence (i) une hausse des activités GCL et de la concentration en GSH, (ii) une hausse de la concentration en MT et (iii) une baisse de la concentration en caroténoïdes chez *G. roeseli* exposé au cadmium. Ces réponses étaient toutes amplifiées avec une hausse de la concentration en cadmium. D'autres études ont plutôt montré une diminution des activités des enzymes anti-oxydantes comme la peroxydase et la catalase chez les amphipodes exposés au cadmium (Timofeyev et al. 2008), alors que l'activité de la catalase était augmentée chez le gastéropode *Hexaplex trunculus* (Romeo et al., 2006). Malgré les différents effets observés sur les systèmes de défense, il semblerait qu'une exposition au cadmium puisse entraîner une mobilisation des réserves énergétiques (lipides, glycogène), comme décrit chez *Dikerogammarus villosus* et *G. roeseli* (Sornom et al., 2012; Gismondi et al., 2012b).

Tableau I.5. Etudes de laboratoire fournissant des données de toxicité du cadmium sur des amphipodes.

Espèces	Conditions expérimentales	Paramètres étudiés	Observations	Références
<i>G. fossarum</i>	• Exposition avec ou sans nourriture	• Survie • Bioaccumulation	• ↗ de la bioaccumulation en présence de nourriture • ↗ de la bioaccumulation corrélée négativement avec la survie	<i>Abel et Bärlocher, 1988</i>
<i>G. pulex</i>	• Exposition de 48h • Température de 20°C et pH de 8.0 • [Cd]=0, 0.01, 0.03 et 0.05 mg _{Cd} .L ⁻¹	• Ventilation • Locomotion • Alimentation	• ↘ de la ventilation en présence de Cd • ↘ de la locomotion en présence de la plus haute concentration de Cd • ↘ de l'activité alimentaire en présence de la plus haute concentration de Cd	<i>Alonso et al., 2009 a</i>
<i>G. pulex</i> <i>adulte</i> <i>Juvenile</i>	• Exposition de 48h et de 96h • Température de 15°C [Cd]: 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0 mg _{Cd} .L ⁻¹ [Cd]: 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 mg _{Cd} .L ⁻¹	• 96h-LC50 • 48h-LC50	48h-LC50: • <i>G. pulex</i> : adulte: 8 mg _{Cd} .L ⁻¹ juvénile: 1.5 mg _{Cd} .L ⁻¹ • <i>G. fossarum</i> : adulte: 1 mg _{Cd} .L ⁻¹ juvénile: 0.2 mg _{Cd} .L ⁻¹	<i>Alonso et al., 2009 b</i>
<i>G. fossarum</i> <i>adulte</i> <i>Juvenile</i>	[Cd]: 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 mg _{Cd} .L ⁻¹ [Cd]: 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mg _{Cd} .L ⁻¹		96h-LC50: • <i>G. pulex</i> : adulte: 1.8 mg _{Cd} .L ⁻¹ juvénile: 0.25 mg _{Cd} .L ⁻¹ • <i>G. fossarum</i> : adulte: 0.6 mg _{Cd} .L ⁻¹ juvénile: 0.1 mg _{Cd} .L ⁻¹	
<i>G. pulex</i> <i>G. fossarum</i> <i>Dikerogammarus villosus</i>	• Exposition à 13°C • Exposition de 96 h [Cd]: 0, 5.6 et 320 µg.L ⁻¹	• 48h-LC50 • 72h-LC50 • 96h-LC50 • Effet d'une pré-exposition (gammarus prélevés sur un site contaminé (SC) ou non-contaminé (SNC))	• Pas de différences claires de la sensibilité entre les différentes espèces D. villosus (SNC): 48h-LC50: 25.7 µg _{Cd} .L ⁻¹ ; 72h-LC50: 6.3 µg _{Cd} .L ⁻¹ D. villosus (SC): 48h-LC50: 14.2 µg _{Cd} .L ⁻¹ ; 72h-LC50: 7.6 µg _{Cd} .L ⁻¹ ; 96h-LC50: 4.7 µg _{Cd} .L ⁻¹ E. berilloni: 48h-LC50: 601.9 µg _{Cd} .L ⁻¹ ; 72h-LC50: 268.1 µg _{Cd} .L ⁻¹ ; 96h-LC50: 88.9 µg _{Cd} .L ⁻¹ G. fossarum (SNC): 72h-LC50: 51.7 µg _{Cd} .L ⁻¹ ; 96h-LC50: 38.4 µg _{Cd} .L ⁻¹ G. fossarum (SC): 72h-LC50: 78.3 µg _{Cd} .L ⁻¹ ; 96h-LC50: 64.2 µg _{Cd} .L ⁻¹ G. pulex: 72h-LC50: 50.2 µg _{Cd} .L ⁻¹ ; 96h-LC50: 20.3 µg _{Cd} .L ⁻¹ G. roeseli: 72h-LC50: 29.0 µg _{Cd} .L ⁻¹ ; 96h-LC50: 8.6 µg _{Cd} .L ⁻¹ G. tigrinus: 48h-LC50: 269.8 µg _{Cd} .L ⁻¹ ; 72h-LC50: 146.5 µg _{Cd} .L ⁻¹	<i>Boets et al., 2012</i>
<i>G. pulex</i>	• Exposition de 264h • Température de 12°C [Cd]: 0, 15.8, 30.4, 122.7, 490.8, 62.5, 62.5, 250, 1000 µg _{Cd} .L ⁻¹	• Cinétique de LC50	• 96h-LC50: 82.1 µg _{Cd} .L ⁻¹ • 120h-LC50: 37.1 µg _{Cd} .L ⁻¹ • 168h-LC50: 21.6 µg _{Cd} .L ⁻¹ • 264h-LC50: 10.5 µg _{Cd} .L ⁻¹	
	• [Cd]: 0, 7.5 et 15 µg _{Cd} .L ⁻¹ • Exposition de 120 et 168 h • Température de 12°C	• Bioaccumulation • [Na ⁺], [Cl ⁻] et [Ca ²⁺] dans l' hémolymph • Activité Na ⁺ /K ⁺ -ATPase • Osmolalité totale de l'hémolymph • Ventilation (battements de pléopodes) • Locomotion • Comportement alimentaire	• ↗ de la bioaccumulation chez les individus exposés. Corrélation positive avec la mortalité et la concentration d'exposition • ↘ de [Ca ²⁺] chez les individus exposés . Corrélation négative avec la concentration d'exposition. • Pas d'effets sur [Na ⁺] et [Cl ⁻] de l'hémolymph • ↗ de l'activité Na ⁺ /K ⁺ -ATPase chez les individus exposés à 15 µg.L ⁻¹ . • ↘ de l'osmolalité de l'hémolymph chez les individus exposés • ↘ de la ventilation chez les individus exposés. Corrélation négative avec la concentration d'exposition • ↘ de la locomotion chez les individus exposés. Corrélation négative avec la concentration d'exposition. • ↘ de la prise alimentaire chez les individus exposés à 15 µg.L ⁻¹ . Corrélation négative avec la concentration d'exposition • Cd majoritairement accumulé dans les fractions cytosoliques, due probablement au processus de détoxification impliqué (MT)	<i>Felten et al., 2008</i>
<i>G. fossarum</i>	• Température de 12°C [Cd]: 0, 6.25 et 25 µg _{Cd} .L ⁻¹	• Distribution et accumulation du Cd dans les différentes fractions subcellulaires	• Corrélation positive entre concentration d'exposition et accumulation de Cd dans les différentes fractions cytosoliques • ↗ de 233 à 253 fois de la concentration interne dans les gammarus exposés au Cd par comparaison au témoin.	<i>Geffard A. et al., 2010</i>
<i>G. roeseli</i>	• Exposition de 96h [Cd]: 0, 6, 18, 54, 62, 162 µg.L ⁻¹	96h-LC50	mâles: 96h-LC50: 50 µg _{Cd} .L ⁻¹ Femelles: 96h-LC50: 107 µg _{Cd} .L ⁻¹	<i>Gismondi et al., 2012a</i>

Tableau I.5 (suite): Etudes de laboratoire fournissant des données de toxicité du cadmium sur des amphipodes.

<i>G. roeseli</i>	Exposition de 96h [Cd]: 0, 2, 8 µg.L⁻¹	Systèmes de défense anti-oxydant et anti-toxique (Activité GCL, Concentrations en GSH, MT et caroténoïde)	Activité GCL et concentration en GSH corrélées positivement à la concentration d'exposition de Cd	<i>Gismondi et al., 2012b</i>
<i>G. fossarum</i>	- Température de 12°C et pH de 7.2 - Expositions de 3 et 7 jours [Cd]: 0 et 15 µg_{Cd}.L⁻¹	- Osmorégulation - Structure branchiale/dommages observés	- Concentration en caroténoïdes corrélée négativement à la concentration d'exposition de Cd - Concentration en MT, corrélée positivement à la concentration d'exposition de Cd ↘ de l'osmolalité de l'hémolymphe chez les individus exposés - Modification de la structure branchiale, en lien avec le temps d'exposition ↗ des dommages branchiaux	<i>Issartel et al., 2010</i>
<i>G. pulex</i>	- Température de 13°C - Exposition de 48h [Cd]: 0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.10, 0.30, et 1.00 mg_{Cd}.L⁻¹	48h-LC50	Juvéniles: 48h-LC50: 0.019 mg_{Cd}.L⁻¹ Adultes: 48h-LC50: 4.7 mg_{Cd}.L⁻¹	<i>McCahon et Pascoe, 1988a</i>
<i>G. pulex</i>	"différences mâles-femelles" "effet de la reproduction"	Sensibilité	- Sensibilité mâles adultes < sensibilité femelles ovigères adultes - La tolérance des femelles est dépendante du cycle de mue mais pas du nombre d'oeufs ou de la phase de développement des œufs	<i>McCahon et Pascoe, 1988b</i>
<i>G. aequicauda</i>	Exposition de 10 jours [Cd]: 0, 0.16, 0.20, 0.24, 0.28 mg_{Cd}.L⁻¹	Rythme de l'activité locomotrice	Pas de changement dans le rythme circadien de la locomotion, la nuit étant plus propice à la locomotion que le jour.	<i>Morillo-Velarde et al., 2011</i>
<i>G. italicus</i>	Température de 8°C	96h-LC50 chez des individus mâles issus de précopulats	G. italicus: 96h-LC50: 9.1 mg _{Cd} .L ⁻¹	<i>Pantani et al., 1997</i>
<i>Echinogammarus tibaltidii</i>	Exposition de 96h	96h-LC50 et LOEC	E. tibaltidii: 96h-LC50: 1.1 mg _{Cd} .L ⁻¹	
<i>Echinogammarus meridionalis</i>	- Exposition de 48h (LC50 et LOEC) - Température de 20°C - Exposition de 6 jours (alimentation)	Alimentation	96h-LC50: 36.17 µg_{Cd}.L⁻¹ 96h- LOEC: 6.53 µg_{Cd}.L⁻¹ ↘ de la prise de nourriture chez les individus exposés. Corrélation négative entre le taux de nourriture et les concentrations sublétales de Cd (<à la LOEC).	<i>Pestana et al., 2007</i>
<i>Echinogammarus pirloti</i>	[Cd]: 0.5 µg.L⁻¹ - Exposition de 5 jours	- Bioconcentration nette (pas de nourriture) - Survie (différence mâles-femelles)	↗ de la concentration métallique interne chez les individus exposés.	<i>Rainbow et White, 1989</i>
<i>G. fossarum</i>	[Cd]: 0, 8, 16, 31, 62, 125, 250, 500, 1000, et 2000 µg.L⁻¹	Protéines de stress	- Sensibilité femelles > mâles. Plus forte mortalité chez les femelles - Après 5 jours d'exposition, induction de hsc/hsp70 avec les plus faibles concentrations de cadmium chez les femelles mais pas les mâles - Baisse de l'induction de hsc/hsp70 avec les plus fortes concentrations de Cd chez les mâles et les femelles	<i>Schill et al., 2003</i>
<i>Dikerogammarus villosus</i>	- Exposition de 4 minutes - Avec ou sans pré-exposition au Cd de 24h [Cd]: 0, 500 µg_{Cd}.L⁻¹	- Reserves énergétiques (lipides, glycogène) - Marqueur d'effet toxique (MDA) - Mobilité - Marqueur d'effet toxique (MDA) - Effet d'une pré-exposition (500 µg_{Cd}.L⁻¹)	↘ des réserves lipidiques chez les mâles et femelles ↗ des dommages cellulaires (MDA) ↗ de la mobilité ↗ des dommages cellulaires (MDA) - effet d'une pré-exposition au Cd: ↘ des réserves de glycogène chez les mâles et femelles ↗ des réserves lipidiques chez les mâles mais pas d'effet chez les femelles - Pas d'effet sur l'utilisation des refuges ↗ des dommages cellulaires (MDA)	<i>Sornom et al., 2012</i>
<i>G. pulex</i>	- Exposition aigue de 48h - Température de 15°C [Cd]: 0, 5.17; 9.87; 20.24; 50.42 µg.L⁻¹	- Concentration de MT - Bioaccumulation - Effet d'une pré-exposition de 24 h	↗ de la concentration de MT chez les individus exposés au Cd. Corrélation positive entre taux de MT et concentration d'exposition ↗ de la bioaccumulation chez les individus exposés au Cd. Corrélation positive entre bioaccumulation et concentration d'exposition - Effet d'une pré-exposition au Cd: ↗ de la tolérance suite à une pré-exposition de 20 et 200 µg_{Cd}.L⁻¹ ↗ de la concentration en MT	<i>Stuhlbacher et Maltby, 1992</i>
<i>Pontoporeia affinis</i>	Température de 2 à 6°C et pH de 7.3 à 7.7			
Expérience 1	Exposition de 265 jours [Cd]: 0, 6.3, 41, 127 µg.L⁻¹	- Mortalité - Embryogenèse (survie, croissance des œufs) - Accumulation	- Après 105 jours, mortalité plus élevée dans les expositions à 127µg.L-1 par rapport au témoin ↗ du nombre d'œufs malformés, en lien avec une hausse de la concentration en Cd - Pas de différence dans le nombre d'œufs chez les femelles exposées/ non exposées - Pas de différence de poids chez les juvéniles exposés/non-exposés - Accumulation de Cd dans les individus exposés: 150 µgCd.g-1 de poids sec chez les femelles adultes 80 à 90 µgCd.g-1 de poids sec chez les juvéniles	<i>Sundelin, 1983</i>
Expérience 2	Exposition de 460 jours [Cd]: 0, 6.5, 46 µg.L⁻¹	- Maturation sexuelle des juvéniles - Croissance des juvéniles - Survie des juvéniles	- Maturation sexuelle normale à toutes les concentrations de Cd testées - Legère perte de poids chez les femelles ↗ de la mortalité chez les juvéniles exposés au Cd.	

Tableau I.5 (suite): Etudes de laboratoire fournissant des données de toxicité du cadmium sur des amphipodes.

<i>Eulimnogammarus verrucosus</i>	• Température de 7 °C	• Hsp • enzymes anti-oxydantes (peroxydases et catalase)	• ↗ Hsp selon une relation dose-réponse pour les trois espèces	<i>Timofeyev et al., 2008</i>
<i>Eulimnogammarus cyaneus</i> <i>G. lacustris</i>	[Cd]: 0, 0.02, 0.16, 1.6 mg.L ⁻¹ pour Hsp [Cd]: 0.02 mg.L ⁻¹ pour les enzymes anti-oxydantes		• ↘ des peroxydases pour les trois espèces (significative seulement après 3 jours d'exposition) • ↘ de l'activité catalase dès 2 h d'exposition pour <i>G. lacustris</i> seulement	
<i>G. lawrencianus</i>	• Exposition de 72h • Température de 20°C [Cd]: 0, 12, 62, 125, 250, 500 µg.L ⁻¹	• Activité de nage horizontale et verticale	• ↘ de la nage horizontale aux fortes concentrations • ↘ de la nage verticale dès les plus faibles concentrations	<i>Wallace et Estephan, 2004</i>
<i>G. pulex</i>	[Cd]: 0.5mg/L-1	• 48 et 96h-LC50	• 48h-LC50: 0.68 mg_{Cd}.L⁻¹ • 96h-LC50: 0.12 mg_{Cd}.L⁻¹	<i>Wright et Frain, 1981</i>
		• Ajout de calcium • Mue	• Une ↗ de calcium entraîne une baisse de la mortalité • sensibilité des individus différente selon le stade de mue: sensibilité des individus en post -mue supérieure à ceux en inter-mue	
<i>Elasmopus rapax</i>	• Exposition de 48 et 96h [Cd]: de 0.25 à 5.5 µM	• 48 et 96h-LC50	• 48h-LC50: 4 µM • 96h-LC50: 1.6 µM • ↘ de la consommation d'O₂ après une exposition à 0.5 µM	<i>Zanders et Rojas, 1992</i>

5.3. Mélanges d'arsenic et de cadmium

La toxicité des mélanges peut être additive, mais aussi significativement plus (synergique) ou moins importante (antagonisme) que la toxicité prévue par la simple addition des effets de chacune des substances chimiques prises individuellement (Marking, 1985).

Jusqu'à présent, peu d'études se sont focalisées sur les effets conjoints du cadmium et de l'arsenic. La plupart des études traitant de telles interactions concernent principalement le domaine de la toxicologie, avec des études sur les humains et les rats essentiellement. Les travaux disponibles sur ce sujet sont toutefois contradictoires, montrant à la fois des effets toxiques antagonistes et synergiques des deux métaux, en fonction des doses métalliques testées, de la durée d'exposition, des paramètres de toxicité mesurés, des formes métalliques testées et des organismes modèles étudiés (Mahaffey and Fowler, 1977; Elsenhans et al., 1987; Diaz-Barriga et al., 1990; Yanez et al., 1991; Keith et al., 1995; Pohl et al., 2003; Fowler et al., 2004). Par exemple, Diaz-Barriga et al. (1990) ont montré que l'arsenic (sodium-arsenic) protégeait les rats des effets du cadmium (chlorure de cadmium) mais que l'inverse n'était pas vérifié. Cette conclusion était basée sur les résultats de LC50 et sur les concentrations en GSH du foie. En effet, la LC50 obtenue après exposition au mélange binaire était plus faible que celle trouvée pour l'exposition à l'arsenic seul, mais plus élevée que celle obtenue pour l'exposition au cadmium seul. De manière similaire, les concentrations de GSH du foie étaient intermédiaires dans les expositions aux mélanges binaires en comparaison de celles observées dans l'exposition aux métaux seuls, l'arsenic seul induisant de plus fortes concentrations en GSH que le cadmium. Yanez et al. (1991) ont à l'inverse montré un effet synergique d'un mélange arsenic/cadmium sur la létalité aiguë chez le rat. Dans le cœur des rats, ces auteurs ont montré une hausse de la peroxydation lipidique et de la concentration en GSH lors d'une exposition simple au cadmium ou à l'arsenic. Dans le mélange, les niveaux de peroxydation lipidique et de concentration en GSH étaient identiques à ceux du métal induisant la plus forte réponse. De plus, la concentration de MT était augmentée lors d'une exposition au cadmium seul mais pas en présence d'une exposition à l'arsenic seul. En mélange, la concentration de MT était inchangée en comparaison avec l'exposition de cadmium seule. Au contraire, Falnoga et al. (2000) ont montré une induction des MT dans le foie de la poule par les composés arsenicaux inorganiques, conduisant à une meilleure détoxification du cadmium.

D'après Mahaffey et al. (1981), aucun des deux métaux n'a eu un effet significatif sur l'accumulation de l'autre dans les reins, le foie ou le cerveau du rat mâle. A l'inverse, dans

les reins de lapin, le cadmium n'a pas eu d'effet sur l'absorption de l'arsenic alors que l'arsenic a légèrement diminué l'absorption de cadmium (Keith et al., 1995). D'autres travaux rapportent un effet antagoniste du mélange de cadmium et d'arsenic sur les paramètres de toxicité hématologiques (ex : baisse de l'hématocrite) et hépatiques (Mahaffey et Fowler, 1977; Mahaffey et al., 1981) et des effets additifs (Mahaffey et al., 1981; Elsenhans et al., 1987) voire à tendance synergique (Diaz-Barriga, 1990) sur les paramètres de toxicité rénale. Cependant, les mécanismes de telles interactions ne sont pas encore connus (Pohl et al., 2003).

Chapitre II.

Matériels et Méthodes

1. Site d'étude

Les individus de *G. pulex* ont été prélevés dans une rivière meusienne: la Méholle à Void-Vacon (France, Figure II.1).

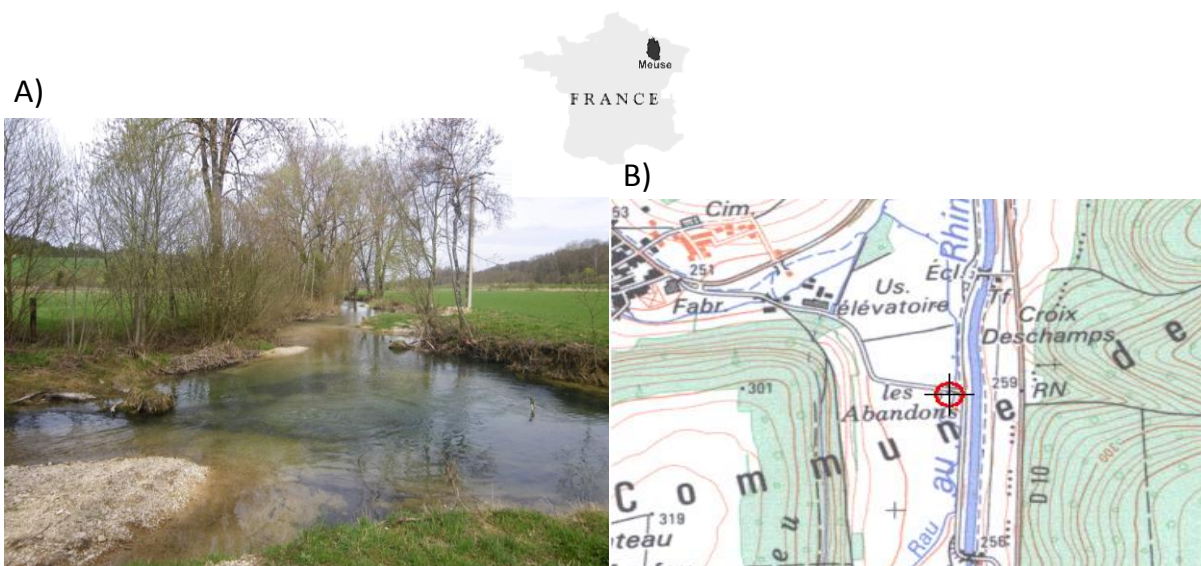


Figure II.1. La Méholle à Void-Vacon en Meuse (Source : Quentin VINCENT).

A) Photographie de la Méholle. **B)** Cartographie au 1/25000^{ème} de la Méholle à Void-Vacon (Meuse, France). La cible rouge représente les coordonnées de prélèvement des gammares [Lambert II E(X) 841244; Lambert II E(Y) 2412346].

1.1. Caractéristiques de la Méholle

La Méholle est un très petit cours d'eau mesurant 17,7 km de longueur, prenant sa source sur le territoire de la commune de Mauvages. Cette rivière draine un bassin versant de 108,3 km² sur lequel les territoires artificialisés sont quasi-inexistants. L'essentiel de la surface du bassin versant est constitué de forêts et de territoires agricoles (prairies et terres arables; Figure II.2). Le cours de la rivière est orienté vers le Nord -Est et son parcours s'effectue uniquement dans le département de la Meuse, en passant par les communes Villeroy-sur-Méholle, Sauvoy puis Void-Vacon. La Méholle conflue avec la Meuse en amont de Void-Vacon, à une dizaine de kilomètres en amont de Commercy. Le débit interannuel moyen est estimé à 1,77 m³/seconde au confluent de la Méholle et de la Meuse par l'agence de l'eau Rhin-Meuse (site internet S.I.E.R.M). La dureté de l'eau est qualifiée de « forte » et la Méholle est une rivière de première catégorie piscicole.

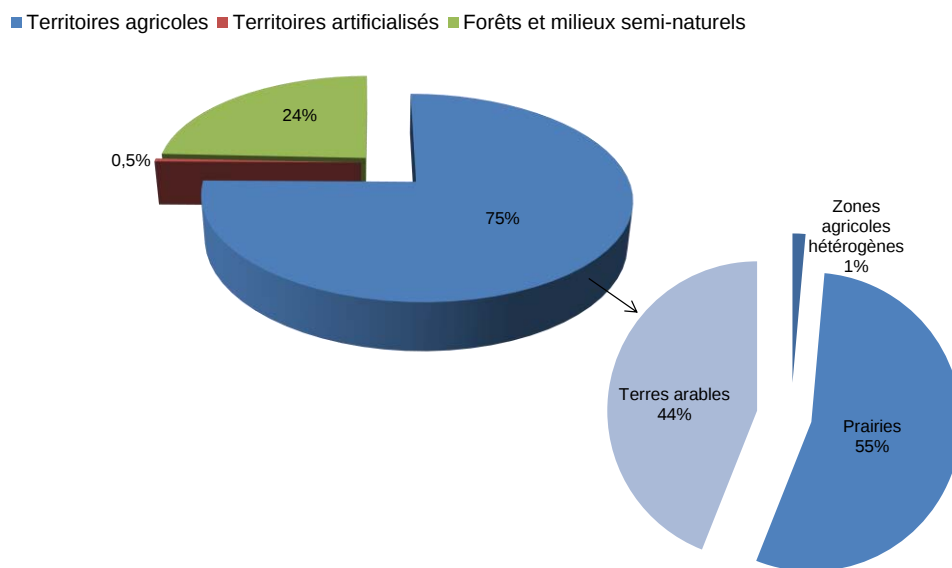


Figure II.2. Occupation des sols sur le bassin versant de la Méholle (D'après le SIERM)

1.2. Qualité écologique et chimique de la Méholle

La Méholle est une rivière considérée comme de « référence » par l'agence de l'eau Rhin-Meuse (code SANDRE 2107900). L'indice biologique global normalisé [IBGN; NF T 90-350, (1992, 2004)], basé sur la variété taxonomique des macroinvertébrés présents sur le site et sur le groupe faunistique indicateur, était de 16 en 2006 (dernière année de données disponibles du SIERM). Cette note IBGN permet de qualifier la rivière comme de « bonne qualité biologique », qui traduit une bonne qualité globale de l'eau et de l'habitat physique. L'indice biologique diatomée [IBD; NF T 90-354 (2000, 2007)] réalisé à la même période que l'IBGN était quand à lui de 18,05 (données du SIERM). Les diatomées étant particulièrement sensibles à la qualité physico-chimique de l'eau, cet indice reflète une « très bonne » qualité physico-chimique de l'eau. De 2001 à 2006, ces deux indices ont oscillé entre les classes de qualité « bonne » et « très bonne ».

La qualité générale de la Méholle était qualifiée de « bonne » à « très bonne » en 2010 et la qualité chimique (O_2 dissous, DBO_5 , DCO et NH_4^+) était considérée comme « bonne ». Le détail des données brutes ayant donné lieu à ces classes de qualité n'étant pas accessibles, nous avons effectué des prélèvements d'eau et de sédiments en avril 2010 afin d'évaluer la physico-chimie globale de la rivière et de quantifier la présence éventuelle de substances classées dangereuses prioritaires. Les échantillons ont été analysés par le laboratoire « La Drôme » à Valence. Après confrontation avec le SEQ-eau V2, les résultats obtenus ont

confirmé la bonne qualité chimique de l'eau et des sédiments et la bonne qualité physico-chimique globale de ce cours d'eau (Tableau II.1). Par la suite, des prélèvements saisonniers d'eau brute et de sédiments ont été réalisés mais seules les analyses de métaux et de physico-chimie classique ont été effectuées (Tableau II.2). A aucun moment, les résultats n'ont montré une contamination métallique ni même une quelconque perturbation physico-chimique de ce cours d'eau.

Tableau II.1. Caractéristiques physico-chimiques et dosages des substances chimiques dangereuses sur eau et sédiments de la Méholle à Void-Vacon en Avril 2010. Les classes de qualité sont représentées avec des couleurs différentes, selon le SeQ-EauV2: Bleu= « très bonne » ; Vert= « bonne » ; Jaune=« moyenne » ; Orange=« médiocre », Rouge= « mauvaise »

			eau brute		sédiments					eau brute		sédiments					eau brute		sédiments	
Paramètres physico-chimiques globaux	pH	8,20					Phtalates	Bis-2-éthylhexylphtalate	<1 (µg/L)	150 µg/kgMS			Hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP)	Anthracène	<0,01 (µg/L)	48 µg/kgMS				
	T° à la mesure du pH (°C)	21,4					Organohalogénés volatils (OHV)	Chloroforme	<0,2 (µg/L)	<5 mg/kgMS				Benzo(a)pyrène	<0,0010 (µg/L)	227 µg/kgMS				
	Conductivité à 25°C (µS/cm)	471						Dichlorométhane	<10,0 (µg/L)	<10 µg/kgMS				benzo(b)fluoranthène	<0,005 (µg/L)	200 µg/kgMS				
	conductivité à 20°C (µS/cm)	422						Dichlorométhane 1,2	<0,2 (µg/L)	<10 µg/kgMS				benzo(k)fluoranthène	<0,005 (µg/L)	82 µg/kgMS				
	MES totales (mg/L)	2,0						Trichlorobenzène 1,2,4	<0,2 (µg/L)	1893 µg/kgMS				benzo(ghi)pérylène	<0,005 (µg/L)	202 µg/kgMS				
	DCO (mg(O₂)/L)	<10						Trichloroéthylène	<0,2 (µg/L)	<5 µg/kgMS				Fluoranthène	<0,01 (µg/L)	396 µg/kgMS				
	DBO5 (mg(O₂)/L)	2,8						Tétrachloroéthylène	<0,2 (µg/L)	<5 µg/kgMS				Indéno(1,2,3-cd)pyrène	<0,01 (µg/L)	120 µg/kgMS				
	Magnésium (mg/L)							Tétrachlorure de carbone	<0,2 (µg/L)	<5 µg/kgMS				Naphtalène	<0,02 (µg/L)	<25 µg/kgMS				
	Calcium (mg/L)							Alkylphénols	Para-tert-octylphénol	<0,040 (µg/L)	<10 µg/kgMS				Alachlore	<0,040 (µg/L)	<20 µg/kgMS			
	Dureté calculée (°F)						Chloroalcanes	Chloroalcanes (C10-C13)	<10 (µg/L)	<100 µg/kgMS				Aldrine	<0,010 (µg/L)	<10 µg/kgMS				
	NH4 (mg/L)	<0,05					Organostanneux complets	Tributylétain cation	<0,013 (µg/L)	<10 µg/kgMS				Atrazine	<0,020 (µg/L)	<20 µg/kgMS				
	Chlorures (mg/L)	6,2							<0,005 (µg/L)	<5 µg/kgMS				Chlorfenvinphos	<0,020 (µg/L)	<10 µg/kgMS				
	Nitrates (mg(NO₃)/L)	13,0						PCB28	<0,005 (µg/L)	<5 µg/kgMS				Dieldrine	<0,010 (µg/L)	<5 µg/kgMS				
	Nitrites (mg(NO₂)/L)	0,03						PCB52	<0,005 (µg/L)	<5 µg/kgMS				Diuron	<0,020 (µg/L)	<50 µg/kgMS				
Phosphore total (mg(P)/L)	0,017						PCB77	<0,005 (µg/L)	<5 µg/kgMS			Endosulfan Alpha	<0,005 (µg/L)	<5 µg/kgMS						
Micropolluants minéraux	% Matières sèches totales (105°C)	59,8						PCB101	<0,005 (µg/L)	<5 µg/kgMS			Endosulfan Béta	<0,010 (µg/L)	<5 µg/kgMS					
	Hg	<0,1 (µg/L)	<0,02 mg/kgMS				PCBs	PCB105	<0,005 (µg/L)	<5 µg/kgMS			Endosulfan (somme alpha+béta)	<0,010 (µg/L)	<5 µg/kgMS					
	Zn	<2 (µg/L)	42,6 mg/kgMS					PCB118	<0,005 (µg/L)	<5 µg/kgMS			Endosulfan Sulfate	<0,010 (µg/L)	<5 µg/kgMS					
	Ag	<0,2 (µg/L)	<0,20 mg/kgMS					PCB126	<0,005 (µg/L)	<5 µg/kgMS			Endrine	<0,005 (µg/L)	<10 µg/kgMS					
	As	<0,2 (µg/L)	2,4 mg/kgMS					PCB138	<0,005 (µg/L)	<5 µg/kgMS			HCH Gamma(Lindane)	<0,010 (µg/L)	<5 µg/kgMS					
	Cd	<0,2 (µg/L)	<0,20 mg/kgMS					PCB153	<0,005 (µg/L)	<5 µg/kgMS			Hexachlorobenzène	<0,010 (µg/L)	<10 µg/kgMS					
	Cr	<0,2 (µg/L)	15,7 mg/kgMS					PCB169	<0,005 (µg/L)	<5 µg/kgMS			Isodrine	<0,010 (µg/L)	<10 µg/kgMS					
	Cu	0,5 (µg/L)	6,7 mg/kgMS					PCB180	<0,005 (µg/L)	<5 µg/kgMS			Isoproturon	<0,040 (µg/L)	<25 µg/kgMS					
	Ni	0,2 (µg/L)	103 mg/kgMS					Hydrocarbures légers	Benzène	<0,2 (µg/L)	<5 µg/kgMS			Pentachlorophénol	<0,020 (µg/L)	<50 µg/kgMS				
	Pb	<0,2 (µg/L)	8,4 mg/kgMS									Pentachlorobenzène	<0,010 (µg/L)	<5 µg/kgMS						
												Simazine	<0,020 (µg/L)	<5 µg/kgMS						
												Trifluraline	<0,020 (µg/L)	<5 µg/kgMS						

Tableau II.2. Caractéristiques physico-chimiques de la Méholle et dosage des micropolluants minéraux sur eau brute ($\mu\text{g.L}^{-1}$) et sur sédiments (mg.kg^{-1}) à différentes dates de prélèvements. *Les classes de qualité sont représentées avec des couleurs différentes, selon le SeQ-EauV2: Bleu= « très bonne » ; Vert= « bonne » ; Jaune= « moyenne » ; Orange= « médiocre », Rouge= « mauvaise ».*

		avr-10		sept-10		févr-11		mai-11		juin-11		sept-11	
		eau brute	sédiments	eau brute	sédiments	eau brute	sédiments	eau brute	sédiments	eau brute	sédiments	eau brute	sédiments
Paramètres physico-chimiques globaux	pH	8,20		7,95		8,05		7,65		7,65		7,70	
	T° à la mesure du pH (°C)	21,4		20,2		21,3		22,0		24,6		22,1	
	Conductivité à 25°C ($\mu\text{S/cm}$)	471		481		498		448		454		476	
	conductivité à 20°C ($\mu\text{S/cm}$)	422		431		446		401		407		427	
	MES totales (mg/L)	2,0		2,0		2,0		37,0		4,0		3,0	
	DCO ($\text{mg(O}_2\text{)/L}$)	<10											
	DBO5 ($\text{mg(O}_2\text{)/L}$)	2,8		<0,5		2,0		0,7		1,1		<0,5	
	Magnésium (mg/L)			4,3		4,4		4,7		5,0		5,2	
	Calcium (mg/L)			91,0		98,0		86,0		88,0		96,0	
	Dureté calculée (°F)			24,5		26,3		23,4		24,0		26,1	
	NH4 (mg/L)	<0,05		<0,05		<0,05		<0,05		<0,05		<0,05	
	Chlorures (mg/L)	6,2		8,2		8,2		5,6		6,1		7,7	
	Nitrates ($\text{mg(NO}_3\text{)/L}$)	13,0		10,0		14,0		10,0		9,2		10,0	
	Nitrites ($\text{mg(NO}_2\text{)/L}$)	0,03		<0,02		<0,02		0,09		0,03		0,02	
	Phosphore total (mg(P)/L)	0,017											
Micropolluants minéraux	% Matières sèches totales (105°C)		59,8		76,1		71,9		66,6		32,6		74,3
		<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
	Hg	<0,1 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,1 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,1 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,1 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,1 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,1 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS
			42,6		20,8		26,2		38,0		49,7		46,3
	Zn	<2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS
			<0,20		<0,2		<0,2		<0,2		<0,2		<0,2
	Ag	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS
			2,4		1,4				3,5		5,4		4,1
	As	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	2 mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS
			<0,20		<0,2		0,3		0,3		0,3		0,3
	Cd	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS
			15,7				8,7		22,9		34,2		27,1
	Cr	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	6 mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS
			6,7		0,6		2,2		6,3		8,8		9,0
	Cu	0,5 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	0,6 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	0,6 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	0,6 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	0,4 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS
			10,3		3,5		4,5		10,3		16,3		11,9
	Ni	0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	0,3 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	0,3 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS
			8,4		3,5		6,9				12,5		10,1
	Pb	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	11 mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS	<0,2 ($\mu\text{g/L}$)	mg/kgMS

2. Techniques de prélèvement et de tri de *G. Pulex*

Du fait de leur rôle écologique clé dans les écosystèmes mais aussi à leur utilisation aisée dans les études écotoxicologiques (Chapitre I, § 1.5), les crustacés amphipodes d'eau douce appartenant à l'espèce *G. pulex* ont été sélectionnés comme modèle biologique dans ce travail de thèse.

2.1. Prélèvements de *G. pulex*

Le prélèvement des individus *G. pulex* était réalisé au niveau des coordonnées lambert II (X) 841244 et (Y) 2412346 de la Méholle à Void-Vacon, rivière considérée comme de « référence ». Des substrats artificiels (balais) étaient placés dans la rivière trois semaines avant la collecte des gammarus, temps nécessaire pour permettre une bonne colonisation de ces « substrats artificiels » par les macroinvertébrés benthiques (Figure II.3). La collecte des gammarus s'est effectuée en secouant légèrement les substrats artificiels au-dessus d'un tamis. Sur la totalité des individus récupérés dans le tamis, environ 90 % d'entre eux sont des *G. pulex* comme illustré dans la Figure II.3. Le reste correspond à un mélange d'éphéméroptères, de plécoptères et de coléoptères ainsi que parfois des chabots qui ont été immédiatement relâchés dans leur milieu d'origine. Les gammarus ont, quant à eux, été placés dans des bacs de tri contenant de l'eau du site.

Préparation des substrats artificiels



Figure II.3. Illustration de la technique de prélèvement de *G. pulex* sur la Méholle à Void-Vacon à l'aide de substrats artificiels (Source des photographies: Jean-Nicolas BEISEL et Philippe WAGNER).

2.2. Tri des *G. pulex*

Pour éviter les différences de sensibilité aux métaux pouvant intervenir suivant les sexes (Sornom et al., 2008), ou entre les stades de développement (McCahon and Pascoe, 1988a), nous avons choisi de travailler avec des individus adultes mâles de taille homogène.

Ce choix a été basé essentiellement sur les deux critères suivants:

- 1) Les adultes étant de plus grande taille que les juvéniles et les mâles adultes étant généralement plus grands que les femelles adultes, l'utilisation des gammares adultes mâles rend d'une part, plus facile leur manipulation et d'autre part, cela évite (i) le prélèvement d'un nombre trop important d'individus dans le milieu naturel mais aussi (ii) l'obligation de constituer des pools d'individus dans certaines expériences faute de pouvoir récupérer une quantité de matériel biologique suffisante sur un individu donné.
- 2) Les femelles étant ovigères à certaines périodes de leur vie, leur sensibilité peut changer (McCahon and Pascoe, 1988a). En fonction de la période de prélèvement, les résultats de laboratoire auraient donc été susceptibles de varier beaucoup plus en utilisant les femelles adultes plutôt que les mâles adultes, ce qui aurait pu également rendre plus difficile des comparaisons inter-expériences pour un même paramètre d'étude.

2.2.1. Tri des tailles

Les individus de *G. pulex* étant considérés comme adultes à partir de 7-8mm, la classe de taille des individus retenus doit être supérieure à cette gamme de valeurs. La classe de taille choisie dans ce travail de thèse a été celle représentée par le plus grand nombre d'individus adultes, à savoir la gamme [9-11] mm.

Les individus ont été triés grossièrement sur le terrain en fonction de leur taille, en les plaçant sur un papier quadrillé. Pour limiter le nombre d'individus prélevés, seuls ceux ayant une taille proche de 1 cm ont été transportés au laboratoire.

Au laboratoire, les tailles des individus prélevés ont été mesurées plus précisément. Pour cela, les individus ont été placés dans une boîte de Petri munie d'un papier quadrillé et des captures d'images ont été réalisées en utilisant une loupe binoculaire pourvue d'une caméra et le logiciel Studio version 7. Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel ImageJ, Version 1.42q (Figure II.4). La première étape a consisté à définir une échelle de mesure. A partir du logiciel, une ligne a été tracée sur l'image en suivant le quadrillage de la boîte de Petri sur la plus grande longueur possible. Sachant qu'un carreau équivalait à 1 cm, la

distance de la ligne tracée était connue et pouvait être renseignée dans le logiciel. La deuxième étape a consisté à mesurer les individus. Pour cela, le logiciel a permis de tracer des segments sur le pourtour de l'individu et grâce à l'échelle de mesure préalablement entrée, la longueur totale des segments dessinés a été calculée. Tous les individus ont été mesurés de l'extrémité du céphalothorax à la base du telson.

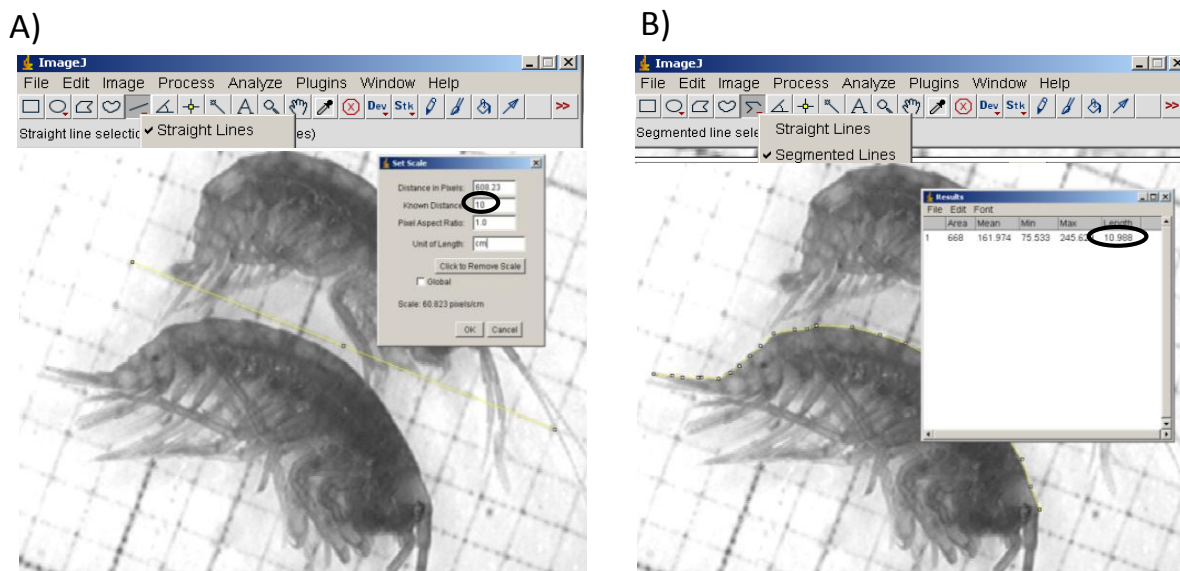


Figure II.4. Illustration des deux étapes de mesure de la taille des *G. pulex* mâles avec le logiciel ImageJ, version 1.42q. A) Première étape. La ligne (en jaune) est tracée le long de 10 carreaux, représentant une distance connue de 10 cm. La distance connue est reportée manuellement dans une boîte de dialogue du logiciel. B) Deuxième étape. Une ligne segmentée est tracée de l'extrémité antérieure du céphalothorax à l'extrémité postérieure du telson (ligne jaune) et la longueur correspondante est calculée directement par le logiciel.

2.2.2. Tri des mâles

Les mâles s'accrochant au-dessus des femelles dans les phases de gardiennage précopulatoires, ils sont aisément reconnaissables. Ainsi, en présence de précopulats, les mâles ont été triés directement sur le terrain. En absence ou lors de l'épuisement des précopulats disponibles sur le terrain, la totalité des *G. pulex* de taille homogène (≈ 10 mm) ont été transportés au laboratoire. Dans ce cas, le sexage des individus a été réalisé sous loupe binoculaire en se basant sur le dimorphisme sexuel des gnathopodes, les mâles ayant des gnathopodes plus massifs que les femelles (Costa et Costa, 1999 pour *Gammarus locusta*; Bollache et al., 2001 pour *G. pulex*; Devin et al., 2003 pour *Dikerogammarus villosus*).

2.2.3. Précautions particulières appliquées

Les individus triés ont été mis dans des bidons de 2 L contenant de l'eau du site. Les bidons ont été placés dans la rivière durant toute la durée du tri pour éviter les variations de température. De plus, l'eau des bidons a été changée régulièrement pour assurer l'oxygénation des individus.

Gismondi et al., (2012a) ont montré que la présence de parasites chez les gammarès était un facteur confondant important à considérer lors des expériences écotoxicologiques en laboratoire. En conséquence, les individus parasités n'ont pas été prélevés et ont été immédiatement relâchés dans la Méholle.

Par respect pour la faune aquatique, toutes les femelles issues des précopulats ont été immédiatement remises à l'eau. Après sexage des individus ramenés en laboratoire, les femelles ont été maintenues dans de l'eau du site, oxygénée à l'aide d'un bulleur et à une température proche de celle retrouvée dans le milieu naturel au moment du prélèvement. Les femelles ont été nourries avec des feuilles de platane jusqu'à leur relâchement sur leur rivière d'origine.

Lors du sexage en laboratoire sous loupe binoculaire, une attention particulière a été prise pour retirer les éventuels individus endommagés (antenne(s) coupée(s) ou présentant une autre anomalie anatomique éventuelle, mauvais état physiologique apparent de l'individu se traduisant par une activité locomotrice réduite et/ou des battements de pléopodes anormalement lents).

2.2.4. Transport au laboratoire

Le transport des individus prélevés a été effectué dans des bidons de 2 L remplis au 2/3 avec de l'eau du site. De plus, pour les prélèvements réalisés en été ou en printemps, les bidons ont été placés dans des glacières réfrigérées jusqu'à leur arrivée au laboratoire.

3. Conception expérimentale du protocole en laboratoire

3.1. Acclimatation des individus

Après sexage des individus, les adultes de *G. pulex* mâles ont été acclimatés durant une semaine dans des aquariums oxygénés (environ 300 gammarès par aquarium) contenant 5 L d'eau minérale (Volvic, France) sous conditions contrôlées de température et de photopériode. La température des aquariums a été maintenue à la température prévue lors des expériences (5°C, 10°C et/ ou 15°C) grâce à une chambre thermostatée. Lorsque les écarts

de température entre le milieu naturel et l'expérimentation prévue étaient importants (au moins 4-5°C), la température de la chambre thermostatée a été progressivement ramenée à la température souhaitée (1 à 2°C/jour) durant la période d'acclimatation. La photopériode a été fixée à 16h de lumière et 8h d'obscurité et a été assurée par une lumière artificielle reliée à un programmeur.

Les gammarès ont été nourris durant la période d'acclimatation jusqu'à 24 heures avant le début des expériences (temps nécessaire pour que le transit intestinal vide le tube digestif, données du laboratoire non publiées). La nourriture était constituée de feuilles de platane, préalablement trempées durant une semaine dans de l'eau Volvic, temps nécessaire au développement d'un biofilm sur les feuilles. Un renouvellement journalier de l'eau Volvic et de la nourriture a été effectué pour éviter l'accumulation de matière organique dans les aquariums et l'apparition éventuelle de composés azotés comme l'ammonium, les nitrites ou les nitrates.

3.2. Exposition des individus

Après la période d'acclimatation, des groupes de mâles de *G. pulex* ont été transférés dans des boîtes de Petri contenant de l'eau Volvic (témoin), de l'arséniate seul, du cadmium seul et/ou des mélanges d'arséniate et de cadmium. Quatre expériences d'intoxication de *G. pulex* ont été réalisées au cours de ce travail.

Selon l'expérience, la durée d'exposition a été de 96h ou de 240 heures et trois, cinq ou huit réplicats par condition testée ont été effectués. Le tableau II.3 récapitule les conditions expérimentales pour chacune de ces expériences.

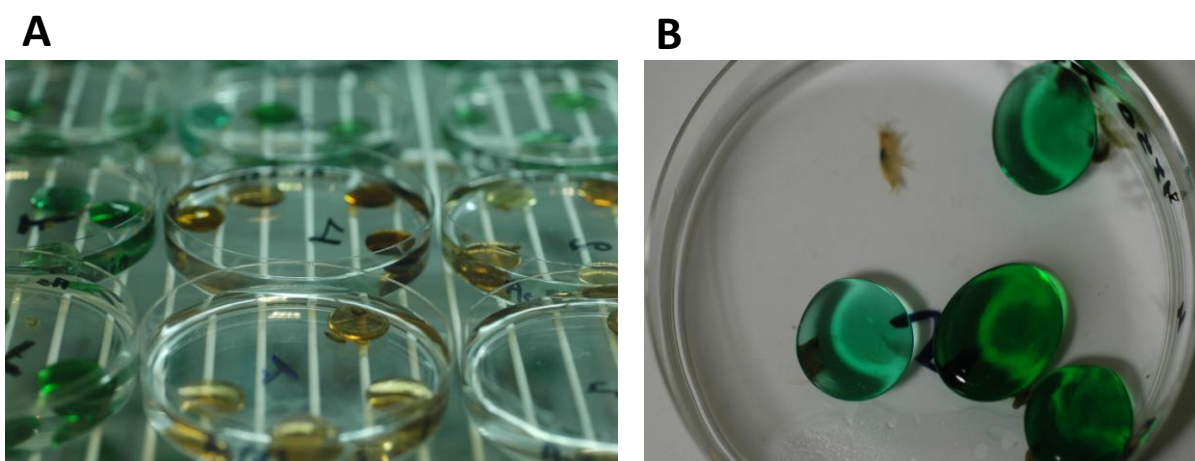


Figure II.5. Photographies des dispositifs expérimentaux. (A) Vue d'ensemble des boîtes de Petri placées dans une armoire thermostatée. (B) Vue de dessus d'une boîte de Petri contenant des gammarès, des billes de verre et une solution métallique. (Photographies: P. Wagner)

Chaque boîte de Petri contenait des billes de verre, posées du côté convexe. Ces billes de verre ont servi d'une part de substrat et d'autre part, à éviter les comportements de cannibalisme entre individus d'un même lot (Figure II.5). Le nombre de gammares par boîte de Petri, la taille des boîtes de Petri, le volume de solutions ainsi que la quantité de billes de verre étaient différents suivant les expériences mais les ratios entre ces paramètres ont été identiques quelles que soient les expériences réalisées.

*Exemple: Dans une boîte de Petri de 100*20 mm (expériences 1, 2 et 3), la superficie calculée est de 7850mm² alors qu'elle est de 16505 mm² dans une boîte de Petri de 145*20mm (expérience 4). Lorsque l'on met 10 gammares dans la première boîte, et que l'on veut garder le même ratio entre le nombre de gammares et la superficie de la boîte dans les différentes expériences, il faut mettre 23 gammares dans la deuxième boîte de Petri.*

Tout le matériel utilisé (boîtes de Petri, billes de verre, containers...) a été préalablement saturé avec la solution métallique correspondant à la situation expérimentale à laquelle chaque matériel était destiné, durant une semaine, pour atteindre un équilibre chimique et minimiser ainsi l'adsorption éventuelle des métaux sur le matériel. Durant l'intoxication, la température (5, 10 ou 15°C) et la photopériode (16h de lumière et 8h d'obscurité) ont été contrôlées, avec un renouvellement journalier de la solution pour éviter les variations de concentration métallique au cours de la période d'exposition. Le pH et les concentrations réelles des solutions ont été mesurés tous les jours (exposition de 96h) ou tous les trois jours (exposition de 240h) dans les boîtes de Petri, avant et juste après le changement journalier de solution. Les dosages ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique en flamme pour les plus fortes concentrations de cadmium (AAS Perkin Elmer AAnalyst 100, limite de détection: 20 µg_{Cd}.L⁻¹) ou d'un spectromètre d'absorption atomique en four pour l'arsenic et les plus faibles concentrations de cadmium (AAS Varian SpectrAA-330, limite de détection: 2 µg_{As}.L⁻¹ and 0.1 µg_{Cd}.L⁻¹).

Quelle que soit l'expérience réalisée, les résultats obtenus ont montré que le pH a été maintenu stable avec des valeurs avoisinant la neutralité et sa valeur était indépendante de la nature et du niveau de contamination. Des expériences préliminaires ont montré qu'il y a moins de mortalité lorsque les gammares ne sont pas nourris et que les boîtes de Petri ne comportent pas de bulleur, par comparaison aux gammares nourris et oxygénés avec un bulleur. Par conséquent, nous avons choisi de ne pas oxygéner et de ne pas nourrir les gammares au cours des expériences d'exposition, ce qui nous a permis également de limiter les matières organiques et de travailler en effets directs (*i.e.* pas de bioaccumulation liée à la nourriture).

Tableau II.3. Recapitulatif des conditions expérimentales pour chaque expérience réalisée.

		Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Expérience 4
Conditions expérimentales	Taille (mm) des boîtes de Petri (diamètre * hauteur)	100*20	100*20	100*20	145*20
	Nombre de <i>G. pulex</i> / boîte de Petri	10	10	10	23
	Volume des solutions/boîte de Petri (mL)	44	44	44	100
	Quantité de billes de verre/ boîte de Petri	4	4	4	9
	Nombre de réplicats/ concentration testée	5	5	8	3
	Température(s) d'intoxication (°C)	10	10	10	5, 10 et 15
	Photopériode (lumière/obscurité)	16h/8h	16h/8h	16h/8h	16h/8h
	Durée d'intoxication (h)	240	240	240	96
	Tailles mesurées des <i>G. pulex</i> (mm)	10,0 (±1,5)	10,8 ± (1,1)	10,2 (± 0,8)	11,0 (± 1,1)
		As0 < l.d	< l.d	< l.d	< 5
		As1: 286,5 (±10,6)	274,7 (±7,7)	376,5 (±16,0)	1213,9 (±104,9)
	Concentrations réelles d'arséniate testées (µg.L ⁻¹ ± écart-type)	As2: 519,0 (±7,1)	534,6 (±11,3)	603,9 (±6,4)	1694,6 (±120,2)
		As3: 821,0 (±2,8)	1010,5 (±41,4)		
		As4: 965,0 (±19,8)	1502,0 (±51,7)		
		As5: 1304,0 (±4,0)			
		As6: 1548,0 (±9,9)			
	Concentrations réelles de cadmium testées (µg.L ⁻¹ ± écart-type)	Cd0: < l.d	< l.d	< l.d	< l.d
		Cd1: 2,0 (±0,1)	1,9 (±0,2)	3,4 (±0,5)	26,9 (± 0,9)
		Cd2: 3,8 (±0,1)	3,7 (±0,3)	6,0 (±0,2)	51,1 (±0,8)
		Cd3: 8,0 (±0,3)	7,5 (±0,4)		
		Cd4: 14,9 (±0,5)	28,5 (±1,1)		
		Cd5: 27,0 (±1,0)			
		Cd6: 56,7 (±2,3)			
		Cd7: 106,7 (±5,0)			
		Cd8: 237,3 (±2,3)			
		Cd9: 444,0 (±12,7)			
		Cd10: 872,0 (±22,6)			
	Etude des mélanges?	NON	OUI	OUI	OUI
Mesure des paramètres de toxicité	Mortalité	OUI	OUI	OUI	OUI
	Concentrations létales (LC10,LC25,LC50 et LC75)	OUI	NON	NON	NON
Mesure des paramètres physiologiques	Bioconcentration	OUI	OUI	NON	OUI
	Pression osmotique	NON	NON	OUI	NON
	[Na ⁺] dans l' hémolymphe	NON	NON	OUI	OUI
	[Cl ⁻] dans l' hémolymphe	NON	NON	OUI	OUI
Mesure des paramètres comportementaux	Fréquence de battements des pléopodes	NON	NON	OUI	NON
	Activité locomotrice	NON	NON	OUI	NON
Mesure des capacités de défenses antitoxiques	Dosage du glutathion réduit (GSH)	NON	NON	OUI	NON
	Dosage de l'activité γ-glutamylcystéine ligase (GCL)	NON	NON	OUI	NON
	Dosage des métallothionéines (MT)	NON	NON	OUI	NON
	Dosage du malondialdéhyde (MDA)	NON	NON	OUI	NON
Réserves énergétique	Dosage du glycogène	NON	NON	OUI	NON
	Dosage des lipides	NON	NON	OUI	NON
	Dosage des protéines	NON	NON	OUI	NON
Etude du protéome	Protéomique	NON	NON	NON	OUI

3.3. Sels de métaux utilisés

Des solutions mères d'arséniate et de cadmium ont été préparées en dissolvant du chlorure de cadmium (CdCl_2 , Sigma-Aldrich, UK) et du sodium arséniate heptahydrate ($\text{AsHNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, UK) dans de l'eau milliQ. Pour éviter l'adsorption des métaux sur les récipients, ces solutions ont été stabilisées avec 0,1% de HNO_3 (65% Ultrapure, Merck). Les solutions métalliques filles, servant à l'intoxication des gammares, ont été obtenues en diluant la solution mère dans de l'eau minérale Volvic, eau très peu minéralisée ayant un pH neutre.

4. Mesure de biomarqueurs

A la fin de la période d'intoxication et selon l'expérience réalisée, différents biomarqueurs ont été mesurés sur les gammares (tableau II.3). Ce paragraphe vise à décrire de manière détaillée les différents protocoles utilisés pour chacun de ces paramètres.

4.1. Mortalité

Les individus de *G. pulex* morts ont été comptés et retirés des boîtes de Petri toutes les 24h pour éviter l'accumulation de déchets organiques mais aussi leur consommation par les gammares vivants. Lorsqu'il y avait plus de 10% de mortalité dans les témoins, une correction d'Abbott a été effectuée (Abbott, 1925).

4.1.1. Détermination des concentrations létales

La détermination des concentrations létales entraînant 10, 25, 50 et/ou 75 % de mortalité ainsi que de leur intervalle de confiance a été réalisée grâce à l'utilisation d'une macroExcel REGTOX créée par Vindimian et al. (1983), qui repose sur une procédure d'ajustement de courbe décrite par Vindimian et al. (1999) et Isnard et al. (2001).

4.1.2. Évaluation du mode d'interaction des mélanges sur la mortalité

L'évaluation du mode d'interaction des mélanges binaires sur la mortalité a été réalisée à l'aide d'un modèle prédictif créé par Kungolos et al. (1999). Ce modèle prédictif est basé sur la théorie des probabilités et est dérivé des modèles développés par Gowing (1960) et Colby (1967). La différence principale entre ces modèles réside dans l'hypothèse de base concernant l'ordre d'action des toxiques. Dans les modèles décrits par Gowing et Colby (1967), les toxiques sont considérés comme agissant « consécutivement » sur les organismes affectés

alors que dans le modèle de Kungolos, les toxiques sont considérés comme agissant « simultanément » sur les organismes affectés.

Dans ce dernier modèle, si M_1 est la mortalité [« *taux d'inhibition* » *sensu* Kungolos et al. (1999, 2009)] engendrée par une concentration donnée du produit chimique A_1 et M_2 la mortalité engendrée par une concentration donnée du produit chimique A_2 , alors la mortalité théorique prédite (M_E) suite à une exposition au mélange de ces deux produits chimiques est donnée par l'équation suivante :

$$M_E = M_1 + M_2 - M_1 M_2 / 100.$$

Suivant si la normalité de distribution des données est respectée ou non, un test t ou un test U de Mann-Whitney est ensuite réalisé pour comparer la mortalité observée (M_O) et théorique (M_E). Si M_O n'est pas significativement différent de M_E , alors le mode d'interaction est considéré comme « additif » sur la mortalité. Si M_O est significativement plus faible que M_E , alors le mode d'interaction du mélange est considéré comme « antagoniste » sur la mortalité. Enfin, si M_O est significativement plus élevée que M_E , alors le mode d'interaction du mélange est considéré comme « synergique » sur la mortalité.

4.2. Biomarqueurs physiologiques

4.2.1. Bioconcentration

Pour réaliser des dosages précis des concentrations métalliques à l'intérieur du corps des gammarès, des expériences préliminaires conduites lors de ce travail de thèse ont montré qu'il était nécessaire de travailler sur des lots de cinq *G. pulex* minimum par réplicat.

Par concentration testée, 15 gammarès vivants (5 gammarès par réplicats x 3 réplicats par concentration testée) ont été récupérés à la fin de la période d'intoxication. Après avoir été rincés dans de l'eau nanopure dans le but d'enlever toute trace de métal adsorbé à la surface de leur corps, les gammarès ont été séchés sur du papier filtre puis congelés par lot à -20°C dans des sachets zippés jusqu'à la poursuite de l'analyse. Après décongélation, chaque lot de gammaré a été placé dans un tube en polypropylène de 10 mL dont le poids vide avait préalablement été mesuré. Deux blancs (tubes ne contenant pas de gammarès) ont été réalisés en parallèle pour s'assurer d'une absence de contamination indépendante de nos analyses. Après avoir été séchés dans une étuve à 65°C durant 48 heures, les tubes ont été pesés pour évaluer le poids sec des lots de gammarès. Le matériel biologique a été digéré pendant 48 h à 65°C grâce à l'ajout de 1 mL d' HNO_3 dilué au demi (65%, suprapure,

MERCK) puis les échantillons obtenus ont été ajustés à une concentration de 2% d'HNO₃ grâce à l'ajout de 4 mL d'eau nanopure. Les tubes ont été conservés à 4°C jusqu'au dosage des métaux, réalisé à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique en flamme (AAS Perkin Elmer AAnalyst 100) ou en four (AAS Varian SpectrAA-330). Toutes les concentrations métalliques dans les tissus biologiques ont été exprimées en µg de métal par poids sec.

Le facteur de bioconcentration peut être calculé à partir de la formule suivante de Duquesne et al. (2000), elle-même dérivée de la formule de Taylor (1983):

$$(C_E - C_T) / C_W$$

avec

C_E : Moyenne des concentrations en toxiques des individus exposés

C_T : Moyenne des concentrations en toxiques des individus témoins (non exposés)

C_W : Concentration moyenne de l'eau

4.2.2. Pression osmotique et mesure de Na⁺ et Cl⁻ dans l'hémolymphe

4.2.2.1. Mesure des concentrations en Na⁺ et Cl⁻ dans l'hémolymphe.

Le prélèvement de l'hémolymphe a été réalisé selon le protocole décrit par Felten et Guerold (2004). L'hémolymphe a été prélevée à l'aide d'une microseringue de 2 µL au niveau du telson des gammarès. Avec cette méthode, un volume de 0,8 et 1,5µL d'hémolymphe a été prélevé. Avant le prélèvement, les gammarès ont été préalablement séchés à l'aide d'un papier absorbant.

L'hémolymphe a été transférée dans un microcapillaire jaugé de 5µL, puis centrifugée pendant 10 minutes à 6596 g. Le surnageant obtenu a été dilué dans 2 mL d'eau nanopure.

Les concentrations en sodium dans l'hémolymphe ont été évaluées à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique en flamme (AAS Perkin Elmer AAnalyst 100) alors que les concentrations en chlorures ont été déterminées par chromatographie ionique.

4.2.2.2. Pression osmotique totale

L'osmolalité de l'hémolymphe (en mOsm.Kg⁻¹) a été mesurée *via* un nano-osmomètre (Otago nanoliter osmometer; Otago Osmometers Ltd, Dunedin, New Zealand) en utilisant de l'eau ultrapure (0 mOsm.Kg⁻¹) et une solution étalon à 300 nOsm.Kg⁻¹. Les gammarès ont été délicatement séchés sur une feuille de papier absorbant puis une ponction d'hémolymphe a été réalisée 2 mm en arrière du céphalon à l'aide d'un microcapillaire jaugé de 5 µL modifié

(étiré à chaud). Une goutte d'hémolymphe (30 nl) a été rapidement transférée dans un des 6 puits du système Peltier contenant chacun de l'huile à forte viscosité, ceci afin d'éviter son évaporation. L'hémolymphe et les étalons ont été congelés à -20°C, puis la température a été augmentée progressivement afin de déterminer le point de décongélation des différents échantillons (en °C), ce qui a permis de calculer leur osmolalité respective, *via* les étalons.

4.3. Mesures des réserves énergétiques, des systèmes de défense antitoxiques et du malondialdéhyde (MDA)

4.3.1. Préparation de l'homogénat

Après la période d'intoxication, six répliquats, contenant 5 individus par concentration testée, ont été placés dans des microtubes de 1,5 mL résistants à la cryogénisation. Chaque lot de gammarès a été immédiatement congelé dans de l'azote liquide et conservé à -80°C jusqu'aux analyses. Puis, les échantillons ont été décongelés et pesés. Un volume de tampon d'homogénéisation équivalent à 2,5 fois le poids du tissu mouillé a été ajouté. La composition du tampon d'homogénéisation ainsi que le rôle de ses différents constituants sont indiqués dans le tableau II.4.

Tableau II.4. Composition du tampon d'homogénéisation et rôles des différents composants

Composition	Rôle
76% (v/v) tampon phosphate 50mM (K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7.6)	
2% (v/v) L-sérine borate 100mM	inhibiteur de protéases
2% (v/v) Phenylmethyl sulphonylfluoride (PMSF) 100 mM	inhibiteur de protéases
20% (v/v) phénylglyoxal 5 mM	inhibiteur de la γ -glutamyl transpeptidase qui dégrade le glutathion

Les échantillons ont été broyés manuellement à l'aide d'un potter (4 tours de potter, vortex puis 4 tours de potter). Le volume des homogénats obtenus a été réparti entre les différents dosages de défenses antitoxiques, de réserves énergétiques ou de mesure des dommages cellulaires (Figure II.6). Pour chaque dosage, deux mesures par répliquat ont été réalisées.

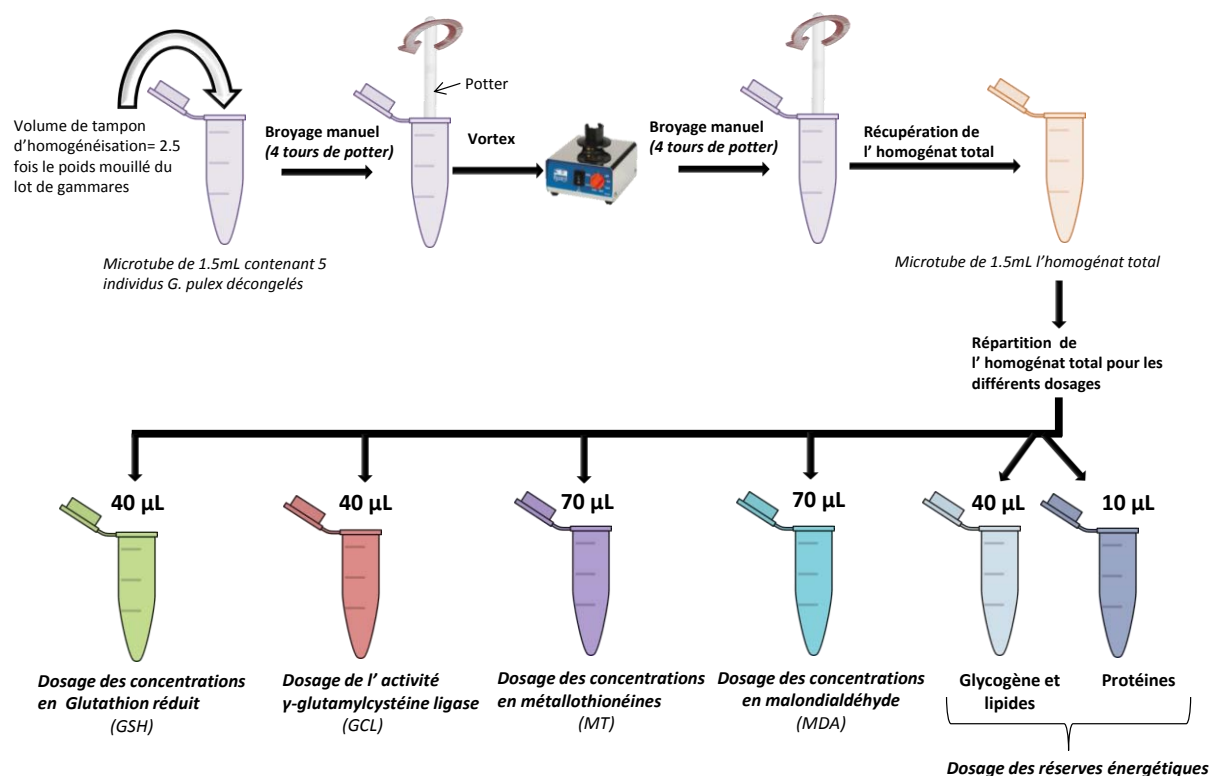


Figure II.6. Protocole de préparation de l'homogénat et répartition du volume total entre les différents dosages de défenses antitoxiques (GSH, GCL, MT), de réserves énergétiques (glycogène, lipides et protéines) ou de mesure des dommages cellulaires (MDA).

4.3.2. Dosage des réserves énergétiques

Les dosages des teneurs en lipides totaux et glycogène ont été adaptés de la méthode de Plaistow et al. (2001). Pour le dosage du glycogène et des teneurs en lipides totaux, la première partie du protocole a été commune. 20 µL de sulfate de sodium 2% (m/v) ainsi que 540 µL de chloroforme/méthanol (1:2) ont été ajoutés à 40 µL d'homogénat total. Les échantillons ont été placés dans de la glace pendant une heure puis ont été centrifugés à 3000 g pendant 10 minutes. Les culots résultant de la centrifugation ont servi à doser le glycogène alors que les surnageants ont été utilisés pour le dosage des lipides totaux.

4.3.2.1. Dosage du glycogène

Après avoir été remis en suspension dans 400 µL d'eau milliQ, les culots ont été placés dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes. Les culots ainsi dissous, 100 µL ont été transférés dans un tube en pyrex dans lequel 4,9 mL de réactif d'anthrone (1,13g d'anthrone, 630 mL d'acide sulfurique et 170 mL d'eau milliQ) ont été ajoutés. Après passage au vortex, les tubes

en pyrex ont été placés dans un bain sec à 95°C pendant 17 minutes, puis refroidis dans de la glace et repassés au vortex. L'absorbance des tubes a été lue au spectrophotomètre à 625 nm. Une gamme étalon composée de 0, 15, 30, 60, 120 et 240 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de glucose commercial a été réalisée en parallèle. L'équation de la droite étalon a permis le calcul des concentrations en glycogène contenues dans les échantillons biologiques. Les résultats obtenus ont été exprimés en $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de tissu.

4.3.2.2. Dosage des teneurs en lipides totaux

Après ajout de 100 μL de surnageant dans des tubes en pyrex, ces derniers ont été placés dans un bain sec à 95°C, sous une hotte. Afin d'évaporer la totalité des solvants, un temps d'attente de 10 minutes a été nécessaire. Puis, 200 μL d'acide sulfurique 95% ont été ajoutés dans chacun des tubes. Après un temps d'attente de 10 minutes nécessaire pour que la réaction ait lieu, les tubes ont été retirés du bain sec et ont été refroidis dans de la glace. A température ambiante, 4,8 mL de solution de phospho-vanilline (960 mg de vanilline, 160 mL d'éthanol 95% et 640 mL d'acide orthophosphorique 85%) ont été ajoutés. Après 10 minutes d'attente, les tubes ont été passés au vortex et leur absorbance a pu être lue au spectrophotomètre à 535 nm.

Une gamme étalon composée de 0, 100, 200, 400, 800 et 1600 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de cholestérol commercial a été réalisée en parallèle, l'équation de la droite étalon obtenue a permis le calcul des teneurs en lipides totaux contenues dans les échantillons biologiques. Les résultats ont été exprimés en $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$.

4.3.2.3. Dosages des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Bradford (1976). L'homogénat total a été dilué 64 fois dans une solution de NaCl 0,9% et 100 μL de l'homogénat dilué ont été transvasés dans un tube à hémolyse. Après ajout de 5 mL de Dye Reagent Quick Start Bradford suivi de 10 minutes d'attente, l'absorbance des échantillons a pu être lue à 595 nm. Une gamme étalon composée de 0, 25, 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de sérum albumine bovine a été réalisée en parallèle, l'équation de la droite étalon obtenue permettant le calcul des concentrations en protéines contenues dans les échantillons biologiques. Les résultats ont été exprimés en $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$.

4.3.3. Mesure des capacités de défenses antitoxiques

Les protocoles mentionnés ci-dessous nécessitant tous l'utilisation d'une technique de chromatographie liquide haute performance (HPLC), un petit rappel du principe de cette technique chromatographique est présentée.

L'HPLC contient une phase mobile qui, comme son nom l'indique, est liquide. Cette technique permet de séparer et d'identifier les constituants d'un mélange mais permet également leur dosage. Comme toutes les autres techniques chromatographiques, le principe de séparation est basé sur la répartition d'une substance A, appelée « analyte » entre la phase stationnaire et la phase mobile. Le temps d'élution, l'élution étant le processus par lequel les analytes sont entraînés à travers la phase stationnaire à l'aide de la phase mobile, diffère selon les affinités physico-chimiques entre les analytes et les deux phases. Plus la substance a une affinité élevée pour la phase mobile et une affinité faible pour la phase stationnaire, plus elle sera éluée rapidement. Au contraire, plus la substance aura une affinité faible pour la phase mobile et une affinité élevée pour la phase stationnaire, plus elle sera éluée lentement. Ainsi, la séparation des analytes se réalise en fonction des vitesses d'élution.

Après injection de l'échantillon dans une vanne d'injection, une pompe à haute pression permet d'entraîner les analytes par la phase mobile au travers de la colonne emprisonnant la phase stationnaire. Les analytes sont séparés au niveau de cette colonne et un détecteur permet d'émettre un signal proportionnel à la concentration de chaque analyte, en se basant sur l'absorption UV ou de fluorescence. Ce signal est transformé en chromatogramme [abondance de l'analyte dans l'échantillon=f (temps)] par un intégrateur durant toute la durée de l'analyse. Ce chromatogramme permet d'obtenir d'une part, des informations qualitatives comme le temps de rétention (durée entre l'injection de l'analyte jusqu'à son arrivée au détecteur) caractéristique de l'analyte, et d'autres part, des informations quantitatives comme la surface et la hauteur du pic chromatographique qui renseignent sur la concentration du composant au sein de l'échantillon injecté après confrontation avec une courbe d'étalonnage.

Il est important de préciser que l'optimisation de la séparation chromatographique pour les différentes analyses qui suivent a été réalisée par Eric Gismondi, au cours de son travail de thèse (2012) réalisé au sein même de notre laboratoire.

4.3.3.1. Dosage des concentrations en glutathion réduit (GSH)

Les dosages des concentrations en GSH ont été réalisés selon le protocole décrit dans le travail de thèse de Gismondi (2012), adapté à partir de Leroy et al. (1993). Les protéines contenues dans 40 μL d'homogénat total sont d'abord précipitées avec 10 % d'acide perchlorique (v/v) avant d'être centrifugées pendant 10 minutes à 20 000 g et à 4°C. Le surnageant résultant de la centrifugation est dilué au 1/40^{ème} dans de l'acide chlorhydrique 0,1 M puis 200 μL de surnageant ainsi dilués sont injectés dans l'HPLC et élués pendant 13 minutes selon les conditions présentées dans le tableau II.5.

Une gamme étalon composée de 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 et 10,0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de GSH commercial est réalisée en parallèle, permettant de définir le temps de rétention du glutathion et de calculer les concentrations en glutathion réduit des échantillons biologiques. Les résultats sont exprimés en $\text{nmol}_{\text{GSH}}.\text{mg}_{\text{protéines}}^{-1}$.

Tableau II.5. Conditions expérimentales des analyses par HPLC (Source: Thèse de Gismondi, 2012)

	Phase mobile (1L) / Débit	Colonne	Four à colonne	Pompe post-colonne	Détecteur
SH CL	Tampon phosphate pH 2,5 + 7% acétonitrile + 37,2 mg de NaEDTA + 130 mg de <i>n</i> -décylsodium sulfate Débit: 1mL/min	LiChrospher RP-18 125x40 mm, 5 μm	20°C	Solution d' <i>ortho</i> -phthalaldéhyde en dérivation Débit: 0,7mL/min	Fluorescence $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$
DA	Tampon phosphate pH 6,5 + 25% d'éthanol 96% + 87 mg de TDTMAD Débit: 0,8mL/min	Lichrospher RP-18 250x40 mm, 5 μm	25°C	-	UV $\lambda = 267 \text{ nm}$
IT	<u>Solution A</u> : 0,1% TFA dans acétonitrile <u>Solution B</u> : 0,1% TFA dans eau ultrapure Débit: 1mL/min	Lichrospher RP-18 250x40 mm, 5 μm	20°C	-	Fluorescence $\lambda_{\text{ex}} = 382 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$

4.3.3.2. Dosage de l'activité γ -glutamylcystéine ligase (GCL)

L'activité GCL a été mesurée selon le protocole décrit dans le travail de thèse de Gismondi (2012), adapté de la méthode de Parmentier et al. (1998).

Le principe du dosage est de mesurer la quantité de glutamylcystéine (GC) formée à partir d'acide glutamique et de cystéine grâce à la γ -glutamylcystéine ligase et en présence d'ATP.

Une première centrifugation de 15 minutes à 500 g et à 4°C a été réalisée sur 40 μL d'homogénat total. Le surnageant obtenu, a été centrifugé pendant 30 minutes à 12 000 g et à

4°C et le surnageant contenant la fraction S12000 a été récupéré. Une dilution au 1/20^{ème} de la fraction S12000 ainsi obtenue a été réalisée dans du tampon d'homogénéisation (Tableau II.6). Des mélanges contenant 40 µL de cette fraction diluée et 112 µL de cocktail d'incubation (cf. tableau II.6) ont été réalisés dans des microtubes placés à 25°C. Après 20 minutes, la réaction a été stoppée par une dilution au quart grâce à l'ajout d'acide chlorhydrique 0,1 M. Puis, 200 µL de l'échantillon ainsi dilué ont été injectés dans le système HPLC et élués pendant 13 minutes dans les conditions expérimentales mentionnées dans le tableau II.5.

Tableau II.6. Composition du cocktail d'incubation utilisé pour le dosage de l'activité γ -glutamylcystéine ligase.

Réactifs	Volume (µL)
Acide glutamique 45mM	80
Cystéine 90mM	15
ATP 90mM	15
Phénylglyoxal 5mM	2,5
<i>volume final</i>	<i>112,5</i>

Une gamme étalon composée de 0; 0,625; 1,5; 2,5; 5,0 et 10,0 µM de GC commercial a permis de définir le temps de rétention de la GC et de calculer les concentrations de GC dans les échantillons biologiques. Les résultats sont exprimés en $\text{nmol}_{\text{GC formées}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{protéines}}^{-1}$.

4.3.3.3. Dosage des concentrations en métallothionéines (MT)

Les concentrations en MT sont dosées par une méthode de HPLC décrite dans la thèse de Gismondi (2012) et adaptée d'Alhama et al. (2006).

70 µL d'homogénat total ont été centrifugés pendant 10 minutes à 3500 g et à 4°C. Le surnageant a été récupéré puis centrifugé pendant 30 minutes à 22000 g et à 4°C. Le surnageant de cette deuxième centrifugation représente la fraction S22000. Ce dernier a été dilué 20 fois dans du tampon d'homogénéisation (Tableau II.4) et 125 µL de la fraction S22000 ont été transvasés dans un microtube. Après ajout de 108 µL de tampon d'incubation (Tableau II.7), les microtubes ont été incubés à 70°C pendant 20 minutes. Le SDS contenu dans le cocktail d'incubation permet la dénaturation de la protéine et le DTT permet la réduction de ses groupements thiols.

Tableau II.7. Composition du cocktail d'incubation utilisé pour le dosage des métallothionéines.

Réactifs	Volume (µL)
Tris 230mM pH 9,5	30
DTT 300mM	10
EDTA 100mM pH 7	5
SDS 10%	63

Une fois les MT dénaturées, ces dernières ont été marquées. Pour cela, 17 µL de monobromobimane 180 mM (mBBr) ont été ajoutés dans les échantillons. Ces derniers ont été immédiatement placés dans l'obscurité pendant 15 minutes, temps nécessaire à ce que le mBBr réagisse avec les fonctions thiols et permette le marquage des MT et donc leur détection. Puis, 200 µL d'échantillon ont été injectés dans le système HPLC et ont été élués pendant 30 minutes dans les conditions expérimentales présentées dans le tableau II.5.

Une gamme étalon composée de 0; 0,625; 1,5; 2,5 et 5µM de MT de foie de lapin a été réalisée, permettant de définir le temps de rétention de la MT et de calculer les concentrations en MT qui sont exprimées en $\text{nmol}_{\text{MT}} \cdot \text{mg}_{\text{protéines}}^{-1}$.

4.3.4. Peroxydation lipidique

Les dosages du MDA permettent d'estimer la cytotoxicité à travers la peroxydation lipidique. Le MDA a été dosé par une méthode de HPLC décrite dans la thèse de Gismondi (2012) et adaptée de Behrens et Madère (1991). Les protéines contenues dans 70 µL d'homogénat total ont été précipitées en présence de 210 µL d'éthanol 95% pendant 1 heure 30 dans de la glace. Après 30 minutes de centrifugation à 18 000 g et à 4°C, 100 µL de surnageant ont été injectés dans le système HPLC et ont été élués pendant 35 minutes dans les conditions expérimentales présentées dans le tableau II.5.

Une gamme étalon composée de 0; 0,125; 0,25; 0,5 et 1,0 µM de 1,1,3,3-tétrahydroxypropane et hydrolysée 2 heures à l'obscurité a permis de calculer le temps de rétention du MDA et les concentrations de MDA dans les échantillons biologiques qui sont exprimées en $\text{nmol}_{\text{MDA}} / \text{mg}_{\text{lipides}}^{-1}$.

4.4. Biomarqueurs comportementaux

4.4.1. Activité ventilatoire

Les fréquences de battements des pléopodes chez le gammare ont été mesurées selon deux approches. La première, plus précise et plus robuste, présente un inconvénient majeur lié à son temps d'analyse important. La deuxième, moins robuste, présente l'avantage d'être plus rapide. Puisque les fréquences de battements des pléopodes suivent un rythme circadien (Rosas et al., 1992; Maciel et al., 2004), la mesure de ce paramètre devait être réalisée le plus rapidement possible, au même moment de la journée. La première méthode a été utilisée pour les deux premières expériences (tableau II.3). Cependant, lors de l'expérience 2, de trop grands écarts de temps entre l'analyse du premier individu et celle du dernier individu ont rendu les résultats incohérents et inexploitable. Par la suite, seule la deuxième méthode a été utilisée puisque le nombre de gammarès à analyser était aussi important et que d'autres biomarqueurs devaient être réalisés simultanément (expériences 3 et 4 du tableau II.3).

Méthode 1 (correspondante à l'expérience 1)

Cinq *G. pulex* de chaque condition testée ont été placés individuellement dans une coupelle ($\varnothing = 3.8$ cm; hauteur = 1.7 cm) contenant 5 mL de solution issue de leur précédente unité expérimentale. Après 2h d'acclimatation à la température de l'expérience (10°C), chaque coupelle a été placée sous une loupe binoculaire contenant une lumière rouge. Après une nouvelle acclimatation de 3 minutes, le comptage des mouvements de pléopodes a été réalisé. Celui-ci a été effectué durant 1 minute à l'aide d'un compteur manuel mais seulement lorsque l'animal était immobile pour éviter toute interprétation erronée liée à une hyperventilation lors du déplacement de l'individu. Trois mesures ont été réalisées par gammare (soit $n = 15$ par condition testée) et les résultats ont été exprimés en nombre de battements. min^{-1} . Cette méthode est adaptée du protocole utilisé par Wijnhoven et al. (2003).

Méthode 2 (correspondante aux expériences 3 et 4)

Contrairement à la première méthode, les gammarès n'ont pas été transférés dans une coupelle, le comptage étant réalisé directement dans les boîtes de Petri servant à l'intoxication. A la fin de l'intoxication, les boîtes de Petri ont été placées sous une loupe binoculaire. Le comptage des battements de pléopodes a été effectué à l'aide d'un compteur manuel durant 1 minute sur 10 individus, un seul réplicat étant réalisé par individu ($n = 10$ par condition testée). Cette méthode permet donc de réduire les temps d'acclimatation et d'analyses.

4.4.2. Activité locomotrice

Dix individus de *G. pulex* ont été placés dans un bac de 800 mL contenant de l'eau Volvic. Un morceau de filet a été placé au fond du bac pour fournir une surface de repos aux gammarès. Le nombre d'individus en mouvement a été compté 35 fois sur une période de 2 s. Pour ne pas influencer l'activité locomotrice des individus, les expériences ont été effectuées sous une lumière constante et à l'abri du bruit.

5. Méthodes d'analyses protéomiques différentielles (DiGE)

Les analyses protéomiques différentielles (DiGE-Differential Gel Electrophoresis) ont été réalisées suite à l'expérience 4 (Tableau II.3) sur *G. pulex* exposés à 5°C, 10°C et 15°C pour les conditions métalliques suivantes :

- Eau Volvic (individus témoins)
- Arséniate seul à deux concentrations (conditions As1 et As2)
- Cadmium seul (condition Cd1)
- Mélange d'arséniate et de cadmium (Condition As1Cd1)

Cinq réplicats correspondant à 5 gammarès par condition testée ont été réalisés.

Cette partie vise à décrire le protocole détaillé d'électrophorèse bidimensionnelle de type DiGE, de la préparation des échantillons à l'identification des protéines (Figure II.7).

5.1. Préparation des échantillons

5.1.1. Dissection du gammaré

La dissection du gammaré a été réalisée dans une solution physiologique qui possède la même osmolarité que les principaux fluides corporels (en particulier l'hémolymphe), permettant ainsi de maintenir l'homéostasie des tissus de l'organisme. La solution physiologique utilisée est le liquide de Ringer « Crustacés » (Van Harreveld, 1936), préparé en pesant 12g de NaCl (205,3mM); 0,4g de KCl (5,37mM); 1,5g de CaCl₂ (13,55mM); 0,25g MgCl₂ (2,61mM) et 0,2g NaHCO₃ (2,38mM) et en complétant jusqu'à 1L avec de l'eau déminéralisée. Après autoclavage et refroidissement, le liquide de Ringer « Crustacés » obtenu a été filtré sur une membrane de 0,2 µm puis conservé à 4°C. La tête du gammaré, encore vivant, a été rapidement décapitée à l'aide d'une pince de dissection. Le troisième pléomère a été coupé du côté des uropodes afin de retirer l'intestin, contenant de nombreuses protéases. Les coecums provenant de l'intestin, le corps dépourvu d'intestin

ainsi que la tête ont été récupérés, placés dans un tube eppendorf de 1,5mL et congelés à -80°C jusqu'à extraction des protéines. Cinq réplicats ont été réalisés pour chacune des conditions testées.

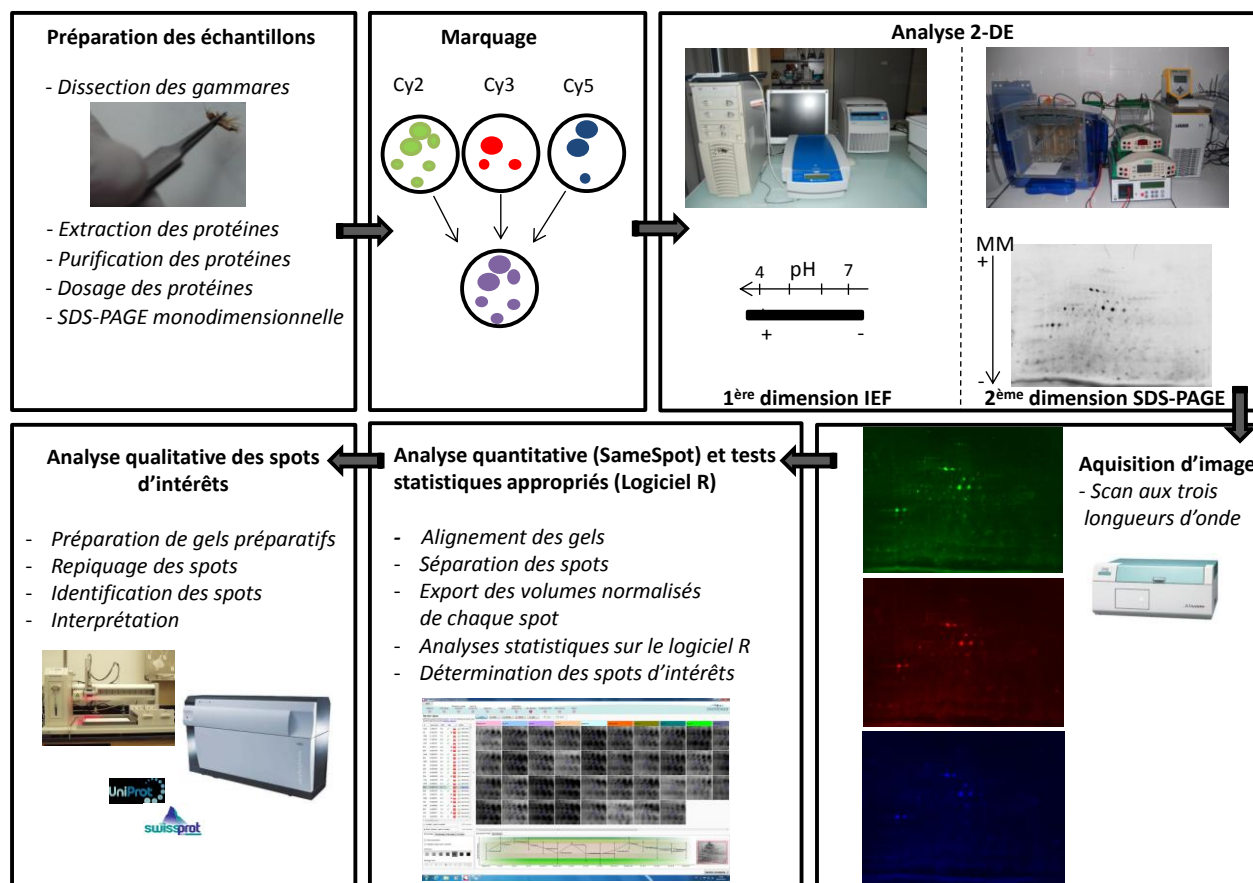


Figure II.7. Vue d'ensemble du protocole de protéomique en DiGE utilisé, de la préparation des échantillons à l'identification des protéines.

5.1.2 Extraction des protéines

Tableau II.8. Composition du tampon d'extraction

Composition	Réactif utilisé (Référence, nom du fournisseur)
8 M Urée	PlusOne Urea (réf 17-1319-01, VWR)
2 M Thiourée	PlusOne Thiourea (réf 25-9000-65, VWR)
4 % (p/v) CHAPS	PlusOne CHAPS (réf 17-1314-01, VWR)
2,3 Tris 1,5M	PlusOne Tris (réf 17-1321-01, VWR)
Inhibiteurs de protéases	mini-EDTA complete 10X (réf 11836170001, Diagnostics Division Applied Sciences) (ATTENTION: à ajouter extemporanément)

Tout au long du protocole présenté, les échantillons ont été replacés dans la glace dès que possible pour réduire les effets des protéases. Chaque échantillon a été solubilisé avec 50 µL de tampon d'extraction dont la composition est mentionnée dans le Tableau II.8. Après ajout

du même volume de billes de verre de taille 0,5 mm, l'échantillon a été broyé manuellement à l'aide d'un potter, puis mécaniquement pendant 40s à 30Hz/s en prenant soin de refroidir au préalable les portoirs du broyeur dans de la glace (Figure II.8). Si nécessaire, cette étape de broyage a été renouvelée. Afin de récupérer l'extrait protéique exempt de billes de verre, d'exosquelette ou toute autre partie « dure » provenant du gammare, le microtube contenant le gammare broyé a été percé par le dessous à l'aide d'une aiguille et a été immédiatement placé au-dessus d'un nouveau microtube de 1,5 mL. Les deux microtubes ainsi superposés ont été centrifugés pendant 1 minute à 1000 g et à 4°C. Cette dernière opération a été renouvelée après avoir ajouté 50 μ L de tampon d'extraction dans le microtube contenant le gammare broyé. Le microtube contenant l'extrait protéique (microtube du dessous) a été alors centrifugé pendant 20 minutes à 20 000 g et 4°C pour éliminer d'éventuels résidus de billes de verre. Le surnageant contenant l'extrait protéique solubilisé mais non purifié a été récupéré pour la suite de la manipulation.

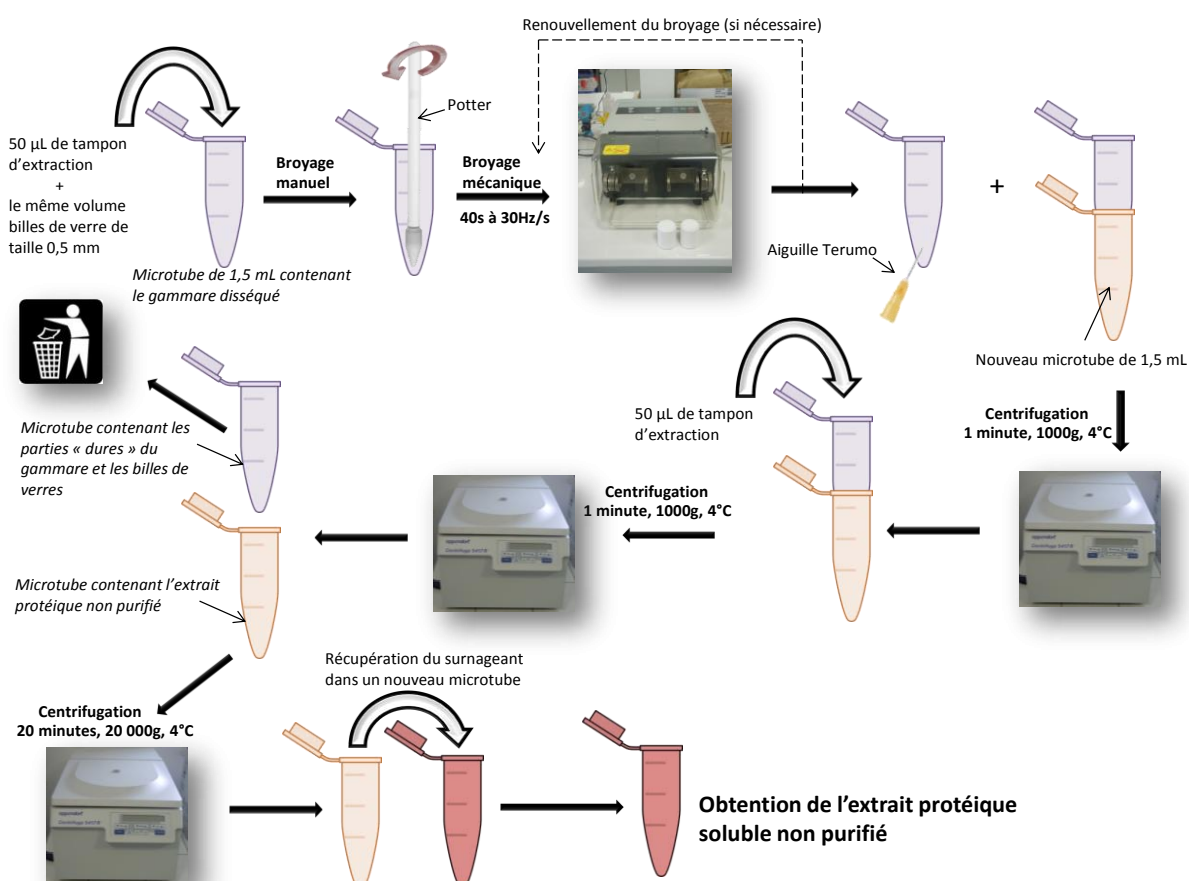


Figure II.8. Protocole schématisé pour l'extraction des protéines. 5 réplicats au minimum ont été réalisés par condition d'exposition (As1, Cd1, As1Cd1) et pour chaque température (5, 10, 15°C).

5.1.3. Purification de l'extrait protéique brut

L'extrait protéique obtenu a été purifié à l'aide d'un kit ReadyPrep 2D Clean-up (Bio-Rad) pour petits volumes d'échantillons (Figure II.9). Ce kit permet d'une part de précipiter les protéines et d'autre part de les purifier en éliminant les substances non protéiques susceptibles d'interférer comme les détergents, les sels, les lipides les phénols ou encore les acides nucléiques résultants de l'étape précédente de préparation et d'extraction des protéines. Comme les impuretés augmentent la conductivité de l'échantillon, ils interfèrent avec la première dimension d'isoélectrofocalisation (IEF) et avec la visualisation des résultats en 2D. De ce fait, la purification de l'extrait protéique permet une analyse en 2D de meilleure qualité. De plus, la précipitation des protéines purifiées est un bon moyen pour concentrer des échantillons trop dilués, ce qui représente un autre avantage non négligeable de cette étape.

La procédure utilisée dans le kit ReadyPrep 2D Clean-up consiste en l'ajout d'un agent précipitant (300 μ L) et d'un agent co-précipitant (40 μ L) dans l'échantillon, chacune de ces étapes étant suivie d'une centrifugation à 12 000 g à 4°C durant 5 minutes (Figure II.9). Après avoir retiré le surnageant qui contient les impuretés non protéiques, le culot subit une étape de lavage. Pour cela, de l'eau milliQ et du tampon de lavage (Wash buffer Reagent) ont été ajoutés simultanément dans le culot et après 30 minutes d'attente à 80°C, une centrifugation de 5 minutes à 12000 g à 4°C a été effectuée. Le surnageant contenant le reste des impuretés a été retiré et le culot a été séché à l'air ambiant. Le culot contenant les protéines précipitées purifiées a été resuspendu dans 100 μ L de tampon d'extraction (Tableau II.8) et passé au vortex jusqu'à ce qu'il soit entièrement remis en suspension (environ 1 h). Une dernière centrifugation de 5 minutes à 12 000 g à 18°C a été réalisée dans le but de ne récupérer que le surnageant. A ce stade, l'extrait protéique peut être utilisé directement pour le dosage des protéines pour la dimension d'isoélectrofocalisation (IEF). Il peut aussi être stocké à -80°C pendant une courte durée en vue de la réalisation ultérieure des analyses.

5.1.4. Dosage des protéines

Pour garantir une bonne analyse quantitative des gels différentiels, il est nécessaire de déposer une quantité identique de protéines pour la première dimension (cf. § 5.3.1). La concentration protéique de l'extrait purifié devait être déterminée à ce stade de l'expérimentation. Dans ce but, un dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) a été réalisé. Cette méthode consiste en un dosage colorimétrique, basé sur le changement

d'absorbance lui-même relié au changement de couleur du bleu de Coomassie suite à sa liaison aux acides aminés aromatiques et aux résidus hydrophobes des acides aminés provenant des protéines. La mesure de l'absorbance était réalisée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une gamme étalon a été préalablement réalisée dans des cuves à spectrophotomètre en ajoutant 20 μL de sérum albumine bovine (SAV) à des concentrations allant de 0,125 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ à 2,0 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. Deux blancs composés de 20 μL d'eau milliQ ont été également réalisés pour corriger l'absorbance de « fond » et servir de « référence ».

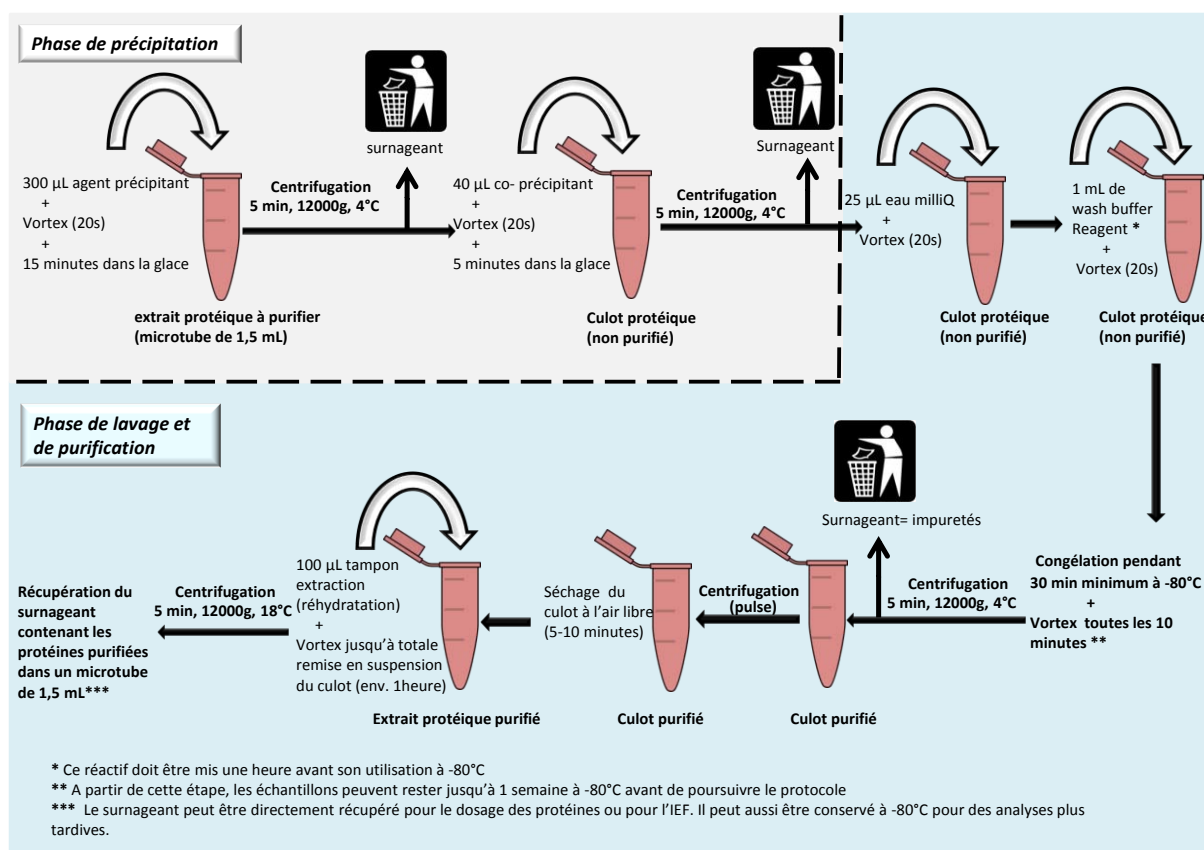


Figure II.9. Protocole schématisé de purification des protéines grâce au kit ReadyPrep™ 2-D Cleanup (D'après BIO-RAD, Catalog #163-2130)

Pour quantifier les protéines, 2 μL de chaque extrait protéique ont été transférés dans une cuve à électrophorèse puis ont été dilués 1/10^{ème} avec de l'eau milliQ. Pour une meilleure précision, deux à trois réplicats ont été effectués par extrait protéique. La lecture de l'absorbance de la gamme étalon ou des extraits protéiques dilués s'effectue après l'ajout de 1 mL de Dye Reagent Quick Start Bradford suivie d'une homogénéisation par retournement du mélange obtenu puis d'une durée d'incubation de 30 minutes (durée optimale pour la linéarité de la gamme étalon). L'équation de la droite étalon a permis de calculer les

quantités de protéines présentes dans les extraits protéiques dilués au 1/10^{ème}. La quantité protéique totale réelle dans l'extrait était donc 10 fois plus concentrée. Une moyenne a été effectuée sur la totalité des réplicats réalisés pour chaque extrait protéique. Tous les échantillons présentaient une concentration en protéine comprise entre 5 µg.L⁻¹ et 10 µg.L⁻¹, suffisante pour mettre en œuvre la suite des expérimentations. Il n'a pas été nécessaire de resuspendre les extraits dans un volume de tampon d'extraction différent et de recommencer les manipulations précédentes.

5.1.5. Electrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)

Comme la qualité du dosage et des extraits protéiques joue un rôle important sur l'interprétation en DiGE, il est nécessaire de visualiser les extraits protéiques grâce à une électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes de type SDS-PAGE. Les molécules de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) présentes dans le gel de polyacrylamide, le tampon de charge et le tampon d'électrophorèse permettent de masquer les charges propres des protéines, de leur conférer une charge négative et de supprimer le facteur forme. Ainsi, sous l'influence d'un champ électrique, leur migration se fait selon leur masse moléculaire de la cathode vers l'anode. Pour dénaturer les protéines, la technique de choix est celle de Laemmli (1970) qui consiste à faire chauffer les extraits, avant leur dépôt, dans un tampon constitué d'un détergent anionique Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) et d'un agent réducteur (β-mercaptoéthanol) permettant de réduire les ponts disulfures. Pour réaliser cette électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes, un volume équivalent à 15 µg de protéines de chaque extrait a été prélevé et placé dans un tube à PCR 0,2mL. Dix microlitres de tampon de charge (SIGMA) ont été ajoutés avant que les protéines ne subissent l'étape de dénaturation. La phase de dénaturation des protéines consiste à faire chauffer les tubes durant 5 minutes à 95°C puis à les laisser refroidir à 4°C à l'aide d'un thermocycleur (Gene Amp PCR 2700). Après centrifugation (30 s à 12 000 g), les échantillons dénaturés sont prêts à être déposés dans les puits du gel SDS-PAGE. Le gel SDS-PAGE utilisé dans ce travail de thèse est un gel en gradient d'acrylamide/bisacrylamide (4-15% criterion, BioRad) qui présente la possibilité de séparer des protéines de poids moléculaires très différents (quelques milliers de Da à plusieurs centaines de milliers), contrairement aux gels contenant des concentrations d'acrylamide/bisacrylamide fixes (20 à 200 KDa). Le tampon d'électrophorèse utilisé est du tampon Tris/SDS/Glycine (25 mM/ 0,1% (p/v)/192 mM ; pH 8,8 ; Laemmli, 1970). La migration, est effectuée à 200 Volts et 75 mA (Biorad, Criterion cell) jusqu'à ce que le front de migration (bleu de bromophénol) arrive à la base des

gels. A la fin de celle-ci, le gel est coloré pendant 12 h dans une solution contenant : 1% de bleu de Coomassie à 2 g/100 mL d'eau milliQ, 10% d'acide acétique, 40% d'éthanol et 49% d'eau milliQ. Puis le gel est décoloré durant une durée comprise entre 30 minutes à 2 heures dans une solution contenant 40% d'éthanol + 10 % d'acide acétique et 50 % d'eau milliQ. A ce stade, le gel peut se conserver à 4°C dans de l'eau milliQ ou peut être scanné pour en conserver l'image.

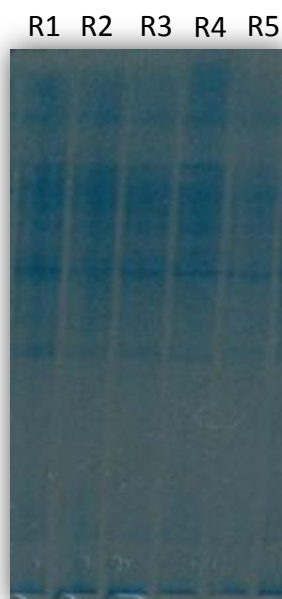


Figure II.10. Protéines séparées par électrophorèse monodimensionnelle et colorées au bleu de Coomassie. Exemple obtenu pour les 5 réplicats (R1 à R5) de *G. pulex* exposés durant 96h à $26,9 (\pm 0,9) \mu\text{g.L}^{-1}$ de cadmium à la température de 10°C.

Dans les parties précédentes, 5 réplicats par conditions testées ont été réalisés. Ces 5 réplicats correspondent à 5 gammes différents. Cependant, pour effectuer une analyse protéomique bidimensionnelle en DiGE, seuls 4 réplicats sont nécessaires. Les meilleurs extraits protéiques, c'est-à-dire ceux qui sont exempts de contamination, qui ne présentent pas de dégradation et qui semblent fournir un dosage de protéine correct (entre 5 et $10 \mu\text{g.L}^{-1}$) ont été sélectionnés pour la suite de l'expérience. Une coloration et des bandes homogènes sur le gel, d'un réplicat à l'autre, pour une même condition d'exposition, sont des données qui renseignent sur la bonne qualité de l'extrait protéique. Par exemple, sur la Figure II.10, les cinq bandes protéiques correspondant aux cinq réplicats d'extraits protéiques issus des *G. pulex* exposés durant 96h au cadmium à 10°C sont ressemblantes mais la cinquième est légèrement moins colorée que les quatre autres, suggérant une quantité de protéines

légèrement inférieure. Cette bande est alors exclue de l'analyse. Lorsque plusieurs réplicats d'une même condition n'étaient pas utilisables ou d'utilisation douteuse, de nouveaux échantillons ont été préparés à partir de nouveaux gammes issus de la même expérience, jusqu'à l'obtention de 4 réplicats satisfaisants.

5.2. Marquage des protéines

Le marquage des protéines a été réalisé grâce au kit CyDye DiGE fluor minimal (GE Healthcare).

Le schéma expérimental de l'analyse par électrophorèse bidimensionnelle est le suivant : chaque gel est composé (i) d'un standard interne contenant la totalité des extraits protéiques à analyser, marqué par la cyanine CyDye2, (ii) d'un réplicat protéique d'une des conditions de l'expérience (exemple As1 à 10°C) marqué par la cyanine CyDye3, et (iii) d'un réplicat protéique d'une autre condition de l'expérience (exemple Cd1 à 10°C) marqué par la cyanine CyDye5.

5.2.1. Préparation des extraits protéiques avant le marquage

Le pH de tous les extraits protéiques a été vérifié grâce à des bandelettes indicatrices de pH. Celui-ci doit être de 8,5 afin de permettre le marquage optimal par les cyanines (CyDye) et selon le protocole préconisé pour un marquage de type « minimal » (minimal labelling).

Pour réaliser le standard interne, des quantités équivalentes (23,33 µg de protéines) de chaque extrait protéique ont été prélevées et poolées, puis le volume final a été complété à 340 µL par du tampon d'extraction (Tableau II.8). Parallèlement, un volume de chaque extrait protéique équivalent à 40 µg de protéines a été prélevé puis complété à 10 µL avec du tampon d'extraction et marqué avec la cyanine correspondant au plan d'expérimentation (Figure II.11).

5.2.2. Plan de marquage

Afin de s'affranchir d'éventuels effets de marquage (« dye »), la moitié des réplicats d'une même condition a été marquée avec la cyanine 3 et l'autre avec la cyanine 5. Le plan de marquage des 60 échantillons à analyser est présenté dans la figure II.11.

Numéro gel 2D	Marquage avec		
	Cy3	Cy5	Cy2
1	T- 5°C- R1	As1- 5°C- R1	
2	T- 5°C- R2	As1- 5°C- R2	
3	As1- 5°C- R3	T- 5°C- R3	
4	As1- 5°C- R5	T- 5°C- R4	
5	As2- 5°C- R6	As1Cd1- 5°C- R1	
6	As2- 5°C- R7	As1Cd1- 5°C- R5	
7	Cd1- 5°C- R4	As2- 5°C- R9	
8	Cd1- 5°C- R5	As2- 5°C- R10	
9	As1Cd1- 5°C- R7	Cd1- 5°C- R6	
10	As1Cd1- 5°C- R8	Cd1- 5°C- R7	
11	T- 10°C- R1	As1- 10°C- R1	
12	T- 10°C- R2	As1- 10°C- R2	
13	As1- 10°C- R4	T- 10°C- R3	
14	As1- 10°C- R5	T- 10°C- R4	
15	As2- 10°C- R1	As1Cd1- 10°C- R1	Standard Interne
16	As2- 10°C- R2	As1Cd1 10°C- R3	
17	Cd1- 10°C- R1	As2- 10°C- R3	
18	Cd1- 10°C- R2	As2- 10°C- R4	
19	As1Cd1- 10°C- R4	Cd1- 10°C- R3	
20	As1Cd1- 10°C- R5	Cd1- 10°C- R4	
21	T- 15°C- R1	As1- 10°C- R1	
22	T- 15°C- R2	As1- 10°C- R2	
23	As1- 15°C- R3	T- 15°C- R3	
24	As1- 15°C- R4	T- 15°C- R4	
25	As2- 15°C- R1	As1Cd1 15°C- R1	
26	As2- 15°C- R2	As1Cd1- 15°C- R2	
27	Cd1- 15°C- R1	As2- 15°C- R3	
28	Cd1- 15°C- R2	As2- 15°C- R5	
29	As1Cd1- 15°C- R3	Cd1- 15°C- R4	
30	As1Cd1- 15°C- R4	Cd1- 15°C- R5	

Figure II.11. Plan de marquage des différents extraits protéiques. Les différentes conditions d'exposition métallique (« T » = Témoin ; « As1 » = $1213,9 (\pm 104,9) \mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$; « As2 » = $1694,6 (\pm 120,2) \mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$; « Cd1 » = $26,9 (\pm 0,9) \mu\text{g}_{\text{Cd}}\cdot\text{L}^{-1}$; « As1Cd1 » = $1213,9 (\pm 104,9) \mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$ et $26,9 (\pm 0,9) \mu\text{g}_{\text{Cd}}\cdot\text{L}^{-1}$), la température d'exposition (5- 10 ou 15°C) et le numéro de réplicat (R1 à R8) de l'extrait protéique sont mentionnés dans ce tableau.

5.2.3. Reconstitution des cyanines et marquage des échantillons

Comme un kit «CyDye DiGE fluor minimal » correspond au marquage de 24 échantillons, 3 kits ont été nécessaires pour notre analyse. Le marquage a été réalisé simultanément sur la totalité des conditions expérimentales pour éviter les biais dans le marquage mais aussi pour éviter l'oxydation du N, N-Diméthylformamide (DMF) et la dégradation des Dyes libres, qui sont très rapides. De plus, pour une plus ample sécurité, une nouvelle bouteille de DMF a été utilisée lors de cette expérience. La lumière pouvant détériorer les propriétés fluorescentes des cyanines, une précaution particulière a été prise pour éviter toute exposition aux sources lumineuses.

Les cyanines ont été utilisées à une concentration de 0,4mM pour respecter le rapport quantité de protéine/quantité de colorant. Une fois sortis du congélateur, les trois kits de CyDyes ont été incubés 5 minutes à température ambiante. Une vue d'ensemble du marquage en DiGE est présentée en figure II.12. Le protocole utilisé et légèrement modifié par rapport à cette figure, est détaillé plus bas.

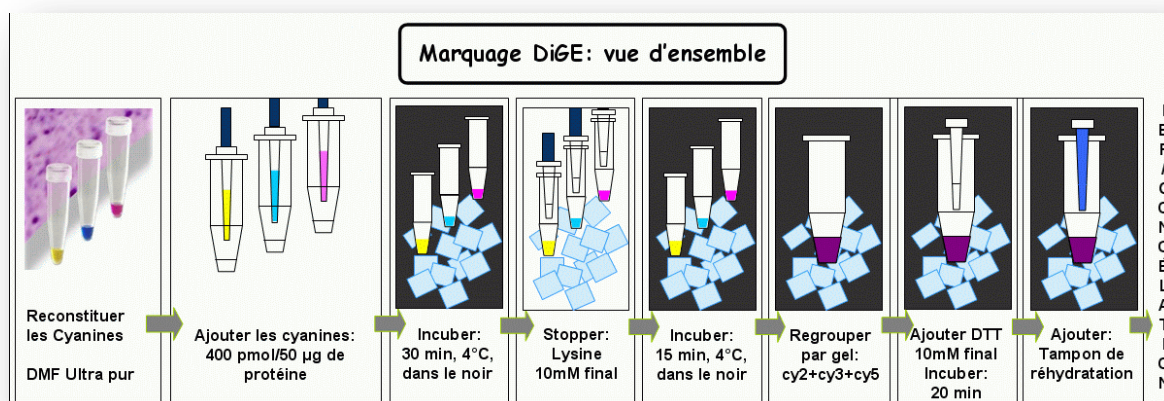


Figure II.12. Vue d'ensemble du marquage DiGE (source: INSERM, Marseille)

5.2.4.1. Reconstitution de CyDye2

Dans chaque tube de CyDye2 du kit, 5 µL de DMF ont été ajoutés. La concentration de ces marqueurs fluorescents était alors de 1mM. Après avoir été passés au vortex et centrifugés (30 s à 12 000 g), les 3 CyDye2 ont été poolés. Le volume de CyDye 2 était d'environ 15 µL. Pour obtenir du CyDye2 à 0,4mM, 18 µL de DMF et 12 µL de CyDye2 ont été prélevés et placés dans un microtube en plastique de 1,5mL (soit 1,5 volume de DMF pour 1 volume de CyDye2 à 1 mM).

5.2.4.2. Reconstitution de CyDye3 et CyDye5

12,5 µL de DMF ont été ajoutés dans chaque tube de CyDye3 ou CyDye5 afin d'obtenir directement la concentration de 0,4mM. Chaque tube contenant le marqueur fluorescent a été ensuite passé au vortex et centrifugé (30 s à 12 000 g).

5.2.5. Marquage des extraits protéiques

5.2.5.1. Marquage avec CyDye2

Dans notre protocole, 40 µg de protéine de chaque extrait ont été marqués. Pour réaliser le marquage du standard interne, 27,2 µL de CyDye2 à 0,4 mM ont été prélevés et additionnés aux 340 µL de standard interne (soit 12,5% de CyDye 2 à 0,4 mM dans le standard interne).

Puis le tube a été passé au vortex et centrifugé (30 s à 12 000 g) avant d'être placé 30 minutes dans la glace et dans le noir. Pour stopper la réaction, 27,5µL de Lysine 10 mM ont été ajoutés et le tube a été à nouveau passé au vortex et centrifugé (30 s à 12 000 g) avant d'être remis 10 minutes dans la glace.

5.2.5.2. Marquage avec CyDye3 et 5

Parallèlement, 0,8 µL de CyDye3 ou CyDye5 à 0,4mM ont été transférés dans les extraits protéiques à marquer selon le plan de marquage présenté en figure II.11.

Puis les extraits protéiques ont été passés au vortex puis centrifugés (30 s à 12 000 g) et placés 30 minutes dans de la glace et dans le noir.

0.8 µL de lysine à 10 mM ont été additionnés à chaque échantillon marqué et les échantillons ont été passés au vortex et centrifugés (30 s à 12 000 g) avant d'être placés pendant 30 minutes dans de la glace et dans le noir.

Par gel d'appartenance, les mélanges des trois cyanines pour chaque strip de première dimension ont été préparés en mélangeant des quantités égales de chaque marquage selon le plan présenté en figure II.11. Après avoir été passés au vortex et centrifugés (30 s à 12 000 g), 120 µg d'extrait de protéines marqués aux trois CyeDyes (gels analytiques) ont été complétés à 450 µL avec du tampon de réhydratation (Tableau II.9) qui contient du DTT 10 mM.

Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à l'IEF.

Tableau II.9. Composition du tampon de réhydratation

Composition	Réactif utilisé (Référence, nom du fournisseur)
8 M Urée	PlusOne Urea (réf 17-1319-01, VWR)
2 M Thiourée	PlusOne Thiourea (réf 25-9000-65, VWR)
2 % CHAPS	PlusOne CHAPS (réf 17-1314-01, VWR)
10 mM DTT	PlusOne Dithiothreitol (réf 17-1318-01, VWR)
1.2% IPG Buffer, pH 4-7	IPG Buffer, pH 4-7 (réf 17-6000-86, VWR)
Traces de Bleu de Bromophenol	PlusOne Bromophenol Blue (réf 17-1329-01, VWR)

5.3. Analyse 2-DE

5.3.1. Première dimension : focalisation iso-électrique (IEF)

5.3.1.1. Réhydratation des strips

Seuls 12 échantillons peuvent être traités simultanément lors de cette étape. La totalité de chaque échantillon marqué (450 μ L) a été déposée dans une rigole de la cassette de réhydratation elle-même préalablement posée dans une chambre de réhydratation. Une bandelette d'acrylamide de 24 cm présentant un gradient de pH 4-7 (GE Healthcare), appelée aussi strip ou Immobilized pH gradient (IPG), a été positionnée dans la rigole de façon à ce que le côté gel soit en contact avec l'échantillon déposé. La réhydratation des strips se fait directement avec l'échantillon. Une précaution a donc été prise à ce niveau pour enlever les bulles d'air pouvant interférer avec la réhydratation et l'IEF. La réhydratation, qui est passive, s'est déroulée toute la nuit.

5.3.1.2. Focalisation iso-électrique

Les strips ont ensuite été déposés côté acide vers l'anode sur le plateau du système Ettan IPGphor3 IEF (GE Healthcare) et ont été recouverts de 110 mL d'huile minérale (Drystrip Cover Fluid Immobiline, VWR) pour éviter leur déshydratation. Cette huile a été préalablement dégazée pour éviter l'oxydation des protéines et leur modification. Avant de positionner les électrodes, des papiers électrodes « paper wicks » imbibés de 150 μ L d'eau milliQ ont été déposés à chaque extrémité des strips. L'IEF qui permet de faire migrer les protéines dénaturées en fonction de leur point isoélectrique a été limitée à 50 μ A/gel et la température du plateau de migration a été maintenue à 20°C (température optimale, Görg et al., 1991) pendant 19h45. Durant ce laps de temps, les papiers électrodes ont été changés trois fois. L'IEF a été effectuée jusqu'à atteindre un voltage de 90 000 Volts.heure⁻¹ en suivant 5 étapes (Tableau II.10). Les strips ont été immédiatement congelés à -80°C ou utilisés pour la deuxième dimension (c.f. § 5.3.2).

Tableau II.10 : Etapes successives de l'isoélectrofocalisation (IEF) des protéines sur bandelettes d'acrylamide 24 cm, pH 4-7 (GE Healthcare)

Etapes	Tension (V)	Durée	Traitement
1	150	3h	Constant
2	200	1h	Constant
3	200-1000	3h	Gradient linéaire
4	1000-8000	4h	Gradient linéaire
5	8000-90000	≈ 8h 45	Gradient linéaire
Arrêt lorsque le voltage cumulé a atteint 90 000 V.			

5.3.2. Deuxième dimension : Migration électrophorétique

Seuls 6 strips peuvent être traités à la fois dans cette partie.

5.3.2.1. Réduction/ alkylation

Les protéines doivent être totalement dénaturées afin de migrer uniquement en fonction de leur masse moléculaire. Les strips sont équilibrés en deux étapes. La première étape, appelée étape de réduction, se réalise en présence de dithiothréitol (DTT) qui permet de bloquer les fonctions thiols des protéines dans le but d'empêcher la reformation de ponts disulfures. La deuxième, appelée étape d'alkylation, se réalise en présence d'Iodoacétamide (IAA) qui permet non seulement d'empêcher la ré-oxydation des protéines durant l'électrophorèse par alkylation des cystéines (-SH) mais aussi d'éliminer l'excès de DTT.

Pour réaliser ces deux étapes d'équilibration, les strips ont été placés dans des tubes en plastique et ont été immergés pendant 15 minutes dans 7 mL tampon de réduction (350 mg DTT, 12,6 g Urea, 35 mL E. Buffer) puis pendant 15 minutes dans 7 mL de tampon d'alkylation (875 mg IAA, 12,6 g Urea, 35 mL E. buffer du kit 2DGel daltsix, SERVA). Le tout a été placé sur un agitateur magnétique pour que les strips trempent uniformément dans le tampon. Le temps a été limité à 2 x 15 minutes pour éviter une perte des protéines par diffusion (Görg et al., 2000). La présence de SDS dans les deux tampons permet de charger négativement les protéines, et le bleu de bromophénol permet de suivre le front de migration lors de la seconde dimension. Après équilibration, le surplus de tampon a été enlevé en déposant les strips sur du papier absorbant.

5.3.2.2. SDS-PAGE multiple sur système vertical

Des gels SDS-PAGE pré-coulés 2D Gel DALT NF 12,5% (FSVT) de taille 26 x 20 cm ont été insérés dans les cassettes en verre de l'appareil Ettan Dalt six system (GE healthcare). Les cassettes ont été scellées grâce à une solution d'agarose contenue dans le kit buffer 2D Gel DALT six (SERVA) et les strips ayant subi les étapes d'alkylation et de réduction ont été placés dans la rigole de la cassette prévue à cet effet puis ont été poussés vers le bord supérieur du gel à l'aide d'une spatule. Cette étape a été effectuée en prenant soin de positionner le côté acrylamide du strip en direction du gel 2D. La cuve de l'électrophorèse a été remplie avec du tampon anode (5 L) et du tampon cathode (1,4 L) contenus dans le kit utilisé. La migration a été finalement réalisée en deux temps, sous une intensité et un voltage définis en fonction du nombre de gels à faire migrer et selon les recommandations du livret fourni avec les gels précoulés. Pour six gels, le programme 1 dure une heure à 3 watts, 60 mA et 50 V et permet d'assurer le transfert des protéines du strip vers le gel. Le programme 2

de durée environ 14 heures à 12 Watts, 180 mA et 250 V et permet d'assurer la migration des protéines sur le gel selon leur masse moléculaire. La température a été contrôlée et maintenue à 17°C grâce à un refroidisseur annexe à la cuve d'électrophorèse (thermocryostat). La migration a été finalement arrêtée lorsque le front de migration était à la base des gels.

5.3.2.3. Fixation des gels et scan

Après démoulage des gels, les protéines ont été fixées durant une heure sous une agitation constante dans une solution contenant 15% d'éthanol, 7,5% d'acide acétique et 77,5% d'eau milliQ. Les gels ont ensuite été scannés en mode fluorescence (Scanner ProExpress Fujifilm BAS-FLA 900) à trois longueurs d'onde différentes correspondant aux trois longueurs d'excitation respectives des trois cyanines. L'image a été acquise avec une résolution de 100 µm par pixel. La fluorescence du gel a été excitée grâce à un photomultiplicateur (PMT) se trouvant dans le scanner. La valeur du PMT a été ajustée manuellement afin d'obtenir la même intensité d'émission du signal pour chaque cyanine. En général, pour CyDye2, la valeur du PMT était située entre 520 et 550 V ; celle pour CyDye3 était située entre 650 et 710 V et celle pour CyDye5 était située entre 770 et 850 V.

5.4. Analyse différentielle quantitative sur SameSpot

Les photos de gels scannés ont été découpées et orientées de la même manière grâce au logiciel MultiGauge avant d'être analysées par le logiciel Progenesis SameSpots v3.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Les images des gels ont été préalablement alignées sur une image de référence choisie, correspondant à l'image « moyenne » d'un des gels réalisés mais pas forcément « la plus jolie ». Les images des gels ont d'abord été alignées automatiquement par le logiciel puis manuellement (ajout de vecteurs de réalignement) afin de corriger les différences de migration et de séparation (Figure II.13). Puis les 4 images (réplicats) correspondant à une même condition d'exposition ont été regroupées. Le logiciel normalise les volumes de chaque spot après correction du bruit de fond et réalise une ANOVA à 1 facteur par spot de protéine pour comparer les volumes obtenus entre les différentes conditions. Pour une meilleure analyse, les protéines mal séparées de manière automatique par SameSpot ont donc été séparées manuellement. A cause de la complexité du plan d'expérience réalisé au cours de ce travail de thèse, il a été nécessaire d'exporter de SameSpot les volumes normalisés de chaque spot de protéines pour réaliser des tests

statistiques plus appropriés (Anova à 2 ou 3 facteurs, suivis de tests post-hoc) que celui proposé par ce logiciel (Anova à 1 facteur sans test post-hoc possible). Les tests statistiques seront détaillés dans la partie résultats.

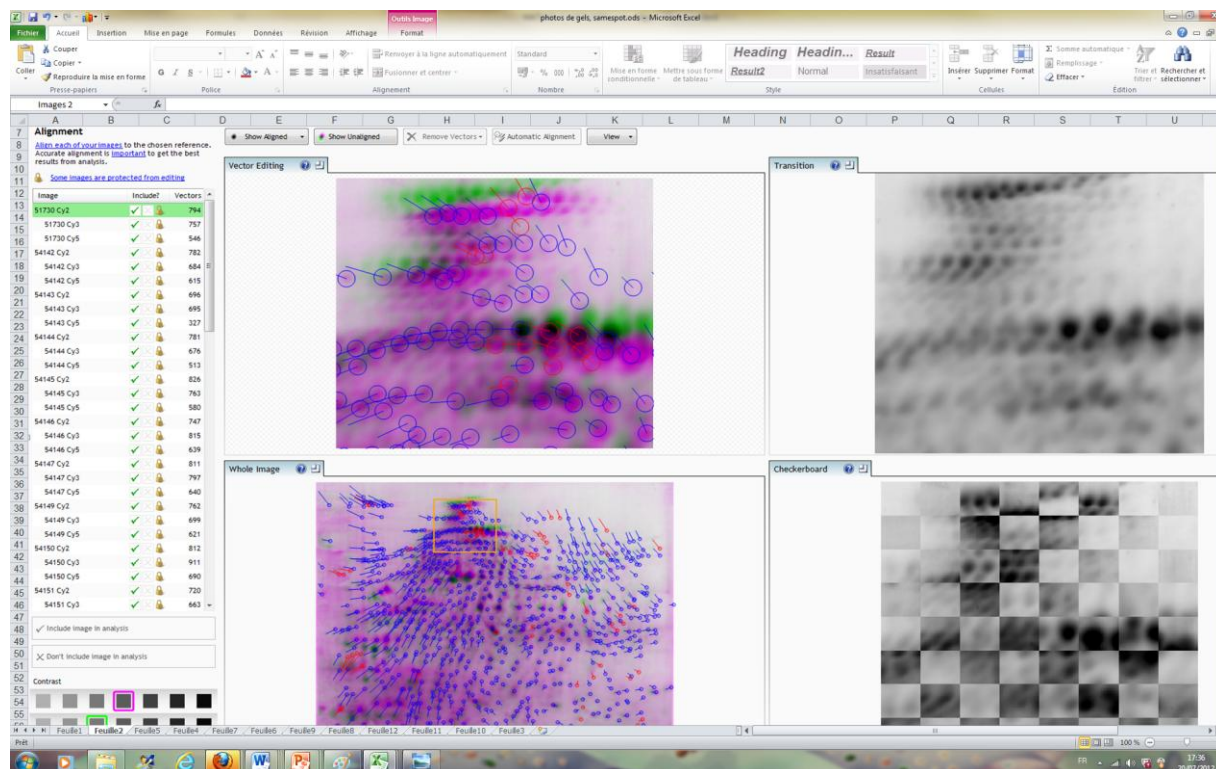


Figure II.13. Réalignement des spots d'un gel sur une image de « référence ». Les vecteurs bleus représentent les vecteurs ajoutés automatiquement par le logiciel Samespot. Les vecteurs rouges correspondent aux vecteurs ajoutés de manière manuelle.

5.5. Analyses qualitatives des spots d'intérêts

5.5.1. Gels préparatifs

Des gels préparatifs contenant environ 700 μg de protéines ont été réalisés afin d'exciser les spots d'intérêt en vue de leur identification. Ces gels ont été préparés en ne prenant qu'un seul réplicat par condition métallique et température testées. Le choix de ce réplicat a été effectué sur (i) la qualité du gel monodimensionnel, et sur (ii) la concentration protéique de l'extrait. Plus l'échantillon était concentré en protéine, plus il a été considéré comme intéressant.

Par gel préparatif et comme nous avons 15 conditions au départ, 50 μg de protéine de chaque réplicat sélectionné ont été prélevés et placés dans un même microtube de 1,5 mL en

plastique. Le volume total de chaque microtube a été complété à 450 μ L avec du tampon de réhydratation (tableau II.9) avant de subir les étapes d'IEF et de migration électrophorétique détaillées précédemment.

Après démoulage des gels préparatifs, les gels ont subi plusieurs bains. D'abord, les gels ont été fixés et acidifiés durant une heure sous agitation légère, dans une solution contenant 15% d'éthanol, 85% d'eau milliQ et de l'acide citrique (part A) contenus dans le kit Larva purple Fluorescent Protein Stain (Serva). Cette étape de fixation rend les protéines insolubles et les empêche de diffuser dans le gel lors de la coloration. Puis le gel a été placé pendant 15 minutes, sous agitation légère, dans une solution contenant de l'acide borique (Part B du kit lava purple) et de l'hydroxyde de sodium (Part C du kit lava purple). Le gel a ensuite été coloré pendant 1 heure sous agitation légère, en rajoutant dans la solution précédente du colorant Lava purple. L'étape de coloration s'est réalisée dans le noir puisque le Lava purple est un colorant fluorescent sensible à la lumière. Puis, le gel a subi un lavage de 15 minutes dans une solution contenant 85% d'eau milliQ et 15% d'éthanol. Cette étape de lavage permet la décoloration du gel, ce qui augmente la sensibilité de la fluorescence. Finalement, le gel était équilibré dans de l'eau milliQ au moins 15 minutes avant d'être scanné. Des gommettes fluorescentes ont été placées à chacune des extrémités (droite et gauche) du gel avant de le scanner.

5.5.2. Prélèvement des spots

Comme précédemment, les gels préparatifs scannés ont été découpés et orientés de la même manière que les anciens gels réalisés. Sur SameSpot, chaque gel préparatif était réaligné automatiquement puis manuellement (ajout de vecteurs de réalignement) sur un des anciens gels de l'analyse qui sert ainsi de référence.

Les positions des deux gommettes fluorescentes, servant de coordonnées de référence, ont été ciblées sur SameSpot pour calculer les coordonnées des spots d'intérêt à exciser. La liste de coordonnées des spots d'intérêts a été finalement éditée et les spots d'intérêts ont été excisés à l'aide d'un piqueur mécanique (Ettan Spot picker, GE Healthcare).

5.5.3. Identification des spots

L'identification des spots a été sous-traitée à l'institut Cochin de Paris. Les spots ont été identifiés grâce à des analyses Maldi Tof Tof ou en RSLC-LTQ-ORBITRAP.

Chapitre III.

Résultats des travaux

PARTIE I:

ETUDES DES EFFETS INDIVIDUELS ET COMBINES DE L'ARSENATE ET DU CADMIUM SUR *G. PULEX*, AVEC OU SANS CHANGEMENT DE LA TEMPERATURE A L'AIDE DE TESTS ET BIOMARQUEURS CLASSIQUEMENT UTILISES EN ECOTOXICOLOGIE.

Cette première partie est constituée de quatre articles. Les trois premiers présentent une analyse des effets des deux métaux seuls ou combinés chez *G. pulex* exposés pendant 240 h sous une température constante et contrôlée. Le quatrième article décrit les effets des deux métaux chez *G. pulex* exposés à trois températures (5-10-15°C) sur une durée d'exposition plus courte (96h).

Le **premier article** intitulé « *Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (Gammarus pulex)* » et publié dans le journal « *Environmental pollution* » (Vellinger et al., 2012a), est principalement consacré à une analyse exploratoire des effets individuels des deux éléments traces métalliques. Son objectif est de déterminer (i) les cinétiques de LC50 mais aussi (ii) les facteurs de bioconcentration de même que la réponse comportementale (fréquence des battements de pléopodes) chez *G. pulex* à 240 h d'exposition à diverses concentrations de cadmium ou d'arséniate, à 10°C.

Le **deuxième article** intitulé « *Antagonistic toxicity of arsenate and cadmium in a freshwater amphipod (Gammarus pulex)* », publié dans le journal « *Ecotoxicology* » (Vellinger et al., 2012b), est consacré à une analyse exploratoire des effets conjoints des deux métaux selon un plan factoriel complet. Son objectif est (i) de caractériser le mode d'action des deux métaux (antagonisme, additivité ou synergisme ?) sur la mortalité de *G. pulex* pour différents ratios et doses testés à l'aide d'un modèle prédictif et (ii) de regarder l'influence de ces mélanges binaires sur la bioconcentration chez les individus de *G. pulex* exposés aux toxiques durant 240h à 10°C.

Le **troisième article** intitulé « *Single and combined effects of Cadmium and Arsenate in Gammarus pulex (Crustacea, Amphipoda): understanding the links between physiological and behavioural responses* » a été accepté dans le journal « *Aquatic Toxicology* » (Vellinger et al., 2012d) sous réserve de corrections. Son objectif est d'utiliser différents biomarqueurs pour

caractériser au mieux les effets des métaux isolés sur des individus de *G. pulex* exposés 240h à 10°C d'une part et d'expliquer les effets conjoints des deux métaux décrits dans l'article précédent d'autre part. Les biomarqueurs utilisés ont été aussi bien des biomarqueurs physiologiques (*pression osmotique, mortalité*), comportementaux (*activité locomotrice et fréquence de battements de pléopodes*), cytotoxiques et de détoxification (taux de MDA, concentrations en MT et GSH, activité GCL), que les réserves énergétiques (lipides, glycogène, protéines).

Le **quatrième article**, intitulé « *Behavioural and physiological responses of Gammarus pulex exposed to cadmium and arsenate at three temperatures: individual and combined Effects* » et publié dans le journal « PlosOne » (Vellinger et al., 2012c), présente les impacts d'un changement de température sur les effets individuels et combinés des deux métaux. A la fin de la période d'intoxication de 96h et pour les trois températures étudiées (5-10-15°C), les gammarus issus des solutions contenant des concentrations métalliques individuelles ou en mélange ont été utilisés à la fois pour des études physiologiques (mortalité, bioconcentration, [Na⁺] et [Cl⁻] dans l'hémolymph) et comportementales (activité locomotrice et fréquence de battements des pléopodes).

Le tableau II.3 (page 74) résume les conditions expérimentales et les concentrations réelles d'exposition des expériences présentées dans les différents articles (Article 1 = Expérience 1; Article 2 = Expérience 2; Article 3 = Expérience 3; Article 4 = Expérience 4).

ARTICLE 1

**Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod
(*Gammarus pulex*)**

Parmi les différentes formes inorganiques de l'arsenic, la forme trivalente (arsenite) est plus toxique que la forme pentavalente (arséniate) pour les organismes aquatiques. De ce fait, peu d'études ont été consacrées aux effets de l'arséniate sur la biocénose aquatique. A notre connaissance, aucune étude de ce genre n'est actuellement disponible dans la littérature chez le crustacé d'eau douce *G. pulex*. Comme l'arséniate est une des formes inorganiques les plus fréquemment retrouvées dans les écosystèmes aquatiques, il nous semblait nécessaire d'évaluer les effets directs de ce métalloïde sur l'organisme modèle choisi, *G. pulex*. Pour une interprétation plus aisée des résultats, nous avons choisi de travailler en parallèle avec un second métal, le cadmium, qui est largement documenté chez cette espèce. Pour éviter les facteurs confondants liés aux changements de température, nous avons choisi d'exposer les gammarus à une température contrôlée de 10°C, qui correspond à la moyenne annuelle des températures observées sur la rivière où les organismes ont été prélevés. Après une semaine d'acclimatation en laboratoire, des lots de *G. pulex* mâles ont été exposés durant 240 heures et à 10°C à six concentrations d'arséniate et à dix concentrations de cadmium. Les individus morts ont été comptés tous les jours et à la fin de la période d'exposition, la bioconcentration a été mesurée et les facteurs de bioconcentration ont été calculés pour toutes les concentrations testées. Parallèlement, une réponse comportementale (fréquence de battements de pléopodes) reflétant le taux de ventilation des organismes, a été évaluée.

Notre étude a permis d'évaluer, pour la première fois, la cinétique de toxicité de l'arséniate chez G. pulex en déterminant les concentrations létales entraînant 50% de mortalité. Après 240 heures d'exposition, l'arséniate peut être considéré comme environ 100 fois moins toxique que le cadmium chez G. pulex, bien que les bioconcentrations de ces deux éléments traces soient similaires à leurs LC50s respectives. Pour le cadmium, le BCF diminue significativement avec l'augmentation des concentrations d'exposition alors que pour l'arséniate, le BCF reste stable quelle que soit la concentration d'exposition testée. Par rapport au cadmium, le BCF obtenu pour l'arséniate est entre 148 et 344 fois plus faible. Dans le cas du cadmium, une réponse comportementale unilatérale est observée, avec une hypoventilation significative pour des concentrations supérieures ou proches de la LC50 obtenue. Pour l'arséniate, la réponse comportementale est bilatérale, avec une

hyperventilation observée pour les plus faibles concentrations d'exposition et une hypoventilation pour les plus fortes concentrations d'exposition. Tous les résultats obtenus ont été discutés en termes de (i) mécanismes possibles d'absorption métallique, (ii) de toxicité et de (iii) stratégie de réallocation énergétique.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*)

Céline Vellinger*, Marc Parant, Philippe Rousselle, Françoise Immel, Philippe Wagner, Philippe Usseglio-Polatera

Laboratoire des Interactions, Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), CNRS UMR 7146, Université Paul Verlaine – Metz, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

Summary

Cadmium is largely documented on freshwater organisms while arsenic, especially arsenate, is rarely studied. The kinetic of the LC50s values for both metals was realized on *Gammarus pulex*. Physiological [i.e. metal concentration in body tissues, bioconcentration factor (BCF)] effects and behavioural responses (via pleopods beats) were investigated after 240-h exposure. Arsenate LC50 value was 100 fold higher than Cd-LC50 value after 240-h exposure, while concentrations in gammarids were similar for both metals at their respective LC50s. BCF decreased with increasing cadmium concentration while BCF remained stable with increasing arsenate concentration. Moreover, BCF was between 148 and 344 times lower for arsenate than cadmium. A significant hypoventilation was observed for cadmium concentrations exceeding or close to the 240h-LC50_{Cd}, while gammarids hyperventilated for the lowest arsenate concentrations and hypoventilated for the highest arsenate concentrations. We discussed the relationships between potential action mechanisms of these two metals and observed results.

Key words: *Gammarus pulex*; Arsenate; cadmium; behavioural responses; toxicological effects

1. Introduction

Heavy metals are naturally present in the environment with low concentrations but anthropological discharge linked to urban and industrial activities contribute to increase their concentration in ground or aquatic ecosystems (Bubb and Lester, 1994; Chowdhury and Chandra, 1987; Markich and Brown, 1998; Zhang and Shan, 2008). In small quantities, some metals are essential for living organisms, but a deficit or an excess of such metals can have deleterious effects on organisms. On the contrary, other metals are considered as 'non-essential' because playing any known biological role (Demir et al., 2005; Hussein et al., 2005). Non-essential metals have toxic properties, leading to adverse effects on human and ecosystem health even in low concentration (Chowdhury and Chandra, 1987).

Cadmium is non-essential heavy metal, with free ionic form (Cd^{2+}) more bioavailable and consequently more toxic for aquatic organisms (Wang and Rainbow, 2006; Wright and Welbourn, 1994). Effects of cadmium are well documented in literature for aquatic organisms (Spehar et al., 1978; Wright and Welbourn, 1994). Arsenic (As) is a metalloid which may be considered as an essential ultra trace element in animals as chickens, goats, hamsters, pigs and rats (Nielsen, 1980; Uthus, 1992). Nevertheless, studies to date do not give evidence that arsenic is an essential element in humans or that it is required for any essential biochemical process (National Research Council, 1999). Few studies have been devoted to As, even if it is a widespread pollutant. The As toxicity is related to its chemical form and valence state, with inorganic forms being considered more toxic than organic ones (Bissen and Frimmel, 2003; Ventura-Lima et al., 2011).

In aquatic environments, inorganic arsenic can be found as trivalent form, the arsenite (As^{3+}), or more frequently as pentavalent form, the arsenate (As^{5+}). Arsenite is the most toxic form (Cervantes et al., 1994; Hughes, 2002; Sharma and Sohn, 2009; Styblo et al., 2000; Terlecka, 2005; Tseng, 2004). The two forms are inter-converted through redox reactions (Bears et al., 2006). The cellular metabolism involves reduction of pentavalent arsenic to trivalent arsenic followed by oxidative methylation to a pentavalent methyl arsenical (Thomas et al., 2007).

The freshwater quality standard in terms of Cd concentration for the protection of aquatic life is 'less than 1 $\mu\text{g/L}$ ' at low hardness (USEPA, 2001), whereas it is 'less than 5 $\mu\text{g/L}$ ' for As (CCME, 1999).

The freshwater amphipod *Gammarus pulex* is widely distributed in Europe and elsewhere in the world (Graca et al., 1994; Janetzky, 1994; Karaman and Pinkster, 1977), where it represents a major component of freshwater ecosystem. *G. pulex* has been considered among the most sensitive aquatic invertebrates to various chemicals (Adam et al., 2009; Alonso and De Lange, 2010; Canivet and Gilbert, 2002; Schulz and Liess, 1999; Van Wijngaarden et al., 2006). Gammarids are shredders and play a key functional role in leaf litter breakdown processes and consequently in nutrient cycling (Forrow and Maltby, 2000; McNeil et al., 1997). They play also a major structural role in community composition by predating other freshwater invertebrates (McNeil et al., 1997). McNeil et al., (2000) demonstrated that gammarids are one of the preferential preys of invertivorous fish and macroinvertebrates, and are also an important reserve of food for birds and amphibians. Because *G.pulex* accumulates generally more toxicants than other aquatic species (Mulliss et al., 1996), such toxicants can be transferred to the upper trophic levels. As a result, gammarids can be used for providing information about potential contamination level of

aquatic ecosystems (Rainbow, 1997; Zauke et al., 1995). Moreover, *G. pulex* is usually abundant in river ecosystem, easy to collect, with clear sexual dimorphism and easy to keep alive under laboratory conditions. For all these reasons, the use of *G. pulex* as test organism is increasing in ecotoxicology.

To the best of our knowledge, no study has been devoted on effects of arsenate on *G. pulex*. Here, we aimed at evaluating for the first time arsenate toxicity on this gammarid species. Individuals were exposed to various arsenate concentrations during 240-h and the kinetic of the LC50s values was established. At the end of the 10 day exposure period, the arsenate concentration in gammarids was measured and the bioconcentration factor (BCF) was calculated. Moreover, the arsenate impact on a behavioural marker (i.e. pleopod beats) related to organism oxygenation was examined. The 240h-LC50 value was related to physiological and behavioural observations. The same design was performed with cadmium, whose toxicity has been more documented in literature. We compared (i) the toxicity of cadmium (Cd) and arsenate (AsV) on *G. pulex* and (ii) its behavioural and physiological responses to both studied metals. Results were discussed in terms of mechanisms of (i) metal absorption, (ii) toxicity and (iii) energetic allocation.

2. Materials and methods

2.1. Organism sampling and acclimation

Gammarus pulex was used as test organism. Only males were kept to avoid potential sexual differences in sensitivity within the sexes (Sornom et al., 2010). Adults (mean body size = 10.0 ± 1.5 mm) were collected, using a hand net, from an unpolluted river: the Mehoulle River [Void-Vacon, France, Lambert II E (X = 841244; Y = 2412346)], between September and December 2010. Amphipods were sampled and quickly brought to the laboratory in plastic bags. Except for males in precopulat directly identified in the field, other individuals were sexed using stereomicroscope based on sexual dimorphism characters; e.g. males exhibiting more massive gnathopodes than females (Bollache et al., 2001 on *G. pulex*; Costa and Costa, 1999 on *Gammarus locusta*; Devin et al., 2003 on *Dikerogammarus villosus*). To prepare size measure of males, pictures were realized using binocular and Studio version 7 software. Then, pictures were manipulated using ImageJ software, Version 1.42q. Males were measured from the top of the cephalothorax to the base of the telson. Adult males were acclimatized for a week before experiments in mineral water (Volvic, France) under constant conditions (10°C in a temperature controlled room with a photoperiod of 16h of light and 8h

of darkness). Specimens were fed with discs of conditioned leaves during acclimation up to 24 h before starting experiments.

2.2. Experimental Design

After the acclimation period, 10 males of *G. pulex* were transferred from acclimation plastic bags to batches of plastic reservoirs (100 mm diameter and 20 mm high) containing 44 mL of toxic (experimental solutions) or Volvic (control) water and four glass pebbles ($\varnothing$ 15 mm, convex side down). As gammarids were not fed during the whole experiment, glass pebbles served both as substrate and refuge for animals to avoid at best cannibalism. Males of *G. pulex* were exposed to various treatments of arsenate (AsV) or cadmium (Cd), at 10°C with a photoperiod of 16 h light and 8 h darkness, during 240-h. The pH in test solutions was measured every three days and was maintained stable (7.32 ± 0.44) independently of the metal concentration level. Test reservoirs were saturated with metal solution 96 h before the beginning of experiments, minimizing metal adsorption during the experiment and allowing reaching an equilibrium before experiments. Five replicates for each concentration were performed. Chemicals were provided by SIGMA-Aldrich, UK. Stock metal solutions (i.e. $9.6 \text{ mg}_{\text{Cd}} \cdot \text{L}^{-1}$ and $20 \text{ mg}_{\text{AsV}} \cdot \text{L}^{-1}$) were prepared by dissolving cadmium chloride (CdCl_2) and sodium arsenate heptahydrate ($\text{AsHNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in milliQ water and were stabilized with 0.1% of HNO_3 (65%, Suprapure, Merck). Metal test solutions were prepared using mineral water (Volvic, France) as diluent of stock solutions. Seven concentrations of arsenate and eleven concentrations of cadmium (Cd) have been tested. Real concentrations of metals were measured and were illustrated in Table 1.

2.3. Cadmium and arsenate toxicity assessment

We aimed at determining the kinetic of *G. pulex* LC 50 value for both arsenate and cadmium until 240-h exposure. Dead animals were removed and mortality was recorded every 24 hours. To calculate day after day the LC50 values, the mortality was processed using a logistic curve-fitting procedure applying the method described by Isnard et al. (2001) and Vindimian et al. (1999). When more than 10% mortality was observed in control reservoirs, the Abbott's correction was applied (Abbott, 1925). The Excel macro REGTOX allowed us to estimate both LC50s using Hill model (Vindimian et al., 1983) and their confidence intervals. The significance of the coefficients of determination (R^2) between Cd-LC50 or AsV-LC50 and exposure time was tested using Student tests.

Table 1.

Mean ($\pm$ s.d.) real concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) of AsV and Cd tested for the experiments ($n=3$). Values were measured by graphite furnace atomic-absorption spectrophotometry (AAS Varian SpectrAA-330, detection limit = $2 \mu\text{g}_{\text{As}}\cdot\text{L}^{-1}$ and detection limit = $0.1 \mu\text{g}_{\text{Cd}}\cdot\text{L}^{-1}$) or by flame atomic-absorption spectrophotometry (AAS PERKIN ELMER AAnalyst 100, detection limit = $5 \mu\text{g}_{\text{As}}\cdot\text{L}^{-1}$ and detection limit = $20 \mu\text{g}_{\text{Cd}}\cdot\text{L}^{-1}$).

	Real concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	AsV	Cd
C1 = Control	<d.l	<d.l
C2	286.5 (± 10.6)	2.0 (± 0.1)
C3	519.0 (± 7.1)	3.8 (± 0.1)
C4	821.0 (± 2.8)	8.0 (± 0.3)
C5	965.0 (± 19.8)	14.9 (± 0.5)
C6	1304.0 (± 4.0)	27.0 (± 1.0)
C7	1548.0 (± 9.9)	56.7 (± 2.3)
C8		106.7 (± 5.0)
C9		237.3 (± 2.3)
C10		444.0 (± 12.7)
C11		872.0 (± 22.6)

2.4. Biological and behavioural procedures

2.4.1. Bioconcentration

Following 240-h exposure to treatment, three replicates, each with at least five male gammarids, were allocated to bioconcentration measurements. Alive gammarids were rinsed with Nanopure water and dried on filter paper. They were immediately stored at -20°C in zipped bags. Lots of five frozen amphipods were placed in polypropylene tubes of 10 mL, dried in a steam room at 65°C for 48h before dry weight measurement. Biological material was digested for 48 h at 65°C with 1 mL HNO_3 diluted in half (65%, suprapure, MERCK). Final samples and standard solutions were adjusted to concentration of 2% HNO_3 by addition of 4 mL of Nanopure water. Metal quantification in biological samples was performed using graphite furnace for arsenate or flame atomic absorption spectrophotometry (AAS) for cadmium. All metal concentrations in biological tissues were reported in $\mu\text{g metal}\cdot\text{g dry weight}^{-1}$. The BCFs were calculated from Duquesne et al. (2000) derived from Taylor (1983). For identifying significant differences among metal concentration in *G. pulex* or BCF according to the corresponding metal concentration in water after 240-h exposure, one way-ANOVAs were performed followed, if significant heterogeneity (i.e. $p < 0.05$) had been identified, by post-hoc HSD Tukey tests. The significance of the coefficients of determination (R^2) between metal concentration in *G. pulex* and arsenate or cadmium concentration in water was tested using Student tests.

2.4.2. Frequency of pleopod beating

The pleopods are specialized abdominal appendages used both for swimming and for facilitating respiratory gas exchanges across tegument (Torres et al., 1977). A close relationship has already been highlighted between ventilatory activity and oxygen uptake (Lawrence and Poulter, 1998; Quetin et al., 1978). Hence, pleopod beats could be used as a measure of respiration rate, relating hyperventilation to an increase in oxygen consumption and hypoventilation to a decrease in oxygen consumption. The effects of various concentrations in arsenate or cadmium (*vs.* control) on *G. pulex* pleopod beat frequency (PBF) were examined after 240-h exposure by adapting the protocol used by Wijnhoven et al. (2003). The measurement of PBF was performed using a binocular and a manual cell counter under red light (Sornom et al., 2010). Immediately after 240-h exposure, five amphipods for each concentration were individually placed in plastic reservoirs ($\varnothing = 3.8$ cm; height = 1.7 cm) containing the tested solution. They had been acclimatized for 2 hours at 10°C and for 3 minutes under red light before experiment. Pleopod beat mean frequency (MPBF) was recorded over 1 minute and expressed as a number of beats.min⁻¹. Three replicates per gammarid were performed (n=15 per tested concentration). The counting of pleopod beats was realized only when the gammarids were at rest. To remove any risk of daily variation in oxygen consumption, all measurements were accomplished rapidly from 14h00 to 18h00 as previously suggested by Maciel et al. (2004) and Rosas et al. (1992). A statistical strategy similar to that presented in § 2.4.1 was applied for identifying significant 'between-experiments' differences among both metal concentrations in *G. pulex* and MPBF values after 240-h exposure.

3. Results

3.1. Cadmium and arsenate toxicity assessment

After 240-h exposure, the LC50 values were 989.75 µg.L⁻¹ for AsV and 10.55 µg.L⁻¹ for Cd (Fig. 1), exhibiting approximately 100 fold concentration difference between the two metals. Between 24 and 240-h, an increase in metal toxicity was observed with an increase in exposure time (Fig. 2). LC50 values were gathered in table 2 for both metals and for each exposure time.

LC50s values decreased with exposure time for both metals (R^2 -t-test, $p = 2.08 \times 10^{-08}$ and $p = 2.85 \times 10^{-09}$ for Cd and AsV, respectively). The 240h-LC50_{Cd} was 125 fold lower than the 24h-

LC50_{Cd}. In contrast, the 240h-LC50_{AsV} was only 3 fold lower than the 24h-LC50_{AsV} (Fig. 2 and table 2).

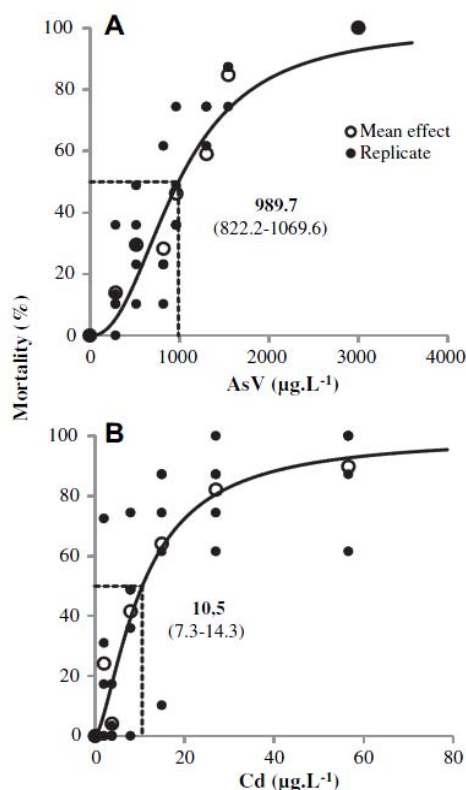


Figure 1. Dose-mortality curves after 240-h arsenate (A) or cadmium (B) exposure for *Gammarus pulex*. The dotted lines represent the values of LC50s ($\pm$ 95 % confidence interval). An Abbott's correction was realized because mean mortality rate in the controls was about 22 %.

Table 2.

LC50 values with 95 % confidence intervals for *Gammarus pulex* between 24-h and 240-h arsenate or cadmium exposure.

Exposure time (h)	LC50 ($\mu\text{g/L}$)	
	Arsenate	Cadmium
24 h	2913.8 (1901.0–2940.5)	1323.1 (933.3–1573.6)
48 h	2578.7 (1637.0–3064.3)	248.6 (203.9–270.8)
72 h	2436.2 (1667.7–2699.6)	154.9 (131.8–177.8)
96 h	2413.4 (1625.7–2787.5)	103.6 (89.2–117.4)
120 h	2263.3 (1717.0–2431)	72.3 (58.3–89.6)
144 h	2143.7 (1506.7–2176.2)	46.7 (35.0–60.2)
168 h	1779.5 (1274.4–1922.3)	33.5 (22.8–28.9)
192 h	1497.4 (1216.3–1642.5)	26.0 (17.5–29.2)
216 h	1249.5 (1041.9–1327.9)	16.1 (11.4–20.3)
240 h	989.7 (822.2–1069.6)	10.5 (7.3–14.3)

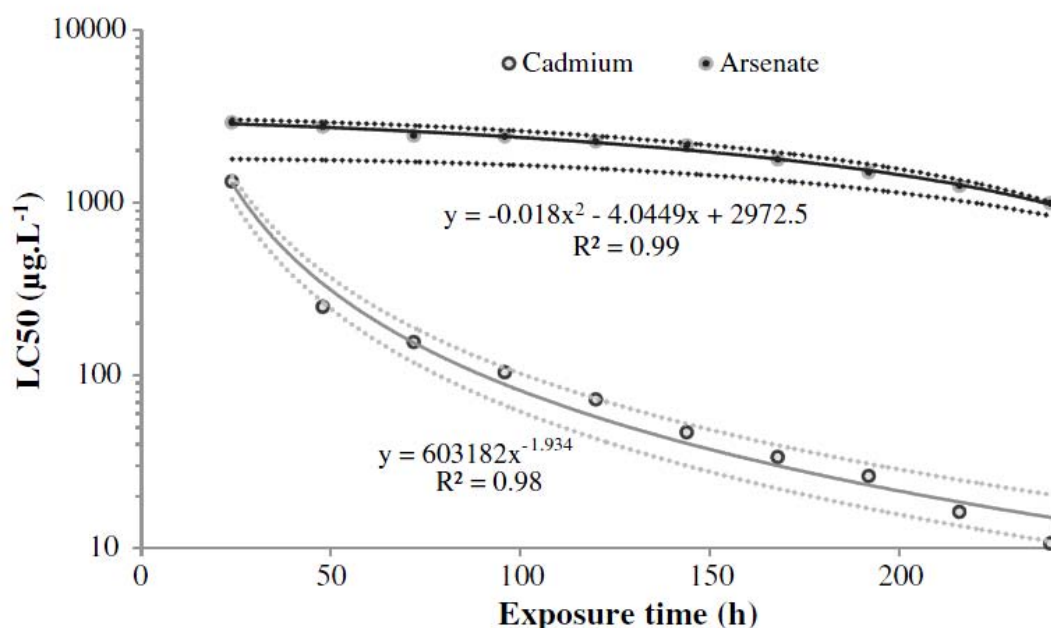


Figure 2. Kinetics analysis of the arsenate and cadmium toxicity for *Gammarus pulex*. LC50 values ($\mu\text{g.L}^{-1}$) and their 95% confidence intervals (dotted lines) were estimated using REGTOX (Vindimian et al., 1999; Isnard et al., 2001).

3.2. Bioconcentration

After 240-h exposure, the observed metal concentration in gammarids increased for both Cd and AsV with the increase in water metal concentration during exposure (Fig. 3, R^2 -t-test, $p = 1.70 \times 10^{-06}$ and $p = 9.4 \times 10^{-04}$ for Cd and AsV, respectively). The internal arsenate concentration in gammarids was significantly higher in contaminated reservoirs than in control reservoirs only for water concentration at least equal to $821.0 \mu\text{g}_{\text{AsV.L}^{-1}}$ during exposure. No significant difference was observed when comparing gammarids from 286.5 or $519.0 \mu\text{g}_{\text{AsV.L}^{-1}}$ contamination level to gammarids from the control reservoirs (Fig. 3A). Similarly, the internal cadmium concentration in gammarids increased significantly when water concentration was at least equal to $8 \mu\text{g}_{\text{Cd.L}^{-1}}$ during exposure (Fig. 3B). The mean AsV -BCF in gammarids was $10.72 (\pm 2.69)$ and not external AsV concentration dependent (Fig. 4A, $p = 0.34$, one way-ANOVA test). In contrast, the mean Cd BCF gradually decreased between 3.8 and $56.7 \mu\text{g}_{\text{Cd.L}^{-1}}$ in water during exposure (Fig. 4B, $p = 0.019$, one way-ANOVA test). The mean Cd BCF value was at least equal to 1589 and reached 3800 for a 240-h exposure to $3.8 \mu\text{g}_{\text{Cd.L}^{-1}}$.

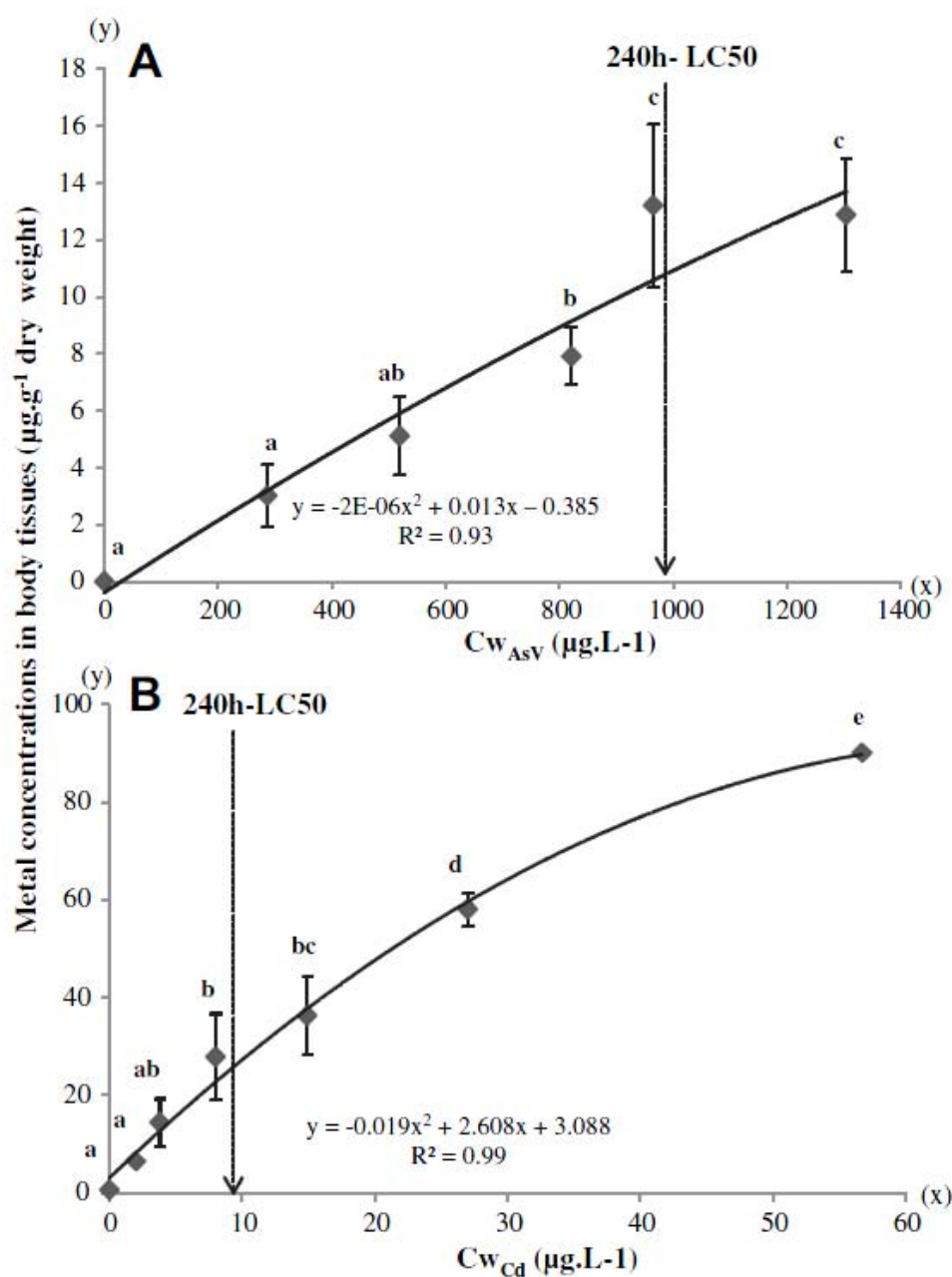


Figure 3. Relationship between metal concentration in *Gammarus pulex* body tissues after 240-h exposure ($\mu\text{g.g}^{-1}$ dry weight) and (A) arsenate or (B) cadmium concentration in water during exposure [Cw]. Significant differences are marked by different letters (Tukey HSD test; $p < 0.05$).

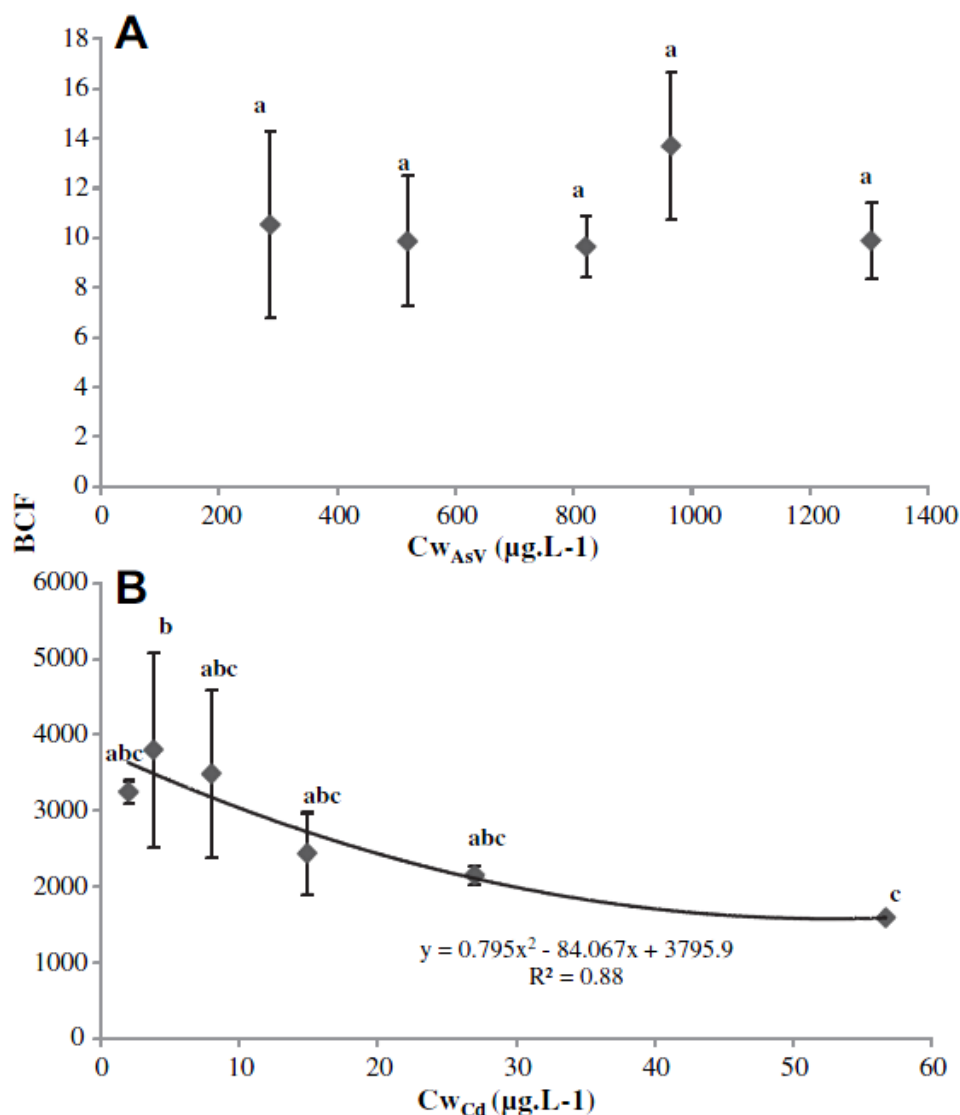


Figure 4. Relationship between mean ($\pm$ s.d.) bioconcentration factor (BCF) in *Gammarus pulex* after 240-h exposure and (A) arsenate or (B) cadmium water concentration during exposure [Cw]. Significant differences were marked by different letters (Tukey HSD test, $p < 0.05$).

3.3. Pleopod beats

Patterns of mean pleopod beat frequencies (MPBF) were depending on concentration exposure for both metals. After 240-h exposure, MPBF of gammarids from control reservoirs for Cd *vs.* AsV experiments were not significantly different ($n = 15$, $p = 0.58$, Student t-test; Fig.5A *vs.* Fig 5B). A biphasic behaviour was observed with AsV with an hyperventilation in the [519 – 821 $\mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$] concentration range leading to a significantly higher MPBF of gammarids if compared to that of gammarids exposed to AsV concentration upper than 1304 $\mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fig. 5A). However, no significant difference in MPBF was identified, despite of

observed trends previously described, between control and AsV exposed gammarids. Cd concentration exceeding $14.9 \mu\text{g}_{\text{Cd}}\cdot\text{L}^{-1}$ led to a significant decline in ventilation of *G. pulex* (Fig. 5B). For both metals, the reduction of MPBF was more marked immediately after the LC50 value.

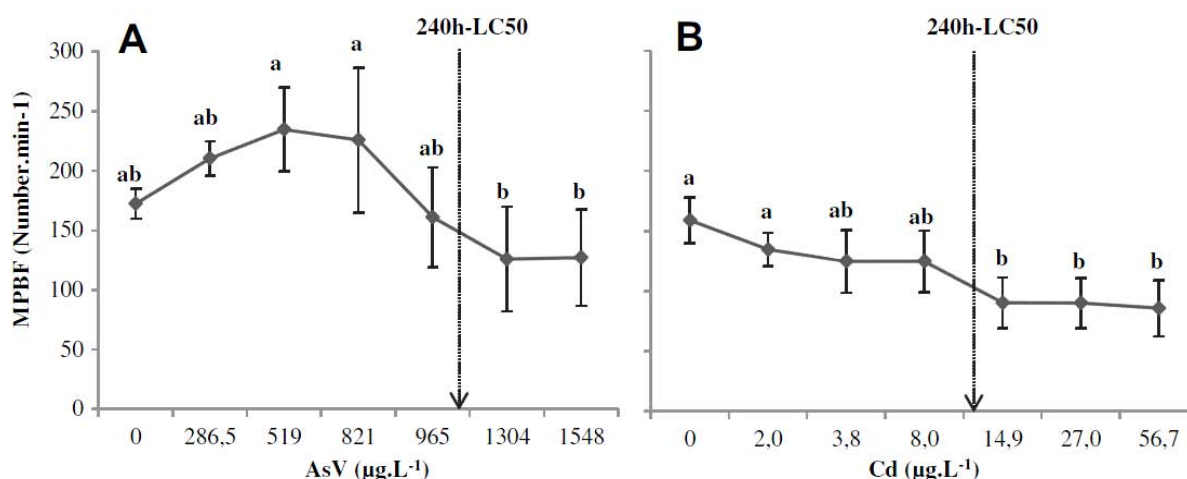


Figure 5. Mean pleopod beat frequency (MPBF $\pm$ s.d.) of *Gammarus pulex* exposed for 240 h to various arsenate (A) or cadmium (B) concentrations. Significant differences were represented by different letters ($n = 15$ for each metal concentration; One way-ANOVA and Tukey HSD test; $p < 0.05$).

4. Discussion

4.1. Arsenate and cadmium toxicity comparison

The LC50_{Cd} values of *G. pulex* from the Mehoulle River (Meuse basin, Northeastern France) were very similar to LC50 values obtained by Felten et al. (2008) for the same crustacean species from the Bourbre river (Rhône basin; Southeastern France), especially at 168-hour (33.5 vs. $21.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and 240-h (10.5 vs. about $15.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) exposure. The highest differences between these two studies were observed at 48-hour and 120-hour exposure (248.6 vs. $494.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 72.3 vs. $37.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). According to Crane (1995), this kind of variability demonstrates the necessity to work with a long time exposure (> 6 days) to avoid inter-population differences within ubiquitous species able to live under various environmental conditions. Observed 'between-experiments' differences in Cd sensitivity may be due to the use of field-collected macroinvertebrates from populations exhibiting particular life-history trait adaptations (Lambrechts et al., 1997; Usseglio-Polatera et al., 2000; 2001). Differences between populations in toxicant sensitivity have been also linked to (i) physiological

differences in tested organisms related to gender (Sornom et al., 2010); life stage (Alonso and De Lange, 2010) and reproductive period (McCahon and Pascoe, 1988), (ii) experimental conditions [e.g. temperature (Heugens et al., 2003); salinity (Sornom et al., 2010 ; Theede et al., 1979) ; hardness (Calamari et al., 1980; Pascoe et al., 1986); acclimation (Stuhlbacher and Maltby, 1992); presence of food (Abel and Bärlocher, 1988; Kluttgen and Ratte, 1994)] or (iii) other parameters which can affect bioavailability and cadmium speciation (Brown and Markich, 2000; Di Toro et al., 2001; Morel, 1983; Pagenkopf, 1983).

Most studies of inorganic arsenic toxicity have focused on the trivalent arsenic considered as more toxic than the inorganic pentavalent form (Bertolero et al., 1987). For the first time, the $LC50_{AsV}$ values for the amphipod *G. pulex* were estimated. They were $2413.4 \mu g_{AsV}.L^{-1}$ and $989 \mu g_{AsV}.L^{-1}$ at 96-h and 240-h exposure, respectively. Previous studies on freshwater species have evaluated the 96-hour $LC50$ value for the freshwater fish, *Catla catla*, which was 18 fold higher (i.e. $43780 \mu g.L^{-1}$) than that of *G. pulex* for the same exposure time. Our study showed that $LC50_{AsV}$ values were respectively 2.2 and 100 fold higher than the $LC50_{Cd}$ values at 24- and 240-h exposure, illustrating the difference in toxicity between these two metals.

For both cadmium and arsenate, the toxicity increased with exposure time but the range of *Gammarus* mortality-inducing cadmium concentration during the 240-h experiments was higher than the corresponding range of AsV concentration. The reason why gammarids are more tolerant to arsenate than cadmium, when the exposure time becomes longer is not well known. Despite an exposure time of 240 h, closer to ecological conditions than acute toxicity tests, , the $LC50$ values were higher than metal concentrations observed in French polluted freshwaters [Ministère de la santé et de la protection sociale (2003): maximal values = $65 \mu g_{As}/L$ and $5.1 \mu g_{Cd}/L$]. On the contrary, in the Bengal districts of India, measured arsenic concentration in ground water has been sometimes 3.7 fold higher than our *G. pulex* $LC50$ value at 240-h exposure (Chatterjee et al., 1995: $0.05 - 3.7 mg_{As}/L$). The dissolved cadmium concentration in some impaired environments could be 6.7 to 30 times higher than our observed 240h- $LC50$ value [e.g. Flanders freshwaters (Bervoets et al., 2005); Ross Lake, Canada (Canadian Environmental Protection Act, 1994)]. Considering the key functional role of *G.pulex* in macroinvertebrate assemblages, cadmium or arsenate contamination can potentially have major consequences on stream ecological functioning.

4.2. Bioconcentration

Metal concentration in gammarids increased with water Cd or AsV concentration (Fig. 3). Luoma and Rainbow (2008) reported that uptake of trace metals from solution is primarily concentration dependent. The BCF was between 148 and 354 fold higher for Cd than AsV after 240-h exposure (Fig. 4). The 240 h - LC50_{AsV} value was about 100 times higher than the 240-h - LC50_{Cd} (Fig. 1). They corresponded to internal concentrations of 10.5 $\mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight and 28.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight, respectively (Fig. 3). Hence, the internal concentrations of the two metals were finally more similar than expected according to the 240h-LC50 values. A metal can penetrate into the gammarid body by three potential ways. A first way is direct introduction with food and drinking water absorption. A second potential way is through cuticle. A third way involves diffusion processes across exchange surfaces. In our study, no food was provided to the organisms during the experiments, excluding this way of contamination but the hypothesis that gammarids have – at least partially – uptaken metals by drinking water cannot be eliminated. Gammarids are arthropods with a thick exoskeleton composed of calcified chitin which fully covers their body. The structure of the crustacean exoskeleton is assumed to be relatively impermeable to toxic elements entering by cuticular way (Rainbow, 1997), probably excluding the second potential way of penetration. The most successful penetration way for AsV and Cd might be through exchange surfaces as gills. In many freshwater species, metals are concentrated in gills where they can significantly influence the osmoregulation and the respiration processes (Homnick, 1977; Wicklund-Glynn et al., 1994). In the fish species *Salmo gairdneri*, Reid and McDonald (1988) showed that Cd can interfere with the transport and metabolism of calcium at intracellular level. Calcium transport was first done by facilitated diffusion using calcium channels located in the apical membrane of chlorid cells (Reid and McDonald, 1988; Verbost et al., 1987). At the cell basal membrane level, the calcium transport becomes active by a Ca^{2+} -ATPase and/ or by $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange (Flik et al., 1994; Lucu, 1994; Towle, 1993). Because the ionic forms Cd^{2+} and Ca^{2+} have the same size, they can compete for binding with the same ligand type (Rainbow, 1995). This process could explain why Cd under its free ionic form Cd^{2+} is more bioavailable, and consequently more toxic, for aquatic organisms (Part et al., 1985; Sunda et al., 1978; Wang and Rainbow, 2006; Wright and Welbourn, 1994).

4.3. Pleopod beat frequency

Pleopod beat frequency decreased with an increase in Cd concentration. Cadmium can damage gill cells (Felten et al., 2008), what can hinder gas uptake capacity. A significant

hypoventilation was observed in *G. pulex* after 240-h exposure for concentrations exceeding or close to the CL50. Few studies have been devoted to the effect of Cd on ventilation activity. In accordance with Alonso et al. (2009) and Felten et al. (2008) results, we observed a significant decrease in ventilation activity of *G. pulex* when exposed to cadmium. The oxygen uptake is generally decreasing in crustaceans exposed to acute heavy metal contamination (Spicer and Weber, 1991). This pattern could be explained by both cytological damages (Soegianto et al., 1999; Wu and Chen, 2004) and disruption to energy allocation mechanisms. Hervant et al. (1997) demonstrated that hypoxia induced a decrease in locomotion and ventilation activity for reducing energetic request and for conserving the glycogen and phosphate reserves to optimize individual survival in *Stenasellus virei* (Isopoda). Cowles and Childress (1988) showed that a reduced locomotion could induce a decrease in oxygen consumption and consequently in ventilatory activity. The negative effect of Cd on the locomotion activity already observed in *G. pulex* (Felten et al., 2008) could explain the decrease in MPBF observed in our study with the same metal (Fig. 5B). Individuals exposed to a given stress must reallocate a part of energy usually used for displacement or pleopod beats (Thomasson et al., 2003) to detoxication processes or in-cellular reparation mechanisms. This redirection of energy is all the more marked when the toxicant concentration increases.

Drinking water or metal-binding ligands in gills could be the major entrance ways of arsenate. It cannot be excluded that damaged cells in gills favoured the passive entrance of arsenate. As AsV can compete with phosphate ions (Fattorini and Regoli, 2004; Kavitha et al., 2010), arsenate could penetrate inside the organism through phosphate channels. Arsenate could also interfere with phosphorylation reactions within electron transport chain or glucose metabolism (Andrew et al., 2003; Gebel, 2000; Ghosh et al., 2007; Tseng, 2004). This mimetic effect could theoretically impede glucose metabolism and disrupt energy production (Fattorini and Regoli, 2004). To our knowledge, no study has been devoted to the effect of arsenate on ventilatory activity. At low concentration exposure gammarids tended to increase their MPBF probably to allocate more oxygen to energetic metabolism (due to phosphate mimetism or for active detoxication) because the energetic profit of this hyperventilation was upper than its energetic cost (produced ATP > consumed ATP). At high arsenate concentration, the mimetic binding effect of this metal with phosphate more severely disrupted the ATP production. As a result, organisms decreased their MPBF to reduce energy depletion due to active movements, the energetic cost of movements being higher than their energetic profit. However, we cannot exclude that the decrease of pleopod

beats was also associated with an increase in arsenate toxicity when *G. pulex* was exposed to the strongest arsenate concentrations. In fact, Thomas et al. (2001) and Vahter (2002) and numerous other ecotoxicologists have demonstrated that absorbed AsV in living organisms is readily reduced to AsIII, the more toxic form (see also Gregus and Nemeti, 2007). This biotransformation of AsV in AsIII can therefore be considered as bioactivation.

The BCF decline with metal concentration when gammarids were exposed to Cd (Fig. 4B) could be linked to chlorid cell saturation. The AsV- BCF remained stable with increasing metal concentration with a value of about 10.7 (Fig. 4A). We hypothesized that the main way of AsV intrance in *G. pulex* was drinking water that leaded to an internal concentration of metal roughly proportional to water concentration. The Cd *vs.* AsV difference in penetration processes could explain the difference in BCF between these two metals (about 10.7 for AsV *vs.* 1589 to 3245 for Cd) and why *G. pulex* seemed to be more tolerant to arsenate than cadmium.

5. Conclusion

We provided for the first time arsenate toxicity values for *G. pulex*, a test-species already largely used in ecotoxicology, and compared them to cadmium toxicity values. Arsenate and Cadmium seem (i) to use different ways for penetrating into the organism and (ii) to involve quite different toxicological mechanisms, which could explain why *G. pulex* was much more tolerant to AsV than to Cd exposure. Further researches should be devoted to shed additional light on the action mechanisms of arsenate and cadmium on benthic organisms but also on the response mechanisms to both metals at cell scale. Proteomic approaches could be a promising way to explore related biochemical processes, i.e. impaired specific enzymatic activities and involved metabolic pathways during cellular responses.

6. References

- Abbott W.S., 1925. Method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of economic entomology* 18, 265-267.
- Adam O., Badot P.M., Degiorgi F., Crini G., 2009. Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 441-449.
- Abel T., Bärlocher F., 1988. Uptake of cadmium by *Gammarus fossarum* (Amphipoda) from food and water. *Journal of Applied Ecology*. 25, 223-231.
- Alonso A. and De Lange H.J., 2010. Contrasting sensitivities to toxicants of the

freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *G. fossarum*. *Ecotoxicology* 19, 133-140.

Alonso A., De Lange H.J., Petters E.T.H.M., 2009. Development of a feeding behavioural bioassay using the freshwater amphipod *Gammarus pulex* and the multispecies freshwater biomonitor. *Chemosphere* 75, 341-346.

Andrew A.S., Warre A.J., Brachowsky A., Temple K.A., Klei L., Soucy N.V., Oara K.A., Hamilton J.W., 2003. Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells. *Environmental Health Perspectives* 111, 825-835.

Bears H., Richards J.G., Schulte P.M., 2006. Arsenic exposure alters hepatic arsenic species composition and stress-mediated gene expression in the common killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquatic Toxicology* 77, 257-266.

Bertolero F., Pozzi G., Sabbioni E., Saffiotti U., 1987. Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. *Carcinogenesis* 8, 803-808.

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

Bissen M., Frimmel F.H., 2003. Arsenic - a review. part I: occurrence, toxicity, speciation, mobility. *Environmental Chemistry* 31, 9-18.

Bollache L., Gambade G., Cézilly F., 2001. The effects of two acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus*, on pairing success in male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 49, 293-303.

Brown P.L., Markich S.J., 2000. Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: extension of the conceptual model. *Aquatic Toxicology* 51, 177-194.

Bubb J.M., Lester J.N., 1994. Anthropogenic heavy metal inputs to lowland river systems, a case study: The River Stour, U.K. *Water Air Soil Pollution* 78, 279-296.

Calamari D., Marchetti R., Vailati G., 1980. Influence of water hardness on cadmium toxicity to *Salmo gairdneri* Rich. *Water Research* 14, 1421-1426.

Canadian Environmental Protection Act., 1994. Priority substances list, assessment report, cadmium and its compounds.

Canivet V., Gilbert J., 2002. Sensitivity of epigeal and hypogean freshwater macroinvertebrates to complex mixtures. part I: laboratory experiments. *Chemosphere* 46, 999-1009.

- CCME (Conseil canadien des ministres de l'environnement) 1999. Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux : protection de la vie aquatique – arsenic, in *Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement*, 1999, Winnipeg.
- Cervantes C., Ji G., Ramirez J., Silver S., 1994. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 355-367.
- Chatterjee A., Das D., Mandal B.K., Chowdhury T.R., Samanta G., Chakraborti D., 1995. Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: The biggest arsenic calamity in the world. Part I: arsenic species in drinking water and urine of the affected people. *Analyst* 120, 643-650.
- Chowdhury B.A., Chandra R.K., 1987. Biological and health implications of toxic heavy metal and essential trace element interactions. *Progress in Food and Nutrition Science* 11, 55-113.
- Costa F.O., Costa M.H., 1999. Life history of the amphipod *Gammarus locusta* in the Sado estuary (Portugal). *Acta Oecologica* 20, 305-314.
- Cowles D.L., Childress J.J., 1988. Swimming speed and oxygen consumption in the bathypelagic mysid *Gnathophausia ingens*. *Biological Bulletin* 175, 111-121.
- Crane M., 1995. Effect of zinc on four populations and two generations of *Gammarus pulex*. *Freshwater Biology* 33, 119-126.
- Demir T.A., Isikli B., Ürer S.M., Berber A., Canbek M., Kalyoncu C., 2005. Nickel exposure and its effects. *Biometals* 18, 7-13.
- Devin S., Piscart C., Beisel J.N., Moreteau J.C., 2003. Ecological traits of the amphipod invader *Dikerogammarus villosus* on a mesohabitat scale. *Archiv für Hydrobiologie* 158, 43-56.
- Di Toro D.M., Allen H.E., Bergman H.L., Meyer J.S., Paquin P.R., Santore R.C., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. technical basis. *Environmental Toxicology* 20, 2383-2396.
- Duquesne S., Riddle M., Schulz R., Liess M., 2000. Effects of contaminants in the antarctic environment - potential of the gammarid amphipod crustacean *Paramorea walkeri* as a biological indicator for antarctic ecosystems based on toxicity and bioaccumulation of copper and cadmium. *Aquatic Toxicology* 49, 131-143.
- Fattorini D., Regoli F., 2004. Arsenic speciation in tissues of the Mediterranean polychaete *Sabella spallanzanii*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1881-1887.
- Felten V., Charmantier G., Mons R., Geffard A., Rousselle P., Coquery M., Garric J., Geffard O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea:

- Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 86, 413-425.
- Flik G., Verboost P.M., Astma W., Lucu C., 1994. Calcium transport in gill plasma membranes of the crab *Carcinus maenas*: evidence for carriers driven by ATP and a Na⁺ gradient. *The Journal of Experimental Biology* 195, 109-122.
- 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.
- Gebel T., 2000. Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology* 144, 155-162.
- Ghosh D., Datta S., Bhattacharya S., Mazumder S., 2007. Long-term exposure to arsenic affects head kidney and impairs humoral immune responses of *Clarias batrachus*. *Aquatic Toxicology* 81, 79-89.
- Graca M.A.S., Maltby L., Calow P., 1994. Comparative ecology of *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) .1. population-dynamics and microdistribution. *Hydrobiologia* 281, 155-162.
- Gregus Z., Nemeti B., 2007. Glutathione-dependent reduction of arsenate by glycogen phosphorylase - responsiveness to endogenous and xenobiotic inhibitors. *Toxicological Sciences* 100, 44-53.
- Hervant F., Mathieu J., Messana G., 1997. Locomotory, ventilatory and metabolic responses of the subterranean *Stenasellus virei* (Crustacea: Isopoda) to severe hypoxia and subsequent recovery. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences* 320, 139-148.
- Heugens E.H.W., Jager T., Creyghton R., Kraak M.H.S., Hendriks A.J., Van Straalen N.M., Admiraal W., 2003. Temperature-dependent effects of cadmium on *Daphnia magna*: accumulation versus sensitivity. *Environmental Science and Technology* 37, 145-2151.
- Homnick H., 1977. Chloride cells and chloride epithelia of aquatic insects. *International Review of Cytology* 49, 285-328.
- Hughes, M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters* 133, 1-6
- Hussein H., Farag S., Kandil K., Moawad H., 2005. Tolerance and uptake of heavy metals by pseudomonads. *Process Biochemistry* 40, 955-961.
- Isnard P., Flammarion P., Roman G., Babut M., Bastien P., Bintein S., Esserméant L., Féraud J.F., Gallotti-Schmitt S., Saouter E., Saroli M., Thiébaud H., Tomassone R., Vindimian E., 2001. Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere* 45, 659-669.
- Janetzky W., 1994. Distribution of the genus *Gammarus* (Amphipoda: Gammaridae) in the River Hunte and its tributaries (Lower Saxony, Northern Germany). *Hydrobiologia* 294, 22-34.

- Karaman G.S., Pinkster S., 1977. Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda), *Bijdr.Dierk.* 47, 1-97.
- Kavitha C., Malarvizhi A., Kumaran S.S., Ramesh M., 2010. Toxicological effects of arsenate exposure on hematological, biochemical and liver transaminases activity in an Indian major carp, *Catla catla*. *Food and Chemical Toxicology*. 48, 2848-2854.
- Kluttgen B., Ratte H.T., 1994. Effects of different food doses on cadmium toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 1616-1627.
- Lambrechts M.M., Blondel J., Hurtrez-Bousses S., Maistre M., Perret P., 1997. Adaptive inter-population differences in blue tit life-history traits on Corsica. *Evolutionary Ecology* 11, 599-612.
- Lawrence A.J., Poulter C., 1998. Development of a sub-lethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*. *Water Research* 32, 569-578.
- Lucu C., 1994. Calcium transport across isolated gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology* 268, 339-346.
- Luoma N., Rainbow P. S., 2008. Metal Contamination in Aquatic Environment. Science and Lateral Management. Cambridge. University Press. New York. NY. USA.
- Maciel F.E., Rosa C.E., Santos E.A., Monserrat J.M., Nery L.E.M., 2004. Daily variations in oxygen consumption, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the gills and hepatopancreas of an estuarine crab. *Canadian Journal of Zoology* 82, 1871-1877 .
- Markich S.J., Brown P.L., 1998. Relative importance of natural and anthropogenic influences on the fresh surface water chemistry of the Hawkesbury Nepean river, south-eastern Australia. *Science of the Total Environment* 217, 201-230.
- McCahon C.P., Pascoe D., 1988. Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluation tests: culture and selection of a sensitive life stage. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 15, 245-252.
- McNeil C., Dick J.T.A., Elwood R.W., 1997. The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea; Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews* 72, 349-364.
- McNeil C., Elwood R.W., Dick J.T.A., 2000. Factors influencing the importance of *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda) in riverine salmonid diets. *Archiv für Hydrobiologie* 149, 87-107.
- Ministère de la santé et de la protection sociale, 2003. Ressources en eau-Distribution de l'eau d'alimentation- Qualité des eaux distribuées

dans les unités de distribution de plus de 5000 habitants. Rapport de synthèse 1996-1997-1998.

Morel F., 1983. Principles of aquatic chemistry. John Wiley and Sons, Inc., Somerset, 446 p.

Mulliss R.M., Revitt D.M., Shutes R.B.E., 1996. A statistical approach for the assessment of the toxic influences on *Gammarus pulex* (Amphipoda) and *Asellus aquaticus* (Isopoda) exposed to urban aquatic discharges. Water Research 30, 1237-1243.

National Research Council, 1999. Arsenic in Drinking Water. National Academy Press, Washington, DC.

Nielsen F.H., 1980. Evidence of the essentiality of arsenic, nickel, and vanadium and their possible nutritional significance. Advances in Nutritional Research 24, 157-172.

Pagenkopf G.K., 1983. Gill surface interaction model for trace metal toxicity to fish: role of complexation, pH and water hardness. Environmental Science and Technology 17, 342-347.

Part P., Svanberg O., Kiessling A., 1985. The availability of cadmium to perfused rainbow trout gills in different water qualities. Water Research 19, 427-434.

Pascoe D., Evans S.A., Woodworth J., 1986. Heavy metal toxicity to fish and the influence of water hardness. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 15, 481-487.

Quetin L.B., Mickel T.J., Childress J.J., 1978. A method for simultaneously measuring the oxygen consumption and activity of pelagic crustaceans. Comparative Biochemistry and Physiology A59, 263-266.

Rainbow P.S., 1995. Physiology, physicochemistry and metal uptake - a crustacean perspective. Marine Pollution Bulletin 31, 55-59.

Rainbow P.S., 1997. Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. Estuarine, Coastal and Shelf Science S44, 169-175.

Reid S.D., McDonald D.G., 1988. Effects of cadmium, copper and low pH on ion fluxes in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Canadian Journal of Fisheries 45, 244-253.

Rosas C., Sanchez A., Escohar E., Soto L. Bolongaro-Crevenna A., 1992. Daily variations of oxygen consumption and glucose hemolymph level related to morphophysiological and ecological adaptations of Crustacea. Comparative Biochemistry and Physiology 101A, 323-328.

Schulz R., Liess M., 1999. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. Aquatic Toxicology 46, 155-176.

Sharma V.K., Sohn M., 2009. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and

- remediation. *Environment International* 35, 743-759.
- Soegianto A., Charmantier-Daures M., Trilles J., Charmantier G., 1999. Impact of cadmium on the structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Aquatic Living Resources* 12, 57-70.
- Sornom P., Felten V., Medoc V., Sroda S., Rousselle P., Beisel J.N., 2010. Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environmental Pollution* 158, 1288-1295.
- Spehar R.L., Anderson R.L., Fiandt J.T., 1978. Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic invertebrates. *Environmental Pollution* 15, 195-208.
- Spicer J.I., Weber R.E., 1991. Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100C, 339-342.
- Styblo M., Del Razo L.M., Vega L., Germolec D.R., LeClyuise E.L., Hamilton G.A., Reed W., Wang C., Cullen W.R., Thomas D.J., 2000. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Archives of Toxicology* 74, 289-299.
- Stuhlbacher A., Maltby L., 1992. Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (l.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22, 319-324.
- Sunda W.G., Engel D.W., Thuotte R.M., 1978. Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp, *Palaemonetes pugio*: importance of free cadmium ion. *Environmental Science and Technology* 12, 409-413.
- Taylor D., 1983. The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 7, 33-42.
- Terlecka E., 2005. Arsenic speciation analysis in water samples: a review of the hyphenated techniques. *Environmental Monitoring and Assessment* 107, 259-284.
- Theede H., Scholz N., Fischer H., 1979. Temperature and salinity effects on the acute toxicity of cadmium to *Laomedea loveni* (Hydrozoa). *Marine Ecology Progress Series* 1, 13-19.
- Thomas D.J., Styblo M., Lin S., 2001. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology* 176, 127-144.
- Thomas D.J., 2007. Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 222, 365-373.
- Thomasson M.A., Johnson M.L., Strömberg J.O., Gaten E., 2003. Swimming capacity and pleopod beat rate as a function of sex, size and

moult stage in northern krill meganyctiphanes Norvegica. Marine Ecology Progress Series 250, 205-213.

Torres J.J., Gluck D.L. and Childress J.J., 1977. Activity and physiological significance of the pleopods in the respiration of *Callinassa californiensis* (dana) (Crustacea: Thalassinidae). Biological Bulletin 152, 134-146.

Towle D.W., 1993. Ion transport systems in membrane vesicles isolated from crustacean tissues. Journal of Experimental Zoology 265, 387-396.

Tseng C., 2004. The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. Toxicology and Applied Pharmacology 197, 67-83.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2001. Uptake of ambient water quality criteria for cadmium. EPA-822-R-OA-001, Washington, DC

Usseglio-Polatera P., Bournaud M., Richoux P., Tachet H., 2000. Biological and ecological traits of benthic freshwater macroinvertebrates: relationships and definition of groups with similar traits. Freshwater Biology 43, 175-205.

Usseglio-Polatera P., Richoux P., Bournaud M., Tachet H., 2001. A functional classification of benthic macroinvertebrates based on biological and ecological traits: application to river condition assessment and stream management. Archiv für Hydrobiologie Suppl 139/1, 53-83.

Uthus E.O., 1992. Evidence for arsenic essentiality. Environmental Geochemistry and Health 14, 55-58.

Vahter M., 2002. Mechanisms of arsenic biotransformation. Toxicology 181-182, 211-217.

Van Wijngaarden R.P.A., Brock T.C.M., van den Brink P.J., Gylstra R., Maund S.J., 2006. Ecological effects of spring and late summer applications of lambda-cyhalothrin on freshwater microcosms. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 50, 220-239.

Ventura-Lima J., Reis Bogo M.R., Monserrat J.M., 2011. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: a comparative biochemical approach. Ecotoxicology and Environmental Safety 74, 211-218.

Verboost P.M., Flik G., Lock R.A.C., Wendelaar Bonga S.E., 1987. Cadmium inhibition of Ca²⁺ uptake in rainbow trout gills. American Journal of Physiology 253, 216-221.

Vindimian E., Robaut C., Fillion G., 1983. A method for cooperative or noncooperative binding studies using nonlinear regression analysis on a microcomputer. Journal of Applied Biochemistry 5, 261-268.

Vindimian E., Garric J., Flammarion P., Thybaud E., Babut M., 1999. An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and

chronic tests and expert judgements. Environmental Toxicology and Chemistry 18, 386-2391.

Wang W., Rainbow P.S., 2006. Subcellular partitioning and the prediction of Cadmium toxicity to aquatic organisms. Environmental Chemistry 3, 395-399.

Wicklund Glynn A., Norrgrenb L. Müssenera A., 1994. Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. Aquatic Toxicology 30, 13-26.

Wijnhoven S., Van Riel M.C., Van der Velde G., 2003. Exotic and indigenous freshwater gammarid species: physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water. Aquatic Ecology 37, 151-158.

Wright D.A., Welbourn P.M., 1994. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological

effects on biota. Environmental Reviews 2, 187-214.

Wu J.P. and Chen H., 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Chemosphere 57, 1591-1598.

Zauke G., Von Lemm R., Meurs H., Butte W., 1995. Validation of estuarine gammarid collectives (Amphipoda: Crustacea) as biomonitors for cadmium in semi-controlled toxicokinetic flow-through experiments. Environmental Pollution 90, 209-219.

Zhang H., Shan B., 2008. Historical records of heavy metal accumulation in sediments and the relationship with agricultural intensification in the Yangtze-Huaihe region, China. Science of the Total Environment 399, 113-120.

Résultats complémentaires

En dehors des résultats de LC50, cette expérience nous a également permis, à l'aide du logiciel REGTOX, de calculer les cinétiques de concentrations létales causant 10, 25 et 75 % de mortalité chez *G. pulex* exposés au cadmium ou à l'arséniate à 10°C. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau III.1.

Tableau III.1. Cinétique des concentrations létales d'arsenate (A) et de cadmium (B) entraînant 10, 25, 50 et 75 % de mortalité chez *G. pulex* exposés à 10°C.

A)

Temps d'exposition (h)	LC10 ($\mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$)	LC25 ($\mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$)	LC50 ($\mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$)	LC75 ($\mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$)
24	1290,5 (1010,8-1409,0)	1939,2 (1482,5-2016,0)	2913,8 (1901,0-2940,5)	4378,3 (2263,8-4384,6)
48	1422,6 (1178,8-2031,0)	1915,3 (1549,4-2488,5)	2578,7 (1637,0-3064,3)	3471,9 (1702,2-3786)
72	1242,2 (1057,16-1548,3)	1739,6 (1479,3-2023,4)	2436,2 (1667,7-2699,6)	3411,6 (1723,1-3647,7)
96	1121,2 (893,5-1635,5)	1645,0 (1334,5-2110,2)	2413,4 (1625,7-2787,5)	3540,7 (1686,4-3765,0)
120	991,9 (759,2-1384,8)	1498,3 (1227,9-1734,3)	2263,3(1717,0-2431,0)	3418,7 (1945,9-3578,5)
144	703,0 (477,0-934,9)	1227,6 (917,0-1356,8)	2143,7 (1506,7-2176,2)	3743,2 (2092,3-3946,0)
168	428,5 (258,3-705,6)	873,25 (605,9-113,1)	1779,5 (1274,4-1922,3)	3626,3 (2005,0-4101,2)
192	449,3 (267,7-624,9)	820,2 (595,0-970,2)	1497,4 (1216,3-1642,5)	2733,8 (1896,6-3339,5)
216	383,0 (317,0-601,6)	691,8 (586,7-886,8)	1249,5 (1041,9-1327,9)	2256,7 (1632,1-2251,0)
240	380,3 (264,7-519,4)	613,5 (473,2-732,3)	989,7 (822,2-1069,6)	1596,8 (1272,2-1807,6)

B)

Temps d'exposition (h)	LC10 ($\mu\text{g}_{\text{Cd}}\cdot\text{L}^{-1}$)	LC25 ($\mu\text{g}_{\text{Cd}}\cdot\text{L}^{-1}$)	LC50 ($\mu\text{g}_{\text{Cd}}\cdot\text{L}^{-1}$)	LC75 ($\mu\text{g}_{\text{Cd}}\cdot\text{L}^{-1}$)
24	137,9 (110,8-206,4)	427,1 (350,0-507,4)	1323,1 (933,3-1573,6)	4098,8 (2236,7-5324,0)
48	67,4 (50029,0-85,8)	129,4 (106,5-145,0)	248,6 (203,9-270,8)	477,5 (356,2-559,4)
72	38,4 (30,8-55,2)	77,2 (66,0-95,8)	154,9 (131,8-177,8)	310,9 (242,6-357,3)
96	28,2 (22,7-42,4)	54,1 (46,1-69,3)	103,6 (89,2-117,4)	198,6 (153,7-216,1)
120	15,0 (11,1-26,7)	32,9 (26,3-46,7)	72,3 (58,3-89,6)	158,6 (111,1-188,0)
144	9,2 (5,2-17,2)	20,7 (14,0-31,0)	46,7 (35,0-60,2)	105,2 (77,8-139,3)
168	7,3 (4,0-11,2)	15,6 (10,1-19,3)	33,5 (22,8-28,9)	71,8 (43,9-87,4)
192	5,0 (2,2-7,6)	11,5 (6,6-14,5)	26,0 (17,5-29,2)	59,1 (37,6-69,7)
216	3,1 (1,5-6,0)	7,1 (4,2-10,5)	16,1 (11,4-20,3)	36,5 (23,8-49,4)
240	2,5 (1,0-5,3)	5,1 (2,7-8,3)	10,5 (7,3-14,3)	21,8 (15,2-29,7)

ARTICLE 2

**Antagonistic toxicity of arsenate and cadmium in a freshwater amphipod
(*Gammarus pulex*)**

Les écosystèmes aquatiques étant multi-contaminés, il nous paraissait important d'évaluer les effets combinés des deux métaux sur *G. pulex*. L'objectif de cet article a été d'abord de caractériser le mode d'action (antagonisme, additivité ou synergisme) du mélange binaire d'arséniate et de cadmium sur la mortalité de *G. pulex*. De plus, comme des études récentes ont montré qu'un métal pouvait influencer l'absorption d'un autre métal, nous voulions regarder : (i) si un mélange binaire influençait les résultats de bioconcentration par comparaison à une exposition métallique simple, et (ii) si les résultats obtenus étaient dépendants du dose/ratio étudié. Pour cela, nous avons exposé des individus mâles de *G. pulex* durant 240h et à 10°C à quatre concentrations différentes d'arséniate et de cadmium seuls ou en mélange, selon un plan factoriel complet. Les quatre concentrations de chaque métal ont été choisies en prenant des concentrations proches des LC10, LC25, LC50 et LC75 obtenues précédemment à la même température et pour le même temps d'exposition (Tableau II.3, page 73). Parallèlement, des individus de *G. pulex* non exposés aux métaux ont servi de témoins pour vérifier le bon état physiologique des individus de la population étudiée et valider l'expérience.

A la fin du temps d'exposition, la bioconcentration et la mortalité ont été mesurées et les effets conjoints des deux métaux sur la mortalité ont été évalués en utilisant un modèle prédictif.

Les résultats ont montré un effet antagoniste de l'arséniate et du cadmium sur la mortalité de G. pulex pour toutes les combinaisons de concentrations testées. Cependant, cet effet antagoniste est plus marqué pour les plus faibles combinaisons de concentrations. Les concentrations métalliques dans G. pulex sont plus faibles lors des expositions aux mélanges que lors des expositions métalliques seules aux concentrations correspondantes. De manière surprenante, la diminution de la bioconcentration, dans les mélanges par rapport aux concentrations isolées, est plus marquée avec les plus fortes combinaisons de concentrations, à l'inverse des résultats de mortalité. Des hypothèses sur les effets conjoints des deux métaux, permettant d'expliquer les différents résultats obtenus ont été émises dans la discussion.

Antagonistic toxicity of arsenate and cadmium in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*)

Céline Vellinger · Marc Parant · Philippe Rousselle ·
Philippe Usseglio-Polatera



Abstract

Because toxicants rarely occur alone in the environment, a major challenge in risk assessment is to address the combined effects of chemicals on aquatic organisms. This work is aimed at investigating the joint toxicity action of binary mixtures of cadmium and arsenate on *Gammarus pulex*. Individuals were exposed during 240 h to four single arsenate or cadmium concentrations and binary mixtures of these metals according to a complete factorial plane. Observed mortality in binary mixtures was compared to observed mortality in single arsenate or cadmium exposures. In addition, interactive effects (antagonistic, additive or synergistic) were evaluated using a predictive model for the theoretically expected interactive effect of chemicals. For all the tested concentration combinations, we observed an antagonist 'between-metals' interaction on *Gammarus pulex* mortality.

This antagonistic effect was more marked for the lowest than for the highest (i.e. 1502.0 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ and 28.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$) tested concentrations of individual metals in binary mixtures. Metal concentrations in body tissues were evaluated and were significantly lower in binary mixtures than in single metal exposures at similar concentration, especially for combinations corresponding to the highest concentrations of both metals (1502.0 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ and 28.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$). Results were discussed in terms of (1) mechanisms of uptake and bioconcentration and (2) relationships between metal concentration in gammarid body and observed toxicity.

Key words: *Gammarus pulex*; antagonistic effect; cadmium; arsenate; bioconcentration; toxicity interaction.

1. Introduction

Trace metals are commonly encountered in the environment as a result of natural activities but anthropogenic activities contribute to increase their concentration (Zhang and Shan, 2008). Consequently, evaluating the ecological and ecotoxicological risks linked to trace metal contamination is becoming a major issue. Cadmium is a non-essential trace metal which is toxic at low concentration for aquatic organisms, due to the bioavailability of

its free ionic form Cd^{2+} (Part et al., 1985; Wang and Rainbow, 2006). Arsenic (As) is a metalloid which may be considered as an essential ultra trace element in animals such as chickens, goats, hamsters, pigs and rats (Uthus, 1992). Nevertheless, no studies have given evidence that arsenic is an essential element for humans or that it is required for any essential biochemical process (e.g. National Research Council, 1999). The arsenic toxicity depends on its chemical form, with inorganic forms more toxic than organic ones and arsenate (AsV) less toxic than arsenite (AsIII) (Stybło et al., 2000; Sharma and Sohn, 2009). The two forms are inter-converted through redox reactions (Bears et al., 2006). The cellular metabolism involves the arsenic reduction from pentavalent to trivalent form, a prerequisite for oxidative methylation into pentavalent methyl arsenical (Thomas, 2007). In polluted freshwaters in France, the observed maximal values have been of $65\mu\text{g L}^{-1}$ for arsenic and $5.1\mu\text{g L}^{-1}$ for cadmium (Ministère de la santé et de la protection sociale, 2003). However, the measured metal concentration could reach 3.7 mg L^{-1} in groundwaters for arsenate [e.g. Bengal districts in India (Chatterjee et al., 1995)] and $67\mu\text{g L}^{-1}$ [e.g. Flanders freshwaters (Bervoets et al., 2005)] to $300\mu\text{g L}^{-1}$ for cadmium [e.g. Ross Lake, Canada (Canadian Environmental Protection Act, 1994)].

The genus *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) is one of the most often used indicators of chemical (e.g. trace metals) contamination because it is widely distributed (Graca et al., 1994; Janetzky, 1994), abundant and it has already demonstrated its usefulness in freshwater ecosystem risk assessment (McNeil et al., 1997). As shredder, *Gammarus* plays a key functional role in leaf litter breakdown processes and consequently in nutrient cycling (McNeil et al., 1997; Forrow and Maltby, 2000). Moreover, it plays also a major structural role in benthic community composition by predating other freshwater macroinvertebrates (McNeil et al., 1997). *Gammarus* accumulates toxicants (Mulliss et al., 1996; Neuparth et al., 2005). Because such toxicants can be transferred to upper trophic levels (e.g. *Gammarus* predators), *Gammarus* can provide valuable information about the potential contamination level of some other taxa in aquatic ecosystems assemblages (Zauke et al., 1995; Rainbow, 1997). The frequent selection of *Gammarus* as model species can also be related to its high sensitivity to various chemicals (Adam et al., 2009; Alonso and De Lange, 2010), its clear sexual dimorphism and its ease to be collected and used under laboratory conditions. All these obvious advantages have led to the selection of the species *Gammarus pulex* (*G. pulex*) as test organism in this study.

Because toxicants rarely occur alone in the environment, a major challenge in risk assessment is to address the combined effects of chemicals on aquatic organisms (Kungolos

et al., 1999; Hadjispyrou et al., 2001). However, combined effects of chemicals on aquatic organisms still remain poorly investigated, despite their potential implication in water or sediment toxicity for many rivers.

This work is aimed at investigating the joint toxicity action of two of the most currently concerned metals (AsV and Cd) which are frequently found together in aquatic ecosystems. Currently there is a lack of such data since toxic effects are often observed in animals exposed to single metal instead of metal mixtures. Based on a complete factorial plane, groups of individuals were exposed during 240 h to single arsenate or cadmium concentrations or binary mixtures of these two metals. The observed mortality of gammarids in the different experimental conditions was compared to the expected one taking into account the predicted interactive effect of chemicals (see Kungolos et al., 1997; 1999). Metal concentrations in body tissues were also evaluated. The relationship between observed body metal concentration and mortality were discussed in order to better understand effects of heavy metal mixtures on freshwater organisms.

2. Material and methods

2.1. Organism sampling and acclimation

To avoid potential differences in toxicity between sexes (Sornom et al., 2010) or among life stages (McCahon and Pascoe, 1988), only adult males of *Gammarus pulex* were collected. *Gammarus* sampling was performed in January 2011 using a hand net in the unpolluted Mehoulle River [Void-Vacon, France, Lambert II E (X = 841244; Y = 2412346)]. After sampling, amphipods were quickly brought to the laboratory in plastic bags. Except for males in precopula directly identified in the field, other specimens were sexed using stereomicroscope, based on sexual dimorphism characters; males exhibiting more massive gnathopods than females [e.g. Costa and Costa (1999) for *G. locusta*; Bollache et al. (2001) for *G. pulex*; Devin et al. (2003) for *D. villosus*]. Males were measured from the top of the cephalothorax to the base of the telson by image software analysis (Studio version 7; ImageJ software version 1.42q). The mean body length of selected males was 10.8 ± 1.1 mm. Individuals were acclimatized for a week before experiments in mineral water (Volvic, France) under controlled conditions (10°C in a temperature controlled room with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness). Individuals were fed with discs of conditioned leaves during acclimation up to 24 h before starting experiments.

2.2. Experimental Design

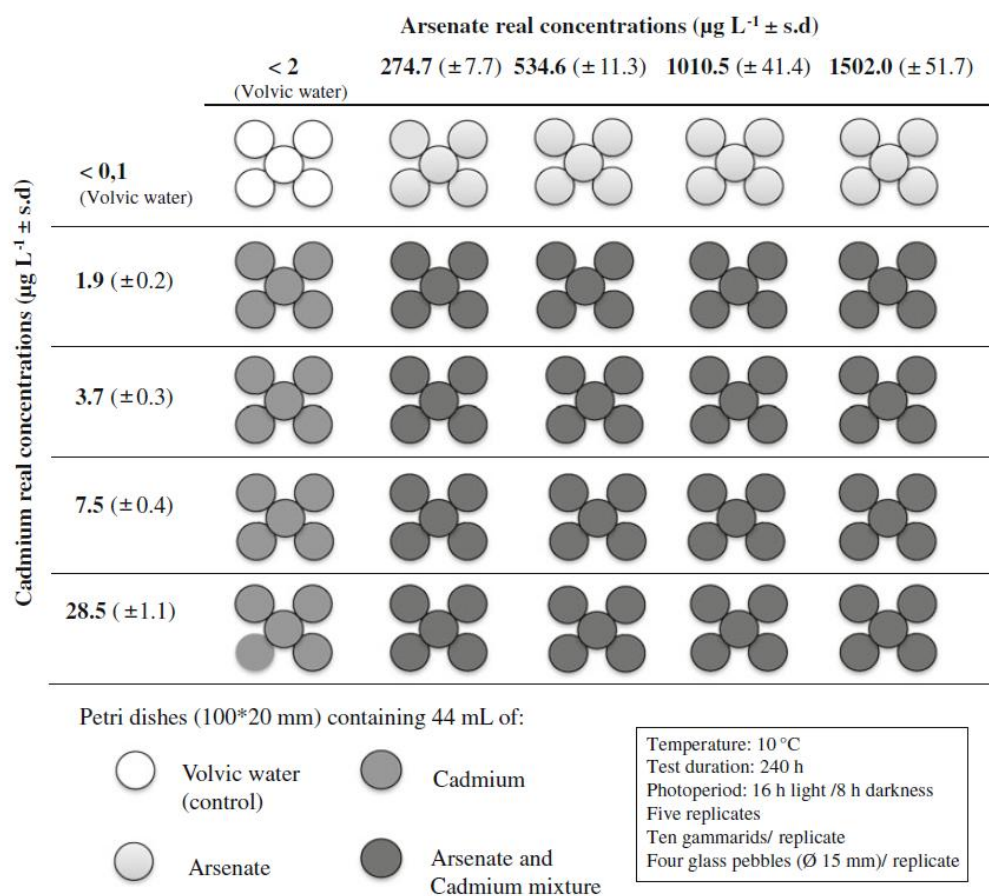


Figure 1. Experiment design and mean real concentrations ($\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{s.d.}$) of arsenate and cadmium tested ($n = 3$) during the experiments. Values were measured by graphite furnace atomic-absorption spectrophotometry (AAS Varian SpectraAA-330, detection limits: $2 \mu\text{g}_{\text{As}} \text{L}^{-1}$ and $0.1 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$) or by flame atomic-absorption spectrophotometry (AAS PERKIN ELMER AAnalyst 100, detection limits: $20 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$).

After the acclimation period, groups of 10 males of *G. pulex* were transferred from batches to plastic Petri dishes (100 mm width and 20 mm height; = 'dishes' hereafter) containing 44 mL of tested toxic solution (experimental dishes) or Volvic water (control dishes) and four glass pebbles ($\varnothing$ 15 mm, convex side down). As gammarids were not fed during the whole experiment, glass pebbles served both as substrate and refuge for animals and allowed to avoid at best cannibalism. In the acclimation temperature and photoperiod conditions, five replicates of ten gammarids were exposed during 240 h to various treatments of (i) pentavalent arsenic (AsV) alone, (ii) cadmium (Cd) alone or (iii) binary mixtures of arsenate and cadmium (figure 1). The pH in tested solutions was measured every day and was maintained stable (7.52 ± 0.05) independently of cadmium and/or arsenate concentration levels. Experiments were performed under semi-static conditions with daily renewal of the solutions to maintain metal concentrations at the same level until 240 h exposure. Test

containers were filled up with metal solutions 96 h before the beginning of experiments, allowing reaching equilibrium before experiments and minimizing metal adsorption during experiments. Chemicals used were provided by SIGMA-Aldrich, UK. Stock solutions of the metals ($9.6 \text{ mg}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$ and $20 \text{ mg}_{\text{AsV}} \text{ L}^{-1}$) were prepared by dissolving cadmium chloride (CdCl_2) and sodium arsenate heptahydrate ($\text{AsHNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in milliQ water and were stabilized with 0.1 % of HNO_3 (65 %, Suprapure, Merck). Metal test solutions were prepared using mineral water (Volvic, France) as diluent of stock solutions. Preliminary dose-effect experiments allowed identifying concentrations of arsenic and cadmium individually causing respectively 10 (LC10), 25 (LC25), 50 (LC50) and 75 % (LC75) of gammarids to die within 240 h of exposure (see Table 1) with the Excel macro REGTOX (Vindimian et al., 1983). Mortality was processed using a logistic curve-fitting procedure applying the method described by Vindimian et al. (1999) and Isnard et al. (2001). Corresponding results were used to build up a complete experimental design of binary mixtures, in which real tested arsenate and cadmium concentrations were chosen close to these lethal concentrations (see Figure 1).

Table 1. Mean LC10, LC25, LC50 and LC75 values ($\mu\text{g L}^{-1} \pm 95 \%$ confidence intervals) estimated for *Gammarus pulex* after 240 h of arsenate or cadmium exposure using REGTOX Excel macro (Vindimian et al., 1983) based on Hill model.

	LC10 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LC25 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LC50 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LC75 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Arsenate	380.3 (264.7–519.4)	613.5 (473.2–732.3)	989.7 (822.2–1069.6)	1596.8 (1272.2–1807.6)
Cadmium	2.5 (1.0–5.3)	5.1 (2.7–8.3)	10.5 (7.3–14.3)	21.8 (15.2–29.7)

2.3. Evaluation of interactive mode of action

The mortality of gammarids was recorded after 240 h exposure to each tested concentration of single metal or binary mixture, dead animals being removed from dishes each day. Because observed mortality in control reservoirs was of 12 %, the Abbott's correction was applied (Abbott, 1925). Comparisons of observed mortalities [i.e. binary mixtures *vs.* corresponding single concentrations of arsenate or cadmium; single concentrations of cadmium *vs.* single concentrations of arsenate] were performed using one-way ANOVAs followed, if a significant heterogeneity (i.e. $p < 0.05$) had been identified, by post hoc HSD Tukey's tests. In addition, [single concentrations of cadmium *vs.* single concentrations of arsenate] mortality comparisons were performed using two-way ANOVA. The theoretically expected mortality of *G. pulex* subjected to the interactive toxic effects of binary mixtures was

derived from a simple mathematical model. This model is based on the theory of probabilities and assumes that the chemicals are acting (antagonistically, additively or synergistically) simultaneously on the affected organisms (Kungolos et al., 1999; 2004; 2009; Hadjispyrou et al., 2001), in contrast with the models developed by Gowing (1960) or Colby (1967). In this model, if M_1 is the mortality (i.e. 'inhibition rate' *sensu* Kungolos et al., 1999; 2009) caused by a certain concentration of chemical A_1 and M_2 the mortality caused by a certain concentration of chemical A_2 , then the theoretically expected mixture toxicity M_E , when the two chemicals are applied together, is given by the following equation:

$$M_E = M_1 + M_2 - M_1 M_2 / 100 \quad (1)$$

For each binary mixture, the experimentally observed mortality after 240 h exposure (M_O) was compared to the theoretically expected mixture mortality M_E calculated with equation (1) using a Student t-test ($n = 5$), after verification of the normal probability distribution of observed values. If M_O and M_E were not significantly different ($p \geq 0.05$), then the mode of interaction was characterized as additive. If M_O was significantly lower than M_E , the mode of interaction was considered as antagonistic. If M_O was significantly higher than M_E , the mode of interaction was considered as synergistic.

2.4. bioconcentration

Metal concentrations in body tissues were performed after 240 h exposure of *G. pulex* to treatments. Three replicates of at least five alive gammarids were composed per treatment. Gammarids were rinsed with nanopure water and dried on filter paper. They were immediately stored at -20°C in zipped bags. Then, gammarids were dried in a drying kiln at 65°C for 48 h before dry weight measurement. Biological material was digested for 48 h at 65°C with 1 mL HNO_3 diluted in half (65 %, suprapure, MERCK). Final samples and standard solutions were adjusted to concentration of 2 % HNO_3 by addition of 4 mL of Nanopure water. Metal quantification in biological samples was performed using graphite furnace for arsenate or flame-atomic absorption spectrophotometry for cadmium (AAS, FD T 90-119 norm). All metal concentrations in biological tissues have been reported in $\mu\text{g metal.g dry weight}^{-1}$. A statistical strategy similar to that presented in § 2.3 was applied for identifying significant differences between internal metal concentrations of gammarids subjected to different treatments [i.e. binary mixtures *vs.* corresponding concentrations of arsenate or cadmium alone].

3. Results

3.1. Toxicity of single compounds

An increase in *G. pulex* mortality was observed with an increase in arsenate or cadmium concentration (Fig. 2). The cadmium concentrations of 1.9; 3.7; 7.5 and 28.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ caused respectively 6.5; 24.1; 41.5 and 82.1 % of mean mortality for *G. pulex* after 240 h exposure. In the same exposure conditions, the arsenate concentrations of 274.7; 534.6; 1010.5 and 1502.0 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ caused respectively 14.1; 29.5; 46.1 and 84.6 % of mean mortality for *G. pulex*.

Along the concentration gradient of each metal, significant differences in mortality were observed between the highest concentration (i.e. 28.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ or 1502.2 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$) and the three other tested concentrations. For arsenate alone, a significant difference was also observed between 1010.5 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ and the lowest concentration (i.e. 274.7 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$).

The concentrations of 1.9 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ and 274.7 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ were respectively included in the 95 % confidence interval of the LC10 observed for *G. pulex* after 240 h cadmium or arsenate exposure (Table 1). The same results were observed for the three other tested cadmium or arsenate concentrations; all these concentrations being respectively included in the 95 % confidence interval of the LC25; LC50 and LC75 for *G. pulex* after 240 h exposure. No significant difference in mortality rate was observed between cadmium and arsenate for each of the tested concentrations (two-way ANOVA; concentration: $p < 10^{-6}$; metal: $p = 0.39$; concentration*metal: $p = 0.99$).

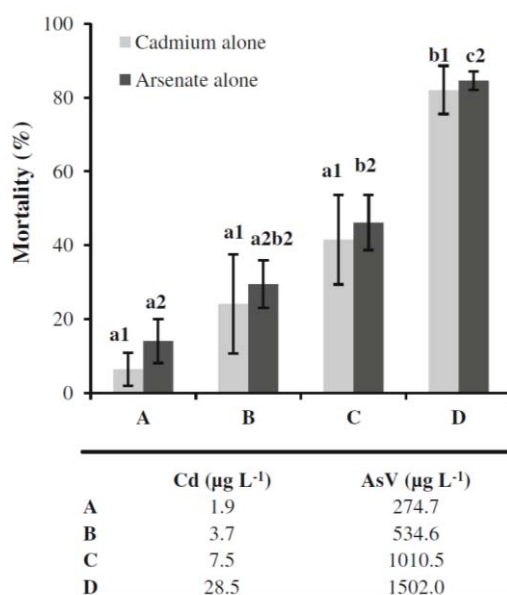


Figure 2. Comparison of the *Gammarus pulex* mean mortality ($\pm$ error type) observed at four arsenate or cadmium concentrations (A to D) after 240h exposure. Letters (a1 to b1 for cadmium and a2 to c2 for arsenate) were used as labels to illustrate significant differences in mortality mean values, for each metal independently (one-way ANOVAs + HSD – Tukey's post hoc tests, at $p < 0.05$ level of significance).

3.2. Toxicity of binary mixtures

At the two lowest concentrations of cadmium (i.e. 1.9 and 3.7 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$), the gammarid mortality did not significantly vary along the gradient of arsenate (Fig.3A). In contrast, after 240 h exposure to 7.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ gammarids exhibited significantly lower mortality rates when also exposed to 274.7 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$, 534.6 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ or 1010.5 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ than when exposed to cadmium alone. However, no significant difference was observed in gammarid mortality rate between the dishes at 7.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ and the dishes at 7.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ + 1502 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$. When gammarids were exposed to the highest cadmium concentration (28.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$), a rather similar pattern was observed along the increasing gradient of arsenate concentrations, but a significant difference in mortality rate was only obtained between the dishes at 28.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ and the dishes at 28.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ + 274.4 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ (Fig3A).

For all the tested arsenate concentrations (274.7 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ excepted), a simultaneous exposure to cadmium in the [1.9 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ - 7.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$] concentration range, significantly reduced the mortality of gammarids (Fig. 3B). Conversely, at low arsenate concentrations (i.e. 274.7 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ or 534.6 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$), an additional cadmium exposure to high concentration (i.e. 28.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$) significantly increased the mortality of *G. pulex* (Fig. 3B). However, no similar increased mortality was observed when gammarids were simultaneously exposed to high cadmium (28.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$) and high arsenate (i.e. 1010.5 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ or 1502 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$) concentrations. Moreover, for all the tested arsenate concentrations, (i) an increase in cadmium concentration within binary mixtures had no significant effect on the gammarid mortality up to 7.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$, and (ii) an exposure to high cadmium concentration (28.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$) significantly increased the gammarid mortality when compared to that of mixtures with lower cadmium concentration (1.9 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ - 7.5 $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ range).

The predicted mortality of *G.pulex* in the different binary mixtures varied between 20 % and 97 % and rose with an increase in both metal concentrations.

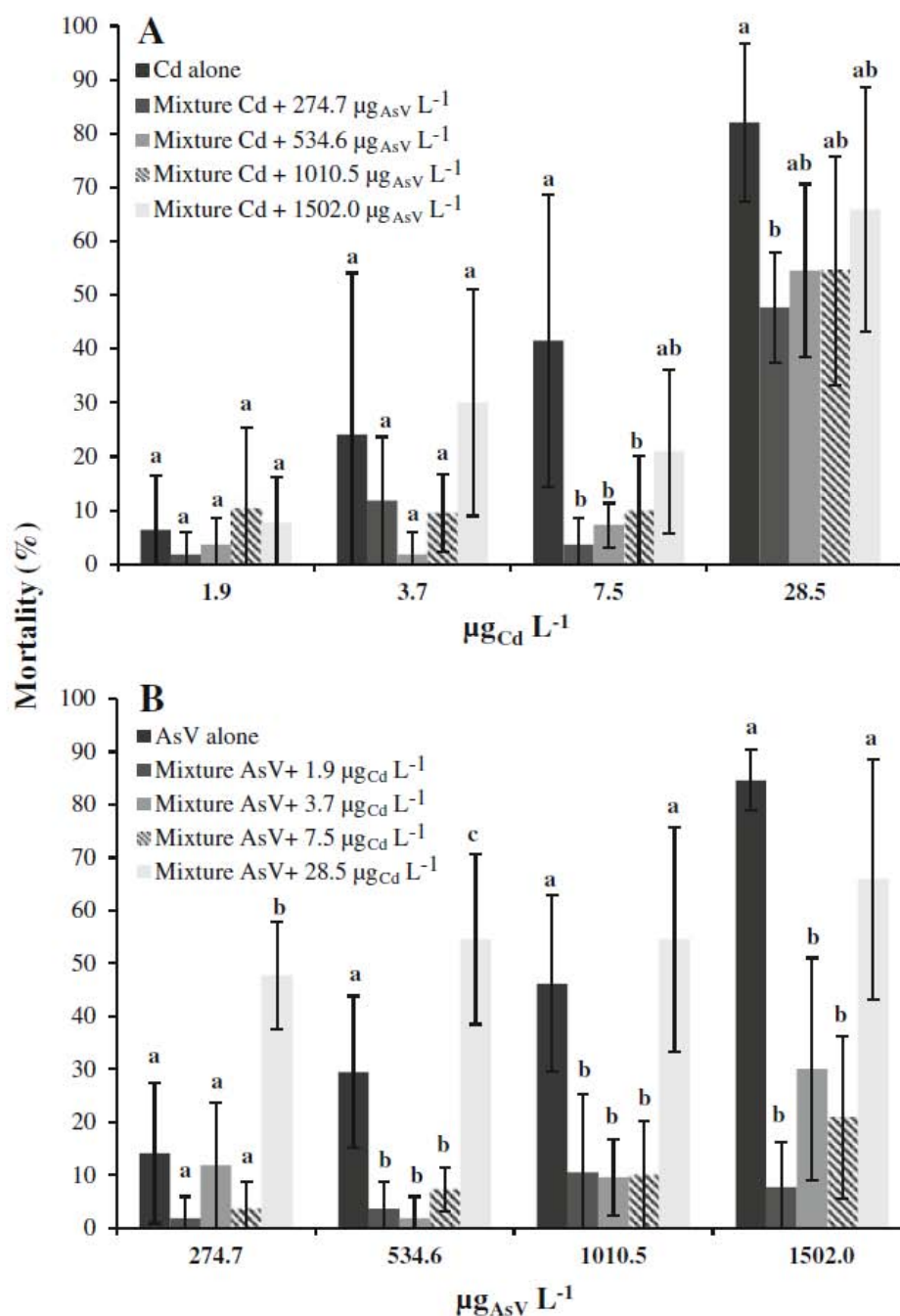


Figure 3. Comparison of the mean ($\pm$ s.d.) observed mortality of *Gammarus pulex* after a 240 h exposure to (i) a single metal (arsenate or cadmium) vs. (ii) a binary mixture (arsenate and cadmium). **A:** arsenate concentration gradient effect on *G. pulex* mortality at four cadmium concentrations in mixtures. **B:** cadmium concentration gradient effect on *G. pulex* mortality at four arsenate concentrations in mixtures. Letters (a to c) were used as labels to illustrate significant differences in mortality mean values within each series of experiments performed at a given concentration of cadmium (A) or arsenate (B) (one-way ANOVAs + HSD-Tukey's post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).

For all binary mixtures, observed mortality values, ranging between 1.8 and 65.9 %, were between 1.47 and 11.15 fold lower than theoretically expected values. The [expected – observed] differences were significant ($p < 0.05$) for all the tested mixtures, with one exception (i.e. combination '2.1' in Fig. 4). However, the p-value for the corresponding Student-t test ($p = 0.051$) was very close to the selected level of significance. These results demonstrated that mixtures of cadmium and arsenate had a lower toxic effect on the freshwater amphipod *G. pulex* than the theoretically expected additive effect of the two metals. Therefore, assuming the hypothesis that chemicals were acting simultaneously, the interaction between arsenic and cadmium can be characterized as antagonistic. This antagonistic effect was however less pronounced for the binary mixtures containing the highest concentrations of both arsenate and cadmium (Fig. 4).

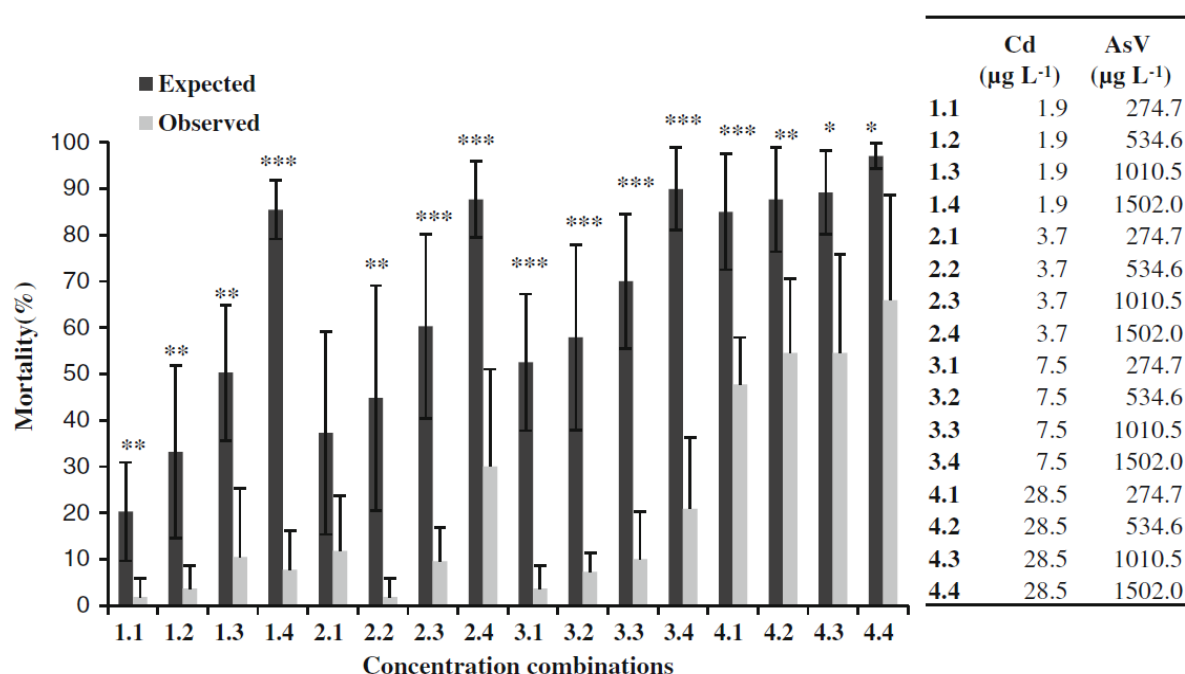


Figure 4. Comparison between 'theoretically expected' and 'observed' combined effects of different cadmium/arsenate binary mixtures on the mean mortality ($\pm$ s.d.) of *Gammarus pulex* after 240 h exposure. Asterisks indicated significant differences between observed and expected values for each binary mixture (Student's t test, * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). Exact p-values are provided in table 2.

3.3. Bioconcentration

When comparing cadmium concentrations in gammarid tissues, no significant difference was observed between (i) males only exposed to [$1.9 - 7.5 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$] and (ii) males simultaneously exposed to arsenate, whatever the arsenate concentration was in the [274.7-

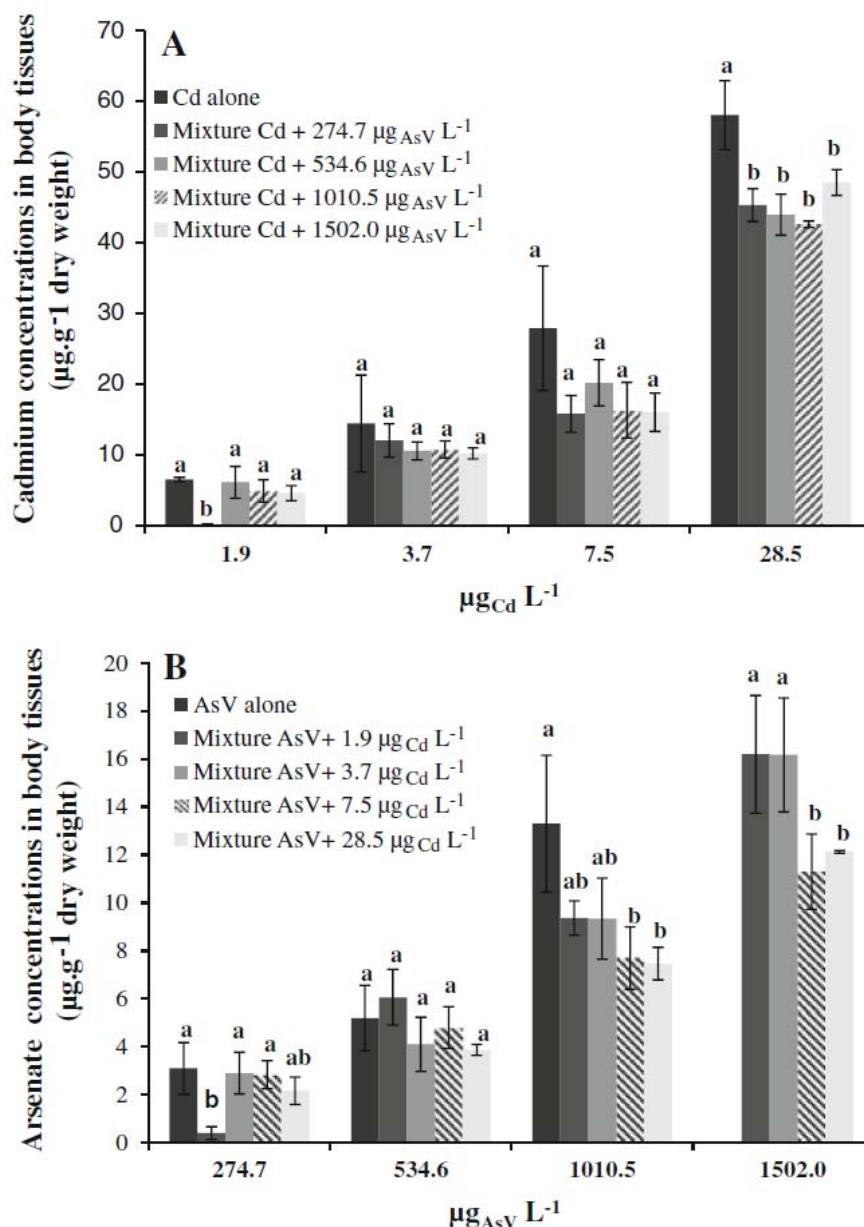


Figure 5. Comparison of mean ($\pm$ s.d.) metal concentrations (in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) in *Gammarus pulex* body tissues after 240 h exposure between the dishes with a single metal (cadmium or arsenic) and dishes with binary mixtures. **A:** arsenate concentration gradient effect on *G. pulex* cadmium concentration at four cadmium concentrations in mixtures, **B:** cadmium concentration gradient effect on *G. pulex* arsenate concentration at four arsenate concentrations in mixtures. Metal concentration in body tissues was not evaluated for the $1502 \mu\text{g}_{\text{AsV L}^{-1}}$ exposure, due to a too high mortality of *G. pulex* in this experimental condition. Letters (a & b) were used as labels to illustrate significant differences in the mean values of metal concentrations in body tissues for each series of experiments performed at a given concentration of cadmium (A) or arsenate (B) (ANOVAs + HSD-Tukey's post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).

1502.0 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$] range (Fig. 5A), except the $[274.7 \mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1} + 1.9 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}]$ mixture which induced a significant decline in internal cadmium concentration of gammarids. In contrast, when gammarids were exposed to $28.5 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$, the addition of arsenate led to significant decline in their body tissue cadmium concentration for all the tested arsenate concentrations (fig 5A).

Most of the binary mixtures with the two lowest arsenate concentrations (i.e. 274.7 and 534.6 $\mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$; Fig.5B) induced no significant difference in arsenate body tissue concentration, except the $[274.7 \mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1} + 1.9 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}]$ mixture for which a significant decrease in arsenate tissue concentration was observed.

In contrast, when gammarids were exposed to $1010.5 \mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ or $1502 \mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ (Fig. 5B), a combined addition of cadmium led to a systematic decline in internal arsenate concentration; but this decline was significant only for the two highest cadmium concentrations ($7.5 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$ and $28.5 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$). The high mortality of *G. pulex* only exposed to arsenate at $1502 \mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ did not allow the evaluation of metal concentration in body tissues, the number of individuals alive after 240 h exposure being too low.

4. Discussion

To understand the effects of combined mixtures of arsenate and cadmium on *Gammarus pulex*, it is first necessary to explain (1) their uptake and bioconcentration mechanisms (Xu and Pascoe, 1993) and (2) the relationship between body metal concentration and observed toxicity (McCahon et al., 1990; Bartlett et al., 2004). Such mechanisms and their relationships have been well documented in literature for single exposures, but they have been rarely studied for combined exposures. However, many authors have shown that in binary mixtures, one metal could affect the uptake of the other which could be enhanced (Shuhaimi-Othman and Pascoe, 2007) or inhibited (Casini and Depledge, 1997; Bat et al., 1998)] or not (Phillips, 1976). The simultaneous (i) uptake inhibition of one metal and (ii) uptake stimulation of another metal have also already been observed in organisms exposed to binary mixtures (Ahsanullah et al., 1981). Our results, summarized in Table 2, demonstrated that the presence of arsenate in binary mixtures influenced the bioconcentration of cadmium and inversely. Both metal concentrations in body tissues were lower in gammarids exposed to binary mixtures than to single metal (at corresponding concentrations), even if differences were not always significant for the lowest concentration combinations (Fig. 5A, B). It is well known that growing metal concentrations in organisms exposed to a given toxicant generally increase their mortality (Spehar et al., 1978; McCahon et al., 1990). Our results showed that in

combined mixtures, the relationships between body tissue concentrations and observed mortality were more complex. For all the tested concentration combinations, the interaction between cadmium and arsenic was characterized as antagonistic regarding the mortality of *Gammarus pulex*.

Table 2. Synthesis of the *Gammarus pulex* bioconcentration and mortality results in binary mixtures when compared to those observed for single exposure of cadmium or arsenate, respectively. All the results were observed after 240 h exposure. The interactive mode of action between the two metals and p-values for the [expected – observed] mortalities are also mentioned (t-test).

‘NE’: No effect ‘-’: significant decrease; ‘+’: significant increase; ‘T-’: decrease tendency (but not significant); ‘T+’: increase tendency (but not significant); ‘UD’: unavailable data

Concentration combinations		Bioconcentration		Mortality		Interactive mode of action on mortality	p Values for the [expected – observed] mortalities (Student's <i>t</i> test)
Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	AsV ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cd	AsV	Cd	AsV		
1.9	274.7	–	–	T–	T–	Antagonistic	0.0068
1.9	534.6	T–	T+	T–	–	Antagonistic	0.0089
1.9	1010.5	T–	T–	T+	–	Antagonistic	0.0027
1.9	1502.0	NE	UD	NE	–	Antagonistic	0.0000
3.7	274.7	T–	T–	T–	T–	Additive	0.0510
3.7	534.6	T–	T–	T–	–	Antagonistic	0.0045
3.7	1010.5	T–	T–	T–	–	Antagonistic	0.0007
3.7	1502.0	T–	UD	T+	–	Antagonistic	0.0004
7.5	274.7	T–	T–	–	T–	Antagonistic	0.0001
7.5	534.6	T–	T–	–	–	Antagonistic	0.0005
7.5	1010.5	T–	–	–	–	Antagonistic	0.0000
7.5	1502.0	T–	UD	T–	–	Antagonistic	0.0000
28.5	274.7	–	T–	–	+	Antagonistic	0.0008
28.5	534.6	–	T–	T–	+	Antagonistic	0.0055
28.5	1010.5	–	–	T–	T+	Antagonistic	0.0106
28.5	1502.0	–	UD	T–	T–	Antagonistic	0.0160

However, this antagonistic effect was more marked for organisms exposed to the lowest cadmium and arsenate concentrations in binary mixtures than for organisms exposed to the highest concentrations (Fig. 6); in contrast to the bioconcentration results.

Metal ions can penetrate in organisms by drinking water or feeding absorption but the transport of free metal ions can also be achieved across the cytoplasmic membrane (Rainbow and Dallinger, 1983; Rainbow, 1997). Adult gammarids have an exoskeleton fully covering their body, and composed of calcified chitin assumed to be rather impermeable to toxics (Rainbow, 1997). As a result, toxic permeability may be restricted to selected regions, such as gills, where toxics can typically follow two routes: (i) facilitated passive diffusion after initially binding to a metal-binding protein in the membrane of the epithelial surface and then passing down a thermodynamic gradient of metal-binding ligands of increasing metal affinities, and (ii) metal-transporting channels driven by an energy-requiring pump in the

epithelial cell membrane (Tessier et al., 1994; Rainbow, 1997). Gills represent the major site of penetration and concentration of metals in many freshwater organisms (Wicklund-Glynn et al., 1994; Felten et al., 2008). Because the arsenate bioconcentration factor (BCF) has been demonstrated to be independent from concentration for (not fed) *Gammarus pulex* exposed to various arsenate concentrations during 10 days (Vellinger et al., 2012), drinking water has been hypothesized to be the major entrance route of arsenate, and metal-binding ligands in gills a secondary entrance route. Numerous authors have also demonstrated that cadmium BCF in *Gammarus pulex* was aquatic medium concentration-dependent and decreased with increasing cadmium concentration (e.g. Felten et al., 2008; Vellinger et al., 2012). These results suggested that, except via drinking water, cadmium would enter mainly by channels or membrane proteins which could be saturated when external cadmium concentration increased. As cadmium ions (Cd^{2+}) have an ionic radius very close to that of Ca^{2+} , cadmium can also enter in organisms by facilitated passive diffusion via calcium channels (Rainbow, 1995) located in the apical membrane of chlorid cells (Verbost et al., 1987; Reid and McDonald, 1988).

The observed inhibition in metal accumulation when gammarids were exposed to cadmium and arsenate mixtures could be explained by four non-exclusive hypotheses. The first hypothesis would be a competition between arsenate and cadmium for a common uptake route (cf. metal binding protein, Vellinger et al. 2012). An increasing concentration of both metals in binary mixture would enhance competition for metal binding protein.

The second hypothesis would be metal complexation. We cannot exclude a possible complexation between the arsenate and cadmium salt solutions used in this study (e.g. between arsenate and chlorides present in cadmium salt or between arsenate and cadmium). In most cases, complexation decreases metal uptake by reducing the free ion activity (Morel, 1983; Ginneken et al., 1999). Furthermore, the number of formed complexes would be concentration dependent; giving a possible explanation for the significantly lower metal bioconcentration in gammarids exposed to binary mixtures than in gammarids exposed to single metal, especially for the highest metal concentrations in binary mixtures (Fig. 5).

The third hypothesis explaining the lower bioconcentration of metals in gammarids exposed to binary mixtures could be an increase of elimination and/or detoxification processes. For example, Holwerda (1991) reported a more rapid elimination of cadmium in *Anodonta cygnea* (Bivalvia) when copper was also accumulated, suggesting that competition between metal ions for the same cellular binding sites would promote metal excretion. The possible induction of metallothioneins (MTs) by uptaken Cd and AsV could play an important role in

detoxification processes. Falnoga et al. (2000) already reported an induction of MTs involved in As-non-specific detoxification by inorganic arsenicals, leading to a decline in Cd concentration in the hen liver tissues.

A possible explanation for the mortality increase [while bioconcentration is decreasing (i.e. the fourth hypothesis)] with the highest concentration mixtures would be related to molecular and cellular damages which may occur after exposure to the tested metal concentrations. If the gills or digestive epithelial cells are damaged (for example by lipoperoxidation or lysosomal membrane disruption), metal uptake may be reduced while toxicity could be enhanced.

It has been already demonstrated that cadmium can damage gill cells of gammarids, leading to drastic modifications in osmoregulation and respiration processes (Felten et al., 2008; Vellinger et al., 2012). However, arsenate effects on *Gammarus* species remain unknown. For a given concentration of cadmium, an increase in arsenate concentration within binary mixtures tended to augment the gammarid mortality even if this increase was never statistically significant (Fig. 3A). In addition, for a given arsenate concentration within binary mixtures, an increase pattern in gammarid mortality was observed with increasing cadmium concentration, even if this increase was statistically significant only for the highest cadmium concentration (Fig. 3B). Consequently, we cannot exclude some arsenate-related damages on gammarids even if those damages would probably be less important if compared to potential (and best known) cadmium-related damages. This between-metals difference in damages could probably explain why antagonistic effects were less marked with the highest concentration combinations, especially for binary mixtures containing the highest concentration of cadmium (see combinations 4.1 to 4.4 in Fig. 4).

5. Conclusion

For most of the tested concentration combinations, an antagonistic toxicity effect between cadmium and arsenate has been demonstrated on *Gammarus pulex*. The results have also indicated that the relationships between mortality

and metal concentration in body tissues were not as clear for binary mixture exposure as for single metal exposure. In fact, at the lowest concentration of metals in binary mixtures, both mortality and bioconcentration decreased if compared to those observed for single metal exposures at similar concentrations. In contrast, at the highest tested metal concentrations in binary mixtures, bioconcentration decreased while mortality tended to increase. These results cannot be readily explained but it seems that metal interactions could actively

promote (i) complexation, and/or (ii) competition between metal ions for the fixation to the uptake sites and facilitate (iii) excretion and/or (iv) detoxification processes, reducing metal concentration in gammarids. However, molecular and cellular damages already observed for some metals at high concentration, can probably reduce the cadmium/arsenate antagonistic effect in binary mixtures, especially for the highest concentration of cadmium. Consequently, it is important to consider a wide range of metal concentrations in tested combinations to evaluate the toxic effects of metal cocktails on exposed organisms. In terms of risk assessment, our results are interesting because they tend to indicate that the coexistence of arsenate and cadmium in a given range of concentrations does not induce a higher ecological risk in aquatic ecosystems than the presence of cadmium or arsenate alone. However, the *Gammarus* response pattern to simultaneous AsV and Cd contamination has to be analysed on a larger range of concentrations. To better understand the ecotoxicological effects of cocktails of pollutants in rivers further researches should also be devoted to impaired specific enzymatic activities and involved metabolic pathways during cellular responses.

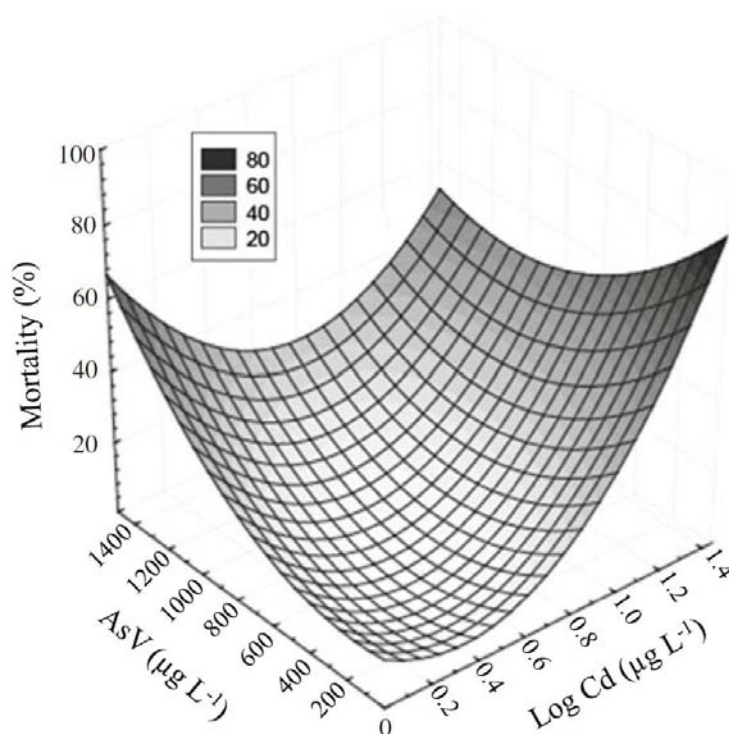


Figure 6. Response surface (3D-modelling spline) illustrating the relationship between the mortality rate (%) of *Gammarus pulex* after 240 h exposure to various AsV and Cd binary mixtures and each metal concentration in the mixture. Modelling was performed using mortality raw data from five replicates per tested concentration.

Acknowledgments

The authors would like to thank the French Ministry of Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche), which has supported this study. The authors warmly thank Karen Hopson for linguistic revision, of the manuscript and the two anonymous reviewers for valuable comments that improved the clarity of the text.

References

- Abbott WS, (1925) Method of computing the effectiveness of an insecticide. *J of Econ Entomol* 18: 265-267
- Adam O, Badot PM, Degiorgi F, and Crini G (2009). Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Ecotox Environ Saf* 72: 441-449.
- Ahsanullah M, Negilski DS, and Mobley MC (1981) Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. III. Accumulation of metals. *Marine Biol* 64: 311-316.
- Alonso A, and De Lange HJ (2010) Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *G. fossarum*. *Ecotoxicology* 19: 133-140.
- Bartlett AJ, Borgmann U, Dixon DG, Batchelor SP, and Maguire RJ (2004) Accumulation of tributyltin in *Hyalella azteca* as an indicator of chronic toxicity: Survival, growth, and reproduction. *Environ Toxicol Chem* 23: 2878-2888.
- Bat L, Raffaelli D, and Marr IL (1998) The accumulation of copper, zinc and cadmium by the amphipod *Corophium volutator* (Pallas). *J Exp Mar Biol Ecol* 223: 167-184.
- Bears H, Richards JG, and Schulte PM (2006) Arsenic exposure alters hepatic arsenic species composition and stress-mediated gene expression in the common killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat Toxicol* 77: 257-266.
- Bervoets L, Voets J, Covaci A, Chu S, Qadah D, Smolders R, Schepens P, Blust R (2005). Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in Flemish surface waters. *Environ Sci Technol* 39: 1492-1505.
- Bollache L, Gambade G, and Cézilly F (2001). The effects of two acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus*, on pairing success in male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Behav Ecol Sociobiol* 49: 293-303.
- Canadian Environmental Protection Act (1994) Priority substances list, assessment report, cadmium and its compounds.

- Casini S, and Depledge H (1997). Influence of copper, zinc, and iron on cadmium accumulation in the talitrid amphipod, *Platorchestia platensis*. Bull Environ Contam Toxicol 59: 500-506.
- Chatterjee A, Das D, Mandal BK, Chowdhury TR, Samanta G, Chakraborti D (1995) Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: The biggest arsenic calamity in the world. Part I: arsenic species in drinking water and urine of the affected people. Analyst 120: 643-650.
- Colby S (1967) Calculation synergistic and antagonistic responses of herbicide combination. Weeds 15: 20-22.
- Costa FO, and Costa MH (1999) Life history of the amphipod *Gammarus locusta* in the Sado estuary (Portugal). Acta Oecol 20: 305-314.
- Devin S, Piscart C, Beisel JN and Moreteau JC (2003). Ecological traits of the amphipod invader *Dikerogammarus villosus* on a mesohabitat scale. Arch. Hydrobiol 158: 43-56.
- Falnoga I, Stibilj V, Tusek-Znidaric M, Slejkovec Z, Majez D, Jacimovic R, Scancar J (2000) Effect of arsenic trioxide on metallothionein and its conversion to different arsenic metabolites in hen liver. Biol Trace Elem Res 78:241-254
- Felten V, Charmantier G, Mons R, Geffard A, Rousselle P, Coquery M, Garric J and Geffard O (2008). Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. Aquatic Toxicol 86: 413-425.
- Forrow DM and Maltby L (2000) Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: direct and indirect effects on detritivore feeding. Environ Toxicol Chem 19: 2100-2106.
- Ginneken LV, Chowdhury MJ and Blust R (1999) Bioavailability of cadmium and zinc to the common carp, *Cyprinus carpio*, in complexing environments: a test for the validity of the free ion activity model. Environ Toxicol Chem 18: 2295-2304.
- Gowing DP (1960) Comments on tests of herbicide mixtures. Weeds 8: 379-391.
- Graca MAS, Maltby L and Calow P (1994) Comparative ecology of *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) I. population-dynamics and microdistribution. Hydrobiologia 281:155-162.
- Hadjispyrou S, Kungolos A and Anagnostopoulos A (2001) Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin, cadmium, and chromium on *Artemia franciscana*. Ecotox Environ Safe 49: 179-186.
- Holwerda DA (1991) Cadmium kinetics in freshwater clams. V. cadmium-copper interaction in metal accumulation by *Anodonta cygnea* and characterization of the metal-binding protein. Arch Environ Con Tox 21: 432-437.

- Isnard P, Flammarion P, Roman G, Babut M, Bastien P, Bintein S, Esserméant L, Férard JF, Gallotti-Schmitt S, Saouter E, Saroli M, Thiébaud H, Tomassone R and Vindimian E (2001) Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere* 45: 659-669.
- Janetzky W (1994) Distribution of the genus *Gammarus* (Amphipoda: Gammaridae) in the River Hunte and its tributaries (Lower Saxony, northern Germany). *Hydrobiologia* 294: 22-34.
- Kungolos A, Emmanouil C, Tsiridis V and Tsiropoulos N (2009) Evaluation of toxic and interactive toxic effects of three agrochemicals and copper using a battery of microbiotests. *Sci Total Environ* 406: 4610-4615.
- Kungolos A, Hadjispyrou S, Petala M, Tsiridis V, Samaras P and Sakellaropoulos GP (2004) Toxic properties of metals and organotin compounds and their interactions on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Water Air Soil Poll* 4: 101-110.
- Kungolos A, Samaras P, Kipopoulou AM, Zoumboulis A and Sakellaropoulos GP (1999) Interactive toxic effects of agrochemicals on aquatic organisms. *Water Sci Technol* 40: 357-364.
- Kungolos A, Samaras P and Sakellaropoulos GP (1997) Evaluation of the interactive effect of chemicals on aquatic organisms, using a method based on the theory of probabilities. In "Proc. Int. Conf. Water Pollution IV", (R. Rajar and C.A. Brebbia eds). Computational Mechanics Publication, Southampton, UK, 107-114.
- McCahon CP, Barton SF and Pascoe D (1990) The toxicity of phenol to the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (L.) during episodic exposure - Relationship between sub-lethal responses and body phenol concentrations. *Arch Environ Con Tox* 19: 926-929.
- McCahon CP and Pascoe D (1988) Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluation tests: culture and selection of a sensitive life stage. *Ecotoxicol Environ Safe* 15: 245-252.
- McNeil C, Dick JTA and Elwood RW (1997) The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea; Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Rev* 72: 349-36.
- Ministère de la santé et de la protection sociale (2003) Ressources en eau-Distribution de l'eau d'alimentation- Qualité des eaux distribuées dans les unités de distribution de plus de 5000 habitants. Rapport de synthèse 1996-1997-1998.
- Morel F (1983) Principles of aquatic chemistry. New-York, Wiley Intersciences, 446p.
- Mulliss RM, Revitt DM and Shutes RBE (1996). A statistical approach for the assessment of the toxic influences on *Gammarus pulex* (Amphipoda) and *Asellus aquaticus* (Isopoda) exposed to urban aquatic discharges. *Water Res* 30: 1237-1243.
- National Research Council, 1999. Arsenic in drinking water. National Academy Press, Washington, DC.

Neuparth T, Correia AD, Costa FO, Lima G, Costa MH (2005) Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: I. Biochemical endpoints. *Mar Environ Res* 60 (1): 69-91

Part P, Svanberg O and Kiessling A (1985) The availability of cadmium to perfused rainbow trout gills in different water qualities. *Water Res* 19: 427-434.

Phillips DJH (1976) The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. *Marine Biol* 38: 59-69.

Rainbow PS (1995) Physiology, physicochemistry and metal uptake - a crustacean perspective. *Marine Poll Bull* 31: 55-59.

Rainbow PS (1997) Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Estuar Coast Shelf S* 44, 169-175.

Rainbow PS and Dallinger R (1983) Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrates. In *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates* (Dallinger, R. & Rainbow, P. S., eds). Boca Raton, Lewis Publishers, 119-131.

Reid SD and McDonald DG (1988) Effects of cadmium, copper and low pH on ion fluxes in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can J Fish Aquat Sci* 45: 244-253.

Sharma VK and Sohn M (2009) Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environ Int* 35: 743-759.

Shuhaimi-Othman M and Pascoe D (2007) Bioconcentration and depuration of copper, cadmium, and zinc mixtures by the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotox Environ Safe* 66: 29-35.

Sornom P, FeltenV, Medoc V, Sroda S, Rousselle P and Beisel JN (2010) Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environ Pollut* 158: 1288-1295.

Spehar RL, Anderson RL and Fiandt JT (1978) Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic invertebrates. *Environ Pollut* 15: 195-208.

Styblo M, Del Razo LM, Vega L, Germolec DR, LeCluyse EL, Hamilton GA, Reed W, Wang C, Cullen WR and Thomas DJ (2000) Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and humans cells. *Arch Toxicol* 74 :289-299.

Tessier A, Buffle J and Campbell PGC (1994) Uptake of trace metals by aquatic organisms. In *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems* (Buffle, J. & De Vitre, R.R., eds). Lewis Publishers, Boca Raton, 197-230.

Thomas DJ (2007) Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 222: 365-373.

Uthus EO (1992) Evidence for arsenic essentiality. *Environ Geochem Hlth* 14: 55-58.

Vellinger C, Parant M, Rousselle P, Immel F, Wagner P and Usseglio-Polatera P (2012) Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*). *Environ Pollut* 160: 66-73.

Verboost PM, Flik G, Lock RA and Wendelaar Bonga SE (1987) Cadmium inhibition of Ca^{2+} uptake in rainbow trout gills. *Am J Physiol* 253: 216-221.

Vindimian E, Garric J, Flammarion P, Thybaud E and Babut M (1999) An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic tests and expert judgements. *Environ Toxicol Chem* 18: 2386-2391.

Vindimian E, Robaut C and Fillion G (1983) A method for cooperative or noncooperative binding studies using nonlinear regression analysis on a microcomputer. *J Appl Biochem* 5: 261-268.

Wang W and Rainbow PS (2006) Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. *Environ Chem* 3: 395-399.

Wicklund-Glynn A, Norrgren L and Müssener A (1994) Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Aquat Toxicol* 30: 13-26.

Xu Q and Pascoe D (1993) The bioconcentration of zinc by *Gammarus pulex* (L.) and the application of a kinetic model to determine bioconcentration factors. *Water Res* 27: 1683-1688.

Zauke G, Von Lemm R, Meurs H and Butte W (1995) Validation of estuarine Gammarid collectives (Amphipoda: Crustacea) as biomonitors for cadmium in semi-controlled toxicokinetic flow-through experiments. *Environ Pollut* 90: 209-219.

Zhang H and Shan B (2008) Historical records of heavy metal accumulation in sediments and the relationship with agricultural intensification in the Yangtze-Huaihe region, China. *Sci Total Environ* 399, 113-120.

ARTICLE 3

(Accepté dans *Aquatic Toxicology* sous réserve de corrections)**Single and combined effects of Cadmium and Arsenate in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda): understanding the links between physiological and behavioural responses**

Cette étude a eu pour but (i) d'étudier les effets des deux métaux seuls et en mélange sur *G. pulex* et (ii) de tenter d'expliquer les effets antagonistes des mélanges précédemment observés sur la mortalité de *G. pulex* à l'aide de différents biomarqueurs. De plus, les relations existant entre les différents biomarqueurs ont été décrites. Pour cela, des individus de *G. pulex* ont été exposés aux mêmes conditions expérimentales que celles décrites dans l'article précédent. Cependant, seules deux concentrations ont été testées par métal, le nombre élevé de biomarqueurs utilisés ne permettant pas d'en envisager plus simultanément (nombre de gammarus à prélever prohibitif, hausse du nombre de réplicats à réaliser, armoires thermostatées en nombre insuffisant...). Les concentrations choisies sont les deux plus faibles (concentrations proches de la LC10 et de la LC25 obtenues pour chaque métal à 10°C, après 240h d'exposition). Le choix de ces concentrations est imputable à un plus grand « réalisme écologique » (quant à la vraisemblance d'un tel niveau de contamination dans le milieu naturel) d'une part, mais aussi au fait que l'effet antagoniste du mélange binaire sur la mortalité de *G. pulex* est plus marqué aux plus faibles combinaisons de concentrations.

A la fin du temps d'exposition, les biomarqueurs d'effets toxiques (mortalité, peroxydation lipidique) ont été estimés et les effets conjoints des deux métaux ont évalués sur ces deux biomarqueurs. De plus, les défenses anti-toxiques [*activité γ -glutamyl-cysteine ligase (GCL)*, *teneur en glutathion réduit (GSH)* et *concentrations en métallothionéines (MT)*], les réserves énergétiques (*glycogène, lipides et protéines*) ainsi que des réponses comportementales (*locomotion, fréquence des battements de pléopodes*) et physiologiques (*pression osmotique*) ont été mesurées.

*Les résultats montrent que dans les expositions métalliques simples, des relations causales entre les différents biomarqueurs pouvaient être établies alors que dans les mélanges binaires, les liens étaient moins clairs et plus complexes à interpréter. Cependant, un effet antagoniste du mélange sur la mortalité de *G. pulex* a pu être expliqué par un effet antagoniste observé simultanément sur la peroxydation lipidique pour toutes les combinaisons de concentrations testées. Les résultats sont discutés en termes (i) de*

stratégies et capacités de réponses de G. pulex face à une contamination à l'arséniate et/ou au cadmium et (ii) d'évaluation des risques environnementaux dans un contexte de pollution métallique.

Article 3**Single and combined effects of Cadmium and Arsenate in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda): understanding the links between physiological and behavioural responses**

(Accepté dans Aquatic Toxicology sous réserve de corrections)

Abstract

This study aimed at investigating both the individual and interactive effects of cadmium (Cd) and arsenate (AsV) in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) through the use of several biomarkers. Individuals were exposed during 240 hours to arsenate or cadmium alone and in binary mixtures according to a complete factorial plane. At the end of the exposure time, toxic effect biomarkers (mortality, lipid peroxidation) were estimated in each tested condition. Interactive effects (antagonistic, additive or synergistic) were evaluated using a predictive model for the theoretically expected interactive effect of chemicals. In addition, the antitoxic defenses [γ -glutamyl-cysteine ligase activity (GCL), reduced glutathione content (GSH) and metallothionein concentrations (MT)], energy reserves (glycogen, lipids, proteins) but also osmolality and behavioural responses (locomotion, pleopod beat frequency) were measured. If clear relationships among biomarkers have been established in single metal concentrations, such relationships were more complex in binary mixtures because they were dose-dependent. However, an antagonistic effect of the two metals in mixture was observed on the mortality in *G. pulex* exposed to all the tested concentration combinations.

Observed results were discussed in terms of (i) response strategy and capacity of *G. pulex* and (ii) ecosystem risk assessment in a context of multi metal contamination.

Key-words: *aquatic invertebrates, metal mixtures, antagonistic effect, biomarkers, behaviour.*

1. Introduction

Trace metals are natural constituents of rocks and soils. In the recent decades, anthropogenic activities contribute to increase their concentration (Zhang and Shan, 2008), what has become a major concern in environmental risk assessment (ERA). Although aquatic

ecosystems are generally multi-contaminated (e.g. HAPs, PCBs, metals), most of studies have focused on the effects of single compounds on organisms (Enserink et al., 1991; Don-Pedro, 1996). However, studies on the combined action of toxicants are becoming increasingly popular in measuring and predicting impacts on organisms (Don-Pedro, 1996). The toxicity of metals in mixtures can be additive, but also significantly more (i.e. synergistic) or less (i.e. antagonistic) important than the toxicity theoretically expected by the simple addition of the independent metal effects (e.g. Attar and Mally, 1982; Marking, 1985; Enserink et al., 1991; Sanchez-Dardon et al., 1997; Ince et al., 1999).

Cadmium is a non-essential trace metal leading to toxic effects at low concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$ order), due to the bioavailability of its free ionic form Cd^{2+} (Part et al., 1985; Wang and Rainbow, 2006). Arsenic (As) is a metalloid (considered as a trace metal) which may be considered as an essential ultra-trace element in animals such as chickens, goats, hamsters, pigs and rats (Uthus, 1992). Nevertheless, no studies have given evidence that arsenic is an essential element for humans or that it is required for any essential biochemical process (e.g. National Research Council, 1999). The arsenic toxicity depends on its chemical form, with inorganic forms being more toxic than organic ones and arsenate (AsV) less toxic than arsenite (AsIII) (Styblo et al., 2000; Sharma and Sohn, 2009). The two forms are inter-converted through redox reactions (Bears et al., 2006). The cellular metabolism involves the arsenic reduction from pentavalent to trivalent form, a prerequisite for oxidative methylation into pentavalent methyl arsenical (Thomas, 2007). Whereas Cd toxicity is well documented for aquatic organisms (e.g. Wright and Melbourne, 1994), very few information is available on arsenic effects, and especially arsenate (AsV), one of the inorganic forms of arsenic frequently found in aquatic environments.

Freshwater amphipods (crustaceans) are aerobic organisms that have been largely used as test organisms in ecotoxicological studies on trace metals, especially species of the genus *Gammarus* (Felten et al., 2008; Gismondi et al., 2012a; 2012b, Vellinger et al., 2012a, 2012b, 2012c). The current use of this genus is related to its wide distribution, high abundance (Kunz et al., 2010), clear sexual dimorphism, ease to be collected, sensitivity to various toxicants (Adam et al., 2009; Alonso et al., 2010) and trophic importance in freshwater ecosystems. As shredder, *Gammarus* plays a key functional role in leaf litter breakdown processes and, consequently, in freshwater food chains and nutrient cycling (McNeil et al., 1997; Forrow and Maltby, 2000; Kelly et al., 2002).

Gills, which represent the major site of penetration and concentration of metals in many freshwater organisms (Wicklund Glynn et al., 1994), are crucial for oxygen uptake,

acid-base balance, osmotic and ionic regulation (Henry and Wheatly, 1992; Péqueux, 1995). Crustaceans exposed to pollutants, environmental stressors and/or pathological agents usually exhibit a disruption of iono/osmoregulation mechanisms, including alterations in the structure and ultrastructure of the branchial and excretory organs, and changes in the Na^+/K^+ -ATPase activity, ion fluxes and gill surface permeability (Lignot et al., 2000). As a result, intra-organismal Na^+ and Cl^- concentrations, which are known to contribute up to 90% or more to the haemolymph osmotic pressure in most crustaceans (Mantel et Farmer, 1983), can be impaired by chemical stress [e.g. zinc (Johnson and Jones, 1990); copper (Brooks and Mills, 2003); cadmium (Felten et al., 2008; Vellinger et al., 2012c); acidification (Felten and Guerold, 2004)]. Osmoregulation is an important and highly energy-consuming regulatory function in aquatic invertebrates.

Usually, gammarid internal concentration of metals increases with external concentration exposure (Vellinger et al., 2012c). Metals can induce oxidative stress leading to the overproduction of reactive oxygen species (ROS; Livingstone, 2001; 2003). To face this stress out and protect cells, antitoxic systems can be mobilized. Glutathione (GSH) is an ubiquitous thiol-containing tripeptide (Glycine, L-cysteine, L-glutamate). Its synthesis is catalyzed by two successive ATP-dependent enzymes: the λ -glutamyl-cysteine ligase (λ -GCL) and the glutathione synthetase (Seelig et al., 1984 ; Coffinet et al., 2008 ; Ventura-Lima et al., 2009). Thus, reduced glutathione plays a critical role in the antitoxic cell defenses by being a “scavenger” of organic and metallic xenobiotics (Valko et al., 2007) due to its thiol group (Griffiths, 1999; Vasseur and Leguille, 2004). It can be used also as a substrate for many antioxidant enzymes such as the glutathione peroxidase (Mills, 1957) or the glutathione S-transferase (Habig et al., 1974). Another way to reduce metal toxicity is a cysteine-rich protein, called metallothionein (MT), which is known to bind up with metal ions (*via* its thiol function), and is not only involve in heavy metal detoxification but also in the regulation of essential trace metal metabolism (Sato and Bremner, 1993). Numerous studies have showed an increase in MT concentration in organisms exposed to pollutants (Cousins, 1985; Onasaka et al., 1987; Amiard et Cosson, 1997; Palmiter, 1998). Thus, the determination of the MT and GSH concentrations in organisms have been used as exposure biomarkers to exogenous pro-oxidants, including metals (Cossu et al., 1997; Doyotte et al., 1997; Regoli et al., 1998; Geffard et al. 2002a, 2002b; 2005; Gravato et al., 2006; Amiard et al., 2006) and have been the subject of particular attention in monitoring programmes (Mathiessen, 2000).

When detoxification and repairing systems were exceeded, toxic effects of ROS may appear. Hence, lipid peroxidation of the cellular membrane is often studied through the concentration of toxicity biomarkers like the malondialdehyde (MDA), one of its intermediate products (Cossu et al., 1997; Gismondi et al., 2012a, 2012b, 2012c).

To ensure growth, reproduction and basal metabolism functioning, organisms need energy as ATP provided by the oxidation of energetic substrates (e.g. glucose, fatty acids, amino-acids) through the electron chain transport. The not consumed energetic substrates are stocked as reserves including glycogen, lipids, and proteins. These reserves could be destocked when individuals are subjected to stress (e.g. fasting, chemical stress) to provide energy (ATP) for physiological compensatory mechanisms (Le Gal et al., 1997) including processes related to detoxification, excretion, homeostasis maintenance (iono-/osmo-regulation) or cellular repairing. De Coen and Janssen (2003) showed that the amount of energetic reserve is often correlated with metrics related to high levels of biological organization, such as population growth rate. Thus, a decrease in the energy reserves available in a given population is often used in ecotoxicological studies as an early biomarker of environmental perturbation (Scott-Fordsmand and Weeks, 2000; Lagadic, 2002). Moreover, the quantification of the different forms of energy reserves has also allowed to complete the knowledge of the strategies of response to disturbance, the choice of the used substrate depending on the response type (Holmstrup et al., 2010).

In the past few years, several studies have used behavioural responses of *Gammarus* as tools for ecotoxicity testing and water quality monitoring [e.g. locomotor activity (Wallace and Estephan, 2004; Mills et al., 2006); ventilatory activity (Lawrence and Poulter, 1998); feeding rate (Maltby et al., 2002)]. The development of such behavioural tests is of high interest for ecotoxicology because they allow to link the toxic effects obtained at biochemical/cellular levels to some impacts observed at population and community levels (Wallace and Estephan, 2004). The organism mobility is an ecologically relevant behavioural marker as well, since locomotion is required to find food, escape from predators and obtain mating success. Any pollutant that alters mobility is likely to reduce the fitness of organisms and could lead to 'ecological death' (Scott and Sloman, 2004).

In a previous study (Vellinger et al., 2012b), we showed an antagonistic effect of AsV and Cd mixtures on *G. pulex* mortality when organisms were exposed during 240 h, at 10°C. Although this effect has been partially explained by a decrease in AsV and Cd concentrations in *G. pulex* body, further studies are needed (i) to better understand Cd and AsV individual

and combined toxicity mechanisms and (ii) to link observed responses to exposure. Thus, in the present study, we aimed at (i) assessing other (sub-) individual responses, such as oxidative stress and energetic metabolism biomarkers, which can help us to identify the involved mechanisms, (ii) linking the observed responses in a context of energetic allocation in order to (iii) better understanding individual and combined effects and toxicity mechanisms of the selected pollutants and (iv) *in fine*, giving sense to the antagonistic effects of AsV-Cd mixtures.

To match these goals, males of *G. pulex* were exposed during 240 h at 10°C to As and Cd concentrations close to those already tested by Vellinger et al. (2012a), but both in single and binary mixtures. At the end of the exposure time, survival rates, biomarkers of exposure (MT, GSH and GCL), biomarkers of toxic effects (MDA, osmolality), energy reserves (glycogen, lipids, proteins) and behavioural biomarkers (locomotion, pleopod beats frequency) were measured on organisms from each tested exposure condition. The interactive effects of binary mixtures on mortality were evaluated using a predictive model (Kungolos et al., 1997; 1999).

2. Material and methods

2.1. Organism sampling and acclimation

Gammarus pulex was used as test organism. Only adult males were kept to avoid potential sexual (Sornom *et al.*, 2010) or between-life stage (McCahon and Pascoe 1988) differences in sensitivity. Moreover, parasitized individuals were released to avoid parasitism as confounding factor (Gismondi et al., 2012a; 2012b). In January 2012, artificial substrates had been placed in an unpolluted river: the Meholle River [Void-Vacon, France, Lambert II E (X = 841244; Y = 2412346)]. After three weeks of colonization, individuals from artificial substrates were sampled and quickly brought to the laboratory in plastic bags with river water. Males in precopulat were directly identified in the field. Other individuals were sexed using stereomicroscope, based on sexual dimorphism; *e.g.* males exhibiting more massive gnathopodes than females (Bollache *et al.*, 2001 on *G. pulex*; Costa and Costa, 1999 on *G. locusta*; Devin *et al.*, 2003 on *Dikerogammarus villosus*). To prepare the size measure of males, pictures were performed using binocular and Studio version 7 software. Then, pictures were manipulated using ImageJ software, Version 1.42q. Males were measured from the top of the cephalothorax to the base of the telson. The mean body length of selected males was 10.2 ± 0.8 mm. Adult males were acclimatized in oxygenated aquaria (approximately 300

males/aquarium) during a week in 5L of mineral water (Volvic, France) under constant temperature and photoperiod conditions (10°C; 16h of light / 8h of darkness) before being used in experiments. Specimens were fed with discs of conditioned leaves during acclimation up to 24 h before starting experiments. During acclimation, a daily renewal of both Volvic water and food was performed. Non used individuals (females and excess of males) in laboratory experiments were rapidly returned to the collection site.

2.2. Experimental design

After the acclimation period, groups of ten males of *G. pulex* were transferred from batches to plastic Petri dishes (100 mm width and 20 mm height; = “dishes” hereafter), each containing 40 mL of tested toxic solution (experimental dishes) or Volvic natural mineral water (control dishes; $[Ca^{2+}] = 11.5 \text{ mg L}^{-1}$; $[Mg^{2+}] = 8.0 \text{ mg L}^{-1}$; $[Na^+] = 11.6 \text{ mg L}^{-1}$; $[K^+] = 6.2 \text{ mg L}^{-1}$; $[SO_4^{2-}] = 8.1 \text{ mg L}^{-1}$; $[HCO_3^-] = 71.0 \text{ mg L}^{-1}$; $[NO_3^-] = 6.3 \text{ mg L}^{-1}$; $[Cl^-] = 13.5 \text{ mg L}^{-1}$; $[SiO_2] = 31.7 \text{ mg L}^{-1}$; $[F^-] = 0.22 \text{ mg L}^{-1}$; pH = 7.0) and four glass pebbles ($\varnothing$ 15 mm, convex side down). In the acclimation temperature and photoperiod conditions, eight replicates of ten gammarids were exposed during 240 h to (i) two concentrations of pentavalent arsenic (AsV) alone, (ii) two concentrations of cadmium (Cd) alone, and (iii) all the possible binary mixtures of these concentrations of arsenate and cadmium according to a complete factorial plane. Selected metal concentrations corresponded to the lethal concentrations causing ten (LC10) and twenty-five percent (LC25) of mortality on *G. pulex* after 240-h exposure in the same photoperiod and temperature conditions (see Vellinger et al., 2012b). Real metal concentrations used in this experiment were calculated using graphite furnace for AsV (total arsenic) or flame-atomic absorption spectrophotometry for Cd (real concentrations, mean $\pm$ S.D.: control $< 2 \mu\text{g}_{AsV} \text{ L}^{-1}$, As1 = $376.5 \pm 16.0 \mu\text{g}_{AsV} \text{ L}^{-1}$, As2 = $604.0 \pm 6.4 \mu\text{g}_{AsV} \text{ L}^{-1}$ and control $< 0.1 \mu\text{g}_{Cd} \text{ L}^{-1}$, Cd1 = $3.4 \pm 0.5 \mu\text{g}_{Cd} \text{ L}^{-1}$, Cd2 = $6.0 \pm 0.2 \mu\text{g}_{Cd} \text{ L}^{-1}$).

During the exposure time, individuals were not fed, minimizing the potential contamination of exposure solutions by faeces or food excess. With the same goal, experimental solutions in dishes were renewed every day and the dead gammarids were removed every 24 h to avoid organism decomposition in dishes, potentially providing nitrogen compounds. As gammarids were not fed during the whole experiment, glass pebbles served both as substrate and refuge for animals to avoid at best cannibalism. Test containers were filled up with metal solutions 96 h before the beginning of experiments, allowing a chemical equilibrium before experiment and minimizing metal adsorption during experiments. pH

was measured every day and was remained stable in tested solutions (7.31 ± 0.16) independently of their Cd and/or AsV concentrations. Chemicals used were provided by SIGMA-Aldrich, UK.

Metal stock solutions ($10 \text{ mg}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$ and $50 \text{ mg}_{\text{AsV}} \text{ L}^{-1}$) were prepared by dissolving cadmium chloride (CdCl_2) or sodium arsenate heptahydrate ($\text{AsHNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in milliQwater and then were stabilized with 0.1 % of HNO_3 (65 %, Suprapure, Merck). Metal test solutions were prepared using mineral water (Volvic, France) as diluent of stock solutions.

2.3. Mortality rate and evaluation of the interactive mode of action

The mortality of gammarids was recorded after 240-hour exposure to each tested concentration of single metal or binary mixture, dead animals being removed from dishes each day. Because observed mortality in control reservoirs was of 10 %, the Abbott's correction was applied (Abbott, 1925). The theoretically expected mortality of *G. pulex* subjected to the interactive toxic effects of binary mixtures was derived from a simple mathematical model. This model is based on the theory of probabilities and assumes that the chemicals are acting (antagonistically, additively or synergistically) simultaneously on the impaired organisms (Kungolos et al., 1999; 2004; 2009; Hadjispyrou et al., 2001), in contrast with the models developed by Gowing (1960) or Colby (1967). In this model, if M_1 is the mortality (i.e. 'inhibition rate' *sensu* Kungolos et al., 1999; 2009) caused by a certain concentration of chemical A_1 and M_2 the mortality caused by a certain concentration of chemical A_2 , then the theoretically expected mixture toxicity M_E , when the two chemicals are applied together, is given by the following equation:

$$M_E = M_1 + M_2 - [M_1 M_2 / 100] \quad (1)$$

For each binary mixture, the experimentally observed mortality after 240-hour exposure (M_O) was compared to the theoretically expected mixture mortality M_E calculated with equation (1) using a Mann-Whitney U-test ($n = 8$), because obtained values did not follow a normal probability distribution. If M_O and M_E were not significantly different ($p \geq 0.05$), the mode of interaction was characterized as additive. If M_O was significantly lower than M_E , the mode of interaction was considered as antagonistic. If M_O was significantly higher than M_E , the mode of interaction was considered as synergistic.

2.4. Osmolality

Osmolality measurement was performed individually on 10 gammarids per treatment. Before haemolymph sampling, behavioural parameters were assessed (locomotion and then ventilation) on the same organisms. A drop of haemolymph was immediately transferred into mineral oil to avoid evaporation. The haemolymph osmolality was measured in 30 nL samples with an Otago nanolitre osmometer (Otago Osmometers Ltd, Dunedin, New Zealand) using a 300 mOsm kg⁻¹ standard.

2.5. Energy reserves, anti-toxic defenses and MDA level measurements

2.5.1. Sample preparation

At the end of the exposure period, six pools of five individuals were formed per tested condition. Each pool was homogenized with a manual Potter Elvehjem tissue grinder in 50 mM phosphate buffer KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7.6) supplemented with 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) and 1 mM L-serine-borate mixture as protease inhibitors and 5 mM phenylglyoxal as γ -glutamyl transpeptidase inhibitor. The homogenization buffer was adjusted to a volume (expressed in μ l) of 2.5-fold the wet weight (in mg) of the sample pool (e.g. 500 μ L of homogenization buffer for 200 mg of tissue wet weight). Each homogenate was divided into five aliquots for measuring the different parameters (i.e. GSH, GCL, MT, MDA and energy reserve). For each replicate, two independent measures of each biomarker were made.

2.5.2. Antitoxic defense capacities

Reduced glutathione (GSH) concentration was assessed by High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) separation adapted from Leroy et al. (1993). The proteins contained in 40 μ L of the total homogenate were precipitated with 10 % perchloric acid (v/v). After a 10 min-centrifugation at 20 000 $\times$ g and 4°C, the resulting supernatant was diluted 40-fold in 0.1 M HCl. Commercial GSH diluted in 0.1 M HCl was used as standard. GSH concentration was expressed in nmol GSH.mg⁻¹ protein.

The γ -glutamylcysteine ligase (GCL) activity was measured using a HPLC method adapted from Parmentier et al. (1998). Measurements were carried out on the S12000 fraction obtained after centrifuging 40 μ L of the total homogenate for 15 min at 500 $\times$ g; then centrifuging the resulting supernatant at 12000 $\times$ g and 4°C for 30 min. A forty-fold dilution

of the S12000 supernatant was prepared in 100 mM HCl and 40 μ L of this diluted solution were added to 112 μ L of the incubation cocktail (0.5 M Tris HCl, 200 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 500 mM KCl, 45 mM glutamic acid, 90 mM cysteine, 1 mM DTT, 90 mM ATP, 0.5 mM phenylglyoxal, pH 8.25) in a 1.5 mL tube to initiate the reaction. The mixture was incubated for 20 min in a water bath at 25°C and the reaction was stopped by a four-fold dilution with 0.1 M HCl. Commercial glutamylcysteine (GC) solution prepared in 0.1 M HCl was used as standard and GCL activity was expressed in nmol GC $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein.

Metallothionein (MT) concentrations were determined with a HPLC method adapted from Alhama et al. (2006). Forty microlitres of the total homogenate were centrifuged at 3500 $\times g$. The resulting supernatant was centrifuged at 22000 $\times g$ and 4°C to obtain the S22000 fraction. A ten-fold dilution of the S22000 fraction was prepared in 100 mM Tris buffer (pH 9.5) supplemented with 1 mM DTT and 100 mM PMSF as protease inhibitor. To reduce and denature the proteins, 125 μ L of diluted sample were added to 108 μ L of the incubation cocktail (230 mM Tris pH 9.5, 300 mM DTT, 100 mM EDTA and 10% sodium dodecyl sulfate) in a water bath at 70°C for 20 min. Then, the incubation mixture was supplemented with 17 μ L of 180 mM monobromobimane (mBBBr) and incubated in the dark at room temperature for 15 min, to mark MTs. Commercial rabbit-liver MT I solution prepared in 230 mM Tris, pH 9.5, was used as standard and MT concentration was expressed in nmol MT mg^{-1} protein.

2.5.3. MDA level

Malondialdehyde (MDA) levels were determined using a HPLC method adapted from Behrens and Madère (1991) with UV detection at 267 nm. Seventy microlitres of the total homogenate were diluted four-fold in 95% ethanol (HPLC grade) and cooled on ice for 1.5 hr deproteinization. The mixture was then centrifuged at 18000 $\times g$ for 30 min at 4°C. One hundred microlitres of the resulting supernatant were injected into the HPLC separation system. MDA level was expressed in ng MDA mg^{-1} lipid.

2.5.4. Energy reserves

Measures of lipid and glycogen contents were adapted from Plaistow et al. (2001). Twenty microlitres of 2% sodium sulphate (w/v) and 540 μ L of chloroform/methanol 1:2 (v/v) were added to 40 μ L of the total homogenate. After 1hr in ice, the samples were centrifuged at 3000 $\times g$ for 5 min at 4°C. The resulting supernatant was used to determine the lipid content and the pellet was used to measure the glycogen content. One hundred microlitres of supernatant were transferred to clean culture tubes and placed in a dry bath at 95°C to

evaporate the solvent. Then, 200 μL of 95% sulphuric acid were added and left for 10 min at 95°C. The different tubes were removed and cooled in ice, and then 4.8 mL of phosphovanillin reagent were added. After a 10-min reaction time, the optical density was measured at 535 nm using cholesterol as standard. The total lipid content was expressed in mg mL^{-1} . The pellet was dissolved in 400 μL of deionised water and 100 μL of sample were placed into clean culture tubes supplemented with 4.9 mL of Anthrone reagent, boiled in a dry bath at 95°C for 17 min, and cooled in ice. Then, the optical density was measured at 625 nm using glucose as standard. Glycogen concentration was expressed in $\mu\text{g mg}^{-1}$ tissue. The total protein content of each sample was quantified as described in Bradford (1976) with bovine serum albumin (BSA) as standard. The result was expressed in mg mL^{-1} .

2.6. Behavioural responses of *G. pulex*

2.6.1. Ventilatory activity

The pleopods are specialized abdominal appendages in malacostraceans used both for swimming and for facilitating respiratory gas exchanges across tegument. The ventilatory activity was recorded by the observation of the pleopod beat frequency during 1 min (Hervant et al., 1997). The measurements were performed rapidly at the same period of the day to avoid the effects of a possible circadian rhythm of respiration (Rosas et al., 1992).

2.6.2. Locomotor activity

Locomotor activity was monitored by counting the number of moving animals in 800 mL tanks containing 10 individuals (Issartel et al., 2005). A piece of net was added in the tank to provide a resting surface (mesh size 200 μm , length x width: 6 x 5 cm). Each count of moving *G. pulex* was conducted on a period of 2 seconds and was repeated 35 times. Measurements were performed at the same period of the day, with similar light conditions and without noise.

2.7. Statistical analyses

The comparison of each biomarker response in tested conditions was performed using (i) under normality and homoscedasticity: one-way ANOVA followed by post hoc HSD Tukey's test if significant heterogeneity among tested conditions (i.e. $p < 0.05$) had been identified, or (ii) in other cases: non parametric Kruskal-Wallis test for multiple independent samples followed by multiple comparison test if significant heterogeneity had been

evidenced. For responses expressed in % (mortality and locomotion), an arcsin root square transformation was done, before applying statistical tests, to normalize raw data.

3. Results

3.1. Mortality rate

In comparison to non-exposed individuals, mortality rate significantly increased in *G. pulex* exposed to Cd or AsV treatments (mortality rate < 5% in control, Figure 1A). An increase in *G. pulex* mean mortality was observed along the gradient of single arsenate or cadmium concentrations, even if no significant difference was observed between the *G. pulex* mortalities of the two tested concentrations of the same contaminant (As2 vs. As1; Cd2 vs. Cd1). After 240-hour exposure, Cd1 and Cd2 caused in average 9.9 ± 5.6 % and 16.8 ± 5.8 % of *G. pulex* mortality respectively, whereas in average 22.2 ± 7.8 % and 24.9 ± 7.9 % of mortality were respectively observed with As1 and As2. The mortality of *G. pulex* exposed to As1 was higher than the expected mortality at the LC10 concentration after 240-h arsenate exposure while the mortality of *G. pulex* exposed to Cd2 was lower than the expected mortality at the LC25 concentration after 240-h cadmium exposure (see Table 1 in Vellinger et al. 2012b). No significant difference in mortality was observed between the different mixtures or between the mixtures and the single exposures of Cd or AsV. However, the mortality rate tended to increase in mixtures containing Cd2 in comparison to mixtures containing Cd1.

Evaluating the interactive mode of action of AsV and Cd on Gammarid mortality

For all the binary mixtures, the predicted mortality of *G. pulex* varied between 29.7 ± 10.2 % and 37.4 ± 7.8 %, while the observed mortality varied between 18.7 ± 9.7 % and 23.9 ± 13.3 % (Figure 1B). The [expected – observed] differences were significant ($p < 0.05$) for all the tested mixtures, except for As1Cd2. However, the p -value for the corresponding Mann-Whitney U test ($p = 0.058$) was close to the selected level of significance ($p = 0.05$).

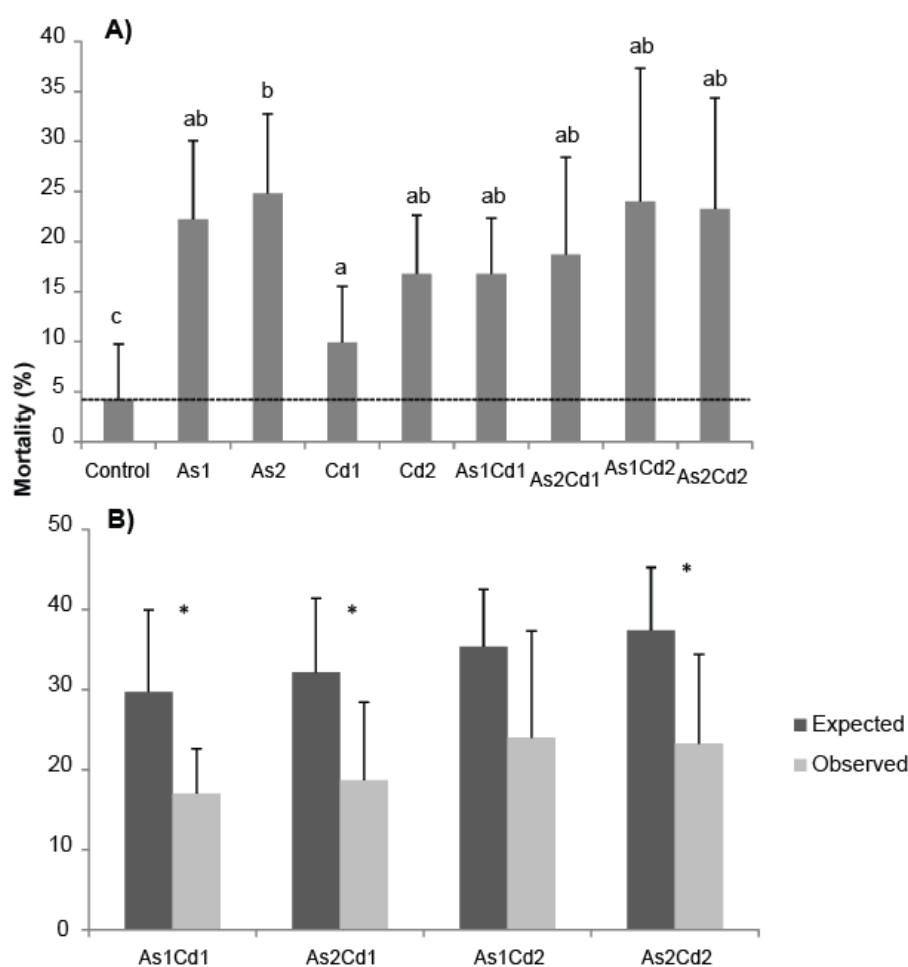


Figure 1.

Mortality of *G. pulex* after a 240-hour exposure to different concentrations of AsV and/or Cd.

A) Comparison of the mean observed mortality ($\% \pm \text{s.d.}$) of *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1 and As2) or cadmium (Cd1 and Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). Letters (a to c) were used as labels to illustrate significant differences in mean mortality values (one-way ANOVA and HSD Tukey post hoc test after arcsin root square transformation; at $p < 0.05$ level of significance, $n=8$). **B)** Comparison of the 'theoretically expected' with the 'observed' combined effects of different cadmium/arsenate binary mixtures on the mortality ($\pm \text{s.d.}$) of *G. pulex* after a 240-hour exposure. Asterisks indicated significant differences between the observed and expected value distributions for each binary mixture (Mann-Whitney U-test; at $p < 0.05$ level of significance).

3.2. Osmolality

If compared to control, haemolymph osmolality tended to decrease in *G. pulex* exposed to contaminants (Figure 2). However, only the single exposures to As2 and Cd2 and to the mixtures with Cd2 caused a significant decrease in osmolality (e.g. a 30% loss for Cd2 exposure). Adding Cd2 to As2 decreased significantly the osmolality when compared to As2. Adding As1 or As2 to Cd did not significantly modify osmolality in gammarids.

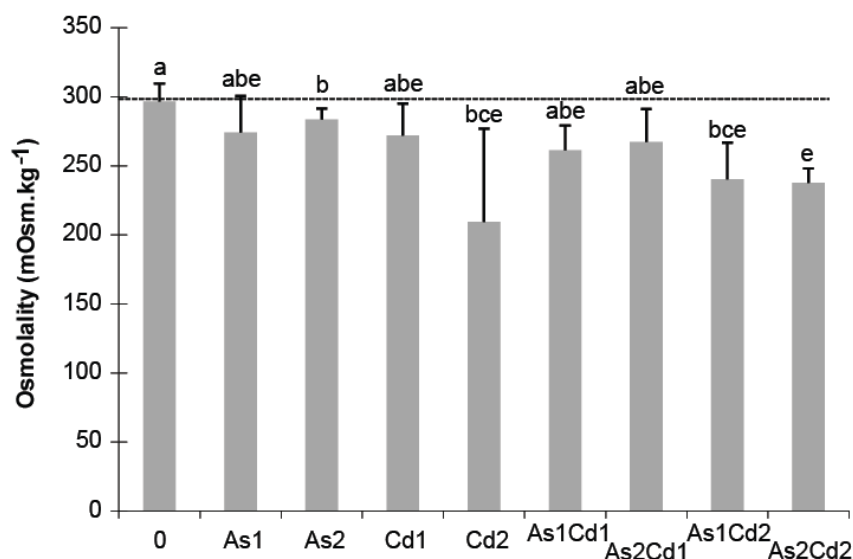


Figure 2.

Mean osmolality level (mOsm kg⁻¹; $\pm$ s.d.) of *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1, As2) and cadmium (Cd1, Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). Letters (a to e) illustrate significant differences (Kruskal-Wallis test; at $p < 0.05$ level of significance; $n=10$).

3.3. GSH concentration and GCL activity

Both the GCL activity and GSH concentration were significantly higher in gammarids exposed to Cd or/and AsV metallic contaminations than in non-exposed gammarids (Figure 3A, B). A rather good, positive relationship was observed between GCL activity and GSH concentration on the whole factorial plane.

No significant difference in both GSH concentration and GCL activity was observed between individuals exposed to As1 vs. Cd1 and between As2 vs. Cd2.

For the single exposures, a significant decrease in GCL activity was observed when gammarids were exposed to increasing concentration of each toxicant (Figure 3B). In

contrast, if GSH concentrations tended also to decrease in similar conditions, these decreases were not significant (Figure 3A).

Adding As1 or As2 significantly increased only the GSH concentration in *G. pulex* exposed to Cd1 (i.e. As1Cd1 vs. Cd1; As2Cd1 vs. Cd1; +40.9 and +43.1 %, respectively; Figure 3A & B). Moreover, no significant differences in both GSH concentration and GCL activity were observed along the gradient of AsV concentration in mixtures containing Cd1 (As1Cd1 vs. As2Cd1) or Cd2 (As2Cd2 vs. Cd2).

Adding Cd1 to As1 or As2 increased significantly the GSH concentration in exposed gammarids (As1Cd1 vs. As1; As2Cd1 vs. As2) whereas adding Cd2 had no impact on the GSH concentration (As1Cd2 vs. As1; As2Cd2 vs. As2; Figure 3A). The same comparisons demonstrated no significant difference in GCL activity (Figure 3B). Moreover, a significant decline in both the GSH concentrations (-39.0 to -44.5 %) and GCL activity (-30.0 to -41.7 %) was observed along the gradient of cadmium concentration in mixtures containing As1 (As1Cd1 vs. As1Cd2) or As2 (As2Cd1 vs. As2Cd2).

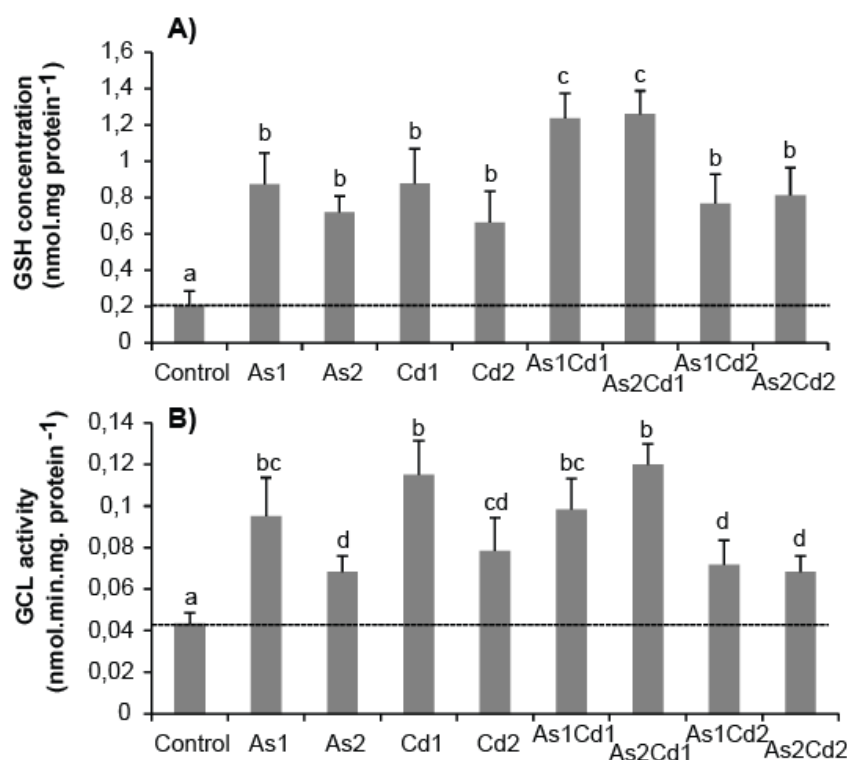


Figure 3. (A) Mean GSH concentration (nmol mg protein⁻¹; ± s.d.) and (B) mean GCL activity (nmol min⁻¹ mg protein⁻¹; ± s.d.) in *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1, As2) and cadmium (Cd1, Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). Letters (a to d) illustrate significant differences (one way-ANOVA and HSD Tukey post hoc test at $p < 0.05$ level of significance, $n = 6$).

3.4. MT concentration

MT concentrations ([MT]) were significantly higher in *G. pulex* exposed to metal concentrations than in control (Figure 4). Individuals exposed to As1, As2 and Cd1 showed similar concentrations of MT (mean of 4.65 ± 0.09 nmol mg_{protein}⁻¹), which were significantly higher (1.52 fold) than that measured in gammarids exposed to Cd2.

Adding As1 to Cd1 (As1Cd1 *vs.* Cd1) significantly increased the [MT] in *G. pulex* (+26.3 %) while adding As2 (As2Cd1 *vs.* Cd1) significantly decreased the MT concentrations (+25.5 %); the MT concentration in gammarids exposed to As1Cd1 being significantly higher than that in gammarids exposed to As2Cd1. Adding As1 or As2 to Cd2 (As1Cd2 *vs.* Cd2; As2Cd2 *vs.* Cd2) not significantly increased the MT concentration; gammarids in As1Cd2 exhibiting lower MT concentrations than those in As2Cd2 (-23.9%).

Adding Cd1 to As1 significantly increased the MT concentration (As1Cd1 *vs.* As1) while a decreasing - but not significant - tendency was observed when adding Cd2 (As1Cd2 *vs.* As1); the [MT] in gammarids exposed to As1Cd1 being 23.4 % higher than that of gammarids exposed to As1Cd2. Adding Cd1 to As2 caused a 23.6 % decrease in the [MT] of gammarids (As2Cd1 *vs.* As2) while adding Cd2 to As2 significantly increased (+30.26%) the gammarid [MT] (As2Cd2 *vs.* As2). Individuals exposed to As2Cd1 had lower [MT] (-41.4 %) than those exposed to As2Cd2.

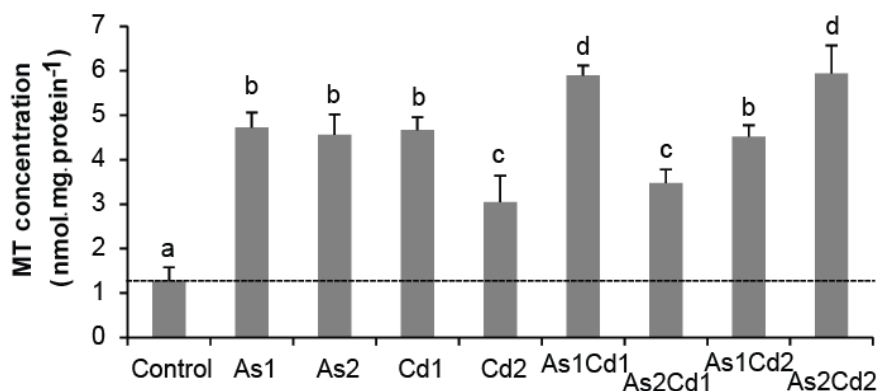
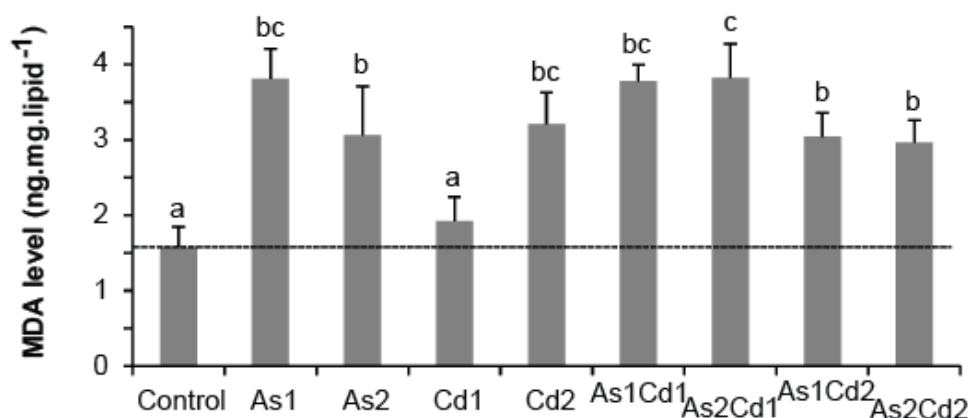


Figure 4.

Mean MT concentrations (nmol mg protein⁻¹; $\pm$ s.d.) in *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1, As2) and cadmium (Cd1, Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). Letters (a to d) illustrate significant differences (one way-ANOVA and HSD Tukey post hoc test at $p < 0.05$ level of significance, $n = 6$).

3.5. MDA level

**Figure 5.**

Mean MDA level ($\pm$ s.d.) in *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1 and As2) or cadmium (Cd1 and Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). Letters (a to c) were used as labels to illustrate significant differences in mean MDA level (one-way ANOVA and HSD Tukey post hoc test; at $p < 0.05$ level of significance; $n = 6$).

The mean MDA level in *G. pulex* was significantly higher in each single or binary exposure to Cd and/or AsV conditions (except Cd1; Figure 5A) than in the control.

At the lowest concentration, As1 exposure caused two-fold higher lipid peroxidation than Cd1, while at the highest concentration (As2 and Cd2), no significant difference was observed. A slight - but not significant - decrease in MDA level was observed between As2 and As1 (-19.7 %), while the MDA level increased significantly when gammarids were exposed to increasing cadmium concentration (+67.2 %).

The addition of As1 or As2 significantly increased the lipid peroxidation in *G. pulex* exposed to Cd1 concentration (As1Cd1 vs. Cd1 and As2Cd1 vs. Cd1), but not when organisms were exposed to Cd2. No significant difference in MDA concentration was observed along the gradient of AsV concentrations in mixtures containing Cd (As1Cd1 vs. As2Cd1; As1Cd2 vs. As2Cd2). An addition of Cd1 or Cd2 in *G. pulex* exposed to AsV had no impact on the MDA level when compared to the MDA level in individuals only subjected to the corresponding AsV concentration (cf. As1Cd1 vs. As1; As1Cd2 vs. As1; As2Cd2 vs. As2), except for As2Cd1 vs. As2 for which MDA in As2 exposed organisms was 19.7 % lower (Figure 5A). Moreover, a decline in MDA level was observed along an increasing gradient of Cd concentration in

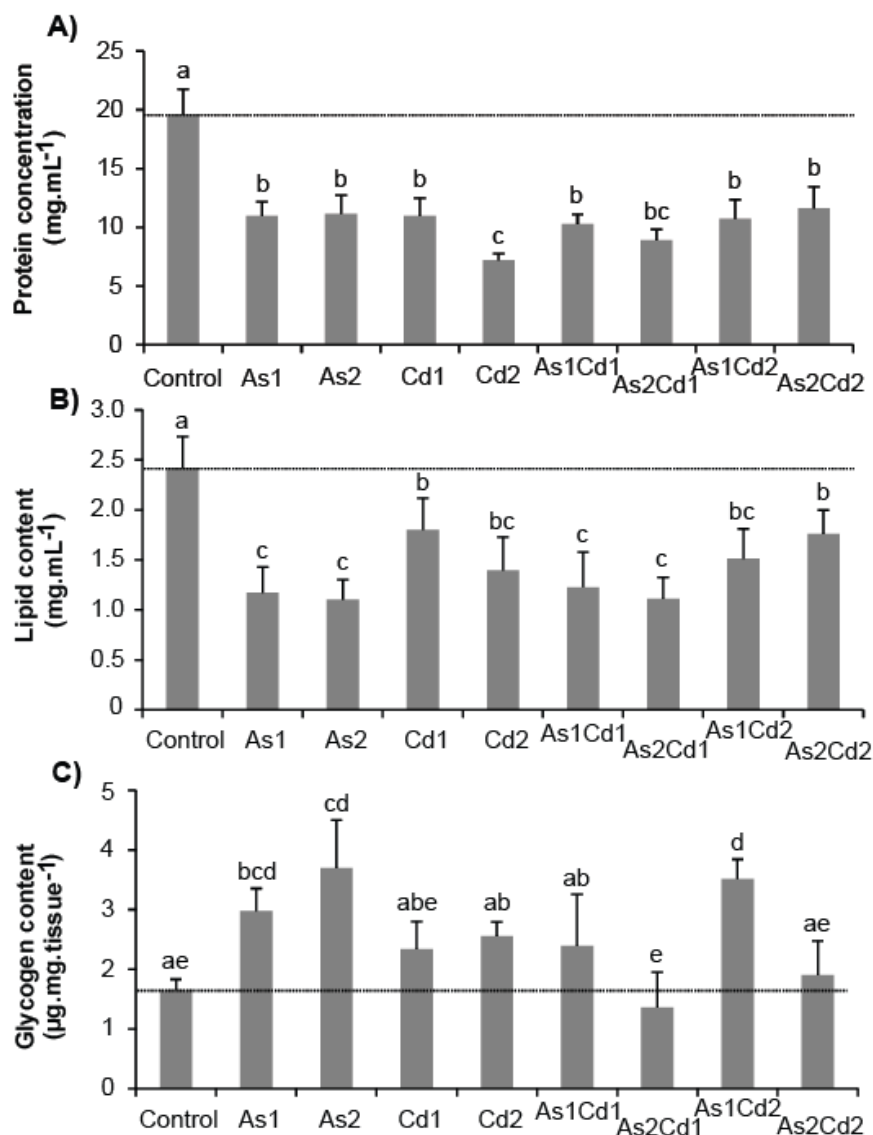
mixtures containing As1 (As1Cd1 vs. As1Cd2, not significant) or As2 (As2Cd1 vs. As2Cd2, significant).

3.6. Energy reserves

Compared to control, both protein concentration ($> -40.8\%$) and lipid content ($> -25.6\%$) significantly decreased in *G. pulex*, for all the exposure treatments, with Cd or/and AsV (Figure 6A, B). Conversely, the glycogen content tended to increase with AsV and/or Cd exposure and significantly increased in As1, As2, and As1Cd2 (Figure 6C).

3.6.1. Protein concentrations

For single contaminant exposure, mean protein contents in gammarids were similar (around $11.03 \pm 0.07 \text{ mg mL}^{-1}$), except a significantly lower content (-34.6% ; Figure 6A) for Cd2; protein concentration in gammarids decreasing with increasing [Cd]. Adding As1 or As2 to Cd1 did not significantly modify the protein concentration in gammarids. In contrast, adding As1 or As2 to Cd2 significantly increased the protein concentration in gammarids (Figure 6A). No significant difference in protein concentrations was observed in gammarids subjected to binary mixtures or single concentration of AsV.

**Figure 6.**

Mean energy reserve concentrations ($\pm$ s.d.) of *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1, As2) and cadmium (Cd1, Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). **A)** Mean protein concentration (mg mL^{-1} ; $\pm$ s.d.). **B)** Mean total lipid content (mg mL^{-1} ; $\pm$ s.d.). **C)** Mean glycogen content ($\mu\text{g mg tissues}^{-1}$; $\pm$ s.d.). Letters (a to e) illustrate significant differences (one way-ANOVA and HSD Tukey post hoc test at $p < 0.05$ level of significance; $n = 6$).

3.6.2. Lipid content

For single contaminant exposure, mean lipid content in gammarids were similar (around $1.22 \pm 0.15 \text{ mg mL}^{-1}$), except a significantly higher lipid content in gammarids exposed to Cd1 ($1.80 \pm 0.32 \text{ mg mL}^{-1}$; Figure 6B). Adding As1 or As2 in mixtures with Cd1 significantly decreased the total lipid content of *G. pulex*, whereas the same addition in mixtures with Cd2 did not change the total lipid content. Specimens of *G. pulex* exposed to As1Cd1 and As2Cd1 showed total lipid contents similar to those measured in organisms exposed to As1 or As2. However, when adding Cd2 to As1 or As2, the total lipid content tended to increase (cf. As1Cd2 vs. As1; As2Cd2 vs. As2).

3.6.3. Glycogen content

Compared to controls, glycogen contents were significantly higher in *G. pulex* exposed to single metals (+40.9 to +122.8 %), but these differences were only significant for AsV (Figure 6C). In single exposures, the glycogen content increasing trend with increasing [AsV] was not significant. Whatever the concentration, no significant difference was observed in the glycogen content of *G. pulex* exposed to Cd alone.

Adding As1 to Cd (As1Cd1 vs. Cd1; As1Cd2 vs. Cd2) significantly increased the glycogen content in gammarids only for Cd2. Adding As2 to Cd not significantly decreased glycogen content in *G. pulex* (As2Cd1 vs. Cd1; As2Cd2 vs. Cd2). Adding Cd1 or Cd2 to AsV did not significantly modify the glycogen content of gammarids (As1Cd1 vs. As1; As2Cd1 vs. As1; As1Cd2 vs. Cd2), except for As2Cd2 where a significant decrease in glycogen content was observed (As2Cd2 vs. Cd2).

3.7. Behavioural responses

3.7.1. Locomotory activity

Locomotion was significantly reduced (at least - 15.6 %) in gammarids exposed to all the Cd or/and AsV treatments, when compared to non-exposed organisms (Figure 7A).

The percentage of moving gammarids was significantly lower in As1 than in Cd1 whereas no significant difference was observed between As2 and Cd2. *G. pulex* moved less when [Cd] or [AsV] increased (As2 vs. As1; Cd2 vs. Cd1), but these differences were only significant for Cd exposure.

Adding AsV to Cd decreased significantly the percentage of moving gammarids, except when adding As1 to Cd2. Adding Cd to AsV did not induce significant change in *G. pulex* locomotory activity (cf. As1Cd1 vs. As1; As2Cd1 vs. As2; As1Cd2 vs. As1), except in As2Cd2

treatment, where a significant reduction in the percentage of moving gammarids was observed (-35.3%).

3.7.2. Ventilation

Despite a slight downward trend, the ventilatory activity was never significantly impacted by metal exposure, whatever the experimental conditions (Figure 7B).

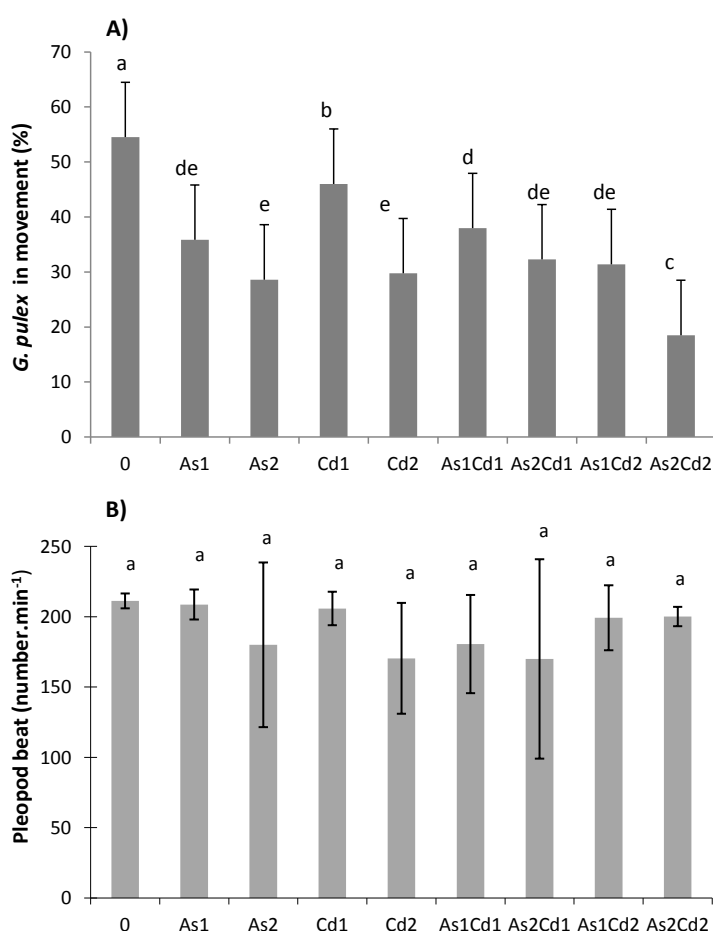


Figure 7.

Behavioural responses of *G. pulex* after a 240-hour exposure to (i) two single arsenate (As1, As2) and cadmium (Cd1, Cd2) concentrations and (ii) all the possible binary mixtures (As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2, As2Cd2). **A)** Mean percentage of moving *G. pulex* ($\pm$ s.d.). Letters (a to e) illustrate significant differences (one way-ANOVA and HSD Tukey post hoc test after arcsin root square transformation; at $p < 0.05$ level of significance; $n = 35$). **B)** Mean pleopod beat frequency (number.min⁻¹; $\pm$ s.d.). Only one group: "a" (i.e. no significant difference among experimental exposures) was identified with a non parametric Kruskal-Wallis test at $p < 0.05$ level of significance; $n = 10$).

4. Discussion

Except ventilation, all the biomarkers studied in *G. pulex* have been modified in some Cd or/and AsV exposure treatments when compared to control. Whatever the tested exposure conditions, the responses of a given biomarker exhibited the same pattern (either a decrease or an increase) when compared to controls. The mortality, GSH concentration, GCL activity, MT concentration, MDA level, and glycogen content increased in gammarids exposed to AsV and/or Cd, whereas both the lipid and the protein concentrations as well as locomotion and osmolality decreased. However, the intensity of the response was more or less important depending on the studied contaminant (Cd or AsV).

4.1. Effects of single Cd or AsV exposure on *G. pulex*

The observed mortality rate in *G. pulex* exposed to AsV or Cd alone was concentration-dependent and tended to increase along the gradient of metal concentration, as already observed in invertebrates by Spehar et al. (1978) and McCahon et al. (1990). Vellinger et al. (2012b) showed that increasing mortality was related to an increase in internal metal concentration after 240-hour exposure of *G. pulex* to arsenate and cadmium, with similar AsV and Cd concentrations than those used in this study (As1 vs. $274.7 \mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ or Cd1 vs. $1.9 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$; As2 vs. $534.6 \mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{L}^{-1}$ or Cd2 vs. $3.7 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$, respectively; corresponding to the LC10 and LC25 of *G. pulex* after 240-hour exposure to each metal at 10°C). When their internal metal concentration increases, individuals should invest energy in highly energy-consuming maintenance mechanisms (Felten et al. 2008; Kooijman et al. 2009; Vellinger et al. 2012c). These maintenance mechanisms could include detoxification, toxicant elimination, homeostasis maintenance (e.g. iono-/osmo-regulation) or cellular repairing processes.

The osmolality level tended to decrease in *G. pulex* exposed to the lowest AsV or Cd concentration, but this decrease was significant only for the individuals exposed to the highest AsV or Cd concentration. Moreover, the osmolality in *G. pulex* exposed to Cd2 was more impaired than that of individuals exposed to As2, even if the difference was not significant. The difference in osmolality level observed between As2 and Cd2 could be partially explained by (i) a more negative impact of Cd on the haemolymphatic $[\text{Na}^+]$ and $[\text{Cl}^-]$, two of the major ions driving the haemolymph osmotic pressure (Mantel et Farmer, 1983), and (ii) the low AsV impact on the iono-osmoregulation processes which had been already observed in *G. pulex* (see Vellinger et al., 2012c). *In fine*, the weak observed AsV effect

on osmolality seems to be more the indirect result of cascading events due to other physiological effects of AsV in *G. pulex* than a direct effect of AsV on osmolality.

Toxic effects are assumed to appear when maintenance mechanisms are exceeded. We observed a significant increase of the MDA level in *G. pulex* exposed to As1, As2 and Cd2 [respectively corresponding to the LC10, LC25 (As) and LC25 (Cd) after 240-hour exposure], reflecting higher lipid peroxidation in gammarids. Only *G. pulex* exposed to Cd1 did not show higher cellular damages than control. Moreover, the MDA level was not concentration-dependent in gammarids only exposed to AsV, whereas it significantly increased along the gradient of Cd concentration. Observed lipid peroxidation, deriving from ROS formation, is in agreement with the results of Gismondi et al. (2012a) who have shown that Cd could induce oxidative stress in *Gammarus roeseli*. However, even if previous studies have demonstrated that inorganic arsenic compounds could be the inductors of ROS in humans (Kessel et al., 2002; Shi et al., 2004; Ding and Liu, 2005; Chowdhury et al. 2010), rats (Zhang et al., 2011) and aquatic animals including crustaceans (Schlenk et al., 1997; Ventura-Lima et al., 2011), to our knowledge no study has examined the effects of arsenate on the oxidative stress in *Gammarus*.

The increase in both the GSH and MT concentrations in *G. pulex* only exposed to AsV or Cd indicated not only the entry of the contaminants in the organisms but also an increased activity of anti-oxidant defense systems in gammarids to face metal stress. Similarly to Ray et al. (1999), GCL activity was positively linked to GSH concentration, probably because the GCL enzyme is a limiting enzyme in the *de novo* GSH synthesis. The GCL activity was slightly higher in individuals exposed to Cd than in those exposed to AsV (As1 vs. Cd1 and As2 vs. Cd2). In the same way, the GCL activity in the gammarids only exposed to the lowest metal concentration was significantly higher to that observed in organisms exposed to the same metal but at the highest concentration (As1 vs. As2; Cd1 vs. Cd2). However, GSH concentrations were similar whatever the single metal exposure. A possible explanation of the GCL activity increase, even if the GSH concentration is unchanged, could be a higher mobilization of GSH in exposed organisms (Meister, 1983; Akira et al., 1990; Gismondi et al., 2012a). Indeed, the GSH could be more used in *G. pulex* exposed to (i) Cd alone in comparison to AsV alone; (ii) As1 in comparison to As2 and (iii) Cd1 in comparison to Cd2. This mechanism could also partially explained (i) why AsV alone induced more cellular damages than Cd alone at the tested metal concentrations, but also (ii) why Cd1 did not induce lipid peroxidation in *G. pulex* after 240-hour exposure. The decrease in GCL activity in individuals exposed to As2 or Cd2, when compared to individuals exposed to As1 or Cd1

respectively, could be explained by a threshold concentration beyond which gammarids are not able to efficiently activate their defense systems.

Similarly to MDA level, MT concentration was not concentration-dependent for single AsV exposure, whereas MT concentration significantly decreased with increasing Cd concentration in contrast to MDA level response. The decrease in the MT expression in Cd2 when compared to Cd1 could partially explain, with the GSH results, the increase in MDA level along the gradient of Cd concentration. Generally, MT concentration increases in cells when elevated non-essential or essential metal concentrations are present in aquatic organisms (Shariati and Shariati, 2011), reflecting high metal bioavailability in the environment (Ross et al., 2002; Geffard et al. 2002a, b ; 2005; Amiard et al., 2006). However, when a certain threshold level of metal concentration is exceeded, this link is not so clear. For example, several papers have highlighted the absence of increase in body MT concentration for aquatic organisms severely exposed to heavy metals (e.g. Pedersen and Lundebye, 1996; Berthet et al., 2005). Therefore, the MT concentration decline in gammarids exposed to Cd2 suggests a Cd concentration in dishes crossing this critical threshold value for cadmium. Even if cadmium is one of the strongest MT inducers (Olsson and Haux, 1986; Wan et al., 1993), the observed differences in MT concentrations were not significant among *G. pulex* exposed to As1, As2 and Cd1. The lower lipid peroxidation level in *G. pulex* exposed to Cd1 than in those exposed to As1 or As2, could be related to the implementation of other antitoxic mechanisms involving antioxidant enzymes (e.g. GST, GPx, catalase). The induction of the antioxidant or antitoxic defense systems requires ATP production. As *G. pulex* has an aerobic metabolism, ATP is produced in mitochondria, requiring molecular oxygen but also energy substrates (e.g. glucose, fatty acids, amino acids), resulting from the degradation of energy reserves (glycogen, lipids, proteins). In comparison to controls, both the total lipid and protein contents decreased in gammarids only exposed to AsV or Cd while their glycogen content increased (trend significant only for AsV). The decline in total lipid and protein contents of gammarids increased along the gradient of Cd concentration but not along the gradient of AsV concentration. According to Holmstrup et al. (2010), these results suggest changes in the strategy of energy reserve utilization. Thus, *G. pulex* seems to use preferentially lipid and protein reserves, which are assumed (i) to provide more energy than glycogen degradation and consequently, and (ii) to be used when individuals have experienced severe stress (De Coen and Janssen, 1997). The decreasing trend in both lipid and protein reserve amount between individuals exposed to Cd1 and Cd2 could explain the decrease in GCL activity, leading to a decrease in GSH concentration in Cd2 and thus, an

increase in lipid peroxidation, reflected by an increase in MDA level. The level of lipid utilization was higher when *G. pulex* was exposed to AsV alone than to Cd alone, in contrast to protein utilization level. AsV can compete with phosphate (Fattorini and Regoli, 2004; Kavitha et al., 2010). AsV could theoretically interfere with phosphorylation reactions within the electron transport chain or glucose metabolism (Gebel, 2000; Andrew et al., 2003; Tseng, 2004; Ghosh et al., 2007). Hence, this mimetic effect could disrupt energy production (Fattorini and Regoli, 2004), but also glycogen reserve utilization. The lipid degradation leads to the production of glycerol, but also fatty acids potentially involved in ketone body synthesis after oxidation. Ketone bodies (e.g. acetoacetate, 3- β -hydroxybutyrate, acetone) and glycerol are energy sources readily and directly available for cells without going through the Krebs cycle or the electron transport chain (Laffel, 2000), potentially explaining why lipid reserves were more used in *G. pulex* exposed to AsV alone than to Cd alone. In the same way, if the energy metabolism is disrupted by the competition between phosphate and AsV, the GSH synthesis, requiring ATP (in addition to the GCL enzyme and amino acids such as the glutamate, cysteine and glycine; Griffith, 1999; Chen et al., 2005 ;), could be less important when *G. pulex* is exposed to AsV than to Cd. Moreover, this energy metabolism disruption could also explain (i) the higher lipid peroxidation and (ii) the lower protein reserve utilization (the required consumption of amino acids for GSH production being less important), when gammarids were exposed to AsV than when exposed to Cd.

In contrast to lipid or protein reserves, glycogen reserves are often used for current activities, such as locomotion, ventilation, osmoregulation processes, growth, reproduction or starvation, favouring individual survival (Kucharski et Da Silva, 1991a ; 1991b ; Sparkes et al., 1996 ; Rosa et Nunes, 2003; Oliveira et al., 2004). Locomotion was significantly lower in *G. pulex* exposed to single AsV or Cd concentrations than in controls. The difference was enhanced with increasing AsV or Cd concentration. This result is in accordance with results previously obtained for *G. pulex* exposed to Cd (Felten et al., 2008) and/or arsenate (Vellinger et al., 2012c). Numerous authors have hypothesized that individuals exposed to a given stress must reallocate a part of the energy usually used for moving or pleopod beats, into maintenance mechanisms (Thomasson et al., 2003; Felten et al., 2008; Vellinger et al., 2012a; 2012b). The observed decrease in locomotion could be either the consequence of a decrease in glycogen reserve utilization, or the cause of the observed increase in glycogen reserves in exposed gammarids. However, the ventilatory activity, described by pleopod beat frequency, was unchanged in *G. pulex* exposed to single arsenate or cadmium

concentration, when compared to non-exposed gammarids. This result could be easily explained by the gammarid vital need to ventilate at the tested single AsV and Cd concentrations. This ventilation will provide the oxygen necessary to ATP production *via* the aerobic metabolism, but also to locomotor activity. Vellinger et al. (2012a) showed that ventilation significantly decreases in *G. pulex* after 240-hour exposure only for single AsV and Cd concentrations close to - or exceeding - the LC50 obtained for the same exposure period, suggesting either an incapacity of individuals to ventilate due to the high toxicity of studied metals, or an obligatory energy reallocation for survival. Similarly, Vellinger et al (2012c) demonstrated that locomotion is impaired before ventilation when gammarids are exposed to AsV or Cd alone. Anyway, these results suggest that ventilation is reduced in the last resort, to prevent the mortality of exposed organisms.

4.2. Effects of Cd and AsV binary mixtures on *G. pulex*

If similar biomarker responses were observed in gammarids exposed to binary mixtures and to single AsV or Cd (when compared to gammarids in control conditions), the relationships among gammarid biomarker responses in binary mixtures are more complex to interpret.

The [expected - observed] mortality differences were significant ($p < 0.05$) for all the tested mixtures, [except one (As1Cd2; $p = 0.058$) with a p -value close to the selected level of significance], the expected mortality being always higher than the observed mortality. This result, demonstrating an antagonistic effect of the binary mixtures on the mortality of exposed *G. pulex*, is in accordance with previous observations at similar concentrations, time and temperature of exposure [As1Cd1, As2Cd1, As1Cd2 and As2Cd2 in this study respectively correspond to the combinations 1.1, 1.2, 2.1, 2.2 in the fig. 4 of Vellinger et al. (2012b)]. In single AsV and Cd concentrations, mortality has been related to cellular damages but also to a decrease in osmolality for the highest tested concentrations. Gammarids exposed to different AsV and Cd binary mixtures did not exhibit higher lipid peroxidation (*i.e.* higher MDA level) than gammarids exposed to the corresponding single AsV or Cd concentrations (except As2Cd1).

Many authors have already shown that in binary mixtures, one metal could impair the uptake of the other, which could be enhanced (Shuhaimi-Othman and Pascoe 2007) or inhibited (Casini and Depledge 1997; Bat et al. 1998). The simultaneous (i) uptake inhibition of one metal and (ii) uptake stimulation of the other metal have been already observed in organisms exposed to binary mixtures (Ahsanullah et al. 1981). However, in our previous

work (Vellinger et al. 2012b), we demonstrated that in the case of arsenate and cadmium binary mixtures, both the AsV and Cd concentrations in gammarids decreased. Thus, different hypotheses could be proposed: (i) a competition between the two metals for common entrance routes, (ii) a complexation between the two salts of metals used in experiments or (iii) an increase either in defense or in metal elimination mechanisms (Vellinger et al. 2012b).

Table 1. Synthesis of the *Gammarus pulex* biomarker responses (excluding mortality) in binary mixtures compared to those for single exposure to Cd or AsV. All the results were observed after 240-hour exposure. 'NE': No significant effect '↗': significant increase; '↘': significant decrease.

	As1Cd1		As2Cd1		As1Cd2		As2Cd2	
Compared to	/As1	/Cd1	/As2	/Cd1	/As1	/Cd2	/As2	/Cd2
GSH concentrations	↗	↗	↗	↗	NE	NE	NE	NE
GCL activity	NE	NE	↗	NE	↘	NE	NE	NE
MT concentrations	↗	↗	↘	↘	NE	↗	↗	↗
MDA level	NE	↗	↗	↗	NE	NE	NE	NE
Protein reserves	NE	NE	NE	NE	NE	↗	NE	↗
Lipid reserves	NE	↘	NE	↘	NE	NE	↗	NE
Glycogen reserves	NE	NE	↘	NE	NE	↗	↘	NE
Locomotion	NE	↘	NE	↘	NE	NE	↘	↘
Ventilation	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Osmolality	NE	NE	NE	NE	NE	NE	↘	NE

In this study, the higher interpretation complexity of observed results in binary mixtures (see a synthesis in Table 1), is probably due to their dose-ratio and dose-level dependence. Consequently, they do not allow to objectively choose among the previous hypotheses, the three hypotheses being likely and complementary. The antagonistic effects on both mortality and lipid peroxidation did not systematically correspond to the same trend in the defense mechanisms measured (GCL activity, GSH and MT concentrations). For example, the MT concentration increased in *G. pulex* exposed to As1Cd1 and As2Cd2 (when compared to corresponding single arsenate and cadmium concentrations), suggesting a simultaneous mobilization of the antitoxic defense systems by the two metals. However, in gammarids exposed to As1Cd2, the MT concentration was significantly higher than the MT concentration observed in gammarids exposed to Cd2, but not significantly different from that observed in gammarids exposed to As1, making the MT concentration response in the mixture a trade-off between the two isolated responses. Finally, in As2Cd1 exposure, the MT concentration was significantly lower than that individually observed in As2 and Cd1.

All other studied biomarkers did not show a clear trend in mixtures when compared to single exposures, confirming the complexity of studying mixtures. The antagonistic effect observed on toxic parameters in binary mixtures could not be predicted by the biomarker used because a mixture of toxicants can lead to positive effects on a given parameter (e.g. MT) and to negative effects on another parameter (e.g. GSH concentrations). Hence, contradictory results can easily be obtained depending on the studied endpoint but also on the individual toxicant concentrations in mixtures, as already highlighted by Barata et al. (2006). Gammarids exposed to single Cd and AsV treatments already showed, not only mortality but also physiological and behavioural troubles, at the lowest tested concentrations. The most likely hypothesis to explain the observed effects in binary mixtures is that their effects are the result of (i) complex interactions among several biological processes with different dynamics; (ii) potential chemical interactions between the two metals, and (iii) variable physiological and behavioural trade-offs in tested organisms, potentially varying according to the metal concentrations in the mixture. Thus, in the case of metal mixtures, no relevant global explanation of between-biomarker links can be easily formulated.

5. Conclusion

In comparison to controls, the biomarker responses were similar in *G. pulex* exposed to AsV or Cd alone and in AsV and Cd mixtures, even if the response intensity was different depending on both the metal and the applied concentration.

Facing metal stress needs to activate antitoxic defense systems, including increases in GCL activity but also in GSH and MT concentrations, even if those increases are not so elevated when a certain threshold in metal concentration is exceeded. In this first study dealing with AsV effects on antioxidant defense of gammarids, we observed that *G. pulex* exposed to arsenate or cadmium, reacted by an increase in antitoxic defense system mobilization requiring an increase in energy availability, that implies (i) changes in energy reserve utilization (lipids and proteins are used prior to glycogen reserves), but also (ii) a possible energy reallocation from locomotion to detoxification processes. The decreasing mobility could lead to increasing vulnerability of gammarids to predation and fasting. In addition, the lower utilization of glycogen, usually used for current activities including growth and reproduction, could cause adverse effects at population level. Finally, despite the higher mobilization of antitoxic defense systems, lipid peroxidation was observed which can be related to the increase in *Gammarus* mortality.

Even if the relationships between biomarkers were clear in single metal experiments, the outcome of the complex interactions between AsV and Cd in binary mixtures still remains difficult to unravel, because it seems to be dose-ratio dependent. However, antagonistic effects on mortality were observed, but were not easily characterizable by studied biomarkers. This kind of studies of toxicants in mixture remains scarce and further studies are crucially needed to better assess and understand the effects of multiple contamination on organisms, especially because most of ecosystems are now facing multiple toxicants.

Acknowledgments

The authors would like to thank the French Ministry of Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche), which has supported this study.

References

- Adam, O., Badot, P.M., Degiorgi, F., Crini, G., 2009. Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Ecotox. Environ. Saf.* 72, 441-449.
- Ahsanullah, M., Negilski, D.S., Mobley, M.C., 1981. Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis* III. Accumulation of metals. *Mar. Biol.* 64, 311-316.
- Akira, N., Anderson, M.E., Meister, A., 1990. Cellular glutathione as a determinant of sensitivity to mercuric chloride toxicity: Prevention of toxicity by giving glutathione monoester. *Biochem. Pharmacol.* 40, 693-697.
- Alhama, J., Romero-Ruiz, A., Lopez-Barea, J., 2006. Metallothionein quantification in clams by reversed phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization. *J. Chromatogr. A.* 1107(1-2), 52-58.
- Alonso, A., De Lange, H.J., 2010. Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *Gammarus fossarum*. *Ecotoxicology.* 19, 133-140.
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160-202.
- Amiard, J.-C., Cosson, R.P., 1997. Les métallothionéines. In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C., Ramade F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris, pp. 53-66.
- Andrew, A.S., Warre, A.J., Brachowsky, A., Temple, K.A., Klei, L., Soucy, N.V., Oara, K.A., Hamilton, J.W., 2003. Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells. *Environ. Health Persp.* 111, 825-835.
- Attar, E., Mally, E., 1982. Acute toxicity of cadmium, zinc and cadmium-zinc mixtures to DAPHNIA MAGNA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11, 291-296.
- Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., Riva, M.C., 2006. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Strau. Implications for multi-substance risks assessment. *Aquat. Toxicol.* 78, 1-14.
- Bat, L., Raffaelli, D., Marr, I.L., 1998. The accumulation of copper, zinc and cadmium by the amphipod *Corophium volutator* (Pallas). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 223, 167-184.

Bears, H., Richards, J.G., Schulte, P.M., 2006. Arsenic exposure alters hepatic arsenic species composition and stress-mediated gene expression in the common killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat. Toxicol.* 77, 257-266.

Behrens, W., Madère, R., 1991. Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Lipids* 26, 232-236.

Berthet, B., Mouneyrac Perez, T., Amiard-Triquet, C., 2005. Metallothionein concentration in sponges (*Spongia officinalis*) as a biomarker of metal contamination. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 141, 306-313.

Bollache, L., Gambade, G., Cézilly, F., 2001. The effects of two acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus*, on pairing success in male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 49, 293-303.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brooks, S.J., Mills, C.L., 2003. The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 135, 527-537.

Casini, S., Depledge, H., 1997. Influence of copper, zinc, and iron on cadmium accumulation in the talitrid amphipod, *Platorchestia platensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 500-506.

Chen, Y., Shertzer, H.G., Schneider, S.N., Nerbert, D.W., Dalton, T.P., 2005. Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *J. Biol. Chem.* 280, 66-74.

Chowdhury, R., Chatterjee, R., Giri, A.K., Mandal, C., Chaudhuri, K., 2010. Arsenic-induced cell proliferation is associated with enhanced ROS generation *Erk* signaling and *CyclinA* expression. *Toxicol. Lett.* 198, 267-271.

Coffinet, S., Cossu-Leguille, C., Rodius, F., Vasseur, P., 2008. Glutamate cysteine ligase (GCL) in the freshwater bivalve UNIO TUMIDUS: Impact of storage conditions and seasons on activity and identification of partial coding sequence of the catalytic subunit. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 151, 88-95.

Colby, S., 1967. Calculation synergistic and antagonistic responses of herbicide combination. *Weeds.* 15, 20-22.

Collén, J., Pinto, E., Pedersén, M., Colepicolo, P., 2003. Induction of oxidative stress in the red macroalgae *Gracillaria tenuistipitata* by pollutant metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 337-342.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997. Glutathione reductase, selenium dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotox. Environ. Safe.* 3, 122-131.

Costa, F.O., Costa, M.H., 1999. Life history of the amphipod *Gammarus locusta* in the Sado estuary (Portugal). *Acta Oecol.* 20, 305-314.

Cousins, R.J., 1985. Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65, 238-309.

De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: A new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.* 6, 43-55.

De Coen, W.M., Janssen, C.R., 2003. A multivariate biomarker-based model predicting population-level responses of *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2195-2201.

Devin, S., Piscart, C., Beisel, J.-N., Moreteau, J.C., 2003. Ecological traits of the amphipod invader *Dikerogammarus villosus* on a mesohabitat scale. *Arch. Hydrobiol.* 158, 43-56.

- Ding, W., Hudson, L.G., Liu, K.J., 2005. Inorganic arsenic compounds cause oxidative damage to DNA and protein by inducing ROS and RNS generation in human keratinocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 279, 105-112.
- Don-Pedro, K.N., 1996. Investigation of single and joint-fumigal insecticidal action of citrus peel oil components. *Pestic. Sci.* 46, 79-84.
- Doyotte, A., Cossu C., Jacquin, M.C., Babut, M., Vasseur, P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.* 39, 93-110.
- Dröge, W., 2003. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.
- Enserink, E.L., Maas-Diepeven, J.L., Van-Leeuwen C.J., 1991. Combined effects of metals; an ecotoxicological evaluation. *Water Res.* 25, 579-687.
- Fattorini, D., Regoli, F., 2004. Arsenic speciation in tissues of the mediterranean polychaete *Sabella spallanzanii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1881-1887.
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.* 86, 413-425.
- Felten, V., Guerold, F., 2004. Haemolymph $[Na^+]$ and $[Cl^-]$ loss in *Gammarus fossarum* exposed *in situ* to a wide range of acidic streams. *Dis. Aquat. Org.* 61, 113-121.
- Forrow, D.M., Maltby, L., 2000. Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2100-2106.
- Gebel, T., 2000. Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology.* 144, 155-162.
- Geffard, A., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., 2002a. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* 7, 123-137.
- Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*. *Ecotox. Environ. Safe.* 61, 209-220.
- Geffard, A., Geffard, O., His, E., Amiard, J.-C., 2002b. Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 233, 131-142.
- Ghosh, D., Datta, S., Bhattacharya, S., Mazumder, S., 2007. Long-term exposure to arsenic affects head kidney and impairs humoral immune responses of *Clarias batrachus*. *Aquat. Toxicol.* 81, 79-89.
- Gismondi, E., Beisel, J.-N., Cossu-Leguille, C., 2012b. Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. *Environ. Res.* (in press)
- Gismondi, E., Rigaud, T., Beisel, J.-N., Cossu-Leguille, C., 2012a. Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a gammarid. *Environ. Pollut.* 160, 17-23.
- Gowing, D.P., 1960. Comments on tests of herbicide mixtures. *Weeds* 8, 379-391.
- Gravato, C., Teles, M., Oliveira, M., Santos, M.A., 2006. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L - the influence of pre-exposure to β -naphthoflavone. *Chemosphere* 65, 1821-1830.
- Griffith, O.W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Bio. Med.* 27, 922-935.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases: The first

enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.

Hadjispyrou, S., Kungolos, A., Anagnostopoulos, A., 2001. Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin, cadmium, and chromium on *Artemia franciscana*. *Ecotox. Environ. Safe.* 49, 179-186.

Henry, R.P., Wheatly, M.G., 1992. Interaction of respiration, ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *Am. Zool.* 32, 407-416.

Hervant, F., Mathieu, J., Barre, H., Simon, K., Pinon, C., 1997. Comparative study on the behavioral, ventilatory, and respiratory responses of hypogean and epigean crustaceans to long-term starvation and subsequent feeding. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 118, 1277-1283.

Holmstrup, M., Sorensen, J.G., Overgaard, J., Bayley, M., Bindesbol, A.-M., Slotsbo, S., Fisker, K.V., Maraldo, K., Waagner, D., Labouriau, R., Asmund, G., 2010. Body metal concentrations and glycogen reserves in earthworms (*Dendrobaena octraedra*) from contaminated and uncontaminated forest soil. *Environ. Pollut.* 159, 190-197.

Ince, N.H., Dirilgen, N., Apikyan, I.G., Tezcanli, G., Ustun B., 1999. Assessment of toxic interactions of heavy metals in binary mixtures: a statistical approach. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 365-372.

Issartel, J., Hervant, F., Voituron, Y., Renault, D., Vernon, P., 2005. Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigean and hypogean crustaceans to different temperatures. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 141, 1-7.

Johnson, I.T., Jones, M.B., 1990. Effect of zinc on osmoregulation of *Gammarus duebeni* (Crustacea: Amphipoda) from the estuary and the sewage treatment works at Looe, Cornwall. *Ophelia* 31, 187-196.

Kavitha, C., Malarvizhi, A., Kumaran, S.S., Ramesh, M., 2010. Toxicological effects of arsenate exposure on hematological, biochemical and liver transaminases activity in

an Indian major carp, *Catla catla*. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2848-2854.

Kelly, D.W., Dick, J.T.A., Montgomery, W.I., 2002. The functional role of *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? *Hydrobiologia* 485, 199-203.

Kessel, M., Liu, S.X., Xu, A., Santella, R., Hei, T.K., 2002. Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mol. Cell. Biochem.* 234-235, 301-308.

Kooijman, S.A.L.M., Baas, J., Bontje, D., Broerse, M., Cees, A.M., 2009. Ecotoxicological applications of dynamic energy budget theory. In *Devillers, J. (eds.) Ecotoxicology Modeling, Emerging Topics in Ecotoxicology: Principles, Approaches and Perspectives*, 2237-2259.

Kucharski, L.C.R., Da Silva, R.S.M., 1991a. Seasonal variation in the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 100, 599-602.

Kucharski, L.C.R., Da Silva, R.S.M., 1991b. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 99, 215-218.

Kungolos, A., Emmanouil, C., Tsiroidis, V., Tsiropoulos, N., 2009. Evaluation of toxic and interactive toxic effects of three agrochemicals and copper using a battery of microbiotests. *Sci. Total Environ.* 406, 4610-4615.

Kungolos, A., Hadjispyrou, S., Petala, M., Tsiroidis, V., Samaras, P., Sakellaropoulos, G.P., 2004. Toxic properties of metals and organotin compounds and their interactions on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Water Air Soil Poll.* 4, 101-110.

Kungolos, A., Samaras, P., Kipopoulou, A.M., Zoumboulis, A., Sakellaropoulos, G.P., 1999. Interactive toxic effects of agrochemicals on aquatic organisms. *Water Sci. Technol.* 40, 357-364.

Kungolos, A., Samaras, P., Sakellaropoulos, G.P., 1997. Evaluation of the interactive effect of chemicals on aquatic organisms, using a method based on the theory of probabilities. In "Proc. Int. Conf. Water Pollution IV", (R. Rajar

and C.A. Brebbia eds.) Computational Mechanics Publication, Southampton, UK. pp. 107-114.

Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A., 2010. *Gammarus* spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: Toward integrated multilevel tests. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 205, 1-76.

Laffel, L. 1999. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. Diabetes Res. 15, 412-426.

Lagadic, L., 2002. Biomarkers: Useful tools for the monitoring of aquatic environment. Rev. Med. Vet-toulouse. 153, 581-588.

Lawrence, A.J., Poulter, C., (1998) Development of a sub-lethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*. Water Res. 32, 569-578.

Le Gal, Y., Lagadic, L., Le Bras, S., Caquet, T., 1997. Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres bio marqueurs associés au métabolisme énergétique. In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C., Ramade F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris, pp. 53-66.

Leroy, P., Nicolas A., Wellmann, M., Michelet, F., Oster, T., Siest, G., 1993. Evaluation of *o*-phthalaldehyde as bifunctional fluorogenic post-column reagent for glutathione in LC. Chromatographia 36, 130-134.

Lignot, J.H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. Aquaculture 191, 209-245.

Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Pollut. Bull. 42, 656-666.

Livingstone, D.R., 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. Rev. Med. Vet-toulouse. 154, 427-430.

Maltby, L., Clayton, S.A., Wood, R.M., McLoughlin, N., 2002. Evaluation of the

Gammarus pulex in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: robustness, responsiveness and relevance. Environ. Toxicol. Chem. 21, 361-368.

Mantel, L.H., Farmer, L.L., 1983. Osmotic and ionic regulation, in: Mantel, L.H. (Ed.) (1983). The biology of Crustacea: 5. Internal anatomy and physiological regulation. The biology of Crustacea, pp. 53-161.

Marking, L.L., 1985. Toxicity of chemical mixtures. Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications. Hemisphere Publishing Corporation Washington DC. pp. 164-176.

Mathiessen, P., 2000. Biological effects quality assurance in monitoring programs (BELQUALM). Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Burham-on-Crouch, UK, 24 p.

McCahon, C.P., Barton, S.F., Pascoe, D., 1990. The toxicity of phenol to the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (L.) during episodic exposure - Relationship between sub-lethal responses and body phenol concentrations. Arch. Environ. Contam. Tox. 19, 926-929.

McCahon, C.P., Pascoe, D., 1988. Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluation tests: culture and selection of a sensitive life stage. Ecotoxicol. Environ. Safe. 15, 245-252.

McNeil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., 1997. The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea; Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. Biol. Rev. 72, 349-364.

Meister, A., 1983. Selective modification of glutathione metabolism. Science. 220, 472 -477.

Mills, G.C., 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J. Biol. Chem. 229, 189-197.

Mills, C.L., Shukla, D.H., Compton, G.J., 2006. Development of a new low cost high sensitivity system for behavioural ecotoxicity testing. Aquat. Toxicol. 77, 197-201.

- National Research Council, 1999. Arsenic in drinking water. National Academy Press, Washington, DC.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.E., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*. 137, 383-390.
- Olsson, P.E., Haux, C., 1986. Increased hepatic metallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch (*Perca fluviatilis*). *Aquat. Toxicol.* 9, 231-242.
- Onasaka, S., Kawakami, D., Min, K.-O., Tanaka, K., 1987. Induced synthesis of metallothionein by ascorbic acid in mouse liver. *Toxicology*. 43, 251-259.
- Palmiter, R.D., 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 8428-8430.
- Parmentier, C., Leroy, P., Wellman, M., Nicolas, A., 1998. Determination of cellular thiols and glutathione related enzyme activities: versatility of high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetric detection. *J. Chromatogr. B* 719, 37-46.
- Part, P., Svanberg, O., Kiessling, A., 1985. The availability of cadmium to perfused rainbow trout gills in different water qualities. *Water Res.* 19, 427-434.
- Pedersen, S.N., Lundebye, A.K., 1996. Metallothionein and stress protein levels in shore crabs (*Carcinus maenas*) along a trace metal gradient in the Fal estuary (UK). *Mar. Environ. Res.* 42, 241-246.
- Pelletier, E., Campbell, P.G.C., Denizeau, F., 2004. *Ecotoxicologie moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Presses de l'université du Québec. 462 p.
- Péqueux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* 15, 1-60.
- Plaistow, S.J., Troussard, J.P., Cézilly, F., 2001. The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *Int. J. Parasitol.* 31, 346-351.
- Ray, S., Misso, N.L.A., Lenzo, J.C., Robinson, C., Thompson, P.J., 1999. Gamma glutamylcysteine synthetase activity in human lung epithelial (A549) cells: Factors influencing its measurement. *Free Radical Bio. Med.* 27, 1346-1356.
- Regoli, F., Hummel, H., Amiard-Triquet, C., Larroux, C., Sukhotin, A., 1998. Trace metals and variations of antioxidants enzymes in Arctic bivalves populations. *Arch. Environ. Contam. Tox.* 35, 594-601.
- Rosa, R., Nunes, M.L., 2003. Biochemical composition of deep-sea decapod crustaceans with two different benthic life strategies of the Portuguese south coast. *Deep Sea Res. Part I*. 50, 119-130.
- Rosas, C., Sanchez, A., Escobar, E., Soto, L., Bolongaro-Crevenna, A., 1992. Daily variations of oxygen consumption and glucose hemolymph level related to morphophysiological and ecological adaptations of Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*. 101, 323-328.
- Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., Elder, J., 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 671-679.
- Sanchez-Dardon, J., Voccia, I., Hontela, A., Anderson, P., Brousseau, P., Blakely, B., Boermans, H., Fournier, M., 1997. Immunotoxicity of cadmium, zinc and mercury after *in vivo* exposure, alone or in mixture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Develop. Comp. Immunol.* 21, 133
- Sato, M., Bremner, I., 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radical Biol. Med.* 14(3), 325-337.
- Schlenk, D., Wolford, L., Chelius, M., Steevens, J., Chan, K.M., 1997. Effect of arsenite, arsenate, and the herbicide monosodium methyl arsonate (MSMA) on hepatic metallothionein expression and lipid peroxidation in channel catfish. *Comp. Biochem. Physiol. PART C*. 118, 177-183.

- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: interating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369-392.
- Scott-Fordsmand, J.J., Weeks, J.M. 2000. Biomarkers in earthworms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 165, 117-159.
- Seelig, G.F., Simonsen, R.P., Meister, A., 1984. Reversible dissociation of γ -glutamylcystéine synthetase into two subunits. *J. Biol. Chem.* 259, 9345-9347.
- Shariati, F., Shariati, S., 2011. Review on methods for determination of Metallothioneins in aquatic organisms. *Biol. Trace Elem. Res.* 141, 340-366.
- Sharma, V.K., Sohn, M., 2009. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environ. Int.* 35, 743-759.
- Shi, H., Shi, X., Liu, K.J., 2004. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* 255, 67-78.
- Shuhaimi-Othman, M., Pascoe, D., 2007. Bioconcentration and depuration of copper, cadmium, and zinc mixtures by the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 29-35.
- Sornom, P., Felten, V., Médoc, V., Sroda, S., Rousselle, P., Beisel, J.-N., 2010. Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environ. Pollut.* 158, 1288-1295.
- Sparkes, T.C., Keogh, D.P., Pary, R.A., 1996. Energetic costs of mate guarding behavior in male stream-dwelling isopods. *Oecologia* 106, 166-171.
- Spehar, R.L., Anderson, R.L., Fiandt, J.T., 1978. Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic invertebrates. *Environ. Pollut.* 15, 195-208.
- Staniek, K., Nohl, H., 2000. Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *BBA-Bioenergetics* 1460, 268-275.
- Styblo, M., Del Razo, L.M., Vega, L., Germolec, D.R., Le Cluyse, E.L., Hamilton, G.A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W.R., Thomas, D.J., 2000. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and humans cells. *Arch. Toxicol.* 74, 289-299.
- Sutcliffe, D.W., 1984. Quantitative aspects of oxygen uptake by *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): a critical review. *Freshw. Biol.* 15, 443-489.
- Thomas, D.J., 2007. Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 365-373.
- Thomasson, M.A., Johnson, M.L., Strömberg, J.O., Gaten, E., 2003. Swimming capacity and pleopod beat rate as a function of sex, size and moult stage in northern krill *Meganyctiphanes norvegica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 250, 205-213.
- Tseng, C., 2004. The potential biological mechanisms of arsenic-induced *Diabetes mellitus*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 197, 67-83.
- Uthus, E.O., 1992. Evidence for arsenic essentiality. *Environ. Geochem. Hlth.* 1, 55-58.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotox. Environ. Safe.* 64, 178-189.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84.
- Vasseur, P., Leguille, C., 2004. Defense systems of benthic invertebrates in response to environmental stressors. *Environ. Toxicol.* 19, 433-436.
- Vellinger, C., Felten, V., Sornom, P., Rousselle, P., Beisel, J.-N., Usseglio-Polatera, P., 2012c. Behavioural and physiological responses of *Gammarus pulex* at three temperatures:

Individual and combined effects. PLoS ONE. 7(6), e39153.doi:10.1371/journal.pone.0039153

Vellinger, C., Parant, M., Rousselle, P., Immel, F., Wagner, P., Usseglio-Polatera, P., 2012a. Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*). Environ. Pollut. 160, 66-73.

Vellinger, C., Parant, M., Rousselle, P., Usseglio-Polatera, P., 2012b. Antagonistic toxicity of arsenate and cadmium in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*). Ecotoxicology. 21, 1817-1827.

Ventura-Lima, J., Bogo, M.R., Monserrat, J.M., 2011. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. Ecotox. Environ.Safe. 74, 211-218.

Ventura-Lima, J., De Castro, M.R., Acosta, D., Fattorini, D., Regoli, D., Machado de Carvalho, L., Bohrer, D., Geracitano, L.A., Barros, D.M., Marins, L.F.F., Da Silva, R.S., Bonan, C.D., Reis Bono, M., Monserrat, J.M., 2009. Effect of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). Comp. Biochem. Physiol.Part C 149, 538-543.

Wallace, W.G., Estephan, A, 2004. Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). Aquat. Toxicol. 69, 289-297.

Wan, M., Hunziker, P.E., Kagi, J.H.R., 1993. Induction of metallothionein synthesis by cadmium and zinc in cultured rabbit kidney cells (RK-13). Biochem. J. 292, 609-615.

Wang, W., Rainbow, P.S., 2006. Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. Environ. Chem. 3, 395-399.

Wicklund Glynn, A., Norrgrenb, L., Müssenera, A., 1994. Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. Aquat. Toxicol. 30, 13-26.

Wright, D.A., Welbourn, P.M., 1994. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. Environ Rev. 2, 187-214.

Zhang, W., Liu, Y., An, Z., Huang, D., Qi, Y., Zhang, Y., 2011. Mediating effect of ROS on mtDNA damage and low ATP content induced by arsenic trioxide in mouse oocytes. Toxicol. in Vitro. 25, 979-984.

Zhang, H., Shan, B., 2008. Historical records of heavy metal accumulation in sediments and the relationship with agricultural intensification in the Yangtze-Huaihe region, China. Sci. Total Environ. 399, 113-120.

ARTICLE 4

Behavioural and Physiological Responses of *Gammarus pulex* Exposed to Cadmium and Arsenate at Three Temperatures: Individual and Combined Effects

Cette étude a eu pour but d'étudier les effets individuels et combinés du cadmium et de l'arséniate sur la physiologie et le comportement de *G. pulex* à trois températures différentes (5-10-15°C). Contrairement aux précédentes études, les gammarus mâles ont été exposés durant un temps plus court (96h). L'exposition métallique s'est donc effectuée avec des concentrations plus fortes de cadmium et d'arséniate, correspondant aux LC10 et LC25 obtenues pour chaque métal après 96h d'exposition à 10°C. De manière similaire aux expériences décrites dans les articles précédents, les gammarus ont été exposés à des concentrations métalliques simples ainsi qu'à toutes les combinaisons possibles des deux métaux selon un plan factoriel complet. A la fin du temps d'exposition, la mortalité et la bioconcentration ont été évaluées pour chaque condition. Pour les mélanges binaires, les effets conjoints sur la mortalité ont été considérés. De plus, les réponses comportementales comme la fréquence des battements de pléopodes et l'activité locomotrice ont été estimées. Enfin, les concentrations hémolympatiques en Na⁺ et Cl⁻ ont été mesurées.

*Les résultats ont montré que dans les expositions simples, la bioconcentration est corrélée positivement avec la mortalité le long d'un gradient croissant d'exposition métallique. Le cadmium a un impact sur les [Na⁺] et [Cl⁻] hémolympatiques alors que l'arséniate a simplement un impact faible sur la [Cl⁻] de l'hémolymphe. Les réponses comportementales de *G. pulex* diminuent avec l'augmentation des concentrations métalliques externes, suggérant une possible réallocation de l'énergie initialement allouée aux réponses comportementales vers les systèmes de maintenance (comme l'osmorégulation et la détoxification). Les interactions entre les deux métaux sur la mortalité ont été considérées comme « additives » pour tous les mélanges et à toutes les températures testées, à l'exception d'une seule condition (la plus faible combinaison de concentrations à 10°C qui a été caractérisée comme « antagoniste »). La baisse des activités comportementales mais aussi de la concentration de Cl⁻ dans l'hémolymphe déjà observée dans les expositions simples est amplifiée lors des expositions mixtes. Cependant, l'ajout d'arséniate a un effet « protecteur » sur la perte hémolympatique en ions Na⁺ observée lors d'une exposition au cadmium. Enfin, toutes les réponses néfastes obtenues, à l'exception de l'activité ventilatoire, sont amplifiées par une*

élévation de la température. La discussion aborde à la fois les mécanismes de toxicité de ces métaux et leurs interactions avec la température.

Behavioural and Physiological Responses of *Gammarus pulex* Exposed to Cadmium and Arsenate at Three Temperatures: Individual and Combined Effects

Céline Vellinger*, Vincent Felten, Pascal Somom, Philippe Rousselle, Jean-Nicolas Beisel, Philippe Usseglio-Polatera

Laboratoire des Interactions, Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), CNRS UMR 7146, Université de Lorraine, Metz, France

Abstract

This study aimed at investigating both the individual and combined effects of cadmium (Cd) and arsenate (AsV) on the physiology and behaviour of the Crustacean *Gammarus pulex* at three temperatures (5, 10 and 15°C). *G. pulex* was exposed during 96h to (i) two [Cd] alone, (ii) two [AsV] alone, and (iii) four combinations of [Cd] and [AsV] to obtain a complete factorial plane. After exposure, survival, [AsV] or [Cd] in body tissues, behavioural (ventilatory and locomotor activities) and physiological responses (iono-regulation of [Na⁺] and [Cl⁻] in haemolymph) were examined. The interactive effects (antagonistic, additive or synergistic) of binary mixtures were evaluated for each tested temperature using a predictive model for the theoretically expected interactive effect of chemicals. In single metal exposure, both the internal metal concentration in body tissues and the mortality rate increased along metallic gradient concentration. Cd alone significantly impaired both [Na⁺] and [Cl⁻] while AsV alone had a weak impact only on [Cl⁻]. The behavioural responses of *G. pulex* declined with increasing metal concentration suggesting a reallocation of energy from behavioural responses to maintenance functions. The interaction between AsV and Cd was considered as 'additive' for all the tested binary mixtures and temperatures (except for the lowest combination at 10°C considered as "antagonistic"). In binary mixtures, the decrease in both ventilatory and locomotor activities and the decline in haemolymphatic [Cl⁻] were amplified when respectively compared to those observed with the same concentrations of AsV or Cd alone. However, the presence of AsV decreased the haemolymphatic [Na⁺] loss when *G. pulex* was exposed to the lowest Cd concentration. Finally, the observed physiological and behavioural effects (except ventilation) in *G. pulex* exposed to AsV and/ or Cd were exacerbated under the highest temperature. The discussion encompasses both the toxicity mechanisms of these metals and their interaction with rising temperature.

Key words: Arsenate; Cadmium; Temperature; individuals effects; combined effects; metal mixture; physiological and behavioural responses; mortality; bioconcentration; ionoregulation; locomotion; ventilation; Freshwater amphipod *Gammarus pulex*

Introduction

Trace metals are natural constituents of rocks and soils but their rising concentration in the environment is directly linked to anthropogenic activities [1,2]. The increasing trace metal concentration in aquatic ecosystems (waters, sediments) has become a major concern. As metals rarely occur alone, living organisms are generally multi-contaminated. The toxicity of metals in mixtures can be additive, but also significantly more or less important than the toxicity theoretically expected by simple addition of the independent metal effects (i.e. synergistic or antagonistic, respectively; [3]). Cadmium (Cd) is a non-essential metal leading to adverse toxic effects at low concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$ order), which are well documented for aquatic organisms [4,5]. In contrast, far less information is available on arsenic effects, and especially arsenate (AsV), one of the inorganic forms of arsenic frequently found in aquatic environments.

Environmental variables such as temperature can influence metal solubility, and then metal bioavailability, leading to change in metal toxicity within exposed organisms [6-8]. Generally, a rising temperature enhances pollution toxicity [9]. Freshwater organisms are vulnerable to temperature change, especially ectothermic organisms that have body temperatures dependent of their environment [10]. Temperature changes can affect not only physiological rates and biochemical reactions but also the biological membrane stability and systemic functions, as ventilation or food absorption [10-12]. Temperature also modifies the distribution of ectothermic species and can lead to population extinctions, contributing to increasing ecosystem vulnerability [11, 13-15]. In pristine or least impaired ecosystems, temperature variations (e.g. nychtemeral or seasonal) have major driving effects not only on organism physiology, population or community composition, structure and dynamics but also on ecosystem functioning. In the global warming context, an increase of about 0.2°C per decade in the mean global temperature has been expected for the next two decades and numerous models have predicted a 1.8 to 4°C increase by the year 2100 [9]. In addition, the increase in mean temperature would be associated with increasing temperature fluctuations and more frequent extreme events [16], which may lead to more frequent and severe physiological stresses for organisms. In this context, a major concern is to consider and investigate temperature effects on organisms to increase the relevance of ecological and ecotoxicological risk assessment approaches.

Freshwater amphipods (crustaceans) are ectotherms that have been largely used as test organisms in ecotoxicological studies on trace metals, especially the genus *Gammarus* [17-19], because of their wide distribution, high abundance [20], clear sexual dimorphism, ease to

be collected, sensitivity to various toxicants [21,22] and trophic importance in freshwater ecosystems. As shredder, *Gammarus* plays a key functional role in leaf litter breakdown processes and, consequently, in freshwater food chains and nutrient cycling [23-25]. Moreover, the accumulation of pollutants in *Gammarus* has been recognized as a relevant tool for water quality and environmental risk assessment (e.g. in monitoring or routine tests) via the assessment of contamination level, uptake and elimination rates and bioconcentration factors [20].

Gills which represent the major site of penetration and concentration of metals in many freshwater organisms [26] are crucial for oxygen uptake, acid-base balance, osmotic and ionic regulation [27-28]. Crustaceans exposed to pollutants, environmental stressors and/or pathological agents usually exhibit a disruption of the iono/osmoregulation mechanisms, including alterations in the structure and ultrastructure of the branchial and excretory organs, and changes in the Na⁺/K⁺-ATPase activity, ion fluxes and gill surface permeability [29]. As a result, Na⁺ and Cl⁻ which are known to make up to 90% or more of the haemolymph osmotic pressure in most crustaceans [30], can be impaired by chemical stress (e.g. zinc [31]; copper [32]; cadmium [17]; acidification [33]). Osmoregulation is an important and highly energy-consuming regulatory function in aquatic invertebrates. According to Sutcliffe (1984, [34]), 11% of the total energy budget in *G. pulex* is devoted to osmoregulation. In the past few years, several studies have used behavioural responses as tools for ecotoxicity testing and water quality monitoring (e.g. locomotor activity [35-36]; ventilatory activity [37-38]; feeding rate [39]). The development of such behavioural tests is of strong interest for ecotoxicology because, in addition to being sensitive, fast, simple to perform and cheap, they allow to link the toxic effects obtained at biochemical/cellular levels to the impacts observed on populations and communities [35]. The organism mobility is an ecologically relevant behavioural marker as well, since locomotion is required to find food, escape from predators and obtain mating success. Any pollutant that interferes with mobility is likely to reduce the fitness of organisms and could involve 'ecological death' [40].

We hypothesized that (i) metals alone or in mixture would be concentrated by gammarids; and (ii) adverse effects on osmoregulation would lead to alteration in behaviour (i.e., locomotor activity), since energetic allocation should enhance maintenance functions (such as osmoregulation and detoxification).

The objectives of the present study were to 1) investigate physiological and behavioural responses of *G. pulex* exposed to Cd and AsV alone, 2) compare responses due to individual metal stress to those obtained under binary metal exposure, and 3) better assess

and understand effects and action mechanisms of these two metals alone and in interaction under different temperatures (5, 10 and 15°C). To match these goals, different levels of Cd and AsV, alone or in binary mixture, were used to assess their effects on survival, bioconcentration (i.e. [AsV] or [Cd] in body tissues), behavioural (ventilatory and locomotor activities) and physiological responses (iono-regulation of [Na⁺] and [Cl⁻] in haemolymph). The interactive effects of binary mixtures were evaluated for each tested temperature using a predictive model [41-42].

Methods

Ethics Statement

All necessary permits were obtained for the described field studies. We obtained the authorization to sample on our field study site by the Meuse prefecture, the regional representative of the French state. The field study did not involve endangered or protected species.

In France, working with *Gammarus* does not require permission, *Gammarus pulex* is not a protected species and its use in scientific researches does not require any specific permit. All efforts were made to reduce the suffering of animals. Non used individuals (females and excess of males) in laboratory experiments were rapidly returned to the collection site.

Collection and acclimation of organisms

Adult males of *G. pulex*, used as test organisms in this study, were collected in winter with both a hand net and artificial substrates from an unpolluted stream, the Méholle River [vicinity of Void-Vacon, FRANCE, Lambert II E (X): 841244; Lambert II E (Y): 2412346]. Amphipods were quickly brought to the laboratory in plastic vessels. Specimens were sexed using sexual dimorphism characters, with males exhibiting more massive gnathopodes than females [43-44]. Males were measured from the top of the cephalothorax to the base of the telson using image software analysis (Studio version 7; ImageJ software, Version 1.42q). Mean body size was 11.0±1.1 mm. Adult males were acclimatized in oxygenated aquaria (approximately 300 males/aquarium) during a week in 5L of mineral water (Volvic, France) under constant temperature and photoperiod conditions (5.0, 10.0 or 15.0±0.6°C; 16h of light / 8h of darkness) before being used in experiments. Specimens were fed with discs of conditioned leaves during acclimation up to 24 h before experiment. During acclimation, a daily renewal of both Volvic water and food was performed.

Experimental Design

After the acclimation period, groups of twenty-three males of *G. pulex* were transferred from batches to plastic Petri dishes (145 mm width and 20 mm height; = 'dishes' hereafter), each containing 100 mL of tested toxic solution (experimental dishes) or Volvic natural mineral water (control dishes; $[Ca^{2+}] = 11.5 \text{ mg L}^{-1}$; $[Mg^{2+}] = 8 \text{ mg L}^{-1}$; $[Na^{+}] = 11.6 \text{ mg L}^{-1}$; $[K^{+}] = 6.2 \text{ mg L}^{-1}$; $[SO_4^{2-}] = 8.1 \text{ mg L}^{-1}$; $[HCO_3^{-}] = 71 \text{ mg L}^{-1}$; $[NO_3^{-}] = 6.3 \text{ mg L}^{-1}$; $[Cl^{-}] = 13.5 \text{ mg L}^{-1}$; $[SiO_2] = 31.7 \text{ mg L}^{-1}$; $[F^{-}] = 0.22 \text{ mg L}^{-1}$; pH = 7.0) and nine glass pebbles ($\varnothing 15 \text{ mm}$, convex side down). As gammarids were not fed during the whole experiment, glass pebbles served both as substrate and refuge for animals to avoid at best cannibalism. For each acclimation temperature, three replicates of twenty-three gammarids were exposed during 96 hours to (i) two concentrations of AsV alone, (ii) two concentrations of Cd alone and (iii) all the possible binary combinations of AsV and Cd with the previous concentrations (Figure 1).

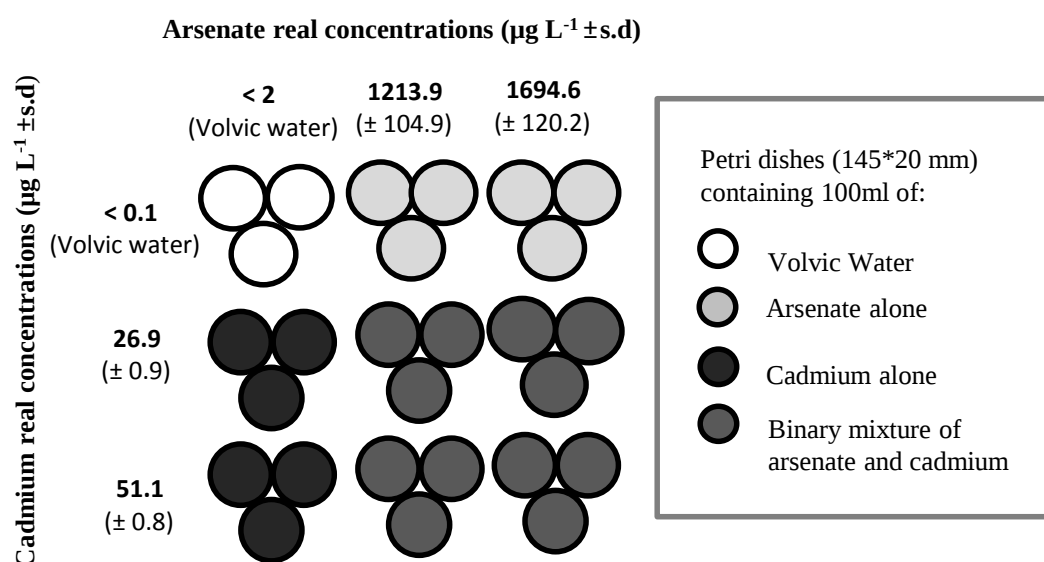


Figure 1. Experimental design and mean real concentrations of arsenate and/or cadmium tested during the experiments.

Values ($\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{s.d.}$) were measured by graphite furnace atomic - absorption spectrophotometry (AAS Varian SpectrAA-330, detection limits: $2 \mu\text{g}_{\text{As}} \text{ L}^{-1}$ and $0.1 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$) or by flame atomic – absorption spectrophotometry (AAS PERKIN ELMER AAnalyst 100, detection limits: $20 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$) Mean real concentrations were based on $n=12$ for control and $n=36$ for all the combined "temperature x tested conditions".

In order to avoid chemical variations (in metal concentrations) during the 96-hour exposure, the water was renewed every 24 h after the daily survival count. pH was measured every day and remained stable in the tested solutions (7.27 ± 0.15) independently of their Cd and/or AsV concentrations. Test containers and dishes were filled up with metal solutions one week before the beginning of experiments, allowing a chemical equilibrium before experiment onset, thus minimizing metal adsorption during experiments. Chemicals used were provided by SIGMA-Aldrich, UK. Stock solutions of the metals ($10 \text{ mg}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$ and $100 \text{ mg}_{\text{AsV}} \text{ L}^{-1}$) were prepared by dissolving cadmium chloride (CdCl_2) and sodium arsenate heptahydrate ($\text{AsHNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in milliQ water and then were stabilized with 0.1 % of HNO_3 (65 %, Suprapure, Merck). Metal test solutions were prepared using mineral water (Volvic, France) as diluent of stock solutions. Using the Excel macro REGTOX [45] on preliminary results of dose-effect experiments allowed to independently identify the [AsV] and [Cd] causing 10 and 25 % mortality of *G. pulex* (i.e. LC10 and LC25, respectively) in 96 h (see Table 1) at 10°C . Mortality was processed using a logistic curve-fitting procedure applying the method described by Vindimian et al. [46] and Isnard et al. [47]. Corresponding results were used to build up a complete experimental design of binary mixtures, in which selected AsV and Cd concentrations were chosen close to these lethal concentrations (Figure 1). Three different experimental concentrations for both Cd and AsV were prepared from the acclimation water (Volvic water) using $10 \text{ mg}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$ and $100 \text{ mg}_{\text{AsV}} \text{ L}^{-1}$ of stock solutions (nominal concentrations: control = $0 \text{ } \mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{ L}^{-1}$, As1 = $1220 \text{ } \mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{ L}^{-1}$, As2 = $1700 \text{ } \mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{ L}^{-1}$ and control = $0 \text{ } \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$, Cd1 = $27 \text{ } \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$, Cd2 = $52 \text{ } \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$; real concentrations, mean $\pm$ S.D.: control < $5 \text{ } \mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{ L}^{-1}$, As1 = $1213.9 \pm 104.9 \text{ } \mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{ L}^{-1}$, As2 = $1694.6 \pm 120.2 \text{ } \mu\text{g}_{\text{AsV}} \text{ L}^{-1}$ and control < $0.1 \text{ } \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$, Cd1 = $26.9 \pm 0.9 \text{ } \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$, Cd2 = $51.1 \pm 0.8 \text{ } \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{ L}^{-1}$).

Table 1. Mean LC10 and LC25 values ($\mu\text{g L}^{-1} \pm 95 \%$ confidence intervals) estimated for *Gammarus pulex* after 96-hour of arsenate or cadmium exposure using REGTOX Excel macro (Vindimian et al., 1983) based on Hill model

	LC10 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LC25 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Arsenate	1121.2 (893.5-1635.5)	1645.0 (1334.5-2110.2)
cadmium	28.2 (13.9-30.3)	54.1 (45.0-69.9)

Mortality rate and evaluation of the interactive mode of action

Every 24 h, dead animals were removed from each dish and living ones were counted in the three replicates of 23 animals. The theoretically expected mortality of *G. pulex* subjected to the interactive toxic effects of binary mixtures was derived from a simple mathematical model. This model, based on the theory of probabilities, assumes that the chemicals are acting (antagonistically, additively or synergistically) simultaneously on the affected organisms [42,48-50]. In this model, if M1 is the mortality (i.e. "inhibition rate" *sensu* [42,49]) caused by a given concentration of chemical A1 and M2 the mortality caused by a given concentration of chemical A2, then the theoretically expected mixture toxicity ME, when the two chemicals are applied together, is given by the following equation:

$$M_E = M_1 + M_2 - M_1M_2/100 \quad (1)$$

For each binary mixture, the experimentally observed mortality in 96 h (MO) was statistically compared to the theoretically expected mixture mortality ME calculated with equation (1) using a Student t-test ($n = 5$), after verification of the normal probability distribution of the observed values. If MO and ME were not significantly different ($p \geq 0.05$), then the mode of interaction was characterized as additive. If MO was significantly lower than ME, the mode of interaction was considered as antagonistic. If MO was significantly higher than ME, the mode of interaction was considered as synergistic.

***Gammarus* [AsV] and [Cd]**

Metal concentrations in body tissues were measured after 96-hour exposure of *G. pulex* to various treatments. Three replicates of at least five alive gammarids were composed per treatment. Gammarids were rinsed with nanopure water and dried on filter paper. They were immediately stored at -20°C in zipped bags. Then, gammarids were dried in a drying kiln at 65°C for 48 h before dry weight measurement. Biological material was digested for 48 h at 65°C with 1 mL HNO_3 diluted in half (65 %, suprapure, MERCK). Final samples and standard solutions were adjusted to concentration of 2% HNO_3 by addition of 4 mL of Nanopure water. Metal quantification in biological samples was performed using graphite furnace for AsV (arsenic total) or flame-atomic absorption spectrophotometry for Cd (AAS). All metal concentrations in biological tissues have been reported in μg metal g dry weight⁻¹.

Analysis of haemolymphatic [Na⁺] and [Cl⁻]

Samples of haemolymph (0.8-1.2 µL) were transferred to a gauged 5-µl microcapillary tube and were centrifuged for 10 min at 6596 g. After centrifugation the liquid phase was diluted in 2 mL of Nanopure water. Sodium concentrations in haemolymph were evaluated using atomic absorption spectrophotometry (Perkin Elmer Analyst 100) whereas chlorides were measured by ionic chromatography (Dionex 4500i equipped with an Ion Pac AS4A column). Further details on haemolymph sampling and analysis are available in [33].

Ventilatory activity

The pleopods are specialized abdominal appendages in malacostraceans used both for swimming and for facilitating respiratory gas exchanges across tegument. The ventilatory activity was recorded by the observation of the pleopod beat frequency during 1 min [51]. The measurements were performed rapidly at the same period of the day (fixed hours: 13h-14h) to avoid the effects of a possible circadian rhythm of respiration [52].

Locomotor activity

Locomotor activity was monitored by counting the number of moving animals in 800 mL tank containing 10 individuals [53]. A piece of net was added in the tank to provide a resting surface (mesh size 200 µm, length x width: 6 x 5 cm). Each count of moving *G. pulex* was conducted on a period of 2 seconds and was repeated 35 times. Measurements were performed at the same period of the day, with similar light conditions and without noise.

Statistical analyses

The comparison of observed physiological and behavioural responses between tested conditions was performed using two-way ANOVA followed, if a significant heterogeneity (i.e. $p < 0.05$) had been identified, by post hoc LSD Fisher's tests. For responses expressed in % (mortality and locomotion), an arcsin root square transformation was done prior to applying statistical tests. The weighted means were calculated with Statistica software to identify (i) the "condition" effects (control *vs.* metal exposures) when all temperatures were combined and (ii) the "temperature" effect when the results from all metal conditions were combined.

Results

Table 2. Results of the two-way ANOVAs (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) testing the homogeneity of the physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* after 96h exposure at 5, 10 and 15°C (temperature effect) to different concentrations of arsenate; cadmium and binary mixtures of these two metals (condition effect).

	Mortality	Concentrations in body tissues					
		AsV	Cd	Locomotion	Ventilation	[Na ⁺]	[Cl ⁻]
T°C	1.10 ⁻⁶ ***	0.11	2.6.10 ⁻⁴ **	< 10 ⁻⁶ ***	< 10 ⁻⁶ ***	5.5.10 ⁻³ **	1.5.10 ⁻⁵ ***
Conditions	< 10 ⁻⁶ ***	< 10 ⁻⁶ ***	< 10 ⁻⁶ ***	< 10 ⁻⁶ ***	1.9.10 ⁻³ **	8.6.10 ⁻³ **	1.1.10 ⁻⁴ ***
T°C*conditions	0.18	0.10	3.7.10 ⁻² *	< 10 ⁻⁶ ***	3.4.10 ⁻⁴ ***	1.5.10 ⁻³ **	1.10 ⁻⁶ ***

Mortality rate

Similar *G. pulex* mortality rates were reported in controls, the highest one was observed at 15°C (2.9±2.5 to 8.7±4.3%, Figure 2a). Significant effects of both temperature and exposure conditions were observed on mortality rate (Table 2; two-way ANOVA, $p < 0.05$) without any significant effect of the interaction (temperature x conditions).

When all the conditions were considered together, the rise in temperature tended to increase the mortality rate of *G. pulex* (Figure 2c). At 10°C, the mortality rate was close to that observed at 5°C (13.2±6.8% and 11.7±6.8%, respectively) but significant differences were observed between 15°C (22.4±5.6%) and the previous temperatures. The mortality rate increased significantly (i) between 5°C and 15°C for individuals exposed to Cd²⁺ alone, and (ii) between 15°C and both 5°C and 10°C for individuals exposed to the binary mixtures As₁Cd₂; As₂Cd₁ and As₂Cd₂ (Fig. 2a).

In both single exposures of AsV or Cd, mortality rates were concentration-dependent and increased with the rise of metal concentration (Fig. 2a, 2b). Significant differences in mean mortality rates were found between control and exposed individuals when combining the results from all the tested temperatures (Fig. 2b). However, for AsV alone, no significant differences in mortality were observed between control, As₁ and As₂ for each tested temperature (Figure 2a). In contrast, for single Cd exposure, significant increases in mortality were found between control and exposed individuals at 10°C (control *vs.* Cd₁ or Cd₂) and 15°C (control *vs.* Cd₂; Fig. 2a). However, no significant increase in mean mortality was observed between Cd₁ and Cd₂ when all the temperatures were combined (Fig. 2b).

In binary mixtures containing the same Cd concentration, an increase in AsV concentration tended to increase the mortality rate (e.g. As₁Cd₁ *vs.* As₂Cd₁; As₁Cd₂ *vs.* As₂Cd₂; Fig. 2b), but a significant difference was only observed at 15°C for As₁Cd₁ *vs.* As₂Cd₁ (Fig. 2a).

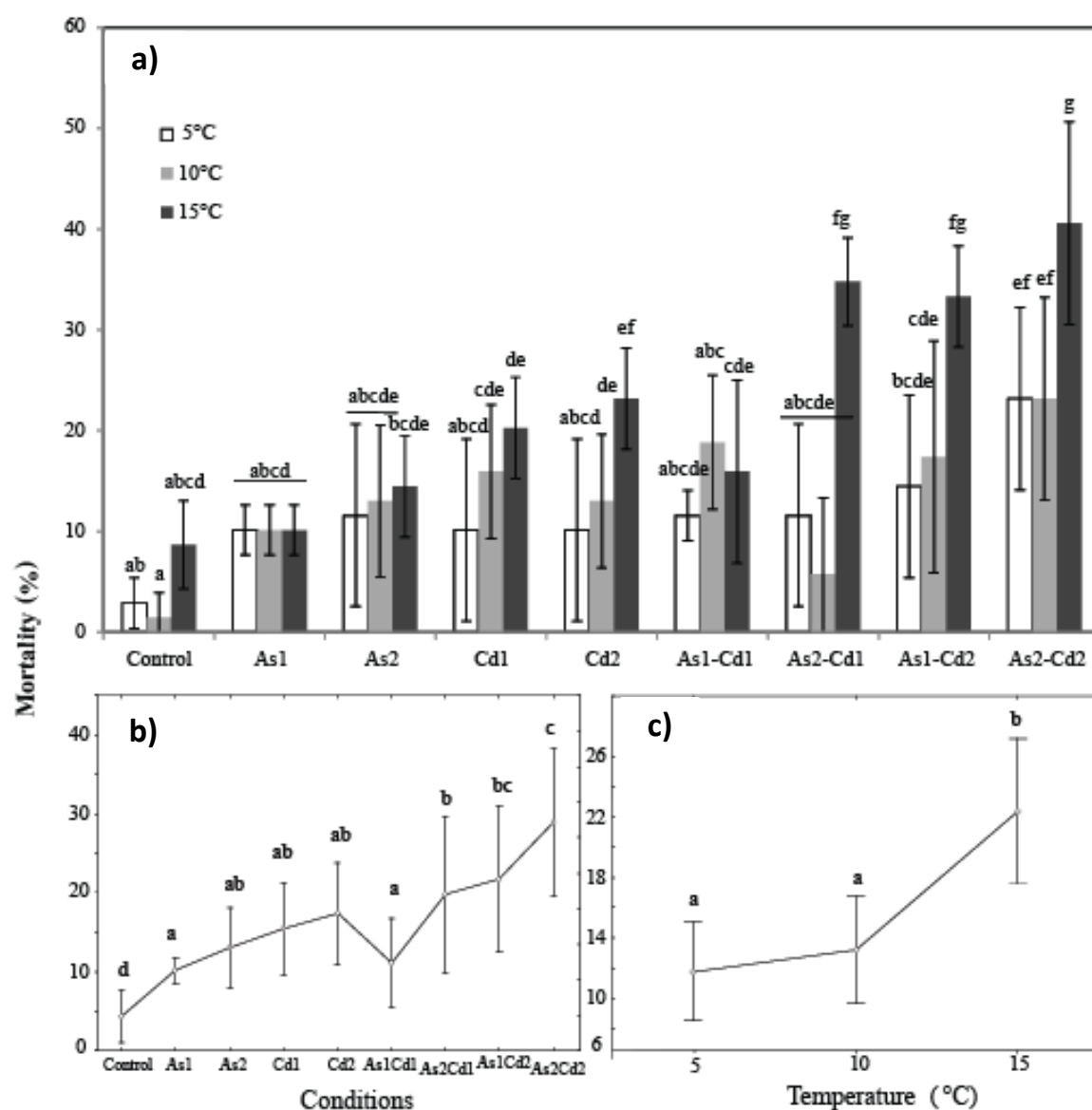


Figure 2. Mean mortality (%) in *Gammarus pulex* exposed to different conditions at three temperatures (5-10-15°C).

The different conditions were “control”, “arsenate”, “cadmium” and four binary mixtures.

a) Temperature x condition effect. Mean mortality for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.

b) Condition effect: Weighted mean mortality for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

c) Temperature effect: Weighted mean mortality for each temperature (results for all the tested conditions were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to g) were used as labels to illustrate significant differences in mean mortality values (two-way ANOVAs + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).

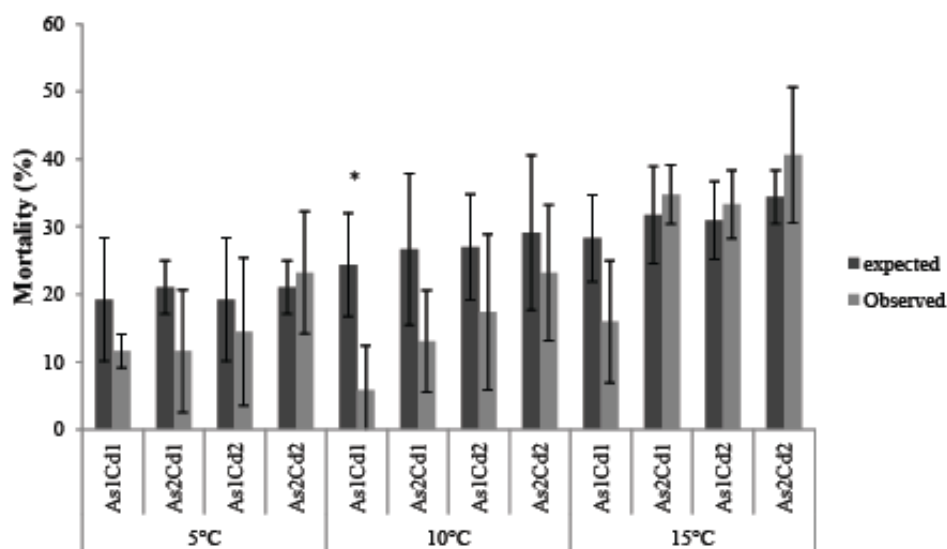


Figure 3. Comparison of mean mortality ($\pm$ s.d.) between 'theoretically expected' and 'observed' combined effects. Mean mortality of different cadmium/arsenate binary mixtures in *Gammarus pulex* after 96-hour exposure. An asterisks indicated significant differences between the observed and expected values for each binary mixture (Student-t test, $p < 0.05$).

Similarly, the average mortality rates slightly increased along the gradient of Cd in binary mixtures containing the same concentration of AsV (i.e. As1 or As2) but the only one significant difference was observed for As1 (As1Cd1 *vs.* As1Cd2) at 15°C (Fig. 2a).

Globally, both the predicted and observed mean mortalities of *G. pulex* in the different binary mixtures increased with the rise in temperature but also along the gradient of AsV and Cd concentrations in mixtures (Fig. 2a, c and Fig. 3). For all the binary mixtures, the predicted mean mortality (minimal-maximal mean values) after 96 h exposure varied between 19.2-21.0% at 5°C; 26.6-29.1% at 10°C; 28.3-34.4% at 15°C while the observed mean mortality varied between 11.6-23.2% at 5°C; 5.8-23.2% at 10°C and 15.9-40.6% at 15°C (Fig.3). These results suggested a lower toxic effect of mixtures of Cd and AsV on the freshwater amphipod *G. pulex* at 5 and 10°C, than theoretically expected. In contrast, when gammarids were exposed to mixtures of Cd and AsV at 15°C, the observed toxic effect was slightly higher than theoretically expected (excepted in the As1Cd1 mixture). Nevertheless, the differences between observed and expected mortalities were not significant (t-test; $p > 0.05$) for all the conditions (except As1Cd1 at 10°C, Fig. 3). Then, assuming the hypothesis that both metals were simultaneously acting, the interaction between AsV and Cd led to an 'additive' toxicity for all the tested binary mixtures, excepted for As1Cd1 at 10°C where AsV and Cd had an 'antagonistic' effect on toxicity.

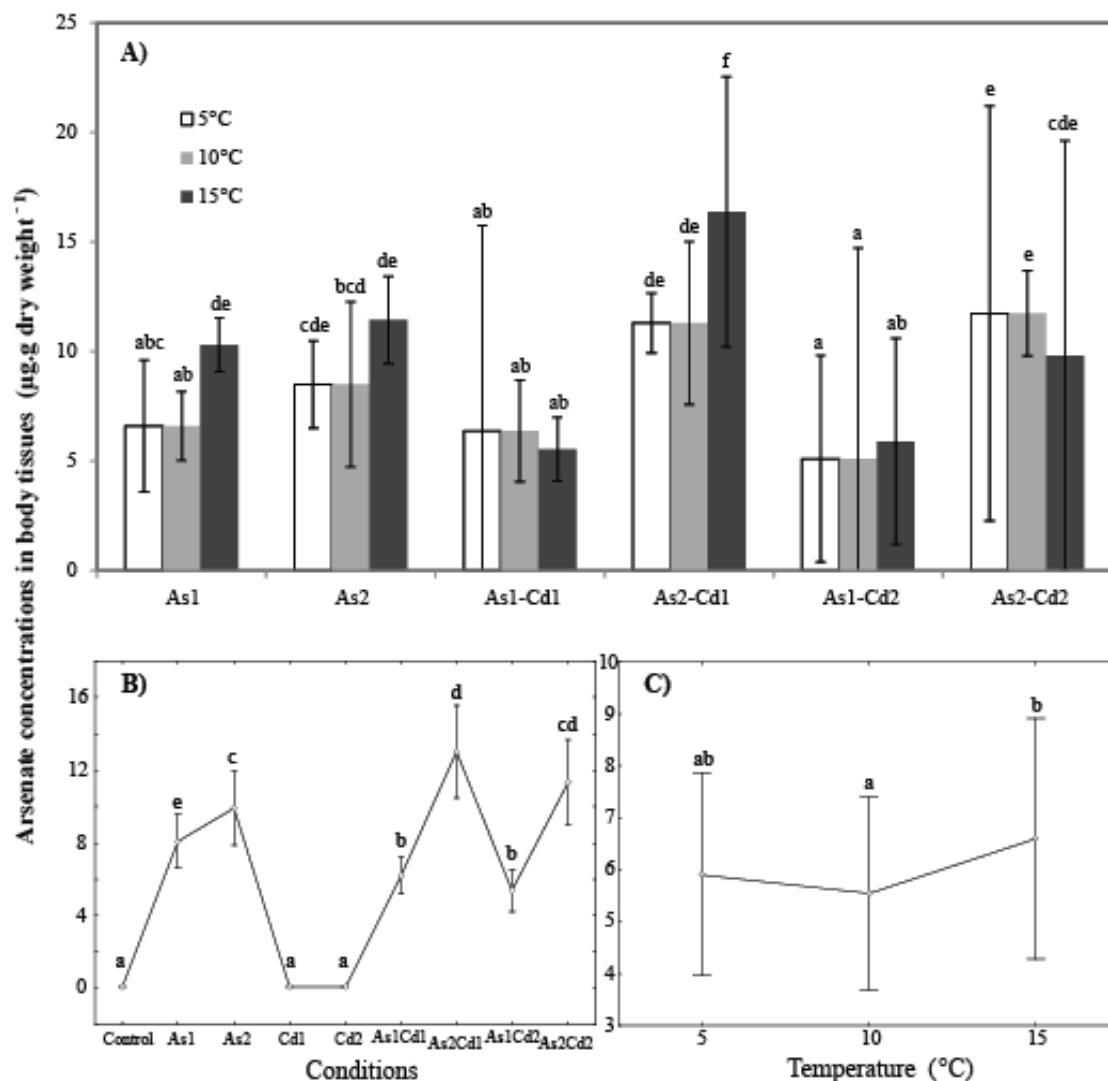


Figure 4. Mean arsenate concentrations in *G. pulex* body tissues ($\mu\text{g.g dry weight}^{-1}$).

Concentrations obtained for individuals exposed 96 h to different conditions (control, arsenate, cadmium and four binary mixtures) at three temperatures (5-10-15°C).

- Temperature x condition effect.** Mean internal arsenate concentration in *G. pulex* for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.
- Condition effect:** Weighted mean concentration of internal arsenate for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.
- Temperature effect:** Weighted mean concentration of internal arsenate concentrations for each temperature (results for all the tested conditions were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to f) were used as labels to illustrate significant differences in mean [AsV] values (two-way ANOVAs + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).

[AsV] in body tissues

In the controls, for all the tested temperatures, the [AsV] in body tissues was lower than the relative detection limit when measured by graphite furnace absorption spectrophotometry ($2 \mu\text{g}_{\text{As}} \text{L}^{-1}$). A significant effect of 'condition' on the [AsV] in body tissues was observed (Table 2, two-way ANOVA, $p < 0.05$), but the effects of 'temperature' or interaction [temperature x condition] were not significant. The rise in temperature did not clearly influence the [AsV] in the body tissues of *G. pulex* (Fig. 4a, c) even if the [AsV] in body tissues was higher at 15°C than at 5 or 10°C for As1 and As2Cd1 ($p < 0.05$; Fig. 4a).

In single AsV exposure, the [AsV] in body tissues was slightly higher in As2 than in As1 exposure but the observed differences were never significant for all the tested temperatures (Fig. 4a). However, when gathering the three temperatures, the average body tissue concentration significantly increased with external [AsV] (Fig. 4b).

In the binary mixtures containing the same [Cd], the [AsV] in body tissues increased significantly along the gradient of AsV (As1Cd1 *vs.* As2Cd1; As1Cd2 *vs.* As2Cd2) when the tested temperatures were considered both separately or together (Fig. 4a,b). In the binary mixtures containing As1, the [AsV] in body tissues varied in the same range along the gradient of Cd whatever the tested temperature (As1Cd1 *vs.* As1Cd2). Moreover, the addition of Cd with As1 has engendered a decline in internal [AsV] when compared to As1 alone (As1 *vs.* As1Cd1, As1 *vs.* As1Cd2), but the difference was statistically significant only at 15°C (Fig. 4a). For the binary mixtures containing As2, the [AsV] in body tissues varied in the same range along the gradient of Cd concentration in mixtures (As2Cd1 *vs.* As2Cd2) at 5 and 10°C . However, a significant decrease in internal [AsV] was observed at 15°C . When compared to As2 alone, the addition of Cd1 increased the internal [AsV] in exposed individuals (As2Cd1), while the addition of Cd2 (As2Cd2) did not changed the internal [AsV].

[Cd] in body tissues

In the control conditions, for all the tested temperatures, the [Cd] in body tissues was lower than their relative detection limits measured by graphite furnace or atomic-absorption spectrophotometry ($0.1 \mu\text{g}_{\text{Cd}} \text{L}^{-1}$). Significant effects of (i) temperature, (ii) condition and (iii) interaction [temperature x condition] on the [Cd] in body tissues were observed (Table 2, two-way ANOVA, $p < 0.05$). The average [Cd] in body tissues of *G. pulex* increased between 5 or 10°C and 15°C when all the exposure conditions were considered together (Fig. 5c).

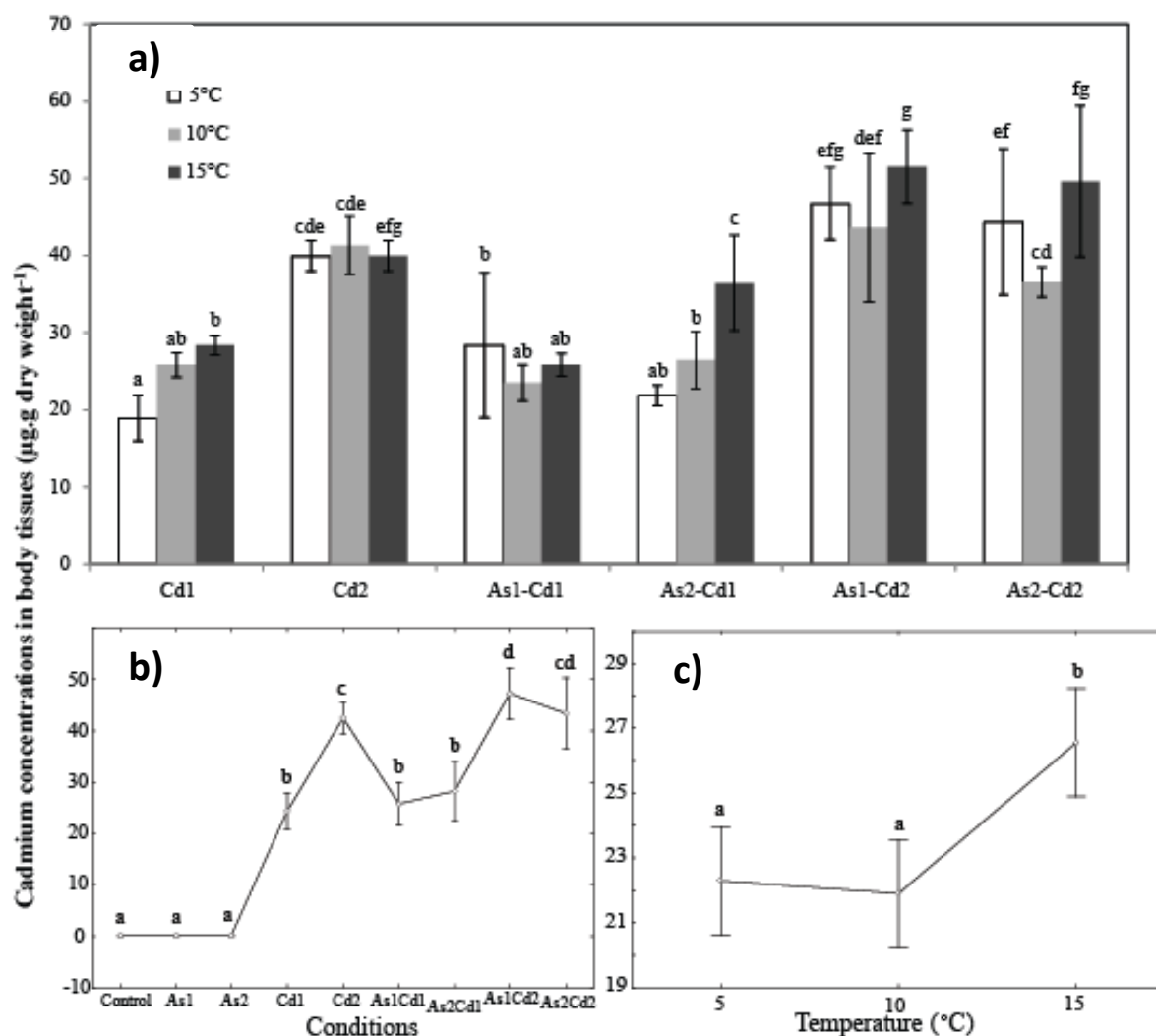


Figure 5. Mean cadmium concentrations in *G. pulex* body tissues ($\mu\text{g} \cdot \text{g dry weight}^{-1}$).

Concentrations obtained for individuals exposed 96 h to different conditions (control, arsenate, cadmium and four binary mixtures) at three temperatures (5-10-15°C).

- a) Temperature x condition effect.** Mean internal Cd concentrations in *G. pulex* for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.
- b) Condition effect:** Weighted mean concentration of internal Cd for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.
- c) Temperature effect:** Weighted mean concentration of internal Cd for each temperature (results for all the tested conditions were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to g) were used as labels to illustrate significant differences in mean [Cd] values (two-way ANOVAs + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).

An interaction [temperature x condition] was revealed and the internal [Cd] was significantly higher (i) at 15°C when compared to 5°C for individuals exposed to Cd1 or As2Cd1, and (ii) at 15°C when compared to 10°C for individuals exposed to As1Cd2 or As2Cd2 mixtures (Fig. 5a).

In single Cd exposure, the [Cd] in body tissues was significantly higher for the external [Cd2] whatever the tested temperature (Fig. 5a, b). When the tested temperatures were considered together, the internal [Cd] was higher in the binary mixtures containing Cd2 than in the binary mixtures containing Cd1 (Fig. 5b). Moreover, an addition of AsV in the binary mixtures containing Cd1 or Cd2 did not significantly change the internal [Cd] when compared to the internal [Cd] for Cd1 or Cd2 exposure. However, when considering separately the different temperatures, the relationship between the internal [Cd] in body tissues and the external [Cd] in binary mixtures was less clear, with a significantly higher [Cd] in body tissues (i) at 5°C for As1Cd1 (if compared to Cd1) and (ii) at 15°C for As2Cd1 (if compared to Cd1; Fig. 5a).

Locomotion

In the control conditions, the mobility of *G. pulex* significantly increased with temperature ($42.9 \pm 12.3\%$ at 5°C; $54.6 \pm 9.2\%$ at 10°C and $62.3 \pm 11.9\%$ at 15°C; Fig. 6a). Highly significant effects of (i) temperature, (ii) condition and (iii) interaction [temperature x condition] were observed on the locomotion of *G. pulex* (Table 2, two-way ANOVA, $p < 0.05$).

When all the exposure conditions were considered together, gammarids were significantly more mobile at 10°C than at the two other temperatures, for which no differences were reported ($37.0 \pm 10.6\%$ vs. $29.5 \pm 9.6\%$ at 5°C and $39.6 \pm 11.6\%$ at 15°C; Fig. 6c). Considering the results independently obtained for each tested temperature (Fig. 6a), the higher locomotor activity of gammarids at 10°C was mainly due to its responses in binary mixtures. The organisms exposed to metal were significantly less mobile than those non-exposed, when the temperatures were combined (Fig. 6b). When the individuals were exposed to single AsV concentrations, their mobility rate decreased with increasing temperature for As1, but no significant difference was observed for As2 (Fig. 6a). The mobility of the individuals exposed to single Cd concentrations increased between 5 or 10°C and 15°C for Cd1, while it slightly decreased for Cd2 (Fig. 6a).

In the two single AsV exposures, the mobility of *G. pulex* was slightly higher in As2 than in As1 ($36.7 \pm 1.8\%$ vs. $32.5 \pm 2.4\%$; Fig. 6b), when the tested temperatures were considered separately. These differences were significant at 10°C and 15°C but not at 5°C (Fig. 6a). In the

two single Cd exposures, the mobility of *G. pulex* varied in the same range (32%), except at 15°C where the mobility was higher with Cd1 (50%) than with Cd2 (28%; Fig. 6a). This difference was strong enough to produce a significant decrease in the *Gammarus* mobility between Cd2 and Cd1 when all the tested temperatures were considered together (Fig. 6b). In these conditions, the mobility of *Gammarus* decreased also in the binary mixtures containing Cd2, when compared to those containing Cd1 (Fig. 6c). The same trend was found in the mixtures containing As2, when compared to those containing As1. Locomotion was systematically lower in the binary mixtures containing Cd2 than in the binary mixtures containing Cd1. An addition of AsV in the binary mixtures containing Cd1 or Cd2 decreased the mobility of *G. pulex* when compared to its mobility in single Cd1 or Cd2 exposure. An addition of Cd in As1 or As2 tended also to decrease the mobility of *G. pulex* when compared to that in the corresponding single AsV exposure (Fig 6b): Significant differences were observed between As2Cd1 and Cd1 or As2, As1Cd2 and Cd2 or As1, As2Cd2 and Cd2 or As2. When the temperatures are considered separately, the individuals exposed at 5°C and 15°C in binary mixtures mainly exhibited significantly lower mobility than the individuals impaired by the corresponding concentrations of Cd or AsV alone, while at 10°C, higher or similar mobility was mainly observed (Fig. 6a).

This pattern probably explains why no significant mobility decrease was observed between As1Cd1 and Cd1 or As1 when the temperatures were considered together.

Mobility decreased with an increase in Cd mixture. The same significant pattern was observed for AsV mixed with Cd1, but the only significant difference in AsV mixed with Cd2 was observed at 15°C.

Ventilation

In the control conditions, the ventilation of *G. pulex* slightly increased from 5 to 15°C (i.e. 192.9 ± 21.8 to 221.1 ± 6.0 pleopod beat min^{-1} , Fig. 7a), but these differences were not statistically significant. Significant effects of (i) temperature, (ii) condition and (iii) interaction [temperature $\times$ condition] on *G. pulex* ventilation were observed (mean pleopod beat frequency - 'MPBF' hereafter- table 2, two-way ANOVA, $p < 0.05$).

When all the exposure conditions were simultaneously considered, a significant MPBF increase was observed with rising temperature (163.7 ± 14.1 ; 176.2 ± 16.6 and 192.1 ± 22.5 pleopod beat min^{-1} at 5, 10 and 15°C respectively; Fig. 7c). When the conditions were considered separately (Fig. 7a), the response pattern was more complex even if the same

trend was observed in the control conditions and in the single AsV or Cd exposures (but not in mixtures).

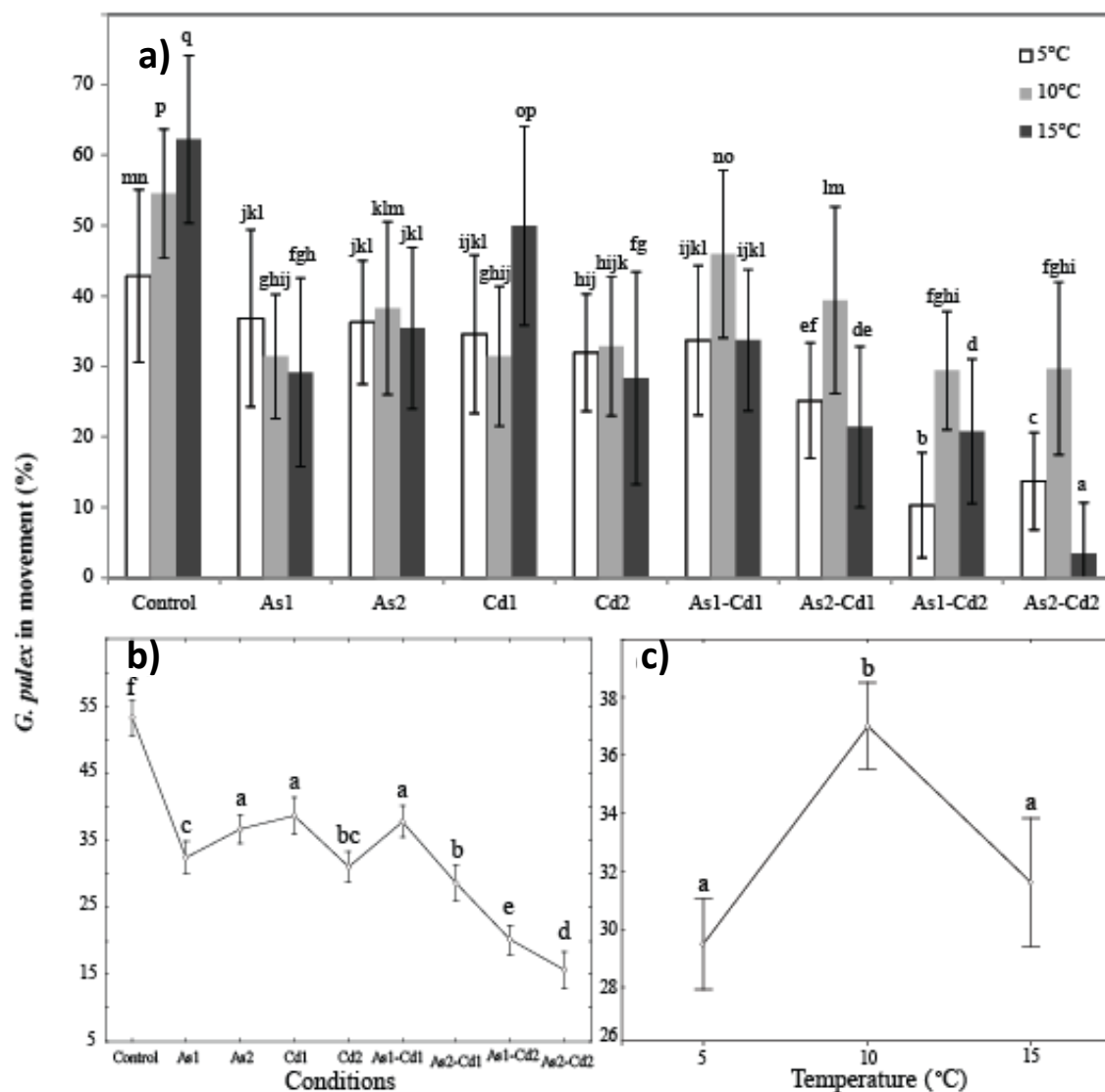


Figure 6. Mean mobility of *Gammarus pulex* (in %) exposed to different conditions.

Mobility obtained for individuals exposed 96 h to different conditions (control, arsenate, cadmium and four binary mixtures) at three temperatures (5-10-15°C).

a) Temperature x condition effect. Mean mobility (%) for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.

b) Condition effect: Weighted mean locomotor activity for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

c) Temperature effect: Weighted mean locomotor activity for each temperature (results for all the tested conditions were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to q) were used as labels to illustrate significant differences in mean mobility values (two-way ANOVAs + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).

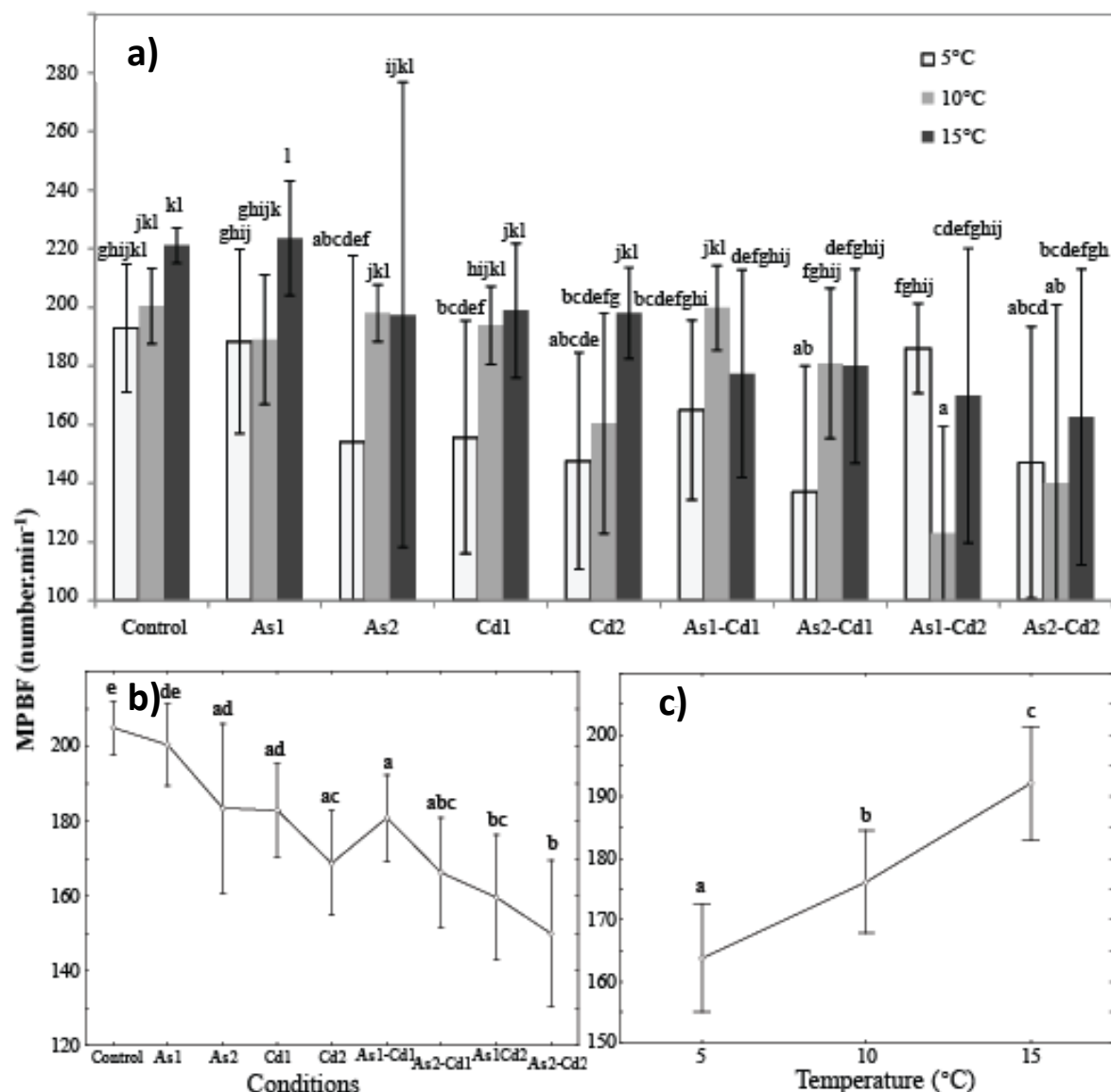


Figure 7. Mean pleopod beat frequency (MPBF) of *Gammarus pulex*.

MPBF obtained for individuals exposed 96h to different conditions (control, arsenate, cadmium and four binary mixtures) at three temperatures (5-10-15°C).

a) Temperature x condition effect. Mean MPBF for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.

b) Condition effect: Weighted mean MPBF for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

c) Temperature effect: Weighted mean MPBF for each temperature (results for all the tested conditions were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to l) were used as labels to illustrate significant differences in MPBF values (two-ways ANOVA + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).

When all the temperatures were simultaneously considered, the individuals exposed to metal (except As1) showed significantly lower ventilation rate than those non-exposed (Fig. 7b). Except at 10°C for AsV, a significant MPBF decrease was observed with an increase in AsV or Cd concentration in the single exposure conditions (Fig. 7a, b). For the tested concentrations, MPBF seemed to be lower for gammarids exposed to Cd than for those exposed to AsV (Cd1 *vs.* As1; Cd2 *vs.* As2) but the difference was not significant.

For the binary mixtures, temperature had a less clear effect on ventilation with either an increase or a decrease in MPBF with rising temperature (Fig. 7a). However, when all the temperatures were simultaneously considered, MPBF tended to decrease with external metal concentration (Fig. 7b). The gammarids exposed to the binary mixtures As1Cd1 or As2Cd1 and the gammarids exposed to AsV or Cd alone exhibited the same ventilation frequency. When comparing the other mixtures at the single corresponding concentration of metals: (i) a significant increase in MPBF was observed between As1Cd2 and As1 at 5°C and (ii) a significant decrease in MPBF was observed between As1Cd2 and As1 or Cd2 at 10°C and As2Cd2 and As2 or Cd2 at 15°C. MPBF was also lower in the binary mixtures containing Cd2 than in the binary mixtures containing Cd1 (Fig. 7b, significant differences only observed for As1Cd1 and As1Cd2).

Haemolymphatic [Na⁺] and [Cl⁻]

In the control conditions, the *G. pulex* haemolymphatic [Na⁺] and [Cl⁻] were similar and independent of temperature ([Na⁺]: from 93.3±10.2 to 96.6±8.7 mmol L⁻¹, Fig. 8a; [Cl⁻]: from 104.4 ±18.1 to 109.6±14.7 mmol L⁻¹, Fig 9a), even if the haemolymphatic [Na⁺] and [Cl⁻] slightly increased with rising temperature. We observed highly significant effects of (i) temperature, (ii) condition and (iii) interaction [temperature x condition] on [Na⁺] and [Cl⁻] in the haemolymph of *G. pulex* (Table 2, two-way ANOVA, $p < 0.05$). When all the exposure conditions were simultaneously considered, a significant decrease in both haemolymphatic [Na⁺] and [Cl⁻] was observed between 5-10°C and 15°C, but no significant difference was observed between 5°C and 10°C (Fig. 8c and 9c). When considering each condition independently, the effect of temperature was less clear on [Cl⁻] than on [Na⁺] with either an increase or a decrease in [Cl⁻] with rising temperature. However at 15°C, the haemolymphatic [Cl⁻] was often lower than at 5 or 10°C (Fig. 9a). Whatever the temperature, no significant difference in the haemolymphatic [Cl⁻] or [Na⁺] was observed when the individuals were exposed to single AsV concentrations (if compared to the control conditions; Fig. 8a,b and 9a,b). When single Cd exposures were compared to the control

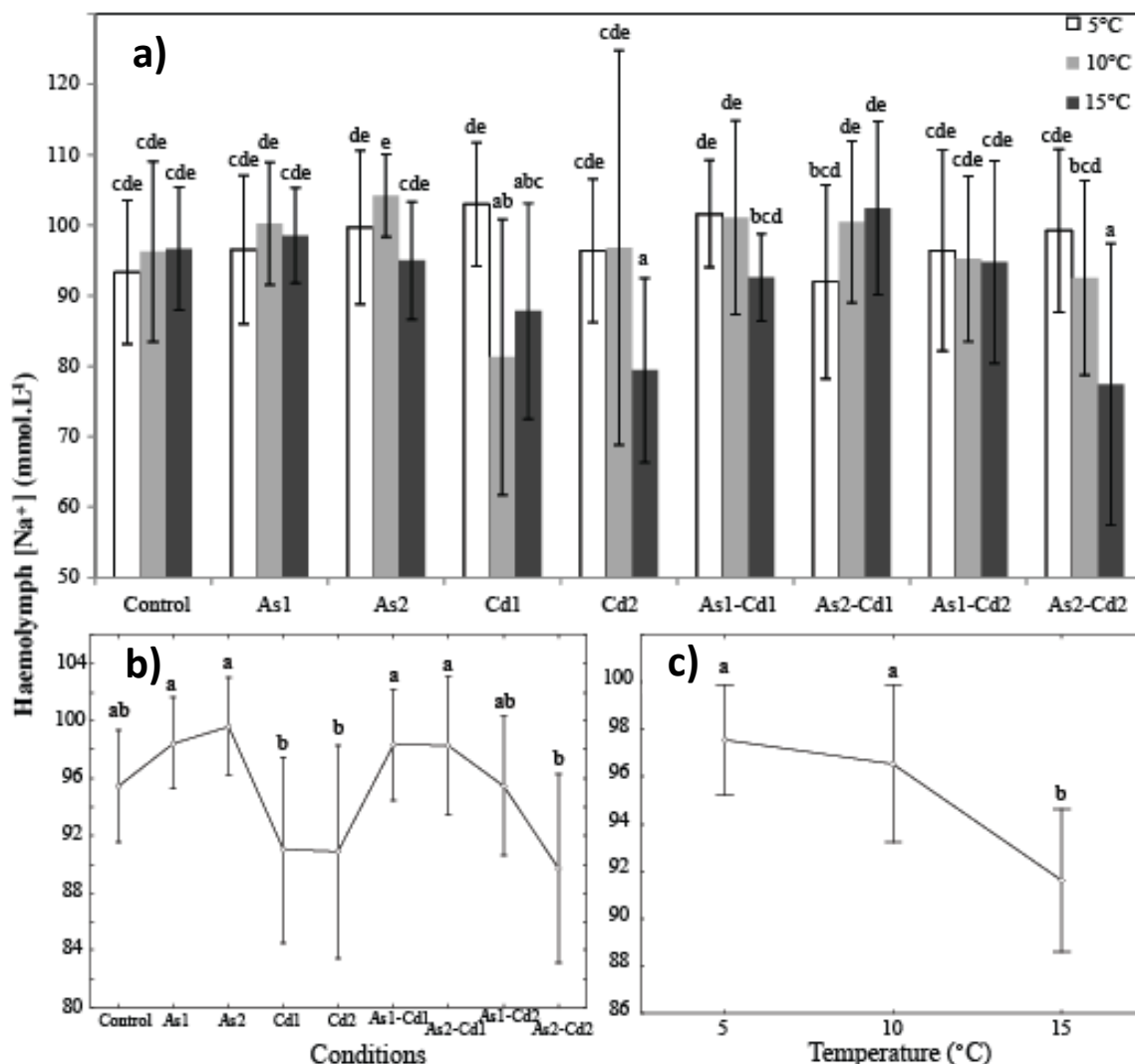


Figure 8. Mean concentrations of haemolymphatic $[Na^+]$ (mmol L⁻¹) in *Gammarus pulex*.

Concentrations obtained for individuals exposed 96 h to different conditions (control, arsenate, cadmium and four binary mixtures) at three temperatures (5-10-15°C).

- a) Temperature x condition effect.** Mean haemolymphatic $[Na^+]$ for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.
- b) Condition effect:** Weighted mean haemolymphatic $[Na^+]$ for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.
- c) Temperature effect:** Weighted mean haemolymphatic $[Na^+]$ for each temperature (results for all the tested conditions were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to e) were used as labels to illustrate significant differences in values of mean haemolymphatic $[Na^+]$ (two-way ANOVAs + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).

conditions, a decrease in both haemolymphatic $[\text{Cl}^-]$ or $[\text{Na}^+]$ was observed with Cd1 at 10°C and Cd2 at 15°C for Na^+ , and with Cd2 at 15°C for Cl^- (Fig. 8a and 9a). Along the $[\text{Cd}]$ gradient, both haemolymphatic $[\text{Na}^+]$ and $[\text{Cl}^-]$ tended to slightly decrease in single exposures, but the differences (except for Na^+ at 10°C) were not significant.

When all the temperatures were simultaneously considered, both the haemolymphatic $[\text{Cl}^-]$ or $[\text{Na}^+]$ of *G. pulex* tended to decrease in mixtures with an increase of only one of the two metals (Fig. 8b and 9b), especially when $[\text{Cd}]$ increased. The Cd exposure led to a higher ionoregulation disturbance than the AsV exposure. For the haemolymphatic $[\text{Cl}^-]$, the difference was only significant between As2Cd2 and the three other mixtures. For Na^+ , the differences were significant between As2Cd2 and As1Cd1 or As2Cd1. Moreover, both haemolymphatic $[\text{Na}^+]$ and $[\text{Cl}^-]$ were lower in binary mixtures containing Cd2 than in binary mixtures containing Cd1 (Fig. 8b and 9b).

The haemolymphatic $[\text{Cl}^-]$ did not vary significantly between As1Cd1 or As1Cd2 and the corresponding single AsV or Cd concentrations (Fig. 9a, b). For As2Cd1, no significant difference was observed with single metal exposure except at 5°C where a loss of $[\text{Cl}^-]$ was observed in comparison to Cd1. For As2Cd2, a significant decrease was observed at 10°C and 15°C in comparison to As2, and at 15°C in comparison to Cd2.

Similar haemolymphatic $[\text{Na}^+]$ were observed in the organisms exposed to As1Cd1 in comparison to As1 or Cd1 alone, except at 10°C where $[\text{Na}^+]$ was higher in As1Cd1 than in Cd1 (Fig. 8a). For the As2Cd1 and As1Cd2 mixtures, no significant difference was observed at 5°C and 10°C in comparison to the corresponding single concentration of AsV or Cd (except for As2Cd1 vs. Cd1 at 10°C). However, at 15°C, a significant increase was observed in comparison to the corresponding single Cd concentrations. For As2Cd2, significant differences were only observed at 10°C and 15°C with a decrease in the haemolymphatic $[\text{Na}^+]$ in mixtures when compared to As2 alone.

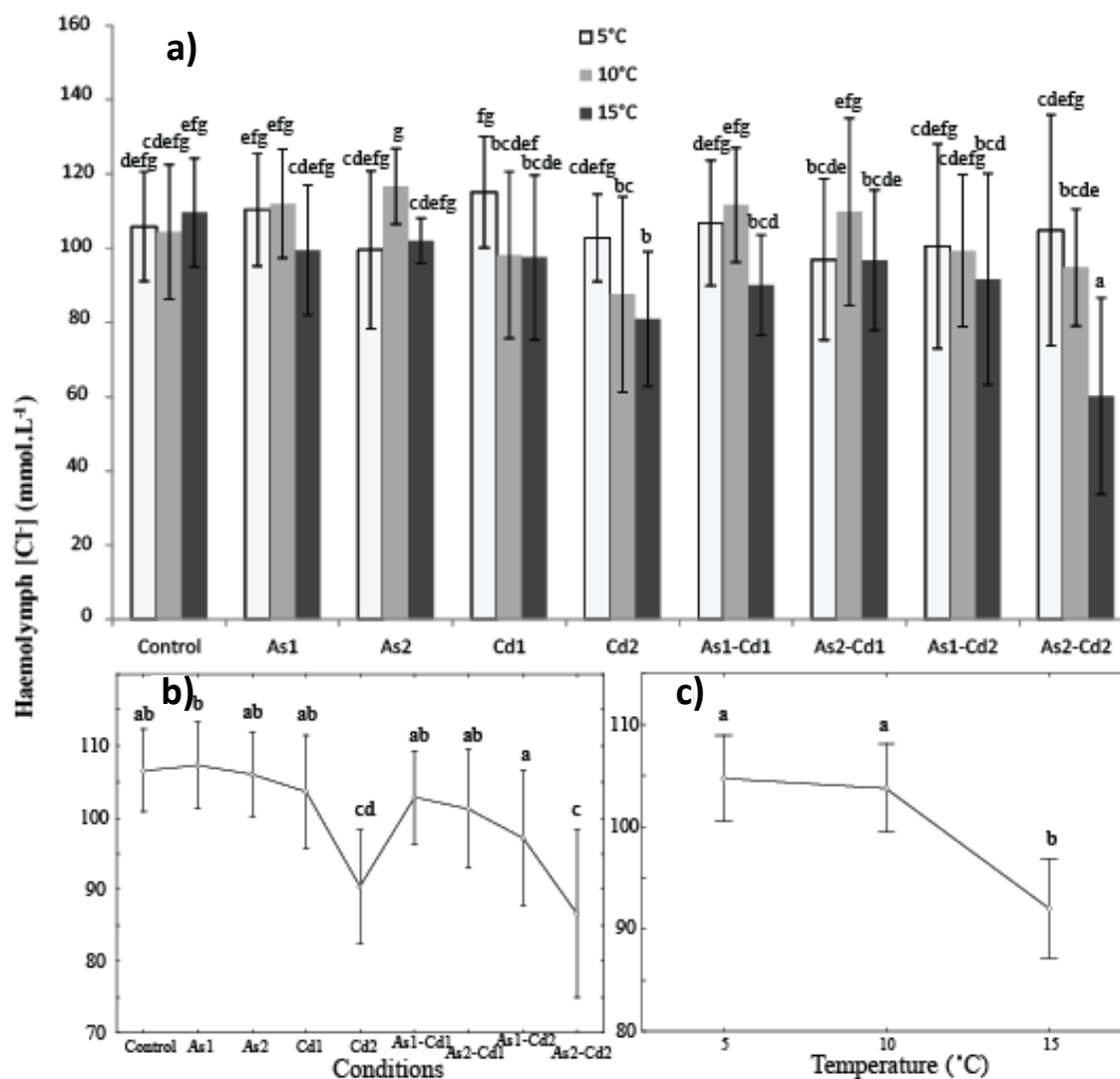


Figure 9. Mean concentrations of haemolymphatic $[Cl^-]$ (mmol L⁻¹) in *Gammarus pulex*. Concentrations obtained for individuals exposed 96 h to different conditions (control, arsenate, cadmium and four binary mixtures) at three temperatures (5-10-15°C).

- a) Temperature x condition effect.** Mean haemolymphatic $[Cl^-]$ for each tested condition and temperature. Vertical bars represent standard deviations.
- b) Condition effect:** Weighted mean haemolymphatic $[Cl^-]$ for each tested condition (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.
- c) Temperature effect:** Weighted mean haemolymphatic $[Cl^-]$ for each temperature (results for all the tested temperatures were combined). Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

Letters (a to g) were used as labels to illustrate significant differences in values of mean haemolymphatic $[Cl^-]$ (two-way ANOVAs + LSD Fisher post hoc tests; at $p < 0.05$ level of significance).

Discussion

Effects of single AsV or Cd exposure

The mortality of *G. pulex* globally increased when individuals were exposed to AsV or Cd in comparison to non-exposed individuals. The mortality rate was external concentration dependent and tended to increase with increasing metal concentration. If compared to non-exposed individuals, *G. pulex* individuals exposed to Cd alone exhibited (i) higher mortality rate, (ii) higher [Cd] in body tissues, (iii) lower behavioural activities (locomotion and ventilation), and (iv) lower haemolymphatic [Na⁺] or [Cl⁻] (i.e. ion loss). The differences significantly increased along the Cd contamination gradient but only for bioconcentration, locomotion and haemolymphatic [Cl⁻]. In the same way, gammarids exposed to AsV alone showed (i) higher [AsV] in body tissues and (ii) lower behavioural activities than non-exposed individuals. The differences were also amplified along an increasing gradient of AsV. In contrary to Cd, the haemolymphatic [Cl⁻] and [Na⁺] in *G. pulex* were not impaired by [AsV].

In accordance with [4] and [54], higher toxicant concentrations (here internal [Cd] or [AsV]) in exposed organism generally increase its mortality. When internal metal concentrations increase, individuals must invest energy in maintenance mechanisms that are highly energy-consuming, such as detoxification, toxicant elimination, homeostasis maintenance (iono-/osmo-regulation), or cellular repairing mechanisms [17,55]. In [56], Thomasson et al. demonstrated that individuals could reallocate a part of the energy, usually used for displacement or ventilation, into maintenance mechanisms; giving potential explanation of the lower ventilation and/or locomotion responses of *G. pulex* exposed to Cd or AsV when compared to non-exposed organisms. The competition between AsV and phosphate can alter phosphorylation reactions within electron transport chain or glucose metabolism [57-60]. This mimetic effect could theoretically impede glucose metabolism and disrupt energy production [61]. Thus, Vellinger et al. [19] assumed that gammarids allocate more oxygen to energetic metabolism when subjected to AsV contamination. A hyperventilation of *G. pulex* was observed when individuals were exposed 10 days at the lowest tested AsV concentration (821 $\mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$), because this hyperventilation induced energetic benefit probably exceeded its energetic cost. In addition, a hypoventilation was observed at the highest AsV concentration tested ($> 1000 \mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$), which reduced energy depletion due to active movements, the energetic cost of movements being assumed to be higher than their energetic benefit.

The ventilation response can be separated into two steps depending on the duration and intensity of exposure [62]. First, the organisms hyperventilate to compensate respiration and/or osmoregulation alteration (compensation). Second, the organisms hypoventilate, when they are close to death. In this study, *G. pulex* could reduce both its ventilation and locomotion rates when exposed to Cd or AsV alone because (i) the energetic balance between cost and benefit was negative, and/or (ii) the metal altered gill structure and functioning (i.e. higher metal impact under higher ventilation rate), and/or (iii) organisms had no more energy (exhaustion), and/or (iv) individuals reduced their locomotion to save oxygen consumption and preserve their energy stock. However, the observed decrease in both pleopod beats and locomotion could be simply due to the direct metal toxicity leading to a worse physiological state of the exposed individuals (e.g. cellular and/or molecular damages due to lysosomal membrane disruption or lipoperoxidation). Hence, in the case of AsV, Thomas *et al.* [63] and Vahter [64] demonstrated that the absorbed AsV was readily reduced to arsenite, a more toxic form of arsenic, inducing a worse physiological state.

A decrease in haemolymphatic $[Na^+]$ and $[Cl^-]$ was observed only in *G. pulex* exposed to single [Cd] during 96 hours. Although a direct effect of metals cannot be excluded, the reduction in locomotor and ventilatory activities seems to be induced by the redirection of energy for osmoregulation compensation mechanisms, such as Na^+/K^+ -ATPase activity (increasing number per surface of ionocytes), directly linked to energetic pathways [17].

Several studies have shown that (i) osmoregulation represents a good tool for evaluating the physiological state of crustaceans, and (ii) stress (e.g. water-borne pollutants, pathological agents or environmental stressors) usually leads to disturbance in Na^+ and Cl^- regulation and/or in osmoregulatory capacity [17,29,65]. The effects of AsV on iono-/osmo-regulation are little documented while they have been well studied for Cd, even if reported patterns are contrasted. In coherence with our results, losses of Na^+ and Ca^{2+} were reported in the rainbow trout [66] and in the crab *Eriocheir sinensis* [67] exposed to Cd. In contrast, other studies reported no effects of Cd exposure on haemolymphatic $[Na^+]$ or $[Cl^-]$ while hypocalcemia was found (e.g. in *Oreochromis mossambicus* [68] and in *G. pulex* [17]). As suggested by Felten *et al.* [17], “between authors” differences could be explained by differences in experimental design (e.g. Cd concentration, water exposure and/or exposure time): exposure to high [Cd] ($\geq 125 \mu g L^{-1}$), in the tested conditions used in [17] leads to haemolymphatic Na^+ loss (Felten, unpublished results).

Three non exclusive hypotheses could explain the impact of Cd on iono-osmoregulation processes and the absence of AsV impact. First, different routes of entrance exist between the

two metals: gills represent the major site of Cd penetration, while the main way of AsV entrance in *G. pulex* was drinking water (see [19]). Metal-binding ligands in gills can be considered as a secondary entrance route of AsV. As gills represent a specialized organ in water and ion transports, it is likely that Cd disrupts more iono-osmoregulation processes than AsV does. Second, the metal capacity to bind with Na⁺/K⁺-ATPase, i.e. the driving force for active Na⁺ uptake across gill epithelium [28], would be different. Brooks and Mills (2003, [32]) have shown that copper could inhibit this enzyme, by interfering with -SH groups on Na⁺/K⁺-ATPase. As Na⁺ in haemolymph was reduced in presence of Cd (but not with AsV), Cd could probably inhibit the Na⁺/K⁺-ATPase whereas AsV could not. Third, Cd can compete with calcium for the same binding site thanks to a similar radius between Cd²⁺ and Ca²⁺ [69] whereas AsV could not. Even if the haemolymph calcium concentration was not studied in this paper, we suspected that Cd could induce the inhibition of calcium absorption and its transport at intracellular level as already demonstrated [8, 17, 70].

Effects of binary mixture of AsV and Cd

In this study, the mode of action of the tested binary mixtures on the mortality of *G. pulex*, was considered as 'additive', except As1Cd1 at 10°C for which an 'antagonistic' mode of action of the metals was evidenced. An antagonistic effect was already observed on the mortality rate of *G. pulex* simultaneously exposed to AsV and Cd during 10 days at 10°C, but for all the tested concentration combinations [71]. This antagonistic effect was less marked with the highest tested concentration combination (i.e. 28.5 µg_{Cd} L⁻¹ and 1502 µg_{AsV} L⁻¹). Such differences could be explained by differences (i) in exposure time (96h *vs.* 240h), and/or (ii) in tested concentrations of each metal in binary mixture which were higher in the present study (26.9 – 51.1 µg_{Cd} L⁻¹ *vs.* 1.9 – 28.5 µg_{Cd} L⁻¹ for Cd concentration range; 1214 - 1695 µg_{AsV} L⁻¹ *vs.* 274.7 - 1502 µg_{AsV} L⁻¹ for arsenate concentration range) than in [71].

In accordance with [62], the relationships between the tested parameters in binary mixtures were less clear than in single metal exposures. For example, in As1Cd2, the [AsV] in body tissues tended to be lower than in single metal exposure while no effect on (i) mortality, and (ii) both locomotion and ventilation were observed when compared to As1 condition (Table 3). This suggests that all these biological parameters have to be considered together to efficiently understand the effects of metal mixtures on the model species (Fig.10).

In binary mixtures, many authors have shown that one metal could modify the uptake of the other, which is enhanced [72] or inhibited [71,73,74] . In other cases, the metal uptake can be

unchanged by the presence of the second metal [75]. When combining all the tested temperatures, our results indicated either an increase or a decrease in body tissue metal concentration when compared to single-metal exposures, suggesting either enhancement or inhibition of metal accumulation.

At 10 and 15°C, the presence of Cd2 in As2Cd2 mixture had adverse effects on both haemolymphatic $[Na^+]$ and $[Cl^-]$ (Table 3) when compared to As2 effects. Indeed, the haemolymphatic $[Cl^-]$ decline, not significant in As2Cd1, became significant in As2Cd2. Similarly, no effect of Cd1 was demonstrated on haemolymphatic $[Na^+]$ while a significant $[Na^+]$ decline was observed with Cd2. In contrast, the presence of AsV in mixtures with Cd1, seems to have a protector effect on the regulatory capacity of Na^+ , with internal $[Na^+]$ concentrations close to those observed in the control conditions and higher than those observed in the individuals only exposed to Cd1. However, the “protector effect” of AsV decreased in mixtures with Cd2. Such results could be explained by an increasing alteration of gill structure (and then an increasing mortality) when the external Cd concentration increases in binary mixtures.

The "protector effect" of AsV on Na^+ ionoregulation could be related to common uptake routes (cf. metal binding proteins in gill surface; [19]). Indeed, if metal binding in gill surface represents a minor way of AsV entrance and a major way of Cd entrance, the two metals could theoretically interact during the branchial uptake. It is likely that AsV would prevent Cd from inhibiting the Na^+/K^+ -ATPase activity but the mechanism of action remains unknown. The weak AsV "protector effect" on Na^+ regulation in mixtures containing Cd2 could be explained by (i) higher internal concentration of Cd compared to internal concentration of AsV and (ii) stronger impact of Cd2 on gill structure in *G. pulex*.

AsV and Cd have adverse effects on both locomotion and ventilatory activities in binary mixtures. These effects were more marked for locomotion than for ventilation. Such behavioural modifications could be a strategy for allocating more energy to maintenance functions. However, as the mechanisms of AsV and Cd toxicity (when alone) seem to be different, the organisms exposed to the binary mixture have to detoxify each metal; individuals reducing both locomotion and ventilation activities when compared to individuals subjected to single metal contamination. We hypothesized that the observed behavioural responses could be caused, at least partly, by a higher impact of combined metals on gill integrity.

Table 3. Synthesis of the physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* in binary mixtures in comparison to single corresponding concentrations of arsenate or cadmium (results for all the tested temperatures were combined). 'NE': No effect; '-': significant decrease; '+': significant increase; 'T-': decrease tendency (but not significant); 'T+': increase tendency (but not significant).

Mortality		Concentration in body tissues		Locomotion		Ventilation		Na+ in haemolymph		Cl- in haemolymph	
AsV	Cd	AsV	Cd	AsV	Cd	AsV	Cd	AsV	Cd	AsV	Cd
NE	T-	-	NE	+	NE	-	NE	NE	+	T-	T-
T+	T+	+	NE	-	-	-	T-	NE	+	T-	T-
+	T+	-	+	-	-	T-	T-	T-	T+	-	+
+	+	T+	T+	-	-	-	-	-	NE	-	T-

Temperature effects on *G. pulex* non-exposed to metals

Mortality rate in *G. pulex* was slightly higher at 15°C than at 5 or 10°C. Numerous studies reported that changes in temperature may affect metabolic rate, locomotion or feeding activities, thus modifying uptake, elimination and detoxication rates [13,76,77].

In this study, only changes in behavioural responses were observed; locomotion and ventilatory activities increasing with rising temperature. At 5°C, the metabolism rate was reduced and consequently both locomotion and pleopod beats decreased while osmolality was maintained. Wijnhoven et al. [78] suggested an increasing ventilatory activity of *G. pulex* with rising water temperature because of both higher metabolic rate and depletion in the concentration of dissolved oxygen in the water. Consequently, at 15°C the high *G. pulex* activity requires more dissolved oxygen; leading to an increase in ventilatory activity.

Temperature effects on *G. pulex* exposed to AsV or/and Cd

Along the temperature gradient, the mortality of *G. pulex* only exposed to AsV did not vary significantly whereas the mortality of individuals only exposed to Cd tended to gradually increase. At both 5 and 10°C, the mixtures of Cd and AsV most often induced a lower toxic effect in *G. pulex* than at 15°C. The mode of action of such binary mixtures was considered as 'additive', except for As1Cd1 at 10°C which was considered as 'antagonistic'.

Bat et al. [6] already demonstrated a positive correlation between warming stress and Cd in *G. pulex*. Because the major differences in toxicity were observed for ventilation and physiological parameters between 5 and 15°C, we focused on the interpretation of such differences. The effects of both individual AsV or Cd exposure and thermal stress on *G. pulex* physiological and behavioural parameters may be viewed as a "snowball" effect. Several reviews examining the effects of interactions between temperature and chemicals on aquatic

biota [13,14,79,80] reported that an increasing temperature mostly enhances the toxic effect. These authors have also demonstrated that an increasing mortality was often related to an increasing metal uptake and accumulation by the organisms. This higher metal accumulation may be partially explain by changes in speciation and increasing metal bioavailability due to higher solubility of metal compounds, and then higher free ionic metal concentration at elevated temperature [7,8,81]. Sokolova and Lannig [10] suggested that metal transport, membrane permeability and systemic functions (e.g. ventilation) can affect temperature-dependent changes in metal uptake and/or elimination. In both single and combined exposures, an increase in temperature enhanced the Cd concentration in body tissues (except for As1Cd1), but no significant temperature impact on AsV concentration in body tissues was demonstrated. Unsurprisingly, the decline in both haemolymphatic $[Na^+]$ and $[Cl^-]$ was amplified when individuals were exposed to both (i) single Cd concentration and thermal stress or (ii) metal mixture and thermal stress, if compared to individuals only exposed to Cd (except As2Cd1 vs. Cd1). Furthermore, no significant effect on $[Na^+]$ and only weak effect on $[Cl^-]$ in haemolymph were observed in *G. pulex* exposed to (i) only AsV and thermal stress, or (ii) metal mixture and thermal stress if compared to individuals only exposed to AsV. In contrast, the ventilatory activity in single or combined metal exposures increased between 5 and 15°C. The ectothermically driven rates of metabolism increase with temperature due to higher energy demand [82]. Consequently, a simultaneous exposure to a given metal (AsV or Cd) and an elevated temperature can increase the oxygen demand of gammarids [83]. In such conditions, *G. pulex* survival needs to achieve enough oxygen to maintain vital functions, e.g. via hyperventilation, even if high energy allocation in this activity had detrimental effects on detoxification, metal elimination or iono-osmoregulation processes. Finally, the lower locomotion of *Gammarus* individuals exposed to both AsV and thermal stress could be linked to a strategy of oxygen consumption reduction. However, the locomotion response was less clear when *G. pulex* was exposed to both Cd and thermal stress. Lannig et al. [84] showed a decline in the mitochondrial capacity to synthesize ATP in the oyster *Crassostrea virginica* when exposed to both Cd and thermal stress. We can hypothesize that this process is also relevant for *Gammarus* exposed to both AsV and thermal stress. Indeed, the competition between AsV and phosphate is temperature-dependent [85]. Thus, this process, in addition to hypoxia driven electron reduction in the mitochondrial chain, could affect the production of ATP. This energetic, oxygen-consuming, metabolism could explain both hyperventilation and mobility reduction in organisms exposed to the combined effects of temperature and metals.

alone. This decline was amplified when the internal metal concentration of *G. pulex* increased. Such pattern could be a strategy to allocate more energy to within-organism detoxification, elimination or iono-osmoregulation processes in the face of metallic stress. However, we cannot exclude some damages on gills caused by both AsV and Cd even if they would probably be less important for AsV than for Cd, taking into account the already observed (and better known) Cd -related damages.

Effects of binary mixture of AsV and Cd

Our results suggested an additive effect of AsV and Cd on the mortality of *G. pulex* for all the tested binary mixture conditions, except As1Cd1 at 10°C. This additive effect of metals in binary mixture was first caused by the individual toxicity of each metal, explaining why toxicity in mixture increased along the AsV (or Cd) gradient for a given concentration of Cd (or AsV). The interactions between the two metals also contributed to this metal additive effect, enhancing or reducing the mixture toxicity on *G. pulex*. The toxicity effects of binary mixtures on haemolymphatic [Cl⁻] increased in gammarids with increasing Cd concentration if compared to the effects observed in gammarids exposed to only AsV. Moreover, mutual synergistic effects of the two metals were especially significant on both locomotion and ventilation. Finally, AsV inhibited the toxicity of the lowest tested Cd concentration because of a "protector effect" on Na⁺ regulatory capacity.

Effects of temperature

An increase in temperature is able to cause a depletion of dissolved oxygen in water and the presence of metals (alone or in mixture) can amplify the oxygen depletion effects. Hypoxia in organisms could lead to a reduction of electrons in the mitochondrial chain and affect ATP production. Because arsenate competes with phosphate in respiratory metabolism, ATP production could be more impaired in *G. pulex* exposed to both AsV and warming stress than in individuals exposed to both Cd and warming stress. However, increasing temperature enhanced Cd accumulation but not AsV accumulation in exposed organisms. The increase in both metal accumulation and hypoxia can induce oxidative stress. To survive, *G. pulex* should hyperventilate to satisfy its oxygen demand. Finally, locomotion was reduced to preserve both oxygen and energy. The increase in Cd accumulation - while internal AsV concentration remained stable - with increasing temperature also conducted to more severe depletion in the haemolymphatic [Na⁺] and [Cl⁻] of *G. pulex* exposed to only Cd or to AsV and Cd binary mixture. Finally, osmolality and/or oxygen demand could explain

why the rise in temperature increased the mortality of *G. pulex* exposed to a single metal or to a binary mixture.

Conclusion and perspectives

To better understand the combined effects of both pollutant cocktails and additional stress, including changes in temperature, it is first necessary to study the individual impact of each toxicant for each temperature. Except the antagonistic effect of the mixture combining the lowest concentrations of AsV and Cd at 10°C, the mode of action of binary mixtures on the mortality of *G. pulex* was considered as additive. In single AsV or Cd exposure, the mortality and internal [AsV] or [Cd] in *G. pulex* were external concentration-dependent. However, these relationships were less clear for binary mixtures. Single cadmium exposure decreased the haemolymphatic [Na⁺] and [Cl⁻] in *G. pulex* while arsenate exposure had no effect on the regulation of [Na⁺] and [Cl⁻]. In binary mixtures, the presence of arsenate seemed to have a “protector” effect on the loss of haemolymphatic Na⁺ due to the cadmium effect. Behavioural activities decreased when *G. pulex* was exposed to AsV or Cd alone. This reduction was amplified in binary mixtures, suggesting a reallocation of energy from behavioural responses to maintenance functions. Finally, the observed physiological and behavioural effects (except ventilation) in *G. pulex* exposed to AsV and/or Cd were exacerbated under the highest (but ecologically realistic) temperature tested. For all the tested conditions, the rise in temperature probably increased the oxygen demand in *G. pulex*, leading to a higher toxicity due to a mismatch between the oxygen demand and the energetic reallocation from ventilatory activity to maintenance functions. These results suggest that in summer or spring, *G. pulex* would be more vulnerable to metals, alone or in mixture. In the same way, at broader temporal scale, climate changes, including global warming, combined with metal contamination of aquatic ecosystems, could accelerate the decline or extinction of *Gammarus* populations, a key species in macrobenthic assemblages, potentially leading to severe alteration in ecosystem functioning. To go further, two main aspects need to be explored. First, we should investigate the mechanisms that can explain the differences in the resulting effects of the interaction between these two metals, depending on their concentrations and the environmental temperature, in particular at low metal concentrations. Second, we would like to examine if the observed effects subsist when gammarids are exposed to mixtures combining metals in a lower range of concentrations, i.e. more likely to be observed in a high number of freshwater ecosystems subjected to anthropogenic pressures. A multimetric approach should be selected combining the measure of both metal concentrations in the

model species with several biomarkers and their toxic effects in organisms. Including markers of oxidative stress, at the crossroad of different metabolic pathways, seems to be a good strategy when the toxicant stress impairs gills, leading to energy reallocation and ionoregulation disruption. To better understand the effects of cocktails of pollutants in a context of global change further researches should be also devoted to the evaluation of (i) specific enzymatic activities and (ii) involved metabolic pathway impairments during cellular responses, taking into account temperature fluctuations and extreme event frequency.

- [1] Markich SJ, Brown PL (1998) Relative importance of natural and anthropogenic influences on the fresh surface water chemistry of the Hawkesbury Nepean River, South-Eastern Australia. *Sci Total Environ* 217: 201-230.
- [2] Zhang H, Shan B (2008) Historical records of heavy metal accumulation in sediments and the relationship with agricultural intensification in the Yangtze-Huaihe region, China. *Sci Total Environ* 399(1-3): 113-120.
- [3] Marking LL (1985) Toxicity of chemical mixtures. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation Washington DC. pp 164-176.
- [4] Spehar RL, Anderson RL, Fiandt JT (1978) Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic invertebrates. *Environ Pollut* 15(3): 195-208.
- [5] Wright DA, Welbourn PM (1994) Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ rev* 2(2): pp. 187-214.
- [6] Bat L, Akbulut M, Çuhla M, Gündoğdu A, Satılmış HH (2000) Effect of temperature on the toxicity of zinc, copper and lead to the freshwater amphipod *Gammarus pulex pulex* (L., 1758). *Turk J Zool* 24: 409-416.
- [7] Worms I, Simon DF, Hassler CS, Wilkinson KJ (2006) Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie* 88: 1721-1731.
- [8] Rainbow PS (2007) Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. *Environ Int* 33 (4): 576-582.
- [9] IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), (2007) Fourth assessment report. Cambridge University Press, New York
- [10] Sokolova IM, Lannig G (2008) Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Res* 37:181-2001.
- [11] Willmer P, Stone G, Johnston I (2000) *Environmental physiology of animals*. Blackwell Science, Oxford.
- [12] Hochachka PW, Somero GN (2002) *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford University Press. 478p.
- [13] Cairns J, Heat AG, Parker BC (1975) The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia* 47: 135-171.
- [14] Heugens EHW, Hendriks AJ, Dekker T, Van Straalen NM, Admiraal W (2002) A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol* 31 (3): 247-284.
- [15] Walther G, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C et al. (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416: 389-395.
- [16] Easterling DR, Evans JK, Groisman PYA, Karl TR, Kunkel KE et al. (2000) Observed variability and trends in extreme climate events: A brief review. *B Am Meteorol Soc* 81 (3): 417-425
- [17] Felten V, Charmantier G, Mons R, Geffard A, Rousselle P et al. (2008a) Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquat Toxicol* 86: 413-425.
- [18] Gismondi E, Rigaud T, Beisel JN, Cossu-Leguille C (2012) Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a Gammarid. *Environ. Pollut.* 160: 17-23.
- [19] Vellinger C, Parant M, Rousselle P, Immel F, Wagner P et al. (2012) Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*). *Environ. Pollut.* 160: 66-73.
- [20] Kunz PY, Kienle C, Gerhardt A (2010) *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests. *Rev Environ Contam Toxicol* 205: 1-76
- [21] Adam O, Badot PM, Degiorgi F, Crini G (2009) Mixture toxicity assessment of wood

preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Ecotox Environ Saf* 72: 441-449.

[22] Alonso A, De Lange HJ (2010) Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *Gammarus fossarum*. *Ecotoxicology* 19: 133-140.

[23] McNeil C, Dick JTA, Elwood RW (1997) The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea; Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biol Rev* 72: 349-364.

[24] Forrow DM, Maltby L (2000) Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environ Toxicol Chem* 19 (8): 2100-2106.

[25] Kelly DW, Dick JTA, Montgomery WI (2002) The functional role of *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? *Hydrobiologia* 485: 199-2003.

[26] Wicklund Glynn A, Norrgrenb L, Müssenera A (1994) Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Aquat toxicol* 30 (1):13-26.

[27] Henry RP, Wheatly MG (1992) Interaction of respiration, ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *Am. Zool.* 32: 407-416.

[28] Péqueux A (1995) Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 15 (1): 1-60.

[29] Lignot JH, Spanings-Pierrot C, Charmantier G (2000) Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191: 209-245.

[30] Mantel LH, Farmer LL (1983) Osmotic and ionic regulation, in: Mantel, L.H. (Ed.) (1983). *The biology of Crustacea: 5. Internal anatomy and physiological regulation. The biology of Crustacea*, pp. 53-161

[31] Johnson IT, Jones MB (1990) Effect of zinc on osmoregulation of *Gammarus duebeni*

(Crustacea: Amphipoda) from the estuary and the sewage treatment works at Looe, Cornwall. *Ophelia* 31 (3): 187-196

[32] Brooks SJ, Mills CL (2003) The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Comp Biochem Physiol Part A* 135: 527-537.

[33] Felten V, Guerold F (2004) Haemolymph [Na⁺] and [Cl⁻] loss in *Gammarus fossarum* exposed in situ to a wide range of acidic streams. *Dis. Aquat. Org.* 61:113-121.

[34] Sutcliffe DW (1984) Quantitative aspects of oxygen uptake by *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): a critical review. *Freshw Biol* 15 (5): 443-489.

[35] Wallace WG, Estephan A (2004) Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). *Aquat Toxicol* 69 (3): 289-297

[36] Mills CL, Shukla DH, Compton GJ (2006) Development of a new low cost high sensitivity system for behavioural ecotoxicity testing. *Aquat Toxicol* 77, 197-201.

[37] Lawrence AJ, Poulter C (1998) Development of a sub-lethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*. *Water Research* 32, 569-578.

[38] Felten V, Guerold F (2001) Hyperventilation and loss of hemolymph Na⁺ and Cl⁻ in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* exposed to acid stress: a preliminary study. *Dis. Aquat Org* 45: 77-80.

[39] Maltby L, Clayton SA, Wood RM, McLoughlin N (2002) Evaluation of the *Gammarus pulex in situ* feeding assay as a biomonitor of water quality: robustness, responsiveness and relevance. *Environ Toxicol Chem* 21: 361-368.

[40] Scott GR, Sloman KA (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: interating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat Toxicol* 68, 369-392.

- [41] Kungolos A, Samaras P, Sakellaropoulos GP (1997) Evaluation of the interactive effect of chemicals on aquatic organisms, using a method based on the theory of probabilities. In "Proc. Int. Conf. Water Pollution IV", (R. Rajar and C.A. Brebbia eds.) Computational Mechanics Publication, Southampton, UK. pp. 107-114.
- [42] Kungolos A, Samaras P, Kipopoulou AM, Zoumboulis A, Sakellaropoulos GP (1999) Interactive toxic effects of agrochemicals on aquatic organisms. *Water Sci Technol* 40 (1): 357-364.
- [43] Bollache L, Gambade G, Cézilly F (2001) The effects of two acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus*, on pairing success in male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Behav Ecol Sociobiol* 49: 293-303.
- [44] Devin S, Piscart C, Beisel JN, Moreteau JC (2003) Ecological traits of the amphipod invader *Dikerogammarus villosus* on a mesohabitat scale. *Arch. Hydrobiol.* 158 (1): 43-56.
- [45] Vindimian E, Robaut C, Fillion G (1983) A method for cooperative or noncooperative binding studies using nonlinear regression analysis on a microcomputer. *J Appl Biochem* 5 (4-5): 261-268.
- [46] Vindimian E, Garric J, Flammarion P, Thybaud E, Babut M (1999) An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic tests and expert judgements. *Environ Toxicol Chem* 18 (10): 2386-2391.
- [47] Isnard P, Flammarion P, Roman G, Babut M, Bastien P et al. (2001) Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere* 45: 659-669.
- [48] Kungolos A, Hadjispyrou S, Petala M, Tsiroidis V, Samaras P, Sakellaropoulos GP (2004) Toxic properties of metals and organotin compounds and their interactions on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Water Air soil Pollut* 4 (4-5): 101-110.
- [49] Kungolos A, Emmanouil C, Tsiroidis V, Tsiropoulos N (2009) Evaluation of toxic and interactive toxic effects of three agrochemicals and copper using a battery of microbiotests. *Sci Total Environ* 406 (16): 4610-4615.
- [50] Hadjispyrou S, Kungolos A, Anagnostopoulos A (2001) Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin, cadmium, and chromium on *Artemia franciscana*. *Ecotoxicol Environ Saf* 49: 179-186.
- [51] Hervant F, Mathieu J, Barre H, Simon K, Pinon C (1997) Comparative study on the behavioral, ventilatory, and respiratory responses of hypogean and epigean crustaceans to long-term starvation and subsequent feeding. *Comp Biochem Physiol* 118A: 1277-1283.
- [52] Rosas C, Sanchez A, Escobar E, Soto L, Bolongaro-Crevenna A (1992) Daily variations of oxygen consumption and glucose hemolymph level related to morphophysiological and ecological adaptations of Crustacea. *Comp Biochem Physiol* 101A: 323-328.
- [53] Issartel J, Hervant F, Voituren Y, Renault D, Vernon P (2005) Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigean and hypogean crustaceans to different temperatures. *Comp Biochem Physiol, Part A* 141: 1-7.
- [54] McCahon CP, Barton SF, Pascoe D (1990) The toxicity of phenol to the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (L.) during episodic exposure: Relationship between sub-lethal responses and body phenol concentrations. *Arch Environ Contam Toxicol* 19: 926-929.
- [55] Kooijman SALM, Baas J, Bontje D, Broerse M (2009) Ecotoxicological applications of dynamic energy budget theory. In *Devillers, J. (eds.) Ecotoxicology Modeling, Emerging Topics in Ecotoxicology: Principles, Approaches and Perspectives*, 2237-2259.
- [56] Thomasson MA, Johnson ML, Strömberg JO, Gaten E (2003) Swimming capacity and pleopod beat rate as a function of sex, size and moult stage in northern krill *Meganyctiphanes norvegica*. *Mar Ecol Prog Ser* 250: 205-213.
- [57] Gebel T (2000) Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology* 144: 155-162.

- [58] Andrew AS, Warre AJ, Brachowsky A, Temple KA, Klei L, Soucy NV et al. (2003) Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells. *Environ. Health Perspect* 111: 825-835.
- [59] Tseng C (2004) The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicol Appl Pharmacol* 197 (2): 67-83.
- [60] Ghosh D, Datta S, Bhattacharya S, Mazumder S (2007) Long-term exposure to arsenic affects head kidney and impairs humoral immune responses of *Clarias batrachus*. *Aquat Toxicol* 81: 79-89.
- [61] Fattorini D, Regoli F (2004) Arsenic speciation in tissues of the mediterranean polychaete *Sabella spallanzanii*. *Environ Toxicol Chem* 23 (8): 1881-1887.
- [62] Felten V, Charmantier G, Charmantier-Daures, Aujoulat F, Garric J et al. (2008b) Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* exposed to acid stress. *Comp Biochem Physiol, Part C* 147:189-197
- [63] Thomas DJ, Styblo M, Lin S (2001) The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 176:127-144.
- [64] Vahter M (2002) Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 181-182: 211-217.
- [65] Issartel J, Boulo V, Wallon S, Geffard O, Charmantier G (2010) Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Chemosphere* 81: 701-710.
- [66] McGeer JC, Szebedinszky C, McDonald DG, Wood CM (2000) Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquat Toxicol* 50: 231-243.
- [67] Silvestre F, Trausch G, Devos P (2005) Hyper-osmoregulatory capacity of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) exposed to cadmium; acclimation during chronic exposure. *Comp Biochem Physiol, Part C* 140: 29-37.
- [68] Pratap HB, Fu H, Lock RAC, Wendelaar Bonga SE (1989) Effect of waterborne and dietary cadmium on plasma ions of the teleost *Oreochromis mossambicus* in relation to water calcium levels. *Arch Environ Contam Toxicol* 18: 568-575.
- [69] Verbost PM, Flik G, Lock RAC, Wendelaar Bonga SE (1987) Cadmium inhibition of Ca^{2+} uptake in rainbow trout gills. *Am J Physiol* 253: R216-R221.
- [70] Reid SD McDonald DG (1988) Effects of cadmium, copper and low pH on ion fluxes in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can J Fish* 45: 244-253.
- [71] Vellinger C, Parant M, Rousselle P, Usseglio-Polatera P (2012) Antagonistic toxicity of arsenate and cadmium in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*). *Ecotoxicology*. In press.
- [72] Shuhaimi-Othman M, Pascoe D (2007) Bioconcentration and depuration of copper, cadmium, and zinc mixtures by the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotoxicol Environ Saf* 66: 29-35.
- [73] Casini S, Depledge H (1997) Influence of copper, zinc, and iron on cadmium accumulation in the Talitrid amphipod, *Platorchestia platensis*. *Bull Environ Contam and Toxicol* 59: 500-506.
- [74] Bat L, Raffaelli D, Marr IL (1998) The accumulation of copper, zinc and cadmium by the amphipod *Corophium volutator* (Pallas). *J Exp Mar Biol Ecol* 223: 167-184.
- [75] Phillips DJH (1976) The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. effects of environmental variables on uptake of metals. *Mar Biol* 38: 59-69.
- [76] Smit CE, Van Gestel CAM (1997) Influence of temperature on the regulation and toxicity of zinc in *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicol Environ Saf* 37: 213-222.
- [77] Fisher SW, Hwang H, Atanasoff M, Landrum PF (1999) Lethal body residues for pentachlorophenol in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) under varying conditions of

temperature and pH. *Ecotoxicol Environ Saf* 43 (3):274-283.

[78] Wijnhoven S, Van Riel MC, Van Der Velde G (2003) Exotic and indigenous freshwater Gammarid species: physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water. *Aquatic Ecol* 37: 151-158.

[79] Hall LW, Anderson RD (1995) The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota. *Crit Rev Toxicol* 25 (4): 281-346.

[80] Holmstrup M, Bindesbol A, Oostingh GJ, Duschl A, Scheil V et al. (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci Total Environ* 408 (18): 3746-3762.

[81] Luoma SN (1983) Bioavailability of trace metals to aquatic organisms--a review. *Sci Total Environ* 28:1-22.

[82] Pörtner HO (2001) Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften* 88:137-146.

[83] Lannig G, Cherkasov AC, Pörtner HO, Bock C, Sokolova IM (2008) Cadmium-dependent oxygen limitation affects temperature tolerance in eastern oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin). *Environmental, Exercise and Respiratory Physiology* 289 (4): R1338-R1346.

[84] Lannig G, Cherkasov AS, Sokolova IM (2006) Temperature-dependent effects of cadmium on mitochondrial and whole-organism bioenergetics of oysters (*Crassostrea virginica*). *Mar Environ Res* 62 (1): S79-S82.

[85] Bryant V, Newbery DM, McLusky DS, Campbell R (1985) Effect of temperature and salinity on the toxicity of arsenic to three estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma balthica*, *Tubifex costatus*). *Mar Ecol Prog Ser* 24:129-137.

PARTIE II:

LA PROTEOMIQUE : UN OUTIL DE DETECTION PRECOCE D'UNE CONTAMINATION METALLIQUE ?

Les analyses protéomiques différentielles en DiGE ont été réalisées suite à l'expérience 4 [Tableau II.3 (page 73), article 4 (pages 194-227)] sur des individus *G. pulex* mâles exposés 96h à 5°C, 10°C ou 15°C avec les conditions expérimentales suivantes:

- Eau Volvic (individus témoins)
- Arsenate seul (condition As1)
- Cadmium seul (condition Cd1)
- Mélange d'arsenate et de cadmium (Condition As1Cd1)

Cette partie vise à évaluer s'il est réaliste d'utiliser la protéomique comme indicateur précoce d'une contamination métallique en utilisant *G. pulex* comme organisme modèle, et en tenant compte d'un facteur abiotique, la température.

Introduction

Les écosystèmes aquatiques subissent des pressions abiotiques (notamment chimiques) multiples qui se répercutent sur les organismes exposés. Les interactions potentielles entre pressions (notamment toxiques) et le faible niveau d'effet de certaines substances motivent la recherche de biomarqueurs susceptibles de révéler un stress physiologique ou biochimique précoce qui ne peut être mesuré par des analyses physico-chimiques classiques. Une approche préventive des effets des contaminants étant préférable à toute autre démarche, la recherche de biomarqueurs sub-létaux est par conséquent privilégiée depuis plusieurs années. Dans ce contexte, la protéomique comparative, qui compare la cartographie d'expression de protéines dans les tissus, les cellules ou autres liquides corporels d'un organisme-modèle dans une condition « test » définie par rapport à une condition « témoin », pourrait satisfaire aux exigences requises pour une détection précoce et ciblée de l'exposition à un stress chimique. Nous nous proposons de tester, par une méthode de travail originale, l'utilisation potentielle de l'outil protéomique en tant qu'indicateur précoce d'une contamination métallique chez les mâles de *G. pulex*, sous l'influence de trois températures.

Dans cette optique, trois grandes questions ont été abordées:

- Peut-on mettre en évidence de manière fiable une contamination métallique, en s'affranchissant des effets de la température ?
- Peut-on identifier précisément la nature de cette contamination métallique ? Existe-t-il des signatures d'expression protéique spécifiques d'un métal donné (PESs, Shepard et Bradley, 2000) ?
- En mélange binaire, les lots de spots spécifiques d'un métal unique sont-ils observables de manière suffisamment robuste pour être encore interprétables ? Nous avons considéré comme étant robuste toute différence de réponse statistiquement significative par comparaison au témoin, et observée de manière similaire lors d'une exposition métallique (i) simple et (ii) en mélange binaire, des organismes-modèles.

Matériel et méthodes

Les analyses protéomiques différentielles en DiGE ont été réalisées suite à l'expérience 4 (Tableau II.3 et article 4) sur des individus mâles de *G. pulex* exposés 96h à trois températures (5, 10, ou 15°C) avec les conditions métalliques suivantes:

- Sans métaux (Eau Volvic, individus témoins)
- Arséniate seul (condition **As1**= 1213.9 ($\pm$ 104.9) $\mu\text{g}_{\text{AsV}}\cdot\text{L}^{-1}$)

- Cadmium seul (condition **Cd1** = $26.9 (\pm 0.9) \mu\text{g}_{\text{Cd}}.\text{L}^{-1}$)
- Mélange d'arséniate et de cadmium (Condition **As1Cd1**)

Quatre réplicats de chaque condition testée ont été réalisés.

Les différentes cartographies du protéome de *G. pulex* ont permis de mettre en évidence 1984 spots de protéines grâce au logiciel SameSpot. Compte tenu du plan d'expérience réalisé, les quatre volumes normalisés de chaque spot de protéine (correspondant aux 4 réplicats), pour chaque condition expérimentale d'exposition de *G. pulex*, ont été extraits à partir de SameSpot afin de réaliser des tests statistiques de comparaison plus appropriés que celui proposé par ce logiciel. La démarche générale adoptée pour catégoriser les protéines de manière à identifier celles susceptibles de discriminer les effets des métaux (par comparaison aux témoins) indépendamment de la température, est illustrée en figure III.1.

Sur chacun des 1984 spots de protéines, une ANOVA à deux critères de classification (appelée ANOVA II dans la suite du mémoire) a permis de comparer les volumes normalisés, compte tenu du facteur « condition (4 modalités : *T*, *As1*, *Cd1*, *As1Cd1*) » et du facteur « température (3 modalités : 5-10-15°C) ». Le seuil de significativité α a été fixé à 0,05. Les résultats des ANOVA II ont montré que sur les 1984 spots de protéines, 176 présentaient une différence significative dans leurs volumes normalisés moyens sous l'effet de l'interaction entre les deux facteurs « température » et « condition ». Puisque l'objectif final est d'obtenir une méthode efficace d'identification d'un effet « métal » indépendamment de la température d'exposition, ces spots ont été retirés de l'analyse. Parmi les spots restants, (ii) 209 affichaient une réponse significative au facteur « condition », et (iii) 90 au facteur « température ».

Parmi ces 299 spots de protéines, 29 présentaient une différence significative de leurs volumes normalisés moyens à la fois sous les effets des facteurs « température » et « condition ». Nous avons groupé ces 29 spots de protéines dans une nouvelle catégorie appelée facteur « température et conditions » (cf. Figure III.1). Ainsi, 180 protéines (= 209 - 29) montraient une différence d'expression significative sous l'effet de facteur « condition » seul et 61 (= 90 - 29) sous l'effet du facteur « température » seul. Les spots variant significativement sous l'effet « température » seul (61 spots) ont été retirés de l'analyse puisque l'objectif est de s'affranchir des effets de la température.

Dans un premier temps, seuls les 180 spots dont les volumes normalisés moyens étaient significativement modifiés uniquement par le facteur « condition » ont été analysés. Sur les volumes normalisés associés à chacun des 180 spots de protéines fournis par les différents réplicats dans les différentes conditions expérimentales associées à chaque critère de

classification, un test post-hoc HSD de Tukey a été réalisé. Le but de ce test post-hoc était de connaître précisément entre quelles conditions expérimentales se situaient les différences d'expression protéique significatives (l'ANOVA n'étant qu'un test d'homogénéité). Lorsque le test post-hoc identifie une différence significative, la confrontation des volumes normalisés moyens extraits de SameSpot dans les deux conditions expérimentales comparées, a permis de qualifier les protéines de « sur-exprimées » ou « sous-exprimées » suivant le sens de la différence significative.

Les résultats issus de l'application de cette démarche ont été rassemblés dans le tableau III.2 résumant toutes les possibilités d'expression différentielle des protéines entre conditions, chaque profil de réponse étant codé par un numéro unique. Cependant, seules les protéines sous- ou sur-exprimées de manière significative dans au moins une condition testée (As1, Cd1 et/ou As1Cd1) par rapport au témoin ont été conservées dans l'analyse. Elles représentent de ce fait des lots de protéines singulières pouvant potentiellement jouer le rôle de biomarqueur spécifique de la condition testée (PESs).

Il est important de mentionner que lorsqu'un spot de protéine est affilié uniquement à l'effet « condition » par l'ANOVA II, cela veut dire que les volumes normalisés associés à ce spot ne varient pas de manière significative pour une condition d'exposition définie suite à un changement de température. Cependant, ce sont les volumes normalisés obtenus pour les réplicats sur l'ensemble des températures testées qui sont pris en compte lors de l'analyse de l'effet « condition » au cours de chaque ANOVA II. Quand la température change, les volumes des spots de protéines peuvent varier, mais de manière statistiquement non significative, pour une condition définie. Ces légères variations de volume entre conditions peuvent être plus ou moins importantes selon la température testée, de sorte que la différence d'expression d'une protéine entre une condition testée et son témoin peut très bien devenir significative si les données correspondant à une température seulement sont prises en compte. Seules des ANOVA à un critère de classification (ANOVA I ; facteur condition T, As1, Cd1 et As1Cd1) par température testée et par spot de protéines peuvent permettre d'évaluer précisément le « poids » de la température dans l'analyse. Ainsi, sur chaque spot de protéine issu du facteur « condition » (toutes températures testées prises en compte) des ANOVA II, nous avons réalisé des ANOVA I (facteur condition) réalisées pour chacune des températures testées. Le seuil de significativité α a été fixé à 0,05. Ces ANOVA I ont été suivies de tests post-hoc de Tukey. A ce stade de la démarche, si une température parmi les 3 testées montre des différences d'expression des protéines plus nombreuses entre conditions métalliques (As1, Cd1, As1Cd1) et témoin, les spots de protéines exprimés à la fois dans les

facteurs « condition » et « température » peuvent être rattachés à l'analyse, en renouvelant le même type de procédure et en gardant les spots exprimés dans la température choisie.

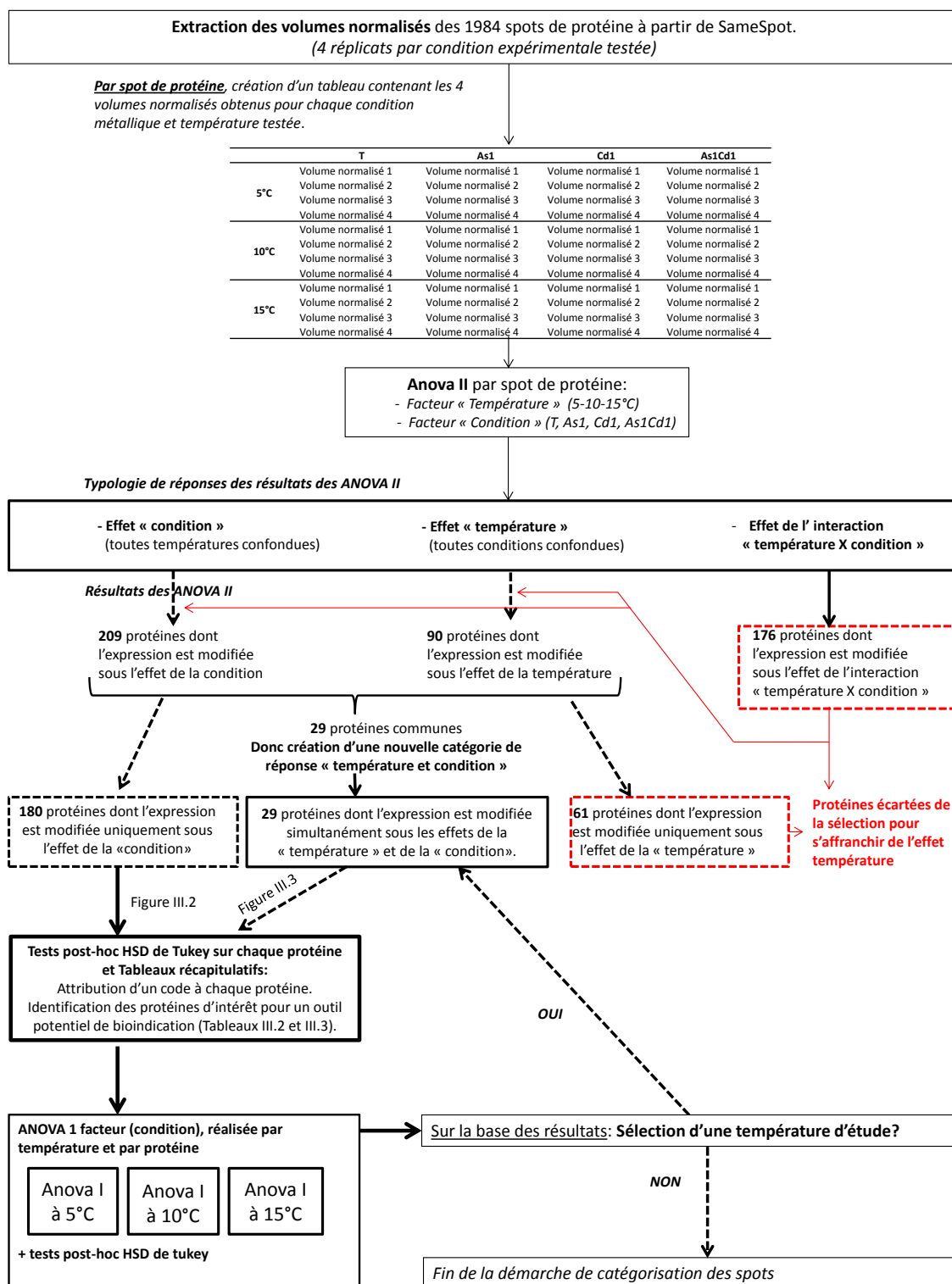


Figure III.1. Démarche utilisée pour catégoriser les protéines de manière à identifier celles susceptibles de mettre en évidence les effets des métaux (par comparaison aux témoins) indépendamment de l'effet de la température. La démarche est appliquée à chaque protéine.

Résultats

Les profils de réponse des 180 protéines exprimées de manière différenciée dans le facteur « condition » des ANOVA II ont été examinées un à un. En tout, 24 profils de réponses ont été différenciés (codés numériquement de 1 à 24 ; cf. Tableau III.2). Ils définissent 24 groupes de protéines dans lesquels les 180 protéines ont été réparties sur la base de leur profil de réponses différencié (Tableau III.2). Par confrontation de ces résultats avec les volumes normalisés moyens, les protéines dont les expressions étaient significativement modifiées d'une condition à une autre ont été qualifiées de « sur-exprimées » ou de « sous-exprimées », mais cette différence pouvait être observée seulement entre As1 et Cd1 par exemple (Tableau III.2).

Tableau III.2. Catégories de combinaisons de résultats obtenues lors de l'analyse des spots d'intérêt potentiel (Tests HSD de Tukey sur le facteur « Condition » des ANOVA II). Chaque colonne présente les résultats de la comparaison de deux conditions d'exposition. Une flèche désigne un sens de variation significatif des volumes normalisés de spots (exemple : As1/control : ↗ signifie que le spot dans As1 est surexprimé par rapport au témoin). NE : non significatif. Chaque type identifié a été codé de 1 à 24.

As1/control	Cd1/control	As1Cd1/control	As1Cd1/As1	Cd1/As1	As1Cd1/Cd1	code of protein spot
↗	NE	↗	NE	NE	NE	1
↗	NE	NE	↘	↘	NE	2
↗	NE	NE	NE	↘	↗	3
↗	NE	NE	NE	↘	NE	4
↗	NE	NE	NE	NE	NE	5
↘	NE	↘	NE	NE	NE	6
↘	NE	NE	NE	↗	↘	7
↘	NE	NE	NE	↗	NE	8
↘	NE	NE	NE	NE	NE	9
NE	↗	↗	↗	NE	NE	10
NE	↗	NE	NE	↗	NE	11
NE	↗	NE	NE	NE	↘	12
NE	↗	NE	NE	NE	NE	13
NE	↘	↘	NE	NE	NE	14
NE	↘	NE	NE	NE	NE	15
↘	↘	↘	NE	NE	NE	16
↘	↘	NE	NE	NE	NE	17
NE	NE	NE	NE, ↘ or ↗	↗	NE, ↘ or ↗	18
NE	NE	NE	NE, ↘ or ↗	↘	NE, ↘ or ↗	19
NE	NE	↗	↗	NE	↗	20
NE	NE	↗	↗	NE	NE	21
NE	NE	↗	NE	NE	↗	22
NE	NE	↗	NE	NE	NE	23
NE	NE	↘	NE	NE	NE	24

Des groupes ont ensuite été créés (Tableau III.3), désignés par des codes alphabétiques, en fonction de la (ou des) condition(s) métalliques pour laquelle (lesquelles) l'expression de la protéine était significativement différente **du témoin**:

- As1 seul: groupe A,
- Cd1 seul: groupe B,
- As1 et Cd1: groupe C,
- aucune condition métallique par rapport au témoin : groupe D,
- mélange binaire As1Cd1 seul: groupe E.

Lorsqu'un spot de protéine était exprimé différemment dans les conditions As1 et /ou Cd1 par rapport au témoin (groupes A, B, C), et que cette différence d'expression était également observée (et dans le même sens) entre le mélange binaire et le témoin, le spot de protéine pouvait être considéré comme un biomarqueur robuste pour le (ou les) métal (métaux) considéré(s) lors d'une contamination métallique binaire (dans nos conditions d'expérience au moins). De plus, lorsqu'une différence d'expression significative de la protéine était observée entre As1 et Cd1, la protéine pouvait être considérée comme discriminante de la nature du métal à l'origine de la contamination (Colonnes 5 des tableaux III.2 et III.3).

Tableau III. 3. Regroupement des spots en fonction de la (ou des) condition(s) métallique(s) où l'expression du spot est significativement différente du témoin. Les groupes ainsi obtenus sont désignés par les lettres A, B, C, D et E. La différenciation de ces groupes repose sur la (i) sur-, (ii) sous- ou (iii) non-expression différenciée du spot par rapport au témoin dans les expositions métalliques simples ou dans le mélange binaire. Les deux dernières colonnes précisent (i) si le spot est exprimé de la même façon dans les expositions simples et en mélange par comparaison au témoin, (ii) si le spot est significativement différent entre As1 et Cd1.

Code of protein spot	Group	Compared to control, spot is significantly expressed in:	Is spot expressed both in single and mixture expositions?	Is the spot discriminant of metal nature?
1	A	As (Over-expressed)	YES	NO
2	A	As (Over-expressed)	NO	YES
3	A	As (Over-expressed)	NO	YES
4	A	As (Over-expressed)	NO	YES
5	A	As (Over-expressed)	NO	NO
6	A	As (Under-expressed)	YES	NO
7	A	As (Under-expressed)	NO	YES
8	A	As (Under-expressed)	NO	YES
9	A	As (Under-expressed)	NO	NO
10	B	Cd (Over-expressed)	YES	NO
11	B	Cd (Over-expressed)	NO	YES
12	B	Cd (Over-expressed)	NO	NO
13	B	Cd (Over-expressed)	NO	NO
14	B	Cd (Under-expressed)	YES	NO
15	B	Cd (Under-expressed)	NO	NO
16	C	As and Cd alone (Under-expressed)	YES	NO
17	C	As and Cd alone (Under-expressed)	NO	NO
18	D	Nothing	NO	YES
19	D	Nothing	NO	YES
20	E	Binary mixture As1Cd1 (Over-expressed)	NO	NO
21	E	Binary mixture As1Cd1 (Over-expressed)	NO	NO
22	E	Binary mixture As1Cd1 (Over-expressed)	NO	NO
23	E	Binary mixture As1Cd1 (Over-expressed)	NO	NO
24	E	Binary mixture As1Cd1 (Under-expressed)	NO	NO

Sur les 180 spots de protéine identifiés comme réagissant de manière significative au facteur « condition » dans l'ANOVA II, une ANOVA I réalisée pour chaque température a permis de montrer des différences d'expression des spots en fonction de la température (Figure III.2).

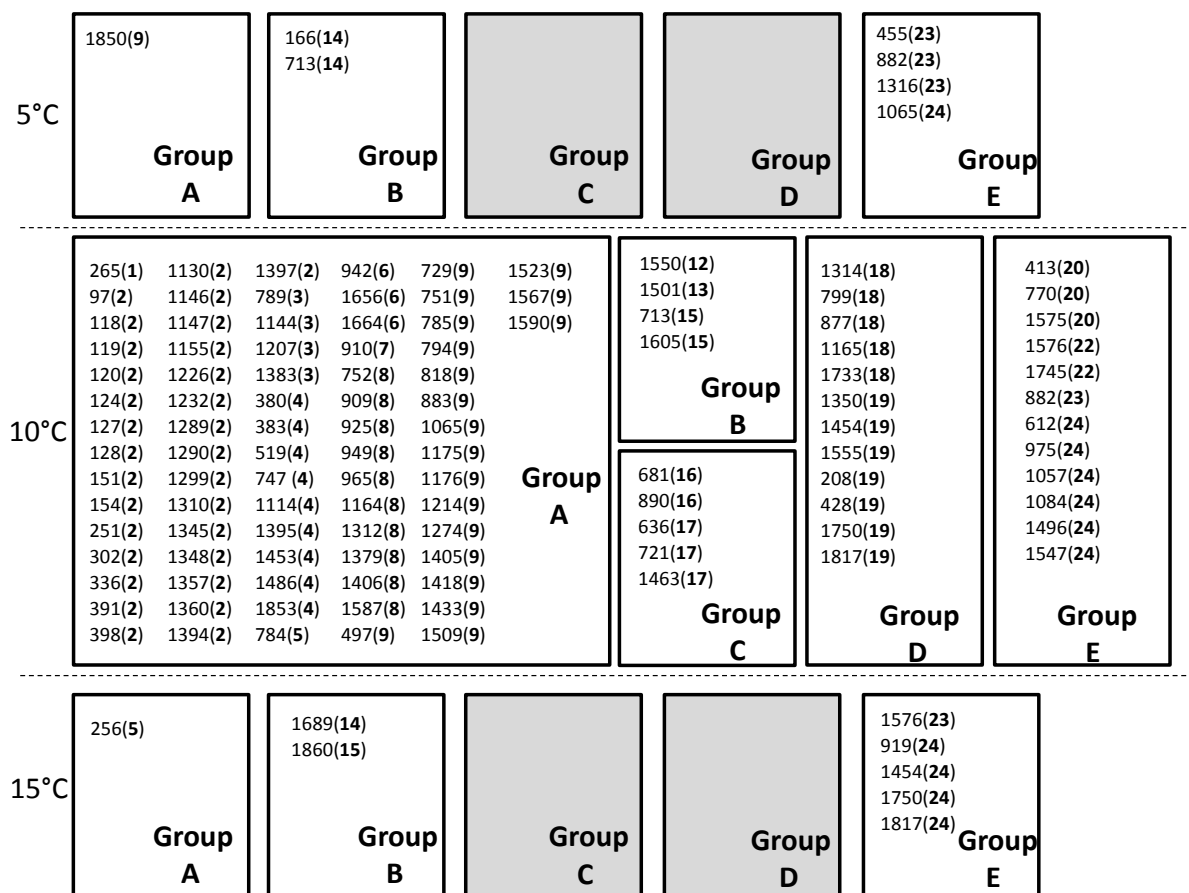


Figure III. 2. Numéros des spots de protéine sélectionnés à l'issue de la synthèse des résultats fournis par l'analyse du facteur « condition » dans chacune des ANOVA II et associés à un effet significatif pour au moins une température compte tenu des résultats fournis par les ANOVA I réalisées par température testée. Le chiffre entre parenthèses est le code numérique assigné au groupe d'appartenance dans la catégorisation décrite dans la figure 1. La signification de chaque code (combinaison des résultats obtenus) est décrite dans le tableau I. Les groupes d'appartenance des spots (A, B, C, D, E) sont décrits dans le tableau III.3.

Un résultat étonnant est que chaque spot de protéine n'a été assigné qu'à un seul groupe pour une seule température, à une exception près (le spot 882, code numérique 23, groupe E à 5 et à 10°C). Quel que soit le groupe considéré (A, B, C, D ou E), le nombre de spots affiliés était supérieur à 10°C par rapport à 5 ou 15°C. Aucun spot affilié aux groupes C et D n'était

ressorti des analyses à 5 et 15°C alors qu'il y en avait respectivement 5 et 12 à 10°C. Le groupe A à 10°C était celui qui comportait le plus grand nombre de spots (78), les groupes suivants les plus importants en incluant seulement 12 (Groupes D et E à 10°C).

Puis, les 29 spots de protéines exprimés à la fois dans les facteurs « condition et température » ont été analysés pour être rattachés aux résultats du facteur « condition » considéré seul (analyses ci-avant). De nouveau, un seul spot a été assigné à deux températures différentes (spot 197, code numérique 11, groupe B à 5 et 1 °C), tous les autres n'étant assignés qu'à une seule température (Figure 3). Quel que soit le groupe considéré (A, B, C, D ou E), le nombre de spots affiliés à un groupe a été supérieur ou égal à 10°C par rapport à 5 ou 15 °C. La température de 10 °C réunit de loin le plus grand nombre de spots, en particulier dans les groupes A, D et E avec respectivement 6, 4 et 5 spots. Les groupes C, D et E à 5°C, ainsi que les groupes A et C à 15°C ne comportent aucun spot.

	A	B	C	D	E
5°C	382 (4) 1308 (4)	197 (11)			
10°C	1279 (2) 1190 (4) 1280 (4) 1252 (6) 987 (9) 1842 (9)	652 (10)	1335 (17) 1336 (17)	1308 (19) 1352 (19) 214 (19) 814 (19)	1473 (20) 454 (23) 546 (23) 1753 (23) 1341 (24)
15°C		197 (11)		1505 (19)	1245 (21)

Figure III.3. Numéros des spots exprimés significativement et simultanément dans les effets « condition et température » des ANOVA II et exprimés de manière significative au sein de chaque groupe à l'issue des ANOVA I réalisées pour chaque température. Le chiffre entre parenthèses est le code numérique assigné à l'issue de la catégorisation décrite dans la figure 1. La signification de chaque code (combinaison des résultats obtenus) est décrite dans le tableau I. Les groupes d'appartenance des spots (A, B, C, D, E) sont décrits au sein du tableau III.3.

En considérant les résultats obtenus à 10°C (Figures 2 et 3), le nombre de spots sur-exprimés dans As1 par rapport au témoin (Groupe A, codes 1 à 4) est de 47 (soit 36 % des spots totaux), le nombre de spots sous-exprimés (Groupe A, codes de 5 à 9) est de 37 (soit 29 % des spots totaux). Parmi ces derniers, 57 spots sont discriminants de la nature du métal [Groupe A, codes (2 -3 -4 -7 -8) ; dernière colonne du tableau II]. Le nombre de spots sur-exprimés dans Cd1 par rapport au témoin (Groupe B, codes 10 à 13) est de 3 (soit 2,3 % des spots totaux), le nombre de spots sous-exprimés (Groupe B, codes 14 et 15) est de 2 (soit 1,5 % des spots totaux). Parmi ces spots, aucun ne discrimine la nature du métal. Les spots qui réagissent aux deux métaux lors d'expositions simples sont systématiquement sous-exprimés et sont au nombre de 7 (soit 5,4 % des spots totaux; Groupe B, codes 16 et 17). Les spots qui différencient As1 et Cd1 sans être significativement différents des témoins sont au nombre de 16 (Groupe D, codes 18 et 19; 12,4 % des spots totaux). Enfin, 10 spots sont sur-exprimés (Groupe E, codes 20 à 23; 7,7 % des spots totaux) et 7 sont sous-exprimés (Groupe E, code 24 ; 5,4% des spots totaux) uniquement dans le mélange par rapport aux témoins.

Quelle que soit la température considérée, aucun spot permettant à la fois de discriminer la nature du métal et répondant de la même manière (par comparaison au témoin) à une contamination métallique simple ou multiple (réponse *Yes*, *Yes* dans les deux dernières colonnes du tableau III.3) n'a été identifié.

Au sein des 24 catégories de spots identifiés, 4 ressortent plus particulièrement à 10°C par le nombre important de spots qui leur sont affiliés : code 2 (31 spots), code 9 (21 spots), code 19 (11 spots), code 8 (10 spots). Les codes 2, 8 et 9 correspondent au groupe A et sont donc significativement exprimés de manière différente dans la condition As1 par rapport au témoin. Le code 19 appartient au groupe D constitué de spots différemment exprimés dans As1 et Cd1, mais pas différents des témoins (réponse *Yes* dans la dernière colonne du tableau III.3).

Seulement 8 spots (6,2 % des spots exprimés à 10°C) peuvent être considérés comme robustes dans le mélange c'est-à-dire s'expriment différemment dans As1 et/ou Cd1 par comparaison au témoin ET s'expriment dans le mélange As1Cd1 de la même manière qu'en contamination simple (toujours par comparaison au témoin) pour le métal pour lequel une différence significative a été identifiée. Parmi ceux-ci, 5 spots appartiennent au groupe A [dont 1 sur-exprimé (code 1) et 4 sous-exprimés (code 6)], 1 seul spot appartient au groupe B (spot sur-exprimé, code 10) et 2 spots appartiennent au groupe C (spots sur-exprimés, code 16).

73 spots (57 % des spots exprimés à 10°C) montrent une différence d'expression entre As1 et Cd1, c'est-à-dire qu'ils permettent de discriminer les deux métaux (dernière colonne du tableau III.3, réponse Yes).

Discussion et Conclusion

- *Limites de la 2D et précautions particulières à prendre en considération avant d'interpréter les résultats obtenus*

Parallèlement à cette étude, et bien que l'objectif initial de l'utilisation de l'outil protéomique dans ce travail doctoral n'était pas d'identifier les protéines, un effort a été conduit dans ce sens. Les résultats d'identification obtenus permettent de donner des informations supplémentaires non négligeables sur les limites de la technique 2D, mais aussi sur les précautions à prendre dans l'interprétation des résultats obtenus dans cette partie. Ce travail d'identification exploratoire a été conduit antérieurement à l'isolement des protéines d'intérêt dans le cadre d'un éventuel outil de bioindication. De ce fait, les spots de protéine identifiés ne correspondent pas forcément à ceux qui ont été mis en évidence dans l'analyse précédente. Le choix des spots de protéine à identifier a été réalisé sur la base des résultats d'analyses de variance à trois critères de classification (ANOVA III): les facteurs « température », « arséniate » et « cadmium » considérés simultanément (Pour plus de précision sur le choix de ces protéines, se référer à l'annexe III). L'identification des protéines a été sous-traitée à l'institut Cochin de Paris. Au total, 264 spots de protéine ont été identifiés.

Les résultats de l'identification par spectrométrie de masse ont été à la fois inattendus et décevants. En effet, la majeure partie des spots de protéines identifiés contenaient un mélange de protéines dont une était systématiquement de l'actine, de la myosine ou de l'hémocyanine (en moindre quantité). L'actine et la myosine sont des protéines musculaires abondantes chez le gammare alors que l'hémocyanine est une protéine qui sert au transport de l'oxygène chez les invertébrés. En regardant la localisation de telles protéines sur le gel 2D, nous avons pu observer que ces protéines étaient réparties sur la totalité du gel. Il semblerait donc que la myosine, l'actine et l'hémocyanine se soient dégradées; cette dégradation générant des peptides de taille inégale qui ont migré sur une bonne partie du gel. Un gel bidimensionnel permet la séparation et la visualisation d'environ 2000 spots (Rabilloud et Lelong, 2011), avec une sensibilité de détection en technique DiGE de 1ng par spot (Ünlü et al., 1997). En conséquence, la présence de protéines abondantes (comme les protéines contaminantes) peut masquer, au moins partiellement, d'autres protéines potentiellement intéressantes pour une telle étude. Ainsi, nous ne pouvons négliger que la

présence des peptides de myosine, d'actine et/ou d'hémocyanine puisse légèrement modifier le volume d'un ou plusieurs spots d'intérêt potentiels. Avant de valider les spots d'intérêt proposés dans le cadre d'un outil de bioindication, il faudra donc tenter de déterminer l'occurrence de ces peptides au sein des différentes conditions expérimentales testées en réitérant les expériences. Si les résultats obtenus montrent que les peptides contaminants issus de la dégradation de certaines protéines sont dégradés de la même manière quelle que soit la condition expérimentale testée, alors les spots d'intérêt sélectionnés dans cette partie pourront être considérés comme valides. Si ces fragments apparaissent de manière spécifique pour une ou plusieurs des conditions expérimentales testées, cela représentera un résultat en soi. Il s'agira alors d'expliquer les mécanismes à l'origine de cette dégradation dans la (ou les) condition(s) expérimentale(s) correspondante(s). Si ces fragments apparaissent aléatoirement dans certaines conditions expérimentales, les résultats obtenus devront être pris avec une grande précaution et un calcul d'incertitude associé au résultat final devra être associé à la méthode de travail. A l'heure actuelle, nous n'avons pas encore pu identifier l'origine de cette dégradation de certaines protéines au cours de la manipulation, l'obtention d'une réponse fiable nécessitant la mise au point et l'application d'un protocole expérimental et coûteux. Quoi qu'il en soit, une première solution permettant de limiter les contaminations peptidiques liées à la dégradation de certaines protéines serait de purifier (par « immunodepletion ») les extraits protéiques issus de l'espèce modèle de ces peptides contaminants.

Outre les peptides contaminants, la plupart des spots contenaient également d'autres protéines (Tableau III.4). Mise à part une protéine de stress général (Heat Shock protein 90, spot numéro 550), une protéine intervenant dans le transport du calcium (sarcoplasmic-calcium binding protein, spot numéro 833 et 1250), et une protéine intervenant dans la réponse anti-oxydante (catalase, spot numéro 1255), les spots de protéine étaient, pour la plupart d'entre eux, associés à des protéines du métabolisme énergétique. Comme le montre le tableau III.4, deux ou plusieurs spots de protéines différents peuvent représenter la même protéine. Le fait que plusieurs spots de protéines aient donné une identification similaire montre que des modifications post-traductionnelles (*e.g.* méthylation, phosphorylation, acétylation, glycosylation) et/ou des dégradations de protéines ont eu lieu (Rabilloud et Lelong, 2011). Nous avons tenté de regarder si ces spots de protéines correspondant à une identification protéique similaire étaient dérégulés de la même façon selon les conditions expérimentales testées. En exemple de résultats, nous avons comparé les spots 882 et 883 qui étaient tous deux identifiés comme correspondant à une arginine kinase.

Tableau III.4. Exemples d'identification de 23 spots de protéine obtenus à l'issue d'une sélection basée sur une réponse significative à l'un ou l'autre des effets isolés ou des interactions testées lors de l'application d'une analyse de variance à trois facteurs de classification (i.e. facteurs « température », « arséniate » et « cadmium ») aux volumes normalisés des spots de protéines obtenus en DiGE-2D. Les résultats obtenus font abstraction de la contamination due aux peptides de myosine, d'actine et/ou d'hémocyanine.

Numéro du spot de protéine	Nom de la Protéine Identifiée ¹	Numéro d'Accès SwissProt ²	Total Ion Score ³	Best Ion Score ⁴	Nombre de Peptides Identifiés ⁵	pI Théor. ⁶	MM Théor. ⁷ (kDa)	% Cov ⁸
369	Similar to aconitase, hypothetical protein [Antheraea yamamai]	gi 28971712	92	92	1	8,5	85	2
380	Succinate-ubiquinone oxidoreductase [Dirofilaria immitis]	gi 1041980	62	62	1	8,5	72	2
521	ATP synthase beta subunit [Chilidia sp. MR-2009]	gi 255733360	261	75	5	5,0	46	15
550	Heat shock protein 90 [Metapenaeus ensis]	gi 150034859	51	32	2	4,9	83	6
756	Vacuolar ATP synthase subunit B K form [Carcinus maenas]	gi 6425061	123	71	2	5,3	54	5
764	F1-ATP synthase beta subunit [Pacifastacus leniusculus]	gi 113204646	580	104	9	5,3	56	22
770	Glutamate dehydrogenase [Ascaris suum]	gi 324506851	75	75	1	8,6	60	2
789	RecName: Full=Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]; Short=PEPCK; AltName: Full=Phosphoenolpyruvate carboxylase	gi 464437	71	71	1	6,3	72	1
794	Arginine kinase [Copelatus distinctus]	gi 189164010	58	37	2	6,7	27	12
833	RecName: Full=Sarcoplasmic calcium-binding protein 1; AltName: Full=Sarcoplasmic calcium-binding protein I; Short=SCP I	gi 134309	139	54	3	4,6	22	13
882	Arginine kinase [Sialis sp. ALW-2008]	gi 189164022	140	55	2	6,5	28	14
883	Arginine kinase [Sialis sp. ALW-2008]	gi 189164022	132	66	3	6,5	28	14
1027	Arginine kinase OS=Penaeus japonicus PE=1 SV=1	KARG_PENJP	41	40	1	6,4	40	10
1102	Arginine kinase OS=Penaeus japonicus PE=1 SV=1	KARG_PENJP	76	51	2	6,4	40	10
1119	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [Gammarus pulex]	gi 82706447	141	67	3	5,8	23	19
1193	Mitochondrial processing peptidase beta subunit [Glossina morsitans morsitans]	gi 289742991	71	38	2	5,9	53	8
1250	Sarcoplasmic calcium-binding protein [Procambarus clarkii]	gi 81171160	95	61	3	4,6	22	15
1255	Catalase [Daphnia magna]	gi 256483428	77	77	1	8,4	57	2
1263	Arginine kinase [Lissorhoptrus sp. DDM-2009]	gi 228014740	56	28	2	8,8	19	26
1270	Putative catalase [Lutzomyia longipalpis]	gi 157674493	72	41	2	8,3	58	3
1370	Putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Gammarus locusta]	gi 190014502	190	100	2	6,1	36	8
1744	F1-ATP synthase beta subunit [Litopenaeus vannamei]	gi 170779040	440	95	7	5,0	56	18
1882	Triosephosphate isomerase [Sycon lingua]	gi 71370870	222	97	7	5,2	23	

1 : correspond au nom de la protéine dans la banque de données SwissProt ou NCBI

2 : correspond au numéro de la protéine dans SwissProt/UniProt (www.uniprot.org)

3 : correspond à la somme de tous les scores d'ions des peptides fragmentés en MSMS

4 : correspond au meilleur des scores d'ions

5 : correspond au nombre de peptides uniques identifiés en MSMS

6 = point isoélectrique théorique

7 = masse moléculaire théorique

8 = point isoélectrique expérimental

Fond jaune : Protéines retrouvées ailleurs que chez les crustacés

Fond vert : Analyse RSLC-LIQ-ORBITRAP

Fond blanc : Analyse MALDI

L'arginine kinase appartient à la classe des kinases phosphagènes. Cette enzyme est reliée au métabolisme énergétique chez les invertébrés puisqu'elle permet la régénération de l'ATP à partir de l'ADP et de l'arginine phosphate (Zhou et al., 1998; Ellington, 2001) selon la réaction réversible suivante :



L'arginine kinase correspondante au spot 883 était sous-exprimée uniquement dans la condition « arséniate » par comparaison au témoin, et de manière significative uniquement à 10°C (Figure III.2, groupe A à 10°C, code 9). Comme l'expression de cette protéine n'était pas différente dans les conditions As1 et Cd1 (tableau III.3, code 9, réponse *No* de la dernière colonne), cela sous-entend que la présence de cadmium tendait également à induire une sous-expression de cette protéine à 10°C mais qui n'était cependant pas significative par rapport au témoin. L'arginine kinase retrouvée dans le spot 882 était quant à elle sur-

exprimée dans le mélange binaire seulement par comparaison au témoin et de manière significative uniquement à 10°C (Figure III.2, groupe E à 10°C, code 23). Ces résultats montrent que le sens de variation de deux spots correspondant à une même protéine n'est pas toujours identique au sein d'une même condition expérimentale. Cela suggère que les sens d'expression (*i.e.* sur-expression ou sous-expression) des spots par rapport au témoin ne peuvent pas être pris en compte à l'heure actuelle pour identifier les impacts des métaux sur une voie biochimique précise. Cependant, le couplage entre l'identification des spots et le nombre de spots exprimés de manière différente dans les conditions testées par rapport au témoin permet la réalisation d'un premier pas vers une explication biochimique de la toxicité. Les résultats obtenus sur les spots 882 et 883 montrent également qu'une même protéine peut être exprimée de manière différentielle par rapport au témoin et dans le même sens, dans plusieurs conditions simultanément. En accord avec Shepard et Bradley (2000), cela suggère qu'un seul spot ne peut pas être considéré comme une protéine spécifique d'une condition expérimentale donnée mais que c'est la cartographie d'un ensemble des spots qui doit être prise en compte pour une étude discriminante de la condition testée (ici, la nature de la contamination métallique). Petrak et al. (2008) ont remarqué que certains types de protéines étaient redondants dans la littérature selon des conditions expérimentales très différentes, pour des tissus différents et des espèces différentes. En conséquence, ces auteurs ont surnommé ces protéines « the déjà-vu in protéomics », puisqu'elles entraînent une impression troublante de déjà-vu. Un Top 15 de ces protéines les plus redondantes a été créé (Petrak et al., 2008), classées par famille de protéines ou par protéine individuelle. Sur les 23 protéines identifiées de manière fiable dans notre expérience, 7 protéines font partie de ce top 15. Il s'agit de (i) la triosphosphate isomérase (spot 1882, protéine intervenant dans la 5^{ème} étape de la glycolyse) et de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (spots 1119 et 1370, protéine intervenant dans la 6^{ème} étape de la glycolyse) positionnées respectivement en 11^{ème} et 15^{ème} places du classement des protéines individuelles mais aussi de (ii) la famille des protéines correspondant à l'ATP synthase beta subunit (spots 521; 756; 764; 1744, protéines intervenant dans le cycle de Krebs et aboutissant à la synthèse d'ATP) positionnée en 13^{ème} place du classement par famille. Ces protéines de « déjà vu » englobent un nombre limité de fonctions cellulaires (ex : protéines de stress oxydant, protéines de transport, protéines chaperonnes...), ce qui peut être relié aux limites de résolution d'un gel 2D qui ne permet de séparer que 2000 protéines en moyenne comme nous l'avons vu précédemment. En effet, seuls les ensembles de protéines très abondantes et très solubles pourront être mis en évidence sur un gel 2D, au détriment des protéines plus faiblement abondantes et moins

hydrosolubles (Rabilloud et al., 2010 ; Rabilloud et Lelong, 2011). Ce constat peut expliquer pourquoi les protéines identifiées sont pratiquement toutes des protéines intervenant dans le métabolisme énergétique.

- *Une réponse du protéome température-dépendante*

Malgré une sélection préalable des spots n'agissant significativement que dans les effets « conditions » de l'ANOVA II, des différences radicales dans l'attribution des spots au sein des groupes suite aux ANOVA I ont été mises en évidence entre 5, 10 et 15°C. A une exception près, chaque spot n'a été assigné qu'à un seul groupe pour une seule température montrant que, comparée au témoin, l'expression différentielle des spots dans les conditions de contamination métallique était température-dépendante. Quelle que soit la condition métallique considérée, c'est clairement à 10°C que le protéome, exprimé de manière différenciée par rapport au témoin, compte le plus grand nombre de spots de protéine. Toutes ces observations sont également valables pour les spots différenciés de manière significative à la fois dans les facteurs « condition » et « température » de l'ANOVA II. Une conséquence est qu'il paraît difficile de travailler directement sur le protéome d'individus échantillonnés sur le terrain pour réaliser des études de bioindication. La meilleure option d'étude avec *Gammarus pulex* consisterait donc, de travailler en laboratoire à une température proche de 10°C, après exposition à l'eau du milieu à tester. Pour pallier les effets de la température, une autre possibilité consisterait à travailler avec des animaux homéothermes, dont l'homéostasie thermique garantirait des conditions physiologiques plus stables et propices à une étude protéomique dans un contexte de perturbation. Cependant, tous les invertébrés aquatiques étant ectothermes, cela paraît difficile à envisager sur un modèle « invertébrés ».

- *Une réponse contrastée entre les effets du cadmium et/ou de l'arséniate*

Nous avons préconisé dans le précédent paragraphe de travailler à 10°C. Seule cette température est donc envisagée dans cette partie. Le nombre de spots affiliés à la condition As1 est de loin plus grand que celui des spots affiliés à la condition Cd1 (84 spots contre 5, respectivement). Il est largement probable, au vu des limites de la 2D évoquées plus haut et des résultats d'identification préliminaires, que la plupart des spots d'intérêt obtenus dans cette étude soient reliés au métabolisme énergétique. Ainsi, la compétition existant entre les ions phosphate et arséniate dans les réactions de phosphorylation pourrait partiellement expliquer le plus grand nombre de spots modifiés par rapport au témoin dans la condition

As1 par rapport à Cd1. 7 spots sont communs aux deux conditions métalliques testées et sont sous-exprimés par rapport au témoin, montrant un mécanisme d'action similaire des deux métaux sur des voies biochimiques semblables.

Plus de la moitié (soit 57 spots) des spots affiliés à As1 sont discriminants de la nature du métal. Ces résultats suggèrent la possibilité de considérer ces 57 spots comme spécifiques de la condition As1. Au contraire, parmi les spots issus de la condition Cd1, aucun n'est discriminant de la nature du métal, suggérant que ces derniers ne sont pas spécifiques de la condition Cd1. Les spots qui différencient As1 et Cd1, sans être significativement différents des témoins, sont au nombre de 16; montrant ainsi que deux métaux peuvent avoir des effets contraires sur des processus biochimiques similaires.

Par comparaison aux témoins, certains spots de protéines réagissent dans le mélange mais pas dans les expositions métalliques isolées (groupe E, 17 spots). A l'inverse, certaines protéines qui réagissent dans une exposition métallique isolée ne réagissent plus en présence d'un second métal (groupe A et B, codes 2 à 5, 7 à 9, 11 à 13 et 15). Ces résultats montrent les caractères interactifs des mélanges sur ces spots de protéines (antagonisme, additivité ou synergie). Nous avons vu précédemment que le grand nombre de protéines affiliées à la condition As1 par rapport à Cd1 pouvait être relié au plus grand impact de l'arséniate sur le métabolisme énergétique. Comme le nombre de spots affilié au mélange binaire (groupe E) est intermédiaire entre celui affilié à As1 et celui affilié à Cd1, et en admettant que ces spots d'intérêt soient bien reliés au métabolisme énergétique, l'hypothèse d'un impact moindre de l'arséniate sur le métabolisme énergétique en présence de cadmium est envisageable. Ces résultats pourraient expliquer partiellement l'effet antagoniste du mélange binaire As1Cd1 précédemment observé sur la mortalité de *G. pulex* à 10°C (Vellinger et al., 2012c).

• *La protéomique : un outil permettant de diagnostiquer une contamination métallique?*

Quelle que soit la température considérée, aucun spot n'a permis de discriminer à la fois la nature du métal et de répondre dans le même sens (par rapport au témoin) à une contamination métallique multiple. Les milieux aquatiques étant souvent multi-contaminés (et ceci par largement plus de 2 métaux différents simultanément), il paraît délicat d'envisager à court terme la protéomique en tant qu'outil permettant de diagnostiquer de manière précise la nature d'une contamination métallique, du moins avec les premiers résultats obtenus dans cette étude.

Par contre, 2 spots à 10°C (code 16, spots 681 et 890) paraissent tout particulièrement intéressants car ils réagissent par une sous-expression (par rapport au témoin) lors des

expositions aux deux métaux isolés et en mélange. Si les résultats obtenus sont reproductibles, l'outil protéomique pourrait dans un premier temps être envisagé comme outil permettant de diagnostiquer une contamination métallique « globale » chez le gammare à l'aide de ces deux spots. Cependant, ces deux spots devront pour cela, satisfaire simultanément à plusieurs critères: (i) leur sous-expression doit être robuste en présence d'autres toxiques (incluant aussi d'autres métaux), (ii) leur sous-expression ne doit pas dépendre de la dose métallique et (iii) les protéines associées ne doivent pas s'apparenter à des protéines de stress général ou des « déjà-vu », ce qui semble difficilement réalisable en l'état actuel. Avant d'émettre des conclusions prématurées sur la possibilité d'utiliser les cartographies de protéines dans les études de surveillance environnementale, une optimisation méthodologique préalable (purification, solubilisation, fractionnement) semble indispensable afin de mettre en évidence de manière plus fiable et efficace les spots de protéines d'intérêt dont le signal est actuellement masqué par des protéines ou des peptides majoritaires (protéines contaminantes et de « déjà-vu »).

Chapitre IV.

Discussion transversale

1. Effets isolés de l'arséniate et du cadmium

Les LC50s obtenues chez *G. pulex* après 24h, 96h et 240h d'exposition à 10°C étaient respectivement 2,2, 23, et 100 fois plus élevées pour l'arséniate que pour le cadmium, montrant (i) une plus forte résistance des individus de *G. pulex* exposés à l'arséniate qu'au cadmium et (ii) une différence de « sensibilité » amplifiée avec une augmentation de la durée d'exposition. La valeur de BCF était faible (de 10) pour l'arséniate alors qu'elle était très élevée pour le cadmium (entre 1589 et 3800) (article 1). De plus, la bioconcentration était similaire aux concentrations correspondant aux LC50 respectives des deux métaux après 240h d'exposition à 10°C, montrant que l'absorption métallique, plus élevée pour le cadmium que pour l'arséniate, peut expliquer en grande partie pourquoi le gammare est plus résistant à l'arséniate qu'au cadmium.

Afin d'isoler les mécanismes d'action possibles des deux métaux, les expériences réalisées dans ce travail de thèse ont été conduites avec des concentrations de cadmium et d'arséniate entraînant un même pourcentage de mortalité, à une même température (10°C). La température de 10°C a été choisie parce qu'elle correspond à la température moyenne du site de prélèvement des gammarès. Ainsi, nous avons considéré que cette température permettait d'optimiser les performances individuelles des individus de *G. pulex*. Ce choix de température « optimale » semble avoir été un bon choix puisque dans l'article 4, nous avons montré que les taux de survie chez les organismes témoins sont plus grands à 10°C qu'à 5 ou 15°C.

Certaines réponses de biomarqueurs se sont avérées similaires aux deux expositions métalliques. D'autres au contraire ont montré des réponses plus spécifiques de la nature du métal comme illustré dans la figure VI.1. Ce paragraphe récapitule toutes les réponses obtenues dans ce travail de thèse concernant les effets isolés de l'arséniate et du cadmium chez *G. pulex*. Quel que soit le biomarqueur étudié, des relations étroites entre les différentes réponses ont pu être établies dans le cas d'une exposition métallique simple.

1.1. Bioconcentration et voies d'entrée

A travers les résultats de bioconcentration et de BCF obtenus, nous avons émis des hypothèses concernant les voies d'entrée les plus probables des deux éléments métalliques étudiés chez *G. pulex* (article 1). Les individus n'étant pas nourris et la structure de l'exosquelette étant considérée comme relativement imperméable aux éléments toxiques (Rainbow, 1997), seuls l'eau de boisson et les processus de diffusion à travers la surface

branchiale semblaient pouvoir correspondre à des voies d'entrée potentielles de ces éléments métalliques.

Comme les ions Cd^{2+} et Ca^{2+} ont une taille ionique similaire, il est maintenant avéré qu'ils peuvent entrer en compétition sur les sites de liaison du Ca^{2+} (Rainbow, 1995). Les processus de transport des ions Ca^{2+} étant bien connus chez les organismes aquatiques (Verboost et al., 1987; Reid et McDonald, 1988; Towle, 1993; Flik et al., 1994; Lucu, 1994; Wheatly et al., 2002), nous avons émis l'hypothèse que, du fait de cette compétition, le cadmium pouvait être transporté (i) d'abord par diffusion facilitée à travers les canaux calcium présents dans la membrane apicale des cellules à chlorures des branchies (ii) puis par transport actif au niveau de la membrane basale cellulaire grâce à une pompe Ca^{2+} -ATPase et/ou par les échanges $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ liés à des Na^+/K^+ -ATPase. Le fait que la bioconcentration en cadmium augmente alors que le BCF diminue le long d'un gradient croissant de concentration externe en cadmium laisse présager une saturation des ligands disponibles sur les canaux calcium, ce qui étaye l'hypothèse des canaux calcium comme « voie d'entrée majeure » pour ce métal. Toutefois, une voie d'entrée mineure du cadmium par l'eau de boisson n'est pas exclue. Pour l'arséniate, un mécanisme d'entrée différent de celui du cadmium a été envisagé. En effet, comme la bioconcentration en arséniate augmente de façon presque linéaire alors que le BCF reste stable le long du gradient de concentration externe en arséniate, la voie d'entrée la plus probable semble être celle de l'eau de boisson, en considérant que le gammare se réhydrate de manière identique quelle que soit la concentration d'exposition en arséniate. Malgré tout, comme l'arséniate est connu pour rentrer en compétition avec les ions phosphates (Fattorini and Regoli, 2004), l'entrée mineure de ce métalloïde par des canaux phosphates présents sur les surfaces branchiales *via* le même mécanisme de diffusion facilitée que celui décrit pour le cadmium, n'est pas exclue. Pour le cadmium comme pour l'arséniate, les voies d'entrée possibles proposées dans ce travail de thèse n'ont pas la prétention d'être exhaustives, d'autres voies mineures ayant été identifiées dans la littérature comme les « *metal binding proteins* » présentes à la surface des cellules branchiales (Tessier et al., 1994; Rainbow, 1997) qui peuvent être responsables d'une diffusion facilitée des métaux dans l'organisme.

1.2. Réponses similaires observées entre les deux métaux chez *G. pulex*.

Indépendamment du temps d'exposition, la bioconcentration en As et en Cd dans *G. pulex* augmente avec une concentration métallique d'exposition croissante (articles 1, 4). Ces

résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans la littérature pour des gammarex exposés au cadmium (Felten et al., 2008; Geffard et al., 2010) ou des amphipodes exposés à de l'arsenic inorganique (Norwood et al., 2006). Le taux de mortalité des gammarex exposés est corrélé positivement à cette bioconcentration (articles 1, 4).

Quand la bioconcentration augmente, les organismes doivent mettre en place des mécanismes de maintenance qui incluent les processus de détoxification, d'élimination, de maintien de l'homéostasie (iono-osmorégulation), ou les mécanismes de réparation cellulaires (Thomasson et al., 2003; Felten et al., 2008; Kooijman et al., 2009). Nos résultats ont montré que pour faire face à une exposition à l'arséniate ou au cadmium, **les individus de *G. pulex* activaient des systèmes de défense anti-toxiques et anti-oxydants**, à l'origine d'une hausse de la concentration en MT d'une part et d'une hausse de l'activité GCL et de la concentration en GSH d'autre part (article 3).

Pour les deux métaux, l'activité GCL diminue entre la plus faible et la plus forte concentration testée (LC10 *vs* LC25 après 240h à 10°C). Cependant, la concentration en GSH reste identique, suggérant une mobilisation de la GSH plus importante aux plus faibles concentrations (Meister, 1983; Akira et al., 1990; Gismondi et al., 2012a).

Cette réduction est également observée pour la concentration en MT mais seulement dans le cas d'une exposition au Cd. De nombreuses études ont montré qu'une hausse de MT dans les cellules était reliée à une hausse de la bioconcentration (Shariati et Shariati, 2011), ce qui reflète une haute biodisponibilité environnementale (Ross et al., 2002; Geffard et al. 2002a,b; Amiard et al., 2006). A l'inverse, d'autres travaux ont montré qu'à partir d'une concentration interne métallique seuil, cette corrélation n'est plus aussi claire (Regoli et Principato, 1995; Pederson et Lundebye, 1996; Toplan et al., 2003; Berthet et al., 2005). Nos résultats suggèrent qu'il est possible qu'une concentration seuil d'exposition (ici LC25 après 240h à 10°C) ne permette plus une aussi bonne activation des systèmes de défense.

Les systèmes de défense étant coûteux en énergie (Kooijman et al., 2009), nous avons mesuré les concentrations en réserves énergétiques (article 3). Nos résultats ont montré que l'exposition de *G. pulex* à de l'arséniate ou à de cadmium provoquait **un changement dans leur concentration, avec une diminution des réserves lipidiques et protéiques et une augmentation des réserves de glycogène. Ces variations sont amplifiées avec une hausse de la concentration métallique**. Comme les mobilisations des réserves lipidiques et protéiques sont considérées comme étant plus rapides et plus riches en apport énergétique que la mobilisation des réserves en glycogène (De Coen et Janssen., 1997), elles sont utilisées en cas de stress intense. En accord avec Holmstrup et al. (2010), il paraît probable que les

diminutions des réserves lipidiques et protéiques soient reliées à un changement de stratégie dans l'utilisation des réserves énergétiques. La réduction des réserves énergétiques utilisées par les gammarés (lipides, protéines) entre l'exposition aux LC10s et LC25s respectives des deux métaux (après 240h à 10°C) peut expliquer la diminution de l'activité GCL et de la concentration des MT observée. Cependant, l'augmentation des réserves en glycogène, qui servent aux activités courantes telles que la locomotion, la ventilation, les processus d'osmorégulation, de croissance ou de reproduction (Kucharski et Da Silva, 1991a,b; Swanson, 1992; Sparkes et al., 1996; Rosa et Nunes, 2003; Oliveira et al., 2004) peut être reliée à (i) une baisse volontaire de l'utilisation du glucose comme substrat énergétique ou à (ii) une augmentation du stockage du glucose due à un effet néfaste des métaux sur le fonctionnement de la glycolyse.

Malgré l'activation des systèmes de défense et des changements de stratégies dans l'utilisation des réserves énergétiques, des effets toxiques de ces deux métaux sur *G. pulex* ont été mis en évidence. Ces effets toxiques sont bien reliés au taux de mortalité observé et sont amplifiés le long du gradient de concentration métallique externe (et donc interne). Nous avons montré que l'exposition de *G. pulex* à de l'arséniate ou à du cadmium provoque une peroxydation lipidique, traduite par un taux de MDA accru. Ce résultat suggère que les deux métaux sont capables d'induire **un stress oxydant** (article 3). La présence d'un stress oxydant suite à une exposition au cadmium a récemment été démontrée chez *G. roeseli* (Gismondi et al., 2012) mais n'avait jamais été montrée chez un gammaré suite à une exposition à l'arséniate bien que des travaux antérieurs aient indiqué que des composés d'arsenic inorganiques étaient capables d'induire un tel stress chez des crustacés (Schlenk et al., 1997; Ventura-Lima, 2011). Le niveau de peroxydation lipidique est similaire pour les deux métaux aux plus fortes concentrations testées (LC25 après 240h à 10°C) mais est plus prononcé pour l'arséniate à la plus faible concentration testée (LC10 après 240h à 10°C). A la plus forte concentration métallique testée, une concentration en MT plus faible et une mobilisation de la GSH plus élevée dans le cas d'une exposition au cadmium par rapport à l'arséniate, peuvent expliquer pourquoi le niveau de peroxydation lipidique est similaire. A la plus faible concentration métallique testée, (i) une plus faible mobilisation de la GSH dans l'exposition au cadmium et (ii) des concentrations de MT similaires pour les deux métaux, expliquent partiellement pourquoi les gammarés ont subi une plus forte peroxydation lipidique lors de l'exposition à l'arséniate. De plus, le niveau de peroxydation lipidique ne varie pas entre les deux concentrations d'arséniate testées, tout comme les concentrations de MT et GSH et l'activité GCL.

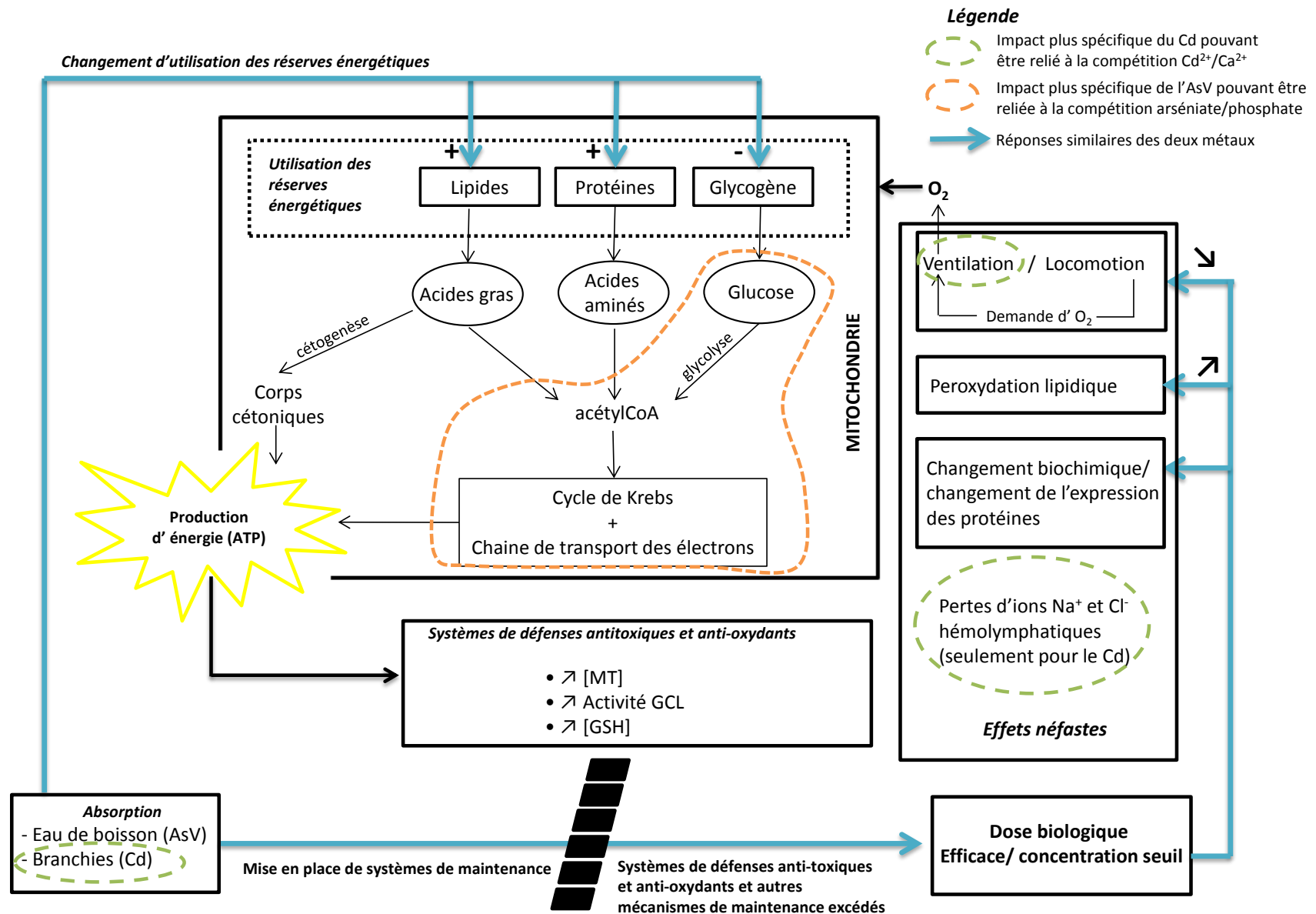


Figure IV.1. Représentation simplifiée des réponses des biomarqueurs chez les individus de *G. pulex* exposés à de l'arséniate ou du cadmium seul.

Pour le cadmium, le niveau de peroxydation lipidique augmente de manière significative avec une plus forte concentration d'exposition, augmentation expliquée par une baisse de la MT et de l'activité GCL.

Une baisse de l'activité locomotrice (articles 3, 4) a été mise en évidence lors des expositions de *G. pulex* aux deux métaux seuls. Cette baisse est d'autant plus prononcée que la concentration d'exposition est élevée. Des résultats similaires ont été observés chez des *G. pulex* exposés au cadmium (Felten et al. 2008; Alonso et al., 2009a). La diminution de l'activité locomotrice peut être la cause d'une hausse des réserves en glycogène ou la conséquence de la baisse de l'utilisation de ces réserves. Nous avons alors émis différentes hypothèses, non exclusives les unes des autres. Dans le premier cas, nous avons émis l'hypothèse que cette baisse de locomotion soit reliée à une stratégie pour économiser de l'énergie, alors réallouée aux systèmes de maintenance comme supposé par Thomasson et al. (2003) et Felten et al. (2008). Hervant et al. (1997) ont montré que la baisse de la locomotion (due à une hypoxie) chez l'isopode *Stenasellus virei* était liée à une stratégie d'économie de l'énergie pour préserver les réserves de glycogène et optimiser ainsi les chances de survie individuelle. Dans le cas d'une exposition métallique, le taux d'oxygène dans l'organisme est généralement réduit chez les crustacés exposés aux métaux lourds (Spicer et Weber, 1991). Ainsi, il n'est pas invraisemblable que la même stratégie observée par Hervant et al. (1997) pourrait être mise en place par *G. pulex* exposés à l'arséniate ou au cadmium, ce qui pourrait expliquer la hausse des réserves en glycogène observée dans l'article 3. Il n'est cependant pas à exclure non plus que la baisse de la locomotion soit liée à un plus mauvais état physiologique de l'individu (sub-mortalité, dommages cellulaires) ou à un manque d'oxygène due à une hypoventilation. Dans l'article 3, nous avons cependant mis en évidence une baisse de la locomotion significative à la plus faible concentration testée, sans que la ventilation (et donc le taux d'oxygénation) ne soit impactée, ce qui réduit la probabilité de cette dernière hypothèse.

Aux plus fortes concentrations d'arséniate et pour toutes les concentrations de cadmium testées, des diminutions (significatives ou tendancielle) de l'activité ventilatoire (estimée via la fréquence de battements des pléopodes) ont été observées chez *G. pulex* (articles 1, 3, 4). Comme les gammarus sont des organismes aérobies, la ventilation des gammarus permet une absorption de l'oxygène qui sera utilisé par la mitochondrie pour assurer le fonctionnement du métabolisme énergétique et donc la production d'ATP. Pour la survie de l'organisme, la balance entre le bénéfice énergétique et la demande énergétique doit être

positive (Calow et Forbes, 1998). Si le coût énergétique lié aux mouvements actifs des pléopodes est plus fort que le bénéfice énergétique, une stratégie de réallocation de l'énergie à partir de la ventilation vers les systèmes de maintenance, est possible (Thomasson et al., 2003). Cependant, nous avons montré que la locomotion était impactée avant la ventilation (article 4). Comme la ventilation est un besoin vital pour les organismes aérobies, nous avons émis l'hypothèse d'une ventilation réduite chez les gammarés uniquement en dernier recours, la réallocation énergétique s'effectuant prioritairement à partir des fonctions non vitales comme la locomotion (article 4). En effet, une baisse de la ventilation aura un impact négatif sur la production d'ATP et donc sur la capacité d'activation des systèmes de maintenance, ce qui peut, par effet de cascade, entraîner une augmentation de la formation de ROS (Chandel et Schumacker, 2000) et accroître la mortalité. Il n'est pas à exclure que l'hypoventilation puisse être reliée à un plus mauvais état physiologique des individus exposés et/ou des impacts directs du métal sur la structure branchiale comme déjà observé pour le cadmium sur *G. pulex* (Felten et al. 2008 ; Issartel et al., 2010). Cependant, cette dernière hypothèse est moins probable puisque nous avons montré qu'avec une hausse additionnelle de la température, la bioconcentration métallique était augmentée, ce qui n'empêchait pas les gammarés d'hyperventiler (article 4).

Lors de l'analyse du protéome à 10°C, nous avons mis en évidence sept spots de protéines dont les expressions sont significativement modifiées de la même manière chez les individus exposés à de l'arséniate et au cadmium lorsque comparés aux individus témoins. Ces protéines modifiées sont toutes sous-exprimées, montrant un mécanisme d'action semblable des deux métaux sur des voies biochimiques similaires. Bien que les protéines n'aient pas toutes été identifiées et que des problèmes de contamination soient survenus au cours du processus d'identification, les résultats obtenus ont montré que la plupart des protéines identifiées étaient impliquées dans le métabolisme énergétique comme la glycolyse, le cycle de Krebs ou la chaîne de transport des électrons. Ce résultat laisse penser que les deux métaux puissent induire des dysfonctionnements similaires sur le métabolisme énergétique et pourrait expliquer pourquoi ces deux métaux concourent à générer chez *G. pulex* la même modification dans l'utilisation des réserves énergétiques.

1.3. Réponses distinctes observées entre les deux métaux chez *G. pulex*.

Bien que les réponses des biomarqueurs cités ci-dessus soient semblables pour les deux expositions métalliques, des variations dans l'intensité des réponses, selon le métal testé, sont observées. De plus, d'autres réponses de biomarqueurs non évoquées ci-dessus ont réagi de manière plus spécifique à la nature du métal. Toutes les différences observées (intensité de la réponse ou réponse spécifique) entre les deux expositions métalliques semblent résulter principalement des compétitions existant entre (i) le phosphate et l'arséniate (Fattorini and Regoli, 2004) et (ii) le cadmium et le calcium (Rainbow, 1995).

1.3.1. Une différence de voie d'entrée ... synonyme de réponses distinctes ?

Les branchies sont considérées comme le site majeur de concentration des métaux (Wicklund-Glynn et al., 1994) et ont un rôle crucial pour l'absorption d'oxygène et l'absorption active d'ions. De ce fait, ces organes jouent un rôle fondamental dans les fonctions physiologiques essentielles comme la respiration, la régulation ionique et osmotique, la balance acide-base, ou encore l'excrétion des composés azotés (Potts et Parry, 1964 ; Mantel et Farmer, 1983 ; Pequeux et al., 1989 ; Onken et Riestenpatt, 1998 ; Kirschner, 2004). **Si notre hypothèse sur des voies d'entrée différentes selon le métal est valide, le cadmium, entrant principalement par les branchies *via* les cellules à chlorures, devrait logiquement avoir plus d'impact sur la structure branchiale des gammarés et leurs fonctions associées, qu'une exposition à l'arséniate entrant par l'eau de boisson. Les résultats que nous avons obtenus en laboratoire, comme ceux issus de la littérature ont montré des résultats en ce sens.** En effet, des altérations dans la structure branchiale (hyperplasie, nécrose) mais aussi des effets néfastes sur l'osmorégulation ont été montrés chez des gammarés exposés au cadmium (Felten et al. 2008 ; Issartel et al., 2010). Cependant, aucune donnée n'a montré de tels impacts de l'arséniate. Nos résultats montrent que l'osmolalité était impactée plus fortement chez les individus exposés 240h à 10°C à la LC25 du cadmium qu'à la LC25 de l'arséniate (article 3). Bien que variable selon la température et la concentration d'exposition, nos résultats indiquent aussi que le cadmium est capable de provoquer une perte d'ions Na⁺ et Cl⁻ dans l'hémolymphe de *G. pulex* après 96h, ce qui n'a jamais été le cas pour l'arséniate (article 4). Ces résultats n'avaient jamais été montrés jusqu'ici dans la littérature pour l'arséniate mais sont en accord avec Felten et al. (2008) et Issartel et al. (2010) concernant l'exposition de gammarés au cadmium. Enfin, nos résultats, *via* les fréquences de battements de pléopodes, ont montré une hypoventilation plus prononcée (même si pas significative) lors d'une exposition au cadmium par rapport à une

exposition à l'arséniate, et ce, pour des concentrations induisant le même pourcentage de mortalité (LC10, LC25 ; articles 1, 3 et 4) et pour des conditions d'expérience similaires.

1.3.2. La ventilation

La compétition arséniate/phosphate peut également expliquer la différence de comportement ventilatoire entre les *G. pulex* exposés à l'arséniate et ceux exposés au cadmium. Par rapport aux individus témoins, la réponse ventilatoire chez les individus exposés après 240h à 10°C est diphasique (tendance à l'hyperventilation avant la LC50 puis hypoventilation après la LC50) le long du gradient d'exposition à l'arséniate alors qu'elle est monophasique (hypoventilation) le long du gradient d'exposition au cadmium. Concernant l'exposition à l'arséniate, la première phase se situe avant la 240h-LC50 à 10°C dans laquelle les gammarés exposés à l'arséniate ne présentent soit aucune différence de ventilation (article 3), soit une tendance à l'hyperventilation (article 1) par rapport aux individus témoins. Le fait qu'une hyperventilation puisse être mise en évidence exclue la possibilité d'un dommage branchial causé par l'arséniate contrairement à ce qui a été supposé pour le cadmium. Les gammarés étant des organismes aérobies, nous avons émis l'hypothèse qu'aux plus faibles concentrations d'arséniate (< LC50), la tendance à l'hyperventilation pouvait être reliée au besoin de compenser le défaut de fonctionnement de la glycolyse et/ou de la chaîne de transport des électrons en allouant un maximum d'oxygène au métabolisme énergétique (ce que n'aurait pas besoin de faire le gammaré exposé au cadmium). Le bénéfice apporté par cette hyperventilation a été considérée comme supérieur au coût énergétique qu'elle nécessite (ATP produit > ATP consommé).

La seconde phase de réponse des gammarés exposés à l'arséniate est semblable à celle des individus exposés au cadmium, et se situe après la 240h-LC50 à 10°C ; concentration à partir de laquelle les gammarés exposés hypoventilent si comparés aux individus témoins (article 1). Aux plus fortes concentrations testées (> LC50), la bioconcentration en arséniate est plus importante qu'aux plus faibles concentrations (< LC50). Ainsi, les effets toxiques (mortalité) sont plus prononcés et nous n'excluons pas un mimétisme arséniate/ phosphate plus important, qui pourrait davantage perturber le métabolisme énergétique. Nous avons alors émis l'hypothèse que les hypoventilations observées pour les plus fortes concentrations d'arséniate ou pour le cadmium pouvait être reliées à (i) un plus mauvais état physiologique de l'individu, et/ou (ii) à un coût énergétique dû à l'activité ventilatoire supérieur au bénéfice énergétique (ATP consommé > ATP produit).

1.3.3. L'iono-osmorégulation

Nous avons montré un impact plus élevé de l'exposition sur l'osmolarité totale chez les individus de *G. pulex* exposés au cadmium en comparaison aux individus exposés à l'arséniate (article 3). Les ions Cl^- et Na^+ étant considérés comme les ions majeurs intervenant dans l'osmolalité totale de l'hémolymphe (Mantel et Farmer, 1983). Ce résultat peut être rapproché de celui obtenu dans l'article 4 où nous avons montré que le cadmium entraînait une perte des concentrations en ions Na^+ et Cl^- de l'hémolymphe alors que l'arséniate avait une tendance à augmenter la concentration en ions Na^+ de l'hémolymphe et n'avait aucun effet sur la concentration en Cl^- .

Trois hypothèses non exclusives peuvent expliquer la différence d'impact entre les deux métaux sur ces concentrations hémolympatiques. La première réside dans les différences de voie d'entrée des deux métaux. Les branchies étant des organes spécialisés dans les transports d'eau et d'ions, il est probable en effet que le cadmium, entrant principalement *via* cet organe, perturbe plus l'iono-osmorégulation que l'arséniate comme indiqué précédemment. La deuxième hypothèse réside dans la capacité du métal à se lier à la Na^+/K^+ -ATPase qui est l'enzyme permettant l'absorption active de Na^+ à travers l'épithélium branchial. Brooks et Mills (2003) ont montré que le cuivre pouvait interférer avec les groupements $-\text{SH}$ sur la Na^+/K^+ -ATPase. Le cadmium entraînant une perte d'ions Na^+ , il est possible que ce dernier puisse inhiber cette enzyme alors que l'arséniate ne le pourrait pas. La troisième hypothèse expliquant une perturbation de l'iono-osmorégulation est liée à la compétition existant entre le calcium et le cadmium. Même si nous n'avons pas mesuré la concentrations en ions Ca^{2+} , nous suspectons un effet négatif du cadmium sur l'absorption et le transport des ions Ca^{2+} au niveau intracellulaire comme cela a déjà été démontré (Rainbow, 2007 ; Felten et al., 2008 ; Reid et McDonald, 1988).

1.3.4. Les réserves énergétiques

Le phosphate intervient dans les réactions de phosphorylation du métabolisme glucidique ou de la chaîne de transport des électrons (Gebel, 2000; Andrew et al., 2003; Tseng, 2004). Il va sans dire qu'une compétition entre l'arséniate et le phosphate peut jouer un rôle non négligeable sur le fonctionnement du métabolisme énergétique en interférant avec ces réactions de phosphorylation. Toutes les réactions faisant intervenir le phosphate peuvent donc être impactées par l'arséniate, expliquant les différences de réponses de certains biomarqueurs entre exposition à l'arséniate et exposition au cadmium.

Nous avons montré précédemment que des changements dans l'utilisation des réserves énergétiques ont lieu lors d'une exposition au cadmium et à l'arséniate, avec une hausse des réserves de glycogène et une baisse des réserves lipidiques et protéiques par rapport aux individus témoins. Cependant, l'augmentation de la réserve en glycogène et la mobilisation des réserves lipidiques sont plus marquées chez les individus de *G. pulex* exposés à l'arséniate qu'au cadmium. De plus, les réserves protéiques sont moins mobilisées chez les individus de *G. pulex* exposés à l'arséniate par rapport à ceux exposés au cadmium. Une moindre mobilisation de la réserve en glycogène pourrait être reliée soit à un défaut de fonctionnement de la glycolyse, ne permettant pas le catabolisme du glycogène en glucose soit à un problème intervenant dans la chaîne de transport des électrons, du fait de la compétition entre phosphate et arséniate. Si la chaîne de transport des électrons est bloquée ou si son fonctionnement est légèrement inhibé par la présence de l'arséniate dans la mitochondrie, l'ATP ne sera pas ou moins fournie à la cellule et ce, quelle que soit la réserve énergétique utilisée de manière traditionnelle. Ce constat peut partiellement expliquer pourquoi la réserve protéique est moins mobilisée par les *G. pulex* exposés à l'arséniate qu'au cadmium. Cependant, une explication de la plus forte mobilisation des réserves lipidiques par les gammarés exposés à l'arséniate peut résider dans la formation de corps cétoniques et/ou de glycérol. En effet, après hydrolyse des lipides en acides gras, ces derniers peuvent synthétiser des corps cétoniques (cétogenèse), lesquels seront directement utilisables par la cellule comme source d'énergie sans nécessiter au préalable leur passage dans le cycle de Krebs puis dans la chaîne de transport des électrons (Figure IV.1).

1.3.5. Analyse du protéome

Bien que des spots de protéines modifiés significativement par rapport aux individus témoins aient été mis en évidence chez les individus exposés aux deux métaux, d'autres spots sont plus spécifiques de la nature du métal, en particulier de l'arséniate. En effet, nous avons montré qu'à 10°C, 57 spots présentent une signature d'expression spécifique (PESs, Shepard et Bradley, 2000) à l'arséniate alors qu'aucun PES n'est mis en évidence pour le cadmium. Il y a par ailleurs plus de spots de protéines modifiés chez les gammarés exposés à l'arséniate (84 spots) que chez les gammarés exposés au cadmium (5 spots), par comparaison aux témoins. Les expositions étant réalisées pour des concentrations létales induisant 10% de mortalité (à 10°C et après 96h) pour chaque métal respectivement, la différence dans le nombre de spots affiliés à chaque métal ne peut être reliée qu'à un mode d'action différent sur un ou plusieurs paramètres biochimiques. Comme la plupart des

protéines identifiées sont impliquées dans le métabolisme énergétique, cette différence (i) permettrait d'étayer l'hypothèse selon laquelle l'arséniate jouerait un rôle non négligeable sur le métabolisme énergétique, certainement à cause de sa compétition avec le phosphate dans les réactions de phosphorylation et (ii) permettrait d'appuyer l'hypothèse selon laquelle la compétition arséniate/ phosphate permettrait de différencier les modes d'action des deux métaux.

2. Mélange d'arséniate et de cadmium

A 10°C, quelle que soit l'expérience réalisée (articles 2, 3, 4), la mortalité observée dans les mélanges binaires d'arséniate et de cadmium est toujours inférieure à la mortalité prédite par le modèle créé par Kungolos et al. (2009). Cependant, les différences entre mortalité prédite et observée ne sont pas toujours significatives, qualifiant le mode d'interaction des deux métaux comme « antagoniste » ou « additif » sur la mortalité.

Afin de faciliter la compréhension de cette partie, la figure IV.2 rappelle les modalités d'exposition de chaque expérience réalisée dans le cadre de mélanges binaires ainsi que les résultats de l'effet conjoint des mélanges sur la mortalité de *G. pulex*.

Dans l'**article 2**, les individus de *G. pulex* étaient exposés durant 240h à 10°C à tous les mélanges binaires combinant les LC10, LC25, LC50 et LC75 (obtenues après 240h à 10°C) respectives des deux métaux ([1], [2], [3] et [4] de la figure IV.2). Quelle que soit la combinaison testée, un effet « antagoniste » sur la mortalité a été obtenu, résultat qui a été confirmé dans l'**article 3** pour des individus de *G. pulex* exposés durant 240h aux mélanges combinant les LC10 et LC25 de chaque métal ([1] et [2], figure IV.2).

Dans l'**article 4**, les individus ont été exposés durant 96h à 10°C à tous les mélanges binaires combinant les LC10 et LC25 (obtenues après 96h à 10°C) respectives des deux métaux ([4] et [5], figure IV.2). L'effet « antagoniste » sur la mortalité de *G. pulex* a été observé seulement pour la plus faible combinaison de concentrations, les autres mélanges montrant un effet « additif » sur la mortalité. Comme le temps d'exposition était plus court (96h), les concentrations correspondant au même pourcentage de mortalité pour ce temps d'exposition ont été de ce fait, plus élevées que dans celles identifiées dans les expériences présentées dans les **articles 2 et 3**. Cependant, la plus faible combinaison de concentrations testée dans

l'**article 4** dans laquelle l'effet « antagoniste » sur la mortalité a été observé correspond à la plus forte combinaison de concentrations testée dans l'article 2 ([4], [4], figure IV.2).

L'effet « antagoniste » observé dans l'**article 3** est moins marqué (i) pour les plus fortes combinaisons de concentrations mais aussi (ii) avec l'augmentation de concentration d'un des deux métaux testés dans le mélange. Ainsi, il paraît cohérent, en faisant abstraction du temps d'exposition, que des concentrations métalliques plus fortes en mélange induisent un effet « additif » sur la mortalité, comme observé dans l'**article 4**.

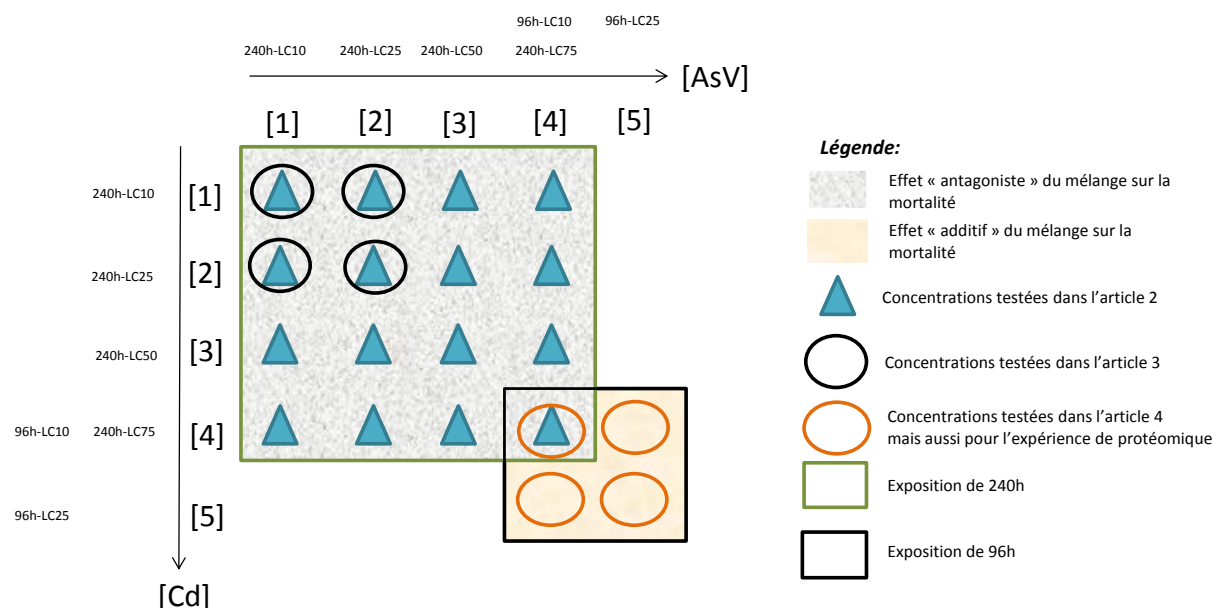


Figure IV.2. Modalités d'exposition des individus de *G. pulex* à 10°C dans les expériences présentées dans les articles 2, 3 et 4 (+protéomique) et résultats obtenus sur le mode interactif du mélange binaire d'arséniate et de cadmium sur la mortalité de ces individus.

Bien que variable selon les doses-ratio testées et selon le temps d'exposition étudié, la plus faible mortalité observée dans les mélanges par rapport à la mortalité prédite peut être reliée principalement à quatre phénomènes:

- une variation de la bioconcentration dans les mélanges par rapport aux expositions simples correspondantes (articles 2 et 4)
- une peroxydation lipidique pas forcément plus élevée dans les mélanges par rapport aux expositions simples correspondantes (article 3)
- un effet « protecteur » de l'arséniate sur la perte en ions Na^+ de l'hémolymphe due au cadmium (article 4).

- un plus faible impact de l'arséniate sur les voies du métabolisme énergétique en présence de cadmium (partie protéomique).

Ces quatre phénomènes sont la résultante (i) de l'interaction de plusieurs processus biologiques ayant une dynamique différente, (ii) des interactions chimiques pouvant être réalisées entre les deux métaux, et (iii) de compromis physiologiques effectués par le gammare, pas forcément identifiés, du fait de ces interactions. Ainsi, les résultats ont montré les difficultés à caractériser les effets souvent complexes des mélanges sur un organisme aquatique.

3. Effets de la température

Les effets de la température ont été présentés dans l'article 4. Les individus de *G. pulex* étaient exposés durant 96h à deux concentrations (i) de Cd seul (LC10 et LC25 obtenues après 96h d'exposition à 10°C), (ii) deux concentrations d'arséniate seul (LC10 et LC25 obtenues après 96h d'exposition à 10°C), ainsi (iii) qu'à tous les mélanges binaires possibles. L'expérience a été réalisée à 5, 10 puis 15°C. Après exposition, les réponses comportementales (ventilation et locomotion) ainsi que les réponses physiologiques (iono-osmorégulation de $[Na^+]$ and $[Cl^-]$ dans l'hémolymphe) ont été examinées. De plus, les réponses protéomiques ont été analysées.

3.1. Effets de la température sur des individus de *G. pulex* témoins

Chez les individus témoins, la mortalité n'est pas significativement différente pour les trois températures testées. Cependant, une plus faible mortalité est observée à 10°C et c'est à 15°C que la mortalité est la plus forte.

Seules les réponses comportementales sont modifiées lorsque la température augmente. En effet, avec une température croissante, les activités locomotrice et ventilatoire chez *G. pulex* sont toutes les deux augmentées, même si les différences sont significatives seulement pour la locomotion.

Wijnhoven et al. (2003) ont montré que les taux métaboliques basaux des organismes aérobies étaient augmentés avec un accroissement de température. Une hausse des taux métaboliques nécessitant une demande d'O₂ plus grande, cela expliquerait partiellement la hausse de la ventilation observée à 15°C. Dodds (2002) a montré qu'une hausse de la température provoquait une diminution de la concentration en oxygène dissous de l'eau, ce qui pourrait causer un dysfonctionnement dans la respiration mitochondriale. De ce fait, il

est probable que l'augmentation de la ventilation observée à 15°C soit effectuée pour permettre une absorption de l'oxygène plus efficace.

Enfin, chez les organismes témoins, l'augmentation de l'activité locomotrice à 15°C par rapport aux deux autres températures pourrait être reliée à l'augmentation de la ventilation et donc de l'oxygène disponible pour cette activité.

3.2. Effets de la température sur les individus exposés à de l'arséniate et/ou du cadmium

Les résultats ont été comparés entre 5 et 15°C puisque c'est entre ces deux températures que les différences observées sont les plus fortes.

Chez les individus soumis au cadmium seul, une hausse de la température a provoqué (i) une augmentation de la bioconcentration en cadmium, (ii) une augmentation de la perte d'ions Na⁺ et Cl⁻ hémolymphatiques, (iii) une hausse de la ventilation et (iv) une hausse de la mortalité.

Chez les individus soumis à l'arséniate seul, une hausse de la température a provoqué (i) une tendance à l'augmentation de la bioconcentration en arséniate, (ii) une tendance à la baisse de la locomotion, (iii) une hausse de la ventilation et (iv) une tendance à la hausse de la mortalité.

Les individus soumis au mélange et à une hausse de la température ont montré (i) une hausse de la bioconcentration en Cd mais pas en arséniate, (ii) une augmentation la perte d'ions Na⁺ et Cl⁻ hémolymphatiques (mais qui reste inférieure à celle de l'exposition au cadmium seul), (iii) une hausse de la ventilation et (iv) une hausse de la mortalité.

Une hausse de la bioconcentration peut être reliée à une augmentation de l'absorption métallique. Des travaux issus de la littérature ont montré que lors d'un stress thermique, la biodisponibilité des métaux pouvait être augmentée suite à une plus forte solubilisation des métaux et par conséquent, à une plus grande concentration en ions métalliques libres (Rainbow, 2007). Ces résultats sont controversés puisque d'autres auteurs considèrent que les températures environnementales ont un effet négligeable sur la spéciation des métaux et en particulier sur l'activité de l'ion libre (Hassler et al., 2004). Sokolova et al. (2008) préconisent ainsi de prendre en compte les effets biologiques pour expliquer la modification de l'absorption métallique et, en conséquence, de la bioconcentration. Pour ces auteurs, de nombreux autres facteurs peuvent expliquer une hausse de l'absorption suite à une élévation

de la température chez les organismes ectothermes. Ces facteurs incluent (i) un changement de la fluidité membranaire pouvant affecter l'intégrité et la perméabilité membranaire, et (ii) une hausse des fonctions systémiques (ventilation et absorption d'eau ou de nourriture).

Nous avons observé une hausse de la ventilation chez les individus soumis à un stress métallique isolé ou en mélange binaire, additionné d'une hausse de la température. Cette hausse de la ventilation, pourrait expliquer en partie la hausse de bioconcentration observée, en particulier pour le stress cadmié (*cf.* voies d'entrée des métaux, article 1).

Nous avons montré précédemment qu'une concentration métallique interne seuil chez le gammare pouvait induire des effets néfastes qui étaient plus ou moins spécifiques de la nature du métal (figure VI.1). Une hausse de la bioconcentration peut donc amplifier les effets des métaux. Puisque la bioconcentration en cadmium augmente avec une hausse de la température, il n'est pas surprenant qu'une hausse de la température ait amplifié la perte d'ions Na^+ et Cl^- hémolympatiques chez les *G. pulex* exposés au cadmium. Weber et al. (1990) ont montré que l'hypoxie (liée à une hausse de la température) pouvait perturber les gradients de concentrations transmembranaires et les niveaux d'ions hémolympatiques. Cependant, lors d'une exposition à l'arséniate seul additionnée d'une hausse de température, nous n'avons pas observé d'effets sur $[\text{Na}^+]$ ou $[\text{Cl}^-]$ dans l'hémolymphe, ce qui suggère que cette hypothèse est peu probable dans les situations expérimentales testées lors de cette étude. Chez les individus soumis aux mélanges binaires, nous avons montré un effet « protecteur » de l'arséniate sur la perte d'ions due au cadmium. Quand la température augmente, la bioconcentration en cadmium augmente dans les mélanges alors qu'elle est inchangée pour l'arséniate. Ainsi, il n'est pas surprenant que l'effet « protecteur » de l'arséniate sur la perte d'ions Na^+ et Cl^- de l'hémolymphe soit moins marqué, ce qui peut expliquer la perte de ces ions avec une hausse de température. Ces résultats peuvent partiellement expliquer également la hausse de mortalité observée dans les mélanges et dans les expositions au cadmium seul.

La hausse de ventilation observée avec une hausse de la température lors d'une exposition métallique isolée ou combinée pourrait expliquer une plus grande part de la hausse de la mortalité. En effet, des travaux ont montré qu'en présence de substances métalliques, le taux d'oxygène dissous dans l'eau était réduit de manière encore plus importante quand la température augmentait, provoquant une formation de ROS plus prononcée (Abele et al., 2002; Sampaio et al., 2008) et une réduction plus accusée du transport des électrons dans la mitochondrie (Chandel et Schumacker, 2000; Lannig et al., 2006). Une hausse de la température additionnée d'un stress métallique pourrait donc

induire une plus forte demande d'oxygène, liée à une plus grande demande énergétique pour les systèmes de maintenance (Willmer et al., 2000, Pörtner, 2001), ce qui pourrait ainsi expliquer l'hyperventilation observée. Dans des conditions de température « optimales » (10°C), nous avons vu que la ventilation diminuait dans les expositions métalliques simples par comparaison aux témoins. Nous avons supposé que cette diminution était à considérer comme une stratégie pour réallouer de l'énergie aux systèmes de maintenance, le coût énergétique de la ventilation étant plus grand que le bénéfice énergétique qu'il apporte. Comme une hausse de la température entraîne une hausse de la ventilation chez les individus exposés au stress métallique, il est concevable que la balance entre le coût énergétique et le bénéfice énergétique devienne négative, induisant alors une plus forte mortalité.

Nos résultats ont également montré que quand la température augmente, la hausse de la ventilation est plus prononcée dans le cas d'une exposition à l'arséniate que dans le cas d'une exposition au cadmium. De plus, la locomotion est réduite dans le cas d'une exposition à l'arséniate alors que la réponse locomotrice n'est pas claire dans le cas d'une exposition au cadmium.

Nous avons vu précédemment que le métabolisme énergétique peut être impacté à cause de la compétition existant entre l'arséniate et le phosphate. Une hypoxie plus sévère, suite à une hausse de température, pourrait amplifier ce dérèglement du métabolisme énergétique et augmenter la demande d'O₂, à l'origine d'une plus forte ventilation dans le cas d'une exposition à l'arséniate par rapport à une exposition au cadmium. De plus, une stratégie de réallocation énergétique à partir de la locomotion vers la ventilation chez les individus exposés à la fois à l'arséniate et au stress thermique est envisageable. Cette réallocation énergétique pourrait expliquer la plus forte baisse de locomotion observée chez ces individus par comparaison aux individus soumis à la fois au stress cadmié et thermique.

3.3. Protéomique

Les protéines issues du facteur « condition seule » des ANOVA II sont des protéines qui agissent dans le même sens (par rapport au témoin), toutes températures confondues. Sur les volumes normalisés de chacune de ces protéines, une ANOVA I par température a été réalisée. Nous avons observé, à 10°C, un nombre de protéines différentielles (par rapport au témoin à la même température) beaucoup plus grand qu'aux autres températures, et ce, pour chaque condition métallique testée (groupe A, B et E correspondant à l'arséniate, au

cadmium et au mélange respectivement, Tableau III.3). C'est aussi à 10°C que la mortalité dans les témoins est la plus faible.

Quelques pistes peuvent être envisagées pour expliquer les résultats obtenus, même si elles restent, en l'état actuel, très hypothétiques :

A 10°C, les protéines significativement modifiées dans les expositions métalliques simples ou combinées (par rapport au témoin) pourraient être des protéines régulées de façon positive dans les réactions biochimiques (i.e. afin de compenser le dysfonctionnement du métabolisme énergétique). A 5°C, il y aurait moins de protéines régulées du fait d'un métabolisme ralenti chez *G. pulex*. Dans le milieu naturel par exemple, les individus du genre *Gammarus* ne se reproduisent pas ou très peu à une telle température (Pöckl et al., 2003). A 15°C, le taux métabolique pourrait être augmenté (cf. ci-dessus) mais la balance énergétique pourrait devenir alors négative à cause d'une plus forte hypoxie à cette température, ce qui ne permettrait pas aux gammarus de réguler les protéines aussi fortement qu'à 10°C. Afin de réaliser une interprétation pertinente des résultats, il faut bien prendre conscience que toutes les protéines dont l'expression est significativement modifiée à 10°C, ont une expression également modifiée dans le même sens à 5 et 15°C mais la différence par rapport au témoin à la même température n'est alors pas significative. Ainsi, pour les expositions à 15°C, une autre piste pourrait être explorée. Comme la température augmente les taux métaboliques, il se pourrait qu'une régulation des protéines se fasse déjà chez les individus témoins à 15°C. De ce fait, la différence d'expression entre les individus témoins et les individus exposés aux métaux à 15°C deviendrait alors moins prononcée, ce qui pourrait expliquer le plus faible nombre de protéines d'intérêt à 15°C.

Chapitre V.

Conclusion et Perspectives

Les objectifs de ces travaux de thèse étaient (i) d'évaluer les effets isolés du cadmium, de l'arséniate, et de la température, ainsi que de toutes les interactions possibles entre ces différents paramètres, sur l'organisme modèle *G. pulex*, pour mieux prédire les conséquences d'une multi-contamination environnementale et d'un éventuel changement de température dans un contexte de « changements globaux » au niveau individuel (*approche pronostique*), et (ii) d'établir les bases d'un outil de bioindication précoce d'une contamination métallique, éventuellement multiple, des écosystèmes aquatiques en utilisant une cartographie d'expression de protéines chez *G. pulex* (*approche diagnostique*). Ces deux approches ont été réalisées en laboratoire en conditions contrôlées.

L'approche pronostique s'est basée sur des biomarqueurs physiologiques (mortalité, bioconcentration, pression osmotique), des biomarqueurs comportementaux (fréquence de battements des pléopodes, activité locomotrice), un biomarqueur de défense anti-toxiques (méthionine), des biomarqueurs anti-oxydants (glutathion réduit et activité γ -glutamyl-cystéine ligase), un biomarqueur des dommages cellulaires (malondialdéhyde) et des mesures de réserves énergétiques (lipides, glycogène, protéines). Les résultats d'identification des protéines ont été rattachés à cette partie.

Les résultats ont montré que lorsque *G. pulex* était exposé à l'arséniate ou au cadmium seul (à 10°C), (i) la plupart des biomarqueurs répondaient de manière similaire, et (ii) un lien cohérent entre les réponses de ces différents biomarqueurs était facile à mettre en évidence. En effet, les deux éléments métalliques sont capables de provoquer des peroxydations lipidiques (taux de MDA accru), certainement dues à la formation de ROS, malgré la capacité de *G.pulex* à activer ses systèmes de défenses anti-toxiques (augmentation de la concentration en MT) et antioxydants (augmentation de l'activité GCL et de la concentration en GSH). De plus, des changements dans la quantité des réserves énergétiques mais aussi des changements comportementaux ont été mis en évidence lorsque *G. pulex* était soumis à l'arséniate ou au cadmium. En effet, une diminution des réserves lipidiques et protéiques et une augmentation des réserves de glycogène ont été observées. Nous avons émis l'hypothèse que ce changement était lié à la mise en place d'une stratégie de mobilisation des réserves énergétiques pour assurer un apport énergétique plus important, indispensable au maintien d'un bon fonctionnement des systèmes de maintenance en situation de stress toxique. Les changements comportementaux se traduisent par une diminution des activités locomotrice et ventilatoire lors des expositions aux plus fortes concentrations métalliques testées (arséniate ou cadmium). L'hypothèse d'une réallocation

énergétique vers les systèmes de maintenance aux dépends des activités locomotrices et ventilatoire paraît être l'hypothèse la plus plausible pour expliquer la diminution observée. Cette réallocation semble se faire prioritairement à partir de la locomotion, à cause du besoin vital du organisme de ventiler pour apporter l'oxygène nécessaire (i) au métabolisme aérobie mais aussi (ii) au déplacement de l'individu. Enfin, la hausse de bioconcentration est corrélée positivement avec la concentration métallique externe. A partir d'un certain seuil de concentration métallique interne, la possibilité d'un débordement des mécanismes cellulaires de défense a été abordée, débordement qui serait responsable d'une hausse des effets toxiques observés et donc de la mortalité.

- *Comme les relations entre les différents biomarqueurs sont assez évidentes, il pourrait être envisagé d'accroître le nombre de biomarqueurs étudiés pour chaque exposition métallique simple. Il paraît tout particulièrement intéressant (i) de mesurer les ROS afin d'établir une relation avec la peroxydation lipidique observée, mais aussi (ii) de mesurer d'autres systèmes de défense anti-oxydants, qu'ils soient enzymatiques (SOD, Gpx, catalase...) ou non (vitamines A et E, caroténoïdes...). Les résultats obtenus sur ces nouveaux systèmes de défenses anti-oxydants permettraient également d'appuyer l'hypothèse d'un débordement des mécanismes de défense aux plus fortes concentrations métalliques internes si une réduction de leur efficacité était observée.*

- *Les perturbations historiques peuvent modifier la susceptibilité des organismes. Des préexpositions métalliques pourraient donc être envisagées parallèlement aux expériences réalisées dans le cadre de cette thèse. Par rapport au métal d'exposition (ex : Cd), ces préexpositions pourraient être : soit de même nature que la perturbation étudiée (ex : Cd), soit d'une nature métallique différente (ex : AsV), voire constituées d'un mélange de deux ou plusieurs métaux.*

Les questions auxquelles nous pourrions répondre sont les suivantes : Existe-t-il, chez l'espèce modèle étudiée, une « mémoire » de l'exposition à un toxique, que l'espèce pourrait conserver afin de pouvoir répondre plus rapidement et efficacement lors d'une seconde exposition à ce toxique ou à un toxique d'une autre nature ? En d'autres termes, les systèmes de défense sont-ils plus rapides, plus efficaces lors d'une exposition à un contaminant quand il y a eu une préexposition à ce contaminant (ou à un contaminant d'une autre nature) ou au contraire, les individus sont-ils significativement plus affaiblis du fait de cette première exposition ? La réponse de l'espèce-modèle lors de l'exposition dépend-elle de la nature de la pré-exposition métallique ?

- *Dans les milieux aquatiques, la plupart des pollutions toxiques proviennent de contaminations épisodiques (i.e. pulse exposures), il semblerait intéressant d'examiner la capacité de résilience des organismes soumis à un tel régime de perturbations.*

Malgré une similarité de la plupart des réponses de biomarqueurs quelle que soit l'exposition métallique simple testée, (i) des différences dans l'intensité des réponses sont observées entre les deux expositions métalliques et (ii) certaines réponses de biomarqueurs sont plus spécifiques du métal étudié. Ces résultats ont été expliqués principalement par la compétition existant entre le phosphate et l'arséniate mais aussi par la compétition existant entre le cadmium et le calcium, ces deux compétitions permettant de caractériser spécifiquement les modes d'action des deux métaux. Basé sur les résultats de BCF et de bioconcentration obtenus pour les deux métaux, nous avons émis les hypothèses (i) d'une voie d'entrée majeure du cadmium par les cellules à chlorures présentes sur l'épithélium branchial de *G. pulex* et (ii) d'une voie d'entrée majeure de l'arséniate par l'eau de boisson. L'identification par spectrométrie de masse des protéines dont l'expression est significativement modifiée par l'exposition à l'arséniate ou au cadmium semble indiquer que le métabolisme énergétique est plus impacté dans le cas de l'arséniate, sans doute du fait de la compétition de l'arséniate avec le phosphate dans les réactions de phosphorylations. Le cadmium réduit plus fortement l'activité ventilatoire que l'arséniate (i) car il pourrait entraîner des dommages au sein des épithéliums branchiaux (sa voie d'entrée majeure) plus importants que l'arséniate mais aussi (ii) parce que le métabolisme énergétique est plus impacté en présence d'arséniate que de cadmium et que l'oxygénation indispensable à la production de cette énergie nécessite le maintien d'une activité ventilatoire soutenue. L'iono-osmorégulation ($[Na^+]$ hémolympatique surtout) est impactée en présence de cadmium mais pas en présence d'arséniate, probablement (i) parce que le cadmium fragilise les fonctions branchiales car la branchie est sa voie d'entrée principale dans l'organisme et/ou (ii) parce que le cadmium inhibe l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase. Enfin, une plus forte mobilisation des réserves lipidiques, une plus faible utilisation des réserves protéiques et une plus forte concentration en glycogène dans les cas d'exposition à l'arséniate seul ont été reliées à un impact plus grand de l'arséniate sur le métabolisme énergétique (glycolyse et la chaîne de transport des électrons principalement).

- La spéciation de l'arsenic à l'intérieur du corps mérite d'être étudiée car les différentes formes de l'arsenic, qui ne présentent pas les mêmes niveaux de toxicité à niveaux de contamination (i.e. concentrations) équivalents, n'ont par ailleurs pas les mêmes mécanismes d'action. Des études comparatives complémentaires des effets des expositions aux deux formes d'arsenic inorganiques (AsIII et AsV) devront également être réalisées chez *G. pulex*.

- Les dommages branchiaux suite à une exposition au Cd ou à l'AsV méritent d'être comparés, par exemple en réalisant des analyses histologiques fines des tissus branchiaux.

- Il paraît également intéressant de mesurer les activités Na^+/K^+ -ATPase pour chaque métal étudié.

Dans les mélanges binaires, la comparaison des réponses des biomarqueurs aux témoins ont fournis des patrons de réponse similaires à ceux obtenus pour les expositions aux métaux seuls. Cependant, la recherche d'un lien cohérent entre réponses des biomarqueurs est plus complexe car les réponses des biomarqueurs varient selon les doses-ratios étudiés. Une mortalité observée plus faible que celle prédite par le modèle utilisé a été obtenue dans tous les mélanges (*i.e.* (i) effet « antagoniste » si la différence est significative ; ou (ii) effet « additif » si cette différence n'est pas significative). Elle peut être reliée à (i) une variation de la bioconcentration dans les mélanges par rapport aux expositions simples correspondantes, (ii) une plus faible peroxydation lipidique dans les mélanges par rapport aux expositions simples, (iii) un plus faible impact de l'arséniate sur les voies du métabolisme énergétique en présence de cadmium et (iv) un effet « protecteur » de l'arséniate sur la perte en ions Na^+ hémolympatiques due à l'action du cadmium.

- Pour mieux comprendre les effets interactifs liés à la présence simultanée de ces deux métaux, et particulièrement la baisse de bioconcentration observée dans le mélange binaire par comparaison aux expositions simples, il serait intéressant d'étudier les réactions de complexation et de compétition pouvant exister entre les sels d'arséniate et de cadmium utilisés dans cette étude.

Nos résultats montrent qu'une hausse de la température amplifie la toxicité des métaux seuls ou en mélange sur *G. pulex*. La plus grande toxicité observée lorsque la température est plus élevée semble principalement être expliquée par (i) une augmentation de la bioconcentration (tendance non significative pour l'arséniate qui le devient pour le Cd), par (ii) une déplétion de la concentration en oxygène dissous dans l'eau. La déplétion de l'oxygène dissous dans l'eau provoquée par une hausse de la température entraîne une diminution de la quantité d'oxygène « environnemental » disponible et peut donc causer un dysfonctionnement du métabolisme énergétique. Pour compenser cette perte d'efficacité dans la production d'énergie, le gammare est donc contraint de ventiler plus au détriment de la stratégie de réallocation énergétique des activités locomotrices et respiratoires vers les mécanismes de maintenance adoptée lors d'une contamination toxique quand la température est « optimale ». La hausse de la bioconcentration peut être responsable d'un débordement des mécanismes antitoxiques cellulaires et peut être expliquée par une plus forte absorption métallique (hausse de la biodisponibilité du métal, hausse de l'activité ventilatoire, perte de la fluidité membranaire...)

- Il paraît donc intéressant de suivre, de manière complémentaire, l'évolution de la fluidité membranaire parallèlement à l'évolution du résultat de la spéciation du métal lors d'une hausse de température.

L'approche diagnostique des contaminations métalliques *via* le protéome de *G. pulex*, a été construite sur des cartographies d'expression de protéines. L'objectif était (i) de trouver des lots de protéines singulières d'une contamination par un métal donné, pouvant être encore détectées dans un cocktail de métaux et (ii) à défaut d'une telle spécificité, de mettre en évidence un ensemble de spots de protéines susceptible d'identifier une contamination métallique *lato sensu*. Ce travail a permis de proposer une méthode originale de travail afin de prendre en compte les effets seuls et conjoints des métaux, tout en s'affranchissant d'un facteur abiotique majeur, notamment dans un contexte changement climatique, la température. Les résultats ont montré que certains spots de protéines étaient discriminants de la nature du métal, mais la réponse d'aucun spot n'a pu être considérée comme un indicateur robuste d'une exposition à un métal donné, en cas de mélange binaire. Ce résultat, chez *G. pulex*, a montré la difficulté d'utiliser, au moins chez cette espèce, la protéomique comparative comme marqueur d'alerte d'une contamination métallique singulière. Cependant, la mise en évidence de deux spots réagissant significativement (lorsque comparés aux témoins) lors de l'exposition aux deux métaux, qu'ils soient seuls ou en mélange, pourrait laisser entrevoir la possibilité d'utiliser la protéomique comparative comme marqueur d'alerte d'une contamination métallique *lato sensu*.

Nous avons par ailleurs montré, après identification des protéines, que des dégradations de myosine, d'actine et d'hémocyanine avaient eu lieu, contaminant le gel. Nous nous sommes également heurtés aux limites de la 2D, cette technique permettant de ne mettre en évidence que les 2000 spots de protéines correspondant aux protéines les plus abondantes. Or les protéines abondantes détectées sont souvent impliquées dans un même processus physiologique, d'où (i) une certaine redondance dans les informations apportées dans des conditions expérimentales différentes, même avec des organismes modèles différents et (ii) leur surnom de « déjà-vu ». Dans notre étude sur *G. pulex*, les protéines identifiées ont été pour la plupart des protéines associées au métabolisme énergétique et des protéines musculaires. Ainsi, et avant de conclure sur les possibilités d'utilisation de la protéomique en bioindication, il paraît nécessaire au préalable d'optimiser le protocole préparatif visant à l'obtention des gels fournissant les spots à interpréter.

Cette optimisation pourrait être obtenue en rehaussant l'expression des protéines faiblement abondantes, potentiellement impliquées dans des mécanismes physiologiques/réactions biochimiques plus spécifiquement altérés ou activés par les métaux et donc plus intéressants pour un outil de bioindication. Cette étape doit passer par une réduction, voire une élimination, des protéines les plus abondantes, qui semblent porteuses de l'information la moins originale. Nous pouvons donc envisager dans l'avenir (i) une étape préalable de purification des protéines musculaires à fort pouvoir contaminant. Une technique d'immuno-déplétion, visant à éliminer certaines molécules cibles à partir d'anticorps dirigés spécifiquement contre elles, est une solution à envisager. Par exemple, l'addition d'un anticorps anti-myosine dans les extraits protéiques pourrait permettre l'élimination de la myosine, à caractère fortement contaminant dans les gels que nous avons obtenus. Les extraits pourraient ensuite être centrifugés et seuls les surnageants, purifiés de cette myosine, seraient alors récupérés pour l'analyse du protéome. Cette opération n'est cependant envisageable que si les anti-myosines commerciaux ont capacité à reconnaître la myosine retrouvée chez le gammare et à se lier à cette molécule avec une forte affinité. Un certain nombre d'essais immunologiques préalables de reconnaissance type « antigène-anticorps » (test ELISA, test de l'anneau...) paraissent donc indispensables.

Nous pouvons également envisager de réaliser des fractionnements cellulaires ou tissulaires. Par exemple, des fractionnements cellulaires pourraient permettre de cibler un (ou plusieurs) organe(s) cellulaire(s) pour mettre en évidence des protéines faiblement abondantes non détectées sur l'organisme *in toto* tel qu'utilisé dans le protocole que nous avons adopté. Par exemple, nous pourrions envisager de travailler uniquement sur la branchie afin d'obtenir une meilleure homogénéité de l'échantillon biologique et surtout moins de protéines de « structure » au sens large (la myosine étant à la fois une protéine musculaire et du cytosquelette). Ces fractionnements ont toutefois, en termes de faisabilité lors d'une utilisation opérationnelle, un inconvénient majeur, à savoir la nécessité de réaliser des pools d'un nombre important de gammares afin de maintenir la masse minimale de protéines indispensable à une révélation et une identification efficaces des protéines lors de l'électrophorèse 2D et la spectrométrie, respectivement.

Si les pistes d'optimisation de la méthode proposée pour analyser le protéome de l'espèce modèle *G. pulex* ne s'avèrent pas concluantes, il faudra alors envisager l'utilisation d'un autre organisme modèle (e.g. présentant un taux de protéines globalement suffisant pour permettre un fractionnement sur un faible nombre d'individus, mais une plus faible proportion relative de protéines musculaires et, si possible, dont le génome est séquencé). Ces travaux de thèse ont également montré que c'était à une température de 10°C que le protéome des individus de *G. pulex* exposés aux métaux se différenciait le plus nettement du protéome des individus témoins. La dépendance des réponses physiologiques à la température, la complexité des effets conjoints des substances en cocktails auxquelles sont soumis les

*organismes et les facteurs confondants potentiels (parasitisme, sexe, âge, histoires de vie...) semblent donc, dans l'état actuel des recherches, rendre difficilement envisageable l'utilisation à court terme de la protéomique comparative dans les études de biomonitoring in situ. Il paraît, pour l'instant, plus raisonnable d'envisager plutôt, après l'optimisation des phases préparatoires et de l'espèce modèle, une méthode de bioindication utilisant l'outil « protéomique », qui soit basée sur un protocole de laboratoire, à une température de 10°C (si nous gardons *G. pulex* comme espèce modèle), avec des individus de caractéristiques populationnelles connues (donc préférentiellement issus d'élevages contrôlés), exposés, sur une période à définir, à de l'eau provenant du site à tester.*

Références bibliographiques

A

- Aardema M.J., MacGregor J.T., 2002. Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **499**: 13-25.
- Abbott W.S., 1925. Method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. **18**: 265-267.
- Abel T., Bärlocher F., 1988. Uptake of cadmium by *Gammarus fossarum* (Amphipoda) from food and water. *Journal of Applied Ecology*. **25**: 223-231.
- Abele D., Heise K., Pörtner H.O., Pantarulo S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *The Journal of Experimental Biology*. **205**: 1831-1841
- Adam J., Greenwood P.J., 1983. Why are males bigger than females in pre-copula pairs of *Gammarus pulex*? *Biomedical and Life Sciences*. **13**(4): 239-241
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A., 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*. **74**(4): 324-329.
- Ahearn G.A., Mandal P.K., Mandal A., 2004. Calcium regulation in crustaceans during the molt cycle: a review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. **137**: 247-257.
- Akira N., Anderson M.E., Meister A., 1990. Cellular glutathione as a determinant of sensitivity to mercuric chloride toxicity: Prevention of toxicity by giving glutathione monoester. *Biochemistry and Pharmacology*. **40**: 693-697.
- Alhama J., Romero-Ruiz A., López-Barea J., 2006. Metallothionein quantification in clams by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization. *Journal of Chromatography*. **A1107**: 52-58.
- Alonso A., De Lange H.J., Peeters E.T.H.M., 2009a. Development of a feeding behavioural bioassay using the freshwater amphipod *Gammarus pulex* and the Multispecies Freshwater Biomonitor. *Chemosphere*. **75**: 341-346.

Alonso A., De Lange H., Peeters E.T.H.M., 2009b. Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *G. fossarum*. *Ecotoxicology*. **19**: 133-140.

Amelina H., Apraiz I., Sun W., Cristobal S., 2007. Proteomics-based method for the assessment of marine pollution using liquid chromatography coupled with two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteome Research*. **6**: 2094-2104.

Amiard, J.-C., Cosson, R.P., 1997. Les métallothionéines. In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C., Ramade F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris, pp. 53-66.

Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates : Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic toxicology*. **76**: 160-202.

Amiard J.C., Amiard-Triquet C., 2008. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier (Eds). 375p.

Andrew A.S, Warre A.J, Brachowsky A., Temple K.A., Klei L., Soucy N.V., O'Hara K., Hamilton J.W., 2003. Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells. *Environmental Health Perspectives*. **111**: 825-835.

Ansaldo M., Nahabedian D.E., Di Fonzo C., Wider E.A., 2009. Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*. *Science of the Total Environment*. **407**: 1923-1928

Ansaldo M., Nahabedian D.E., Holmes-Brown E., Agote M., Ansay C.V., Varrengia Guerrero N.R., Wider E.A., 2006. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. *Toxicology*. **224**: 119-127.

Apraiz I., Mi J., Cristobal S., 2006. Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). *Molecular and Cellular Proteomics*. **5**:1274-1285.

Bandara L.R., Kennedy S., 2002. Toxicoproteomics-a new preclinical tool. *Research focus*. **7**(7): 411-418

Archaimbault V., 2003. Réponses bio-écologiques de macroinvertébrés benthiques aux perturbations : la base d'un outil diagnostique fonctionnel des écosystèmes d'eaux courantes, Thèse en Hydrobiologie animale, Université de Metz.

Attrill M.J., Depledge M.H., 1997. Community and population indicators of ecosystem health: Targeting links between levels of biological organization. *Aquatic Toxicology*. **38** (1-3): 183-197.

B

Barnard J.L., Barnard C.M., 1983. Freshwater Amphipoda of the World (Parts I & II). Hayfield Associates, Mt. Vernon.

Barrett J., Brophy P.M., Hamilton J.V., 2005. Analysing proteomic data. *International journal for Parasitology*. **35** (5): 543-553.

Bayne B.L., Brown D.A., Burns K., Dixon D.R., Ivanovici A., Linvingstone D.R., Lowe D.M., Moore M.N., Stebbing A.R.D., Widdows J., 1985, The effects of stress and pollution on marine animals, *Praeger Publishers*, New York, 384p.

Behrens W., Madère R., 1991. Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Lipids*. **26**: 232-236. doi: 10.1007/BF02543977.

Beliaeff B., Burgeot T., 2009. Integrated Biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **21**(6): 1316-1322.

Berthet B., Mouneyrac C., Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Berthelot Y., Le Hen A., Mastain O., Rainbow P.S., Smith B.D., 2003. Response to metals of the polychaete annelid *Hediste diversicolor*, a key species in estuarine and coastal sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **45**: 468-478.

Berthet B., Mouneyrac Perez T., Amiard-Triquet C., 2005. Metallothionein concentration in sponges (*Spongia officinalis*) as a biomarker of metal contamination. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **141** (3): 306-313.

Benninghoff A.D., 2007. Toxicoproteomics- The next step in the evolution of environmental biomarkers? *Toxicological Sciences*. **95**: 1-4.

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

Biesinger K.E., Christensen G.M., 1972. Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*. *Journal of the Fisheries Board of Canada*. **29**: 1691-1700.

Bissen M., Frimmel F.H., 2003a. Arsenic—a review. Part I: occurrence, toxicity, speciation, and mobility. *Acta Hydrochimica Hydrobiologia*. **31**: 9-18.

Bissen M., Frimmel F.H., 2003b. Arsenic—a review. Part II: oxidation of arsenic and its removal in water treatment. *Acta Hydrochimica Hydrobiologia*. **31**: 97-107.

Bisson M., Diderich R., Houeix N., Hulot C., Lacroix G., Lefevre J.P., Leveque S., Magaud H., Morin A., Pepin G., Pichard A., 2011. Cadmium et ses derives- INERIS- Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. 82p.

Blackstock W.P., Weir M.P., 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnology*. **17**: 121-126.

Boets P., Lock K., Goethals P.L.M., Janssen C.R., De Schamphelaere K.A.C., 2012. A comparison of the short-term toxicity of cadmium to indigenous and alien gammarid species. *Ecotoxicology*. **21**: 1135-1144.

Bollache L., 2001. Sélection sexuelle, parasitisme et patterns d'appariement chez le crustacé amphipode *Gammarus pulex*. Université Claude Bernard de Lyon. 204p.

Bollache L., Gambade G., Cézilly F., 2001. The effects of two acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus*, on pairing success in male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. **49**: 296-303.

Borowsky B., 1991. Patterns of reproduction of some amphipod crustacean and insights into the nature of their stimuli. In: Bauer R.T., Martin J.W.(eds), Crustacean sexual biology. Columbia university press, New York. p. 33-49.

Bousfield E.L., 1973. Shallow-water gammaridean Amphipoda of New England. Cornell University Press, Ithaca, New York.

Bouskill N.J., Handy R.D., Ford T.E., Galloway T.S., 2006. Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **65**: 342-349.

Boverhof D.R., Zacharewski T.R., 2006. Toxicogenomics in risk assessment: Applications and needs. *Toxicological Sciences*. **89**: 352-360.

Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

Bradley B.P., Shrader E.A., Kimmel D.G., Meiller J.C., 2002. Protein expression signatures: an application of proteomics. *Marine Environmental Research*. **54**: 373-377.

Brooks S.J., Mills C.L., 2003. The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. **135**: 527– 537.



Cadenas E., Sies H., 1998. The lag phase. *Free Radical Research*. **28**: 601-609.

Cai L., Satoh M., Tohyama C., Cherian M.G., 1999. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology*. **132**: 85-98.

Calow P., Forbes V.E., 1998. How do physiological responses to stress translate into ecological and evolutionary processes? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. **120**:11-16

Cameron J.N., 1986. Acid base equilibria in invertebrates. In: Heisler, N. (Ed.), *Acid-Base Regulation in Animals*. Elsevier, New York, pp. 357-394.

Canadian Environmental Protection Act., 1994. Priority substances list, assessment report, cadmium and its compounds.

Canivet V., Chambon P., Gibert J., 2001. Toxicity and Bioaccumulation of Arsenic and Chromium in Epigeal and Hypogean Freshwater Macroinvertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **40**: 345-354.

Caputo E., Moharram R., Brian M.M., 2003. Methods for on-chip protein analysis. *Analytical Biochemistry*. **321** (1): 116-124.

Caputo E., Lombardi L., Luongo V., Moharram R., Tornatore P., Pirozzi G., Guardiola J., Martin B.M., 2005. Peptide profiling in epithelial tumor plasma by the emerging proteomic techniques. *Journal of Chromatography B*. **819** (1-5): 59-66.

Cavaletto M., Ghezzi A., Burlando B., Evangelisti V., Cerratto N., Viarengo A., 2002. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **131**: 447-455.

Chabot F., Mitchell J.A., Gutteridge J.M.C., Evans T.W., 1998. Reactive oxygen species in acute lung injury. *European Respiratory Journal*. **11**: 745-757.

Chakraborty S., Ray M., Ray S., 2010. Toxicity of sodium arsenite in the gill of an economically important mollusk of India. *Fish and Shellfish Immunology*. **29**: 136-148.

Chakraborty S., Ray M., Ray S., 2012. Arsenic toxicity: A heart-breaking saga of a freshwater mollusk. *Tissue and Cell*. **44**: 151-155.

Chandel N.S., Schumacker P.T., 2000. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insights. *Journal of Applied Physiology*. **88**:1880-9.

Chapman R.F., 1998. The insects: Structure and function, Cambridge University Press, Cambridge, 4th Edition, 919p.

Chatterjee A., Das D., Mandal B.K., Chowdhury T.R., Samanta G., Chakraborti D., 1995. Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part I: arsenic species in drinking water and urine of the affected people. *Analyst*. **120**: 643-650.

Chen Y., Shertzer H.G., Schneider S.N., Nerbert D.W., Dalton T.P., 2005. Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *The Journal of Biological Chemistry*. **280** (40): 33766-74.

Cherel Y., Robin J-P., Heitz A., Calgari C., Le Maho Y., 1992. Relationship between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic and environmental Physiology*. **162**(4): 305-313.

Cheung A.P.L., Lam T.H.J., Chan K.M., 2004. Regulation of tilapia metallothionein gene expression by heavy metal ions. *Marine Environmental Research*. **58**: 389-394.

- Chevreux E., Fage L., 1970. Amphipodes. (eds) faune de France, Tome 9. Nendeln (Lichtenstein)
- Cooper P.D., 1994. Mechanisms of haemolymph acid-base regulation in aquatic insect. *Physiol. Zoology*. **67**(1): 29-53.
- Choi J., Ha M.H., 2009. Effect of cadmium exposure on the globin protein expression in 4th instar larvae of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae): An ecotoxicoproteomics approach. *Proteomics*. **9**: 31-39.
- Chora S., Starita-Geribaldi M., Guignonis J.M., Samson M., Roméo M.,Bebianno M.J., 2009. Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. *Aquatic Toxicology* (Amst). **94**: 300-308.
- Coffinet S., Cossu-Leguille C., Rodius F., Vaseur P., 2008. Glutamate cysteine ligase (GCL) in the freshwater bivalve UNIO TUMIDUS: Impact of storage conditions and seasons on activity and identification of partial coding sequence of the catalytic subunit. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. **151**: 88-95
- Colby S., 1967. Calculation synergistic and antagonistic responses of herbicide combination. *Weeds*. **15**: 20-22.
- Collén J., Pinto E., Pedersén M., Colepicolo P., 2003. Induction of oxidative stress in the red macroalgae *Gracillaria tenuistipitata* by pollutant metals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **45**: 337-342.
- Correia A.D., Lima G., Costa M.H., Livingstone D.R., 2002. Studies on biomarkers of copper exposure and toxicity in the marine amphipod *Gammarus locusta* (Crustacea). I: induction of metallothionein and lipid peroxidation. *Biomarkers*. **7**(5): 422-437.
- Correia A.D., Costa M.H., Luis O.J., Livingstone D.R., 2003. Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus lacustra* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **289**(1): 83-101.
- Cosson R.P., Amiard J-C., 2000. Use of metallothioneins as biomarkers of exposure to metals. In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J-C., Ramade F. (Eds). *Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment*. Scientific Publs, Inc., Enfield, UAS, Plymouth, UK, 2000, pp. 79-111.

Costa F.O., Costa M.H., 1999. Life history of the amphipod *Gammarus locusta* in the Sado estuary (Portugal). *Acta Oecologica*. **20**: 305-314.

Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A, Vasseur P., 1997a. Glutathione reductase, selenium dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **38**:122-131.

Cossu C., Doyotte A., Jacquin M-C., Vasseur P., 1997b. Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène. In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie*. Aspects Fondamentaux. Masson, Paris, pp. 126-147.

Cousins R.J. 1985. Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiology reviews*. **65**: 238-309.

Cullen W.R., Reimer K.J., 1989. Arsenic speciation in the environment. *Chemical reviews*. **89**: 713-764.

D

Daily G., 1997. Nature's services : Societal dependence on natural ecosystems. Island Press. 412 p.

Danchin E., Giraldeau, L-A., Cézilly F., 2005. Concepts fondamentaux en écologie comportementale. Dunot (Eds). 664p.

Dangles O., Guérold F., 2001. Leaf litter processing and invertebrates linking shredders and leaf litter processing: Insights from an acidic stream study. *International Review of Hydrobiology*. **86**: 395-406.

De Coen W.M., Janssen C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: A new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. **6**: 43-55

De Coen W.M., Janssen C.R., 2003. A multivariate biomarker-based model predicting population-level responses of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **22**: 2195-2201

Depledge M.H., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecological tools. In M.C. Fossi et C. Leonzio(eds). *Nondestructive Biomarkers in vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, 261-285.

Depledge M.H., Galloway T.S., 2005. Healthy animals, healthy ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 3(5): 251-258.

De Lafontaine Y., Gagné F., Blaise C., Costan G., Gagnon P., Chan H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology*. 50: 51-71.

DeLeve L.D., Kaplowitz N., 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*. 52: 287-305.

Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N., 2005. A review of recent studies on malondialdéhyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*. 15: 316-328.

De Zwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E., 1999. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. *Free radical Biology and Medicine*. 26 (1-2): 202-226.

Devin S., Piscart C., Beisel J.N., Moreteau J.C., 2003. Ecological traits of the amphipod invader *Dikerogammarus villosus* on a mesohabitat scale. *Archiv für Hydrobiologie*. 158: 43-56.

Diaz-Barriga F., Llamas E., Mejia J.J., Carrizales L., Santoyo M.E., Vega-Vega L., Yanez L., 1990. Arsenic-cadmium interaction in rats. *Toxicology*. 64(2): 191-203.

Dodds W.K., 2002. Freshwater biology: concepts and environmental applications. San Diego, California: Academic Press.

Dowling V.A., Sheehan D., 2006. Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics*. 6: 5597-5604.

Dröge W., 2003. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological review*. 82: 47-95.

Ducrot V., 2005. Compréhension et modélisation des relations entre les caractéristiques biologiques et écologiques et la sensibilité aux contaminants des communautés d'invertébrés benthiques: perspectives pour l'évaluation des effets des substances chimiques, *Thèse de l'université de Metz*.

Durou C., Mouneyrac C., Pellerin J., Péry A., 2008. Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. Dans Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Paris : Lavoisier. P. 273-289.

Dutra B.K., Castiglioni D.S., Santos R.B., Bond-Buckup G., Oliveira G.T., 2007. Seasonal variations of the energy metabolism of two sympatric species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in the southern Brazilian highlands. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. **148**(1): 239-247.

Ε

Elsenhans B., Schmolke G., Kolb K., Stokes J., Forth W., 1987. Metal-metal interactions among dietary toxic and essential trace metals in the rat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **14**(3): 275-287

Esterbauer H., Cheeseman K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In L. Packer et Glazer A.N. (eds), *Methods in Enzymology*. Vol. 186. Academic press, San Diego, 407-421.

Esterbauer H., 1993. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxydation products. *The American Society for Clinical Nutrition*. **57**: 779S-786S

Ζ

Falnoga I, Stibilj V, Tusek-Znidaric M, Slejkovec Z, Majez D, Jacimovic R, Scancar J., 2000. Effect of arsenic trioxide on metallothionein and its conversion to different arsenic metabolites in hen liver. *Biological Trace Element Research*. **78**: 241-254.

Fargasova A., 1994. Toxicity of metals on *Daphnia magna* and *Tubifex tubifex*. *Ecotoxicology and Environmental safety*. **27**: 210-213.

Fattorini D., Regoli F., 2004. Arsenic speciation in tissues of the Mediterranean polychaete *Sabella spallanzanii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **23**: 1881-1887.

Felten V., Guerold F., 2004. Haemolymph [Na⁺] and [Cl⁻] loss in *Gammarus fossarum* exposed in situ to a wide range of acidic streams. *Disease of Aquatic Organisms*. **61**:113-121.

- Felten V., Charmantier G., Mons R., Geffard A., Rousselle P., Coquery M., Garric J., Geffard O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*. **86**: 413-425.
- Fielding N.J., MacNeil C., Dick J.T.A., Elwood R.W., Riddell G.E., Dunn A.M., 2003. Effects of the acanthocephalan parasite *Echinorhynchus truttae* on the feeding ecology of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Zoology*. **261**:321-325.
- Fitter R., Manuel R., 1994. Collins photo guide to lakes, rivers, streams and ponds. HarperCollins, London.
- Fleischer M. Sarofilm A.F., Fassett D.W., Hammond P., Shacklette H.T., Nisbet I.C., Epstein S., 1974. Environmental impact of cadmium: a review by the Panel on hazardous trace substances. *Environmental Health Perspectives*. **7**: 253-323.
- Forrow D. and 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**(8): 2100-2106
- Flik G., Verboost P.M., Astma W., Lucu C., 1994. Calcium transport in gill plasma membranes of the crab *Carcinus maenas*: evidence for carriers driven by ATP and a Na⁺ gradient. *The Journal of Experimental Biology*. **195**: 109-122.
- Fowler B.A., Hildebrand C.E., Kojima Y., Webb M., 1987. Nomenclature of metallothioneins. In: Kägi J.H.R., Kojima Y. (Eds.). *Metallothionein II*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 19-22.
- Fowler B.A., Whittaker M.H., Lipsky M., Chen G.W-Q., 2004. Oxydative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures: 30-day, 90 day, and 180 day drinking water studies in rats: An overview. *Biometals*. **17**(5): 567-568.
- Francesconi K.A., Edmonds J.S., 1996. Arsenic and marine organisms. *Advances in Inorganic Chemistry*. **44**: 147-189.
- Fraysse B., Geffard O., Berthet B., Quéau H., Biagianti-Risbourg S., Geffard A., 2006. Importance of metallothioneins in the cadmium detoxification process in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **144**: 286-293.

Freire C.A., Onken H., McNamara J.C., 2008. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. **151**: 272-304.

Friedberg T., Bentley P., Stasiecki P., Glatt H.R., Raphael D., Oesch F., 1979. The identification, solubilization, and characterization of microsome-associated glutathione S-transferases. *The Journal of Biological Chemistry*. **254** (23): 12028-12033.

Fridovitch I., 1975. Superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. **44**: 147-159

Fröhlich T., Arnold G.J., Fritsch R., Mayr T., Laforsch C., 2009. LC-MS/MS-based proteome profiling in *Daphnia pulex* and *Daphnia longicephala*: the *Daphnia pulex* genome database as a key for high throughput proteomics in *Daphnia*. *BMC genomics*. **10**: 171.



Garric J., Geffard O., 2007. Mise au point de biotests au laboratoire et in situ sur des espèces représentatives du milieu naturel: crustacé *Gammarus pulex*, mollusques gastéropodes (*Potamopyrgus antipodarum*, *Valvata piscinalis*), 23p.

Gebel T., 2000. Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology*. **144**: 155-162.

Geffard A., Amiard J., Amiard-Triquet C., 2002a. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers*. **7**: 123-137.

Geffard A., Geffard O., His E., Amiard J-C., 2002b. Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Marine Ecology Progress Series*. **233**: 131-142.

Geffard A., Amiard-Triquet C., Amiard J-C., 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **61**: 209-220.

Geffard A., Quéau H., Debourge O., Biagianti-Risbourg S., Geffard O., 2007. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology*. **145**: 632-640.

- Geffard A., Sartelet H., Garric J., Biagenti-Risbourg S., Delahaut L., Geffard O., 2010. Subcellular compartmentalization of cadmium, nickel, and lead in *Gammarus fossarum*: Comparison of methods. *Chemosphere*. **78**: 822-829.
- George S.G., Olsson P.E., 1994. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In: Kramer, K.J.M. (Ed.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 151-171.
- Ghosh D., Datta S., Bhattacharya S., Mazumder S., 2007. Long-term exposure to arsenic affects head kidney and impairs humoral immune responses of *Clarias batrachus*. *Aquatic Toxicology*. **81**: 79-89.
- Griffith O.W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*. **27**: 922-935.
- Gutteridge J.M.C., Halliwell B., 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*. **15**(4):129-135
- Gismondi, 2012. Thèse. Etude des systèmes de défenses antitoxiques chez l'amphipode *Gammarus roeseli* : effets du parasitisme et d'une exposition au cadmium. Université de Lorraine.
- Gismondi E., Rigaud T., Beisel J-N., Cossu-Leguille C., 2012a. Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a Gammarid. *Environmental pollution*. **160**: 17-23.
- Gismondi E., Beisel J-N., Cossu-Leguille C., 2012b. *Polymorphus minutus* affects antitoxic responses of *Gammarus roeseli* exposed to cadmium. *PlosOne*. **7**(7): e41475. doi:10.1371/journal.pone.0041475.
- Gismondi E., Cossu-Leguille C., Beisel J-N., 2012c. Acanthocephalan parasites: help or burden in gammarid amphipods exposed to cadmium?. *Ecotoxicology*. **21**(4): 1188-1193.
- Gledhill D., Sutcliffe D.N., Williams W.D., 1993. British freshwater crustacea malacostraca: A key with ecological notes. Freshwater Biological Association. 176pp.
- Gomiero A., Pampamin D., Bjornstad A., Larsen B., Provan F., Lying E. and Andersen O., 2006. An ecotoxicoproteomic approach (SELDI-TOF mass spectrometry) to biomarker discovery in crab exposed to pollutants. *Aquatic toxicology*. **78S**:S34-S41

Görg A.C., Obermaier G., Boguth A., Harder B., Scheibe R., Wildgruber R., Weiss W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. **21**: 1037–1053.

Görg A., Postel W., Günther S., 1988. Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. **9**: 531–546.

Gowing, D.P., 1960. Comments on tests of herbicide mixtures. *Weeds*. **8**: 379-391.

Grassé P.P., Poisson R.A., Tuzet O., 1961. Zoologie, Tome I, Invertébrés. Masson et Cie (Eds), Paris. pp. 547-1185.

Greenaway P., Nakamura T., 1991. Nitrogenous excretion in two terrestrial crabs (*Gecarcoidea natalis* and *Geograpsus grayi*). *Physiological Zoology*. **64**: 767–786.

Gregus Z., Nemeti B., 2007. Glutathione-dependent reduction of arsenate by glycogen phosphorylase—Responsiveness to endogenous and xenobiotic Inhibitors. *Toxicological Sciences*. **100**(1):43-53.

Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R., 1999a. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*. **19** (3): 1720-1730.

Gygi S. P., Rist B., Gerber S. A., Turecek F., Gelb M. H., Aebersold R., 1999b. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*. **17**: 994–999.

Gygi S. P., Corthals G. L., Zhang Y., Rochon Y., Aebersold R., 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**: 9390–9395.



Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological chemistry*. **249**: 7130-7139.

Halliwell B., Gutteridge J.M., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*. **219**: 1-14.

Hanash, S. M., 2000. Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients, Current status. *Electrophoresis*. **21**: 1202-1209.

Hanash S., 2003. Disease proteomics. *Nature*. **422**: 226-232.

Hanaoka K., Nakamura O., Ohno H., Tagawa S., Kaise T., 1995. Degradation of arsenobetaine to inorganic arsenic by bacteria in seawater. *Hydrobiologia*. **316**: 75-80.

Hassler C.S., Slaveykova V.I., Wilkinson K.J., 2004. Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **23**:283-291.

Haynes P., Gygi S., Figeys D. and Aebersold R., 1998. Proteome analysis: Biological assay or data archive?, *Electrophoresis*. **19**:1862-1871.

Haynes P.A., Yates J.R., 2000. Proteome profiling – pitfalls and progress. *Yeast*. **17**: 81-87.

Hervant F., 1996. Réponses comportementales, respiratoires, métaboliques à l'hypoxie de crustacés souterrains. Comparaison avec des crustacés superficiels, Thèse de doctorat de l'Université de Lyon 1, spécialité Ecologie- Physiologie animale. 159p.

Hervant F., Mathieu J., Messana G., 1997. Locomotory, ventilatory and metabolic responses of the subterranean *Stenasellus virei* (Crustacea: Isopoda) to severe hypoxia and subsequent recovery. *Comptes Rendus Academie Sciences Paris, Life Sciences*. **320**: 139-148.

Hiatt V., Huf, J.E. 1975. The environmental impact of cadmium: an overview. *International journal of Environmental Studies*. **7** (4): 277-285.

Hoeben A., Landuyt B., Botrus G., De Boeck G., Guetens G., Highly M., Van Oosterom A.T., De Bruijn E.A., 2006. Proteomics in cancer research: methods and application of array-based protein profiling technologies. *Analytica Chimica Acta*. **564**: 19-33.

Holmstrup M., Sorensen J.G., Overgaard J., Bayley M., Bindesbol A-M., Slotsbo S., Fisker K.V., Maraldo K., Waagner D., Labouriau R., Asmund G., 2010. Body metal concentrations and glycogen reserves in earthworms (*Dendrobaena octraedra*) from contaminated and uncontaminated forest soil. *Environmental pollution*. **159**(1): 190-197.

Hosokawa Y., 1993. Remediation work for mercury contaminated bay-experiences of Minamata bay project, Japan. *Water Science and Technology*. **28**: 339-348.

Huggett R., Kimerle R., Mehrle P. and Bergman H., 1992. Biomarkers, *Biochemical, Physiological, and histological markers of anthropogenic Stress*, Lewis editions, 347 p.

Hugues M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*. **133**: 1-16

7

Iles K.E., Liu R-M., 2005. Mechanisms of glutamate cysteine ligase (GCL) induction by 4-hydroxynonenal. *Free Radical Biology and Medicine*. **38** (5): 457-556.

Isnard P., Flammarion P., Roman G., Babut M., Bastien P., Bintein S., Esserméant L., Férard J.F., Gallotti-Schmitt S., Saouter E., Saroli M., Thiébaud H., Tomassone R., Vindimian E., 2001. Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere*. **45**: 659-669.

Issartel J., Boulo V., Wallon S., Geffard O., Charmantier G., 2010. Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum*. *Chemosphere*. **81**(6): 701-710

8

Kägi J.H.R., 1993. Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. In: Suzuki K.T., Imura N., Kimura M., (Eds.), *Metallothioneins III-Biological Roles and Medical Implications*, Birkhäuser, Basel, pp. 29-55.

Kangharot B.S., 1991. Toxicity of metals to a freshwater tubificid worm, *Tubifex tubifex*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **46**:906-912.

Karaman G., Pinkster S., 1977. Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea, Amphipoda). I. *Gammarus pulex* group and related species. *Bijdr Dierk*. **47**:1-97.

Keith R.L., McGuinness S.J., Gandolfi A.J., Lowe T.P., Chen Q., Fernando Q., 1995. Interaction of metals during their uptake and accumulation in rabbit renal cortical slices. *Environmental Health Perspectives*. **103**(1): 77-80.

Kelly A., Dunn A.M., Hatcher M.J., 2002. Incomplete feminisation by the microsporidian sex ratio distorter, *Nosema granulosis*, and reduced transmission and feminisation efficiency at low temperatures. *International Journal for Parasitology*. **32**: 825-831.

Ketterer B., Coles B., Meyer D.J., 1983. The role of glutathione in detoxication. *Environmental Health Perspectives*. **49**: 59-69.

Kirschner L.B., 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *The Journal of Experimental Biology*. **207**: 1439-1452.

Krogh A., 1938. The active absorption of ions in some freshwater animals. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*. **25**: 335-350

Klaassen C.D., Liu J., Choudhuri S., 1999. Metallothionein: An intracellular Protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **39**: 267-294

Kojima Y., 1991. Definitions and nomenclature of metallothioneins. In: Riordan J.F., Vallee B.L., (eds): *Methods in enzymology*, Academic Press, San Diego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto. **205**: 8-10

Kooijman S.A.L.M., Baas J., Bontje D., Broerse M., 2009. Ecotoxicological applications of dynamic energy budget theory. In Devillers, J. (eds.) *Ecotoxicology Modeling, Emerging Topics in Ecotoxicology: Principles, Approaches and Perspectives*. pp 2237-2259.

Kosower N.S., Kosower E.M., 1978. The Glutathione Status of Cells. In Bourne G.H., Danielli J.F., (eds) *International review of cytology*, Academic Press, London. **54**: 110-153.

Kucharski L.C.R., Da Silva R.S.M., 1991a. Seasonal variation in the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. **100**: 599-602

Kucharski L.C.R., Da Silva R.S.M., 1991b. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. **99**: 215-218.

Kultz D., Somero G., 1996, Differences in protein patterns of gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis* after osmotic and thermal acclimation. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. **166** (2):88-100.

Kungolos A., Samaras P., Kipopoulos A.M., Zoumboulis A. and Sakellaropoulos G.P., 1999. Interactive toxic effects of agrochemicals on aquatic organisms. *Water Science and Technology* **40**: 357-364.

Kungolos A., Emmanouil C., Tsiridis V., Tsiropoulos N., 2009. Evaluation of toxic and interactive toxic effects of three agrochemicals and copper using a battery of microbiotests. *Science of Total Environment* **406** (16): 4610-4615.

Kunz P.Y., Kienle C., Gerhardt A., 2010. *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*. **205**: 1-76



Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lagadic L., Caquet T., Amiard J-C., Ramade F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson (Eds). 419p.

Lagadic L., 2002. Biomarkers: Usefull tools for the monitoring of aquatic environment. *Revue de médecine vétérinaire*. **153** (8-9): 581-588.

Lannig G., Flores J.F., Sokolova I.M., 2006. Temperature dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquatic Toxicology*. **79**:278-287.

Larsen B.K., Bjørnstad A., Sundt R.C., Taban I.C., Pampanin D.M., Andersen O.K., 2006. Comparison of protein expression in plasma from nonylphenol and bisphenol A-exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*) turbot (*Scophthalmus maximus*) by use of SELDI-TOF. *Aquatic Toxicology*. **785**: S25-S33.

Lawrence A.J., Poulter C., 1998. Development of a sub-lethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*. *Water Research* **32**: 569-578.

- Lignot J.H., Spanings-Pierrot C., Charmantier G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*. **191**: 209-245.
- Lee S.E., Yoo D.H., Son J., Cho K., 2006. Proteomic evaluation of cadmium toxicity on the midge *Chironomus riparius* Meigen larvae. *Proteomics*. **6**: 945-957.
- Le Gal Y., Lagadic L., Le Bras S., Caquet T., 1997. Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres bio marqueurs associés au métabolisme énergétique. In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris, pp. 53-66.
- Le Maho Y., Vu Van Kha H., Koubi H., Dewasmes G., Girard J., Ferre P., Cagnard M., 1981. Body composition, energy expenditure, and plasma metabolites in long term fasting geese. *Endocrinology and metabolism*. **241**(5): E342-E345.
- Leroy D., Haubruge E., De Pauw E., Thome J.P., Francis F., 2010. Development of ecotoxicoproteomics on the freshwater amphipod *Gammarus pulex*: Identification of PCB biomarkers in glycolysis and glutamate pathways. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **73** (3): 343-352.
- Leroy P., Nicolas A., Wellmann M., Michelet F., Oster T., Siest G., 1993. Evaluation of o-phthalaldehyde as bifunctional fluorogenic post-column reagent for glutathione in LC. *Chromatographia* **36**: 130-134.
- Lilley K.S., Razzaq A., Dupree P., 2002. Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Current Opinion in Chemical Biology*. **6**(1): 46-50.
- Lincoln R.G., 1979. British marine Amphipoda: Gammaridea. British Museum (Natural History), London, UK.
- Liochev S. I., Fridovich I., 2002. The Haber-Weiss cycle—70 years later: An alternative view. *Redox Rep.* **7**: 55-57.
- Liu F., Wang D.Z., Wang W.X., 2012. Cadmium induced changes in trace element bioaccumulation and proteomics perspective in four marine bivalves. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **31**(6): 1292-1300

Livingstone D.R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical technology and Biotechnology*. **57**: 195-211.

Livingstone D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*. **42**: 656-666.

Livingstone D.R., 2003. Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Pollution and Aquaculture. *Revue de médecine vétérinaire*. **154**(6) : 427-430

Lockwood A.P., Inman C.B., 1973. Changes in the apparent permeability to water at moult in the amphipod *Gammarus duebeni* and the isopod *Idotea linearis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. **44**: 943-952.

Lucu C., 1994. Calcium transport across isolated gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology*. **268**: 339-346.

Lucu C., Siebers D., 1995. Acidification of the gill cells of the shore crab *Carcinus mediterraneus* – its physiological significance. *Helgol. Meeresunters*. **49**: 709-713

Luperchio S., Tamir S., Tannenbaum S.R., 1996. No-induced oxidative stress No-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. *Free Radical Biology and Medicine*. **21**: 513-519.

M

Maazouzi C., Piscart C., Pihan J.C., Masson G., 2009. Effect of habitat-related resources on fatty acid composition and body weight of the invasive *Dikerogammarus villosus* in an artificial reservoir. *Fundamental and Applied Limnology*. **175**: 327-338.

Macan T., 1974. Mitteilungen des Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie. *Running water*. **20**: 301-321.

Maciel F.E., Rosa C.E., Santos E.A., Monserrat J.M., Nery L.E.M., 2004. Daily variations in oxygen consumption, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the gills and hepatopancreas of an estuarine crab. *Canadian Journal of Zoology* **82**: 1871-1877.

- MacNeil C., Dick J.T.A., Elwood R.W., 1997. The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp.(Crustacea: Amphipoda): Problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Review*. **72**: 349–364.
- Mahaffey K.R., Fowler B.A., 1977. Effects of concurrent administration of lead, cadmium and arsenic in rat. *Environmental Health Perspectives*. **19**: 165-171
- Mahaffey K.R., Capar S.G., Gladen B.C., Fowler B.A., 1981. Concurrent exposure to lead, cadmium, and arsenic. Effects on toxicity and tissue metal concentrations in the rat. *The journal of Laboratory and Clinical Medicine*. **98**(4): 463-481.
- Maltby L., Naylor C., 1990. Preliminary observations on the ecological relevance of the *Gammarus* «Scope for Growth» assay: effect of zinc on reproduction. *Functional Ecology* **4**: 393-397.
- Manahan S.E., 2003. Toxicological chemistry and biochemistry. Lewis publishers, Boca Raton.
- Mandal B.K., Suzuki K.T., 2002. Arsenic around the world: a review. *Talanta*. **58**: 201–35.
- Mantel L.H., Farmer L.L., 1983. Osmotic and ionic regulation. In: L.H. Mantel (Ed.), *The Biology of Crustacea, Internal Anatomy and Physiological Regulation*, Academic Press, New York. **5**: 53–161
- 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.
- Margoshes M., Vallee B.L., 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*. **79**: 4813–4814.
- Marking L.L., 1985. Toxicity of chemical mixtures. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation Washington DC. pp 164-176.
- Marillo-velarde P.S., Lloret J., Marin A., Sanchez-Vszquez F.J., 2011. Effects of cadmium on locomotor activity rhythms of the Amphipod *Gammarus aequicauda*. *Achives of Environmental Contamination and Toxicology*. **60**: 444-451.
- Marnett L.J., 1999. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. **21** (3): 361-370.

Mason A.Z., Jenkins K.D., 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier A., Turner D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons Ltd., London, pp. 479-608.

Mass M.J., Tennant A., Roop B.C., Cullen W.R., Styblo M., Thomas D.J., Kligerman A.D., 2001. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chemical Research in Toxicology*. **14**: 355-361.

Mathiessen P., 2000. Biological effects quality assurance in monitoring programs (BELQUALM). Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Remembrance Avenue, Burham-on-Crouch, Essex CMO 8HA, UK, 24 p.

McCahon C.P., Pascoe D., 1988a. Use of *Gammarus pulex* in Safety Evaluation Tests: Culture and Selection of a sensitive Life Stage. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **15**: 245-252.

McCahon C.P., Pascoe D., 1988b. Increased sensitivity to cadmium of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* during the reproductive period. *Aquatic Toxicology*. **13**(3): 183-193.

McMahon B.R., Wilkens J.L., 1983. Ventilation, perfusion and oxygen uptake. In: L. Mantel, D. Bliss (Eds.), *Biology of Crustacea*, Academic Press, New York. **6**: 289-372

Médoc V., Piscart C., Maazouzi C., Simon L., Beisel J.N., 2011. Parasite-induced changes in the diet of a freshwater amphipod: field and laboratory evidence. *Parasitology*. **138**(4): 537-546

Meharg A.A., Hartley-Whitaker J., 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*. **154**: 29-43.

Meiller J., Bradley B., 2002. Zinc concentration effect at the organismal, cellular and subcellular levels in the eastern oyster. *Marine Environmental Research*. **54**: 401-404

Meister A., 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*. **220**: 472-477.

Merrick B.A., Tomer K.B., 2003. Toxicoproteomics: A parallel approach to identifying biomarkers. *Environmental Health Perspectives*. **111**: A578-A579

Meister A., 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *The Journal of Biological Chemistry*. **263**(33):17205-17208.

Meister A., 1994. Glutathione, Ascorbate and cellular protection. *Cancer Research*. **54**: 1969s-1975s.

Merrick B.A., Tomer K.B., 2003. Toxicoproteomics: A parallel approach to identifying biomarkers. *Environmental health Perspectives*. **111**: A578-A579.

Miller D. M., Buettner G. R., Aust, S.D., 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology & Medicine*. **8**: 95-108.

Mills G.C., 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal of Biological Chemistry*. **229**: 189-197.

Ministère de la santé et de la protection sociale, 2003. Ressources en eau-distribution de l'eau d'alimentation-qualité des eaux distribuées dans les unités de distribution de plus de 5000 Habitants. Rapport de synthèse 1996-1997-1998.

Mogren C.L., Von Kiparski G.R., Parker D.R., Trumble J.T., 2012. Survival, reproduction and arsenic body burdens in *Chironomus riparius* exposed to arsenate and phosphate. *Science of the Total Environment*. **425**: 60-65.

Monribot-Espagne C., Boucherie H., 2002. Differential gel exposure, a new methodology for the two-dimensional comparison of protein samples. *Proteomics*. **2**: 229-240.

Monteil C., Mulder P., Thuillez C., 2004. Stress oxydant et insuffisance cardiaque: Une cible thérapeutique utpique? *Médecine thérapeutique Cardiologie*. **2** (2):78-85.

Morel F., 1983. Principles of Aquatic Chemistry. John Wiley and Sons, Inc., Somerset, 446 pp.

Morgenstern R., Depierre J.W., Ernster L., 1979. The identification, solubilization, and characterization of microsome-associated glutathione S-transferases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **87**(3):657-663.

Morin G., Calas G., 2006. Arsenic in soils, mine tailings, and former industrial sites. *Elements*. **2**: 97-101.

Muralidharan S., Thompson E., Raftos D., Birch G., Haynes P., 2012. Quantitative proteomics of heavy metal stress responses in Sydney rock oysters. *Proteomics*. **12**(6): 906-921

N

Nesatyy V.J., Suter M.J.F., 2007. Proteomics for the analysis of environmental stress responses in organisms. *Environmental Sciences and Technology*. **41**: 6891-6900.

Ng J.C., 2005. Environmental contamination of arsenic and its toxicological impact on humans. *Environmental Chemistry*. **2**: 146-160.

Nielsen, F.H., 1980. Evidence of the essentiality of arsenic, nickel, and vanadium and their possible nutritional significance. *Advances in Nutritional Research*. **24**: 157-172.

Norwood W.P., Borgmann U., Dixon D.G., 2006. Saturation models of arsenic, cobalt, chromium and manganese bioaccumulation by *Hyalella Azteca*. *Environmental Pollution*. **143**: 519-528.

NRC (National Research Council), 1999. Arsenic in Drinking Water. National Academy Press, Washington, DC.

O

O'Connor J.D., Gilbert L.I., 1968. Aspects of lipid metabolism in crustaceans. *Integrative and Comparative Biology*. **8**(3): 529-539.

O'Farrel P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. **250**: 4007-4021.

Oliveira G.T., Rossi I.E., Kucharski L.C., Da silva R.S.M., 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. **137**: 383-390

Olsson P.E., Kling P., Hogstrand C., 1998. Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish. In: Langston W.J., Bebianno M.J. (Eds.). *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London, pp. 321-350.

Onasaka S., Kawakami D., Min K-O., Tanaka K., 1987. Induced synthesis of metallothionein by ascorbic acid in mouse liver. *Toxicology*. **43**: 251-259

Onken H., Graszynski K., Zeiske W., 1991. Na⁺-independent, electrogenic Cl⁻ uptake across the posterior gills of the Chinese crab (*Eriocheir sinensis*), voltage-clamp and microelectrode studies. *Journal of Comparative Physiology*. **161B**: 293–301

Onken H., Riestenpatt S., 1998. NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs, transport mechanisms and their regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. **119**: 883–893

Onken H., Tresguerres M., Luquet C.M., 2003. Active NaCl absorption across posterior gills of hyperosmoregulating *Chasmagnathus granulatus*. *The Journal of Experimental Biology*. **206**: 1017–1023

Olsen T., Ellerbeck L., Fisher T., Callaghan A., Crane M., 2001. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius* Meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **20**(8): 1725-1732.

Otto D.M.E., Moon T.W., 1996. Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **31**: 141-147

P

Palmiter R.D., 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **95**: 8428-8430

Pantani C., Pannunzio G., De Cristofaro M., Novelli A.A., 1997. Salvatori M., Comparative acute toxicity of some Pesticides, metals, and surfactants to *Gammarus italicus* Goedm. and *Echinogammarus tibaldii* Pink. And Stock (Crustacea: Amphipoda). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **59**: 963-967.

Park J.D., Liu Y., Klaassen C.D., 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology*. **163**:93-100

Parmentier C., Leroy P., Wellman M., Nicolas A., 1998. Determination of cellular thiols and glutathione related enzyme activities: versatility of high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetric detection *Journal of Chromatography B* **719**: 37-46.

Patton W.F., 2002. Detection technologies in proteome analysis. *Journal of Chromatography B*. 771(1-2): 3-31.

Pedersen S.N., Lundebye A.K., 1996. Metallothionein and stress protein levels in shore crabs (*Carcinus maenas*) along a trace metal gradient in the Fal estuary (UK). *Marine Environmental Research*. **42** (1-4): 241-246.

Pedlar R.M., Ptashynski M.D., Wautier K.G., Evans R.E., Baron C.L., Klaverkamp J.F., 2002. The accumulation, distribution, and toxicological effects of dietary arsenic exposure in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Comparative Biochemistry and physiology Part C*. **131**: 73-91.

Péqueux A., Gilles R., Marshall W.S., 1989. NaCl transport in gills and related structures. In: R. Greger (Ed.), *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Springer, Berlin (1989), pp. 1-73

Péqueux A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*. **15** (1): 1-60.

Pelletier E., Campbell P.G.C., Denizeau F., 2004. Ecotoxicologie moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développement. *Presses de l'université du Québec*. 462 p.

Penninckx M., 2000. A short review on the role of glutathion in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxydative stresses. *Enzyme and Microbial Technology*. **26** :9-10.

Pestana J.L.T., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M., 2007. Effects of cadmium and zinc on the feeding behaviour of two freshwater crustaceans: *Atyaephyra desmarestii* (Decapoda) and *Echinogammarus meridionalis* (Amphipoda). *Chemosphere*. **68**: 1556-1562

Petrick J.S., Ayala-Fierro F., Cullen WR., Carter D.E., Vasken Aposhian H., 2000. Monomethylarsonous acid (MMAIII) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **163**: 203-207.

Pilz J., Meineke I., Gleiter C.H., 2000. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **742** (2): 315-325.

Pinel-Alloul B., Perceval O., Giguère A., Couillard Y., Campbell P.G.C., Hare L., 2004. La métallothionéine : un biomarqueur d'exposition au cadmium pour les invertébrés d'eau douce. In : Pelletier E., Campbell P.G.C., Denizeau F., *Ecotoxicologie moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Presses de l'université du Québec. 462 p.

- Piscart C., Roussel J.M., Dick J.T.A., Grosbois G., Marmonier P. 2011. Effects of coexistence on the habitat use and trophic ecology of interacting native and invasive amphipods. *Freshwater Biology*. **56**: 325-334.
- Piscart C., Bollache L., 2012. Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales de France. Crustacés amphipodes de surface (Gammare d'eau douce). Association Française de Limnologie (AFL)- Station d'hydrobiologie lacustre INRA, Thonon-les-Bains Cedex. 122p.
- Plaistow S.J., Troussard J.P., Cézilly F., 2001. The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *International Journal of parasitology*. **31**:346-351.
- Pöckl M., 1992. Effects of temperature, age and body size on moulting and growth in the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. *Freshwater Biology*. **24**: 211-225.
- Pöckl M., Webb B. W., Sutcliffe D. W., 2003. Life history and reproductive capacity of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda) under naturally fluctuating water temperatures: a simulation study. *Freshwater Biology*. **48**: 53-66. doi: 10.1046/j.1365-2427.2003.00967.x
- Pohl H.R., Roney N., Wilbur S., Hansen H., De Rosa C.T., 2003. Six interaction profiles for simple mixtures. *Chemosphere*. **53**: 183-197.
- Porter N.A., Caldwell S.E., Mills K.A., 1995. Mechanisms of Free Radical Oxidation of Unsaturated Lipids. *Lipids*. **30** (4): 277-289
- Pörtner H.O., 2001. Climate change and temperature dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*. **88**: 137-146.
- Potts W.T.W., Parry G., 1964. Osmotic and Ionic Regulation in Animals. Pergamon Press, Oxford.
- Pratt C., Cornely K., 2012. Le métabolisme du glucose. In De Boeck (Eds) *Biochimie*. pp348-352

2

Quetin L.B., Mickel T.J., Childress J.J., 1978. A method for simultaneously measuring the oxygen consumption and activity of pelagic crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. **59**: 263-266.

R

Rahman M.A., Hasegawa H., Lim R.P., 2012. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. *Environmental Research*. **116**: 118-135

Rainbow P.S., 1995. Physiology, physicochemistry and metal uptake - a crustacean perspective. *Marine Pollution Bulletin*. **31** : 55-59.

Rainbow P.S., 1997. Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. **S44**: 169-175.

Rainbow P.S., White S.L., 1989. Comparative strategies of heavy metals accumulation by crustaceans: Zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia*. **174**: 245-262.

Ralston-Hooper K., Sanchez B.C., Adamec J., Sepulveda M.S., 2010. Proteomics in aquatic amphipods: Can it be used to determine mechanisms of toxicity and interspecies responses after exposure to atrazine? *Environmental Toxicology and Chemistry*. **30**(5): 1997-1203

Ramade, 2002. Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. Dunot (Eds).

Regoli F., Principato G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals in different field and laboratory conditions: implications for a proper use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*. **31**:143-164

Regoli F., 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology*. **50**(4): 351-36.

Reid S.D., McDonald D.G., 1988. Effects of cadmium, copper and low pH on ion fluxes in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Canadian Journal of Fisheries*. **45**: 244-253.

- Richman P.G., Meister A., 1975. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *The Journal of Biological Chemistry*. **250**: 1422-1426
- Rinderhagen M., Ritteroff J. and Zauke G., 2000. Crustaceans as Bioindicateurs. In: (Gerard A, ed) *Biomonitoring of Polluted Water, reviews on Actual Topics*. **9**:161-194.
- Riva C., Binelli A., Rusconi F., Colombo G., Pedriali A., Zippel R., Provini A., 2011. A proteomic study using zebra mussels (*D. polymorpha*) exposed to benzo(α)pyrene: The role of gender and exposure concentrations. *Aquatic Toxicology*. **104**(1-2): 14-22.
- Rodland K.D., 2004. Proteomics and cancer diagnosis: the potential of mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*. **37** (7): 579-583.
- Rodriguez-Ortega M.J., Alhama J., Funes V., Romero-Ruiz A., Rodriguez-Ariza A., Lopez-Barea J., 2002. Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from south-Spanish littoral. *Environmental and Toxicological Chemistry*. **21**: 542-549.
- Rodriguez-Ortega M., Grosnick B., Rodriguez-Ariza A., Goksoyr A. and Lopez-Barea J., 2003. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. *Proteomics*. **3**:1535-1543. doi: 10.1002/pmic.200300491
- Roesijadi G., 1981. The significance of low molecular weight, metallothionein-like proteins in marine invertebrates: current status. *Marine Environmental Research*. **4** (3): 167-179.
- Roesijadi G., Fellingham G.W., 1987. Influence of Cu, Cd and Zn pre-exposure on Hg toxicity in the mussel *Mytilus edulis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **44**: 680-684.
- Roesijadi G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. **22**: 81-114.
- Roesijadi G., 1994. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environmental Health Perspectives*. **102** (Suppl. 12): 91-95
- Roesijadi G., 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **113** (2): 117-123

- Roeva N.N., Sidorov A.V., Yurovitskii Y.G., 1999. Metallothioneins, proteins binding heavy metals in fish. *Biological Bulletin*. **26** (6): 617–622.
- Rombough P.J., Garside E.T., 1982. Cadmium toxicity and accumulation in eggs and alevins of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Canadian Journal of Zoology*. **60**: 2006-2014.
- Romeo M., Gharbi-Bouraoui S., Gnassia-Barelli M., Dellali M., Aïssa P., 2006. Responses of *Hexaplex* (Murex) *trunculus* to selected pollutants. *Science of the Total Environment*. **359**: 135-144.
- Romero-Ruiz A., Montserrat C., Alhama J., Gomez-Ariza J.L., Abian J., Lopez-Barea J., 2006. Utility of proteomics to assess pollutant response of clams from the Doñana bank of Guadalquivir Estuary (SW Spain). *Proteomics*. **6**: 245-255.
- Rosenberg D.M., Resh V.H., 1993. Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates. Chapman and Hall., New York.
- Rosa R., Nunes M.L., 2003. Biochemical composition of deep-sea decapod crustaceans with two different benthic life strategies off the Portuguese south coast. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. **50**: 119-130
- Rosas C., Sanchez A., Escobar E., Soto L., Bolongaro-Crevenna A., 1992. Daily variations of oxygen consumption and glucose hemolymph level related to morphophysiological and ecological adaptations of Crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology* **101A**: 323–328.
- Ross K., Cooper N., Bidwell J.R., Elder J., 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Marine Pollution Bulletin*. **44**: 671-679.
- Roux L.A., 1970. Les gammarès du groupe *pulex*. Essai de systématique biologique- Etudes Morphologiques et Morphométriques. *Archive de Zoologie Expérimentale et Générale*. **111** :313-356

S

- Sampaio F.G., Bojink C.D.L., Oba E.T., Dos Santos L.R.B., Kalinin A.L., Rantin F.T., 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **147**: 43–51.

- Sanchez B.C., Ralston-Hooper K., Sepulveda M.S., 2011. Review of recent proteomics applications in aquatic toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **30**(2): 274-282.
- Santos H.M., Diniz M.S., Costa P.M., Peres I., Costa M.H., Alves S., Capelo J.L., 2007. Toxicological effects and bioaccumulation in the freshwater clam (*Corbicula fluminea*) following exposure to trivalent arsenic. *Environmental Toxicology*. DOI 10.1002/tox. p.502-509
- Schaeffer R., Francesconi K.A., Kienzl N., Soeroes C., Fodor P., Vairadi L., Raml R., Goessler W., Kuehnelt D., 2006. Arsenic speciation in freshwater organisms from the river Danube in Hungary. *Talanta*. **69**: 856-865.
- Schlenk, D., Wolford L., Chelius M., Stevens J., Chan K.M., 1997. Effect of arsenite, arsenate, and the herbicide monosodium methyl arsonate (MSMA) on hepatic metallothionein expression and lipid peroxidation in channel catfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **118**: 177-183.
- Schlenk D., 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine pollution Bulletin*. **39**: 48-53
- Schill R.O., Görlitz H., Köhler H.R., 2003. Laboratory stimulation of a mining accident: acute toxicity, hsc/hsp70 response, and recovery from stress in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) exposed to a pulse of cadmium. *Biometals*. **16**: 391-401.
- Schmitz E.H., 1992. Amphipoda. In: F.W. Harrison, A.G. Humes (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Crustacea*, Wiley-Liss, New York. **9**: 443-528
- Scott-Fordsmand J.J., Weeks J.M., 2000. Biomarkers in earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. **165**: 117-159
- Seelig G.F., Simonsen R.P., et Meister A., 1984. Reversible dissociation of γ -glutamylcystéine synthetase into two subunits. *Journal of Biological Chemistry*. **259**: 9345-9347.
- Sexton E.W., 1924. The moulting and growth-stages of *Gammarus*, with description of the normal and intersexes of *G. chevreuxi*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. **13**: 340-396.
- Shariati F., Shariati S., 2011. Review on methods for determination of Metallothioneins in aquatic organisms. *Biological Trace Element Research*. **141**: 340-366.

Sharma V.K., Sohn M., 2009. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environment International*. **35**: 743–759.

Shaw G., 1979. Prey selection by breeding dippers. *Bird Study* . 26:66–67.

Shepard J.L., Bradley B.P., 2000. Protein expression signatures and lysosomal stability in *Mytilus edulis* exposed to graded copper concentrations. *Marine Environmental Research*. **50**: 457–463.

Shepard J., Olsson B., Tegendren M. and Bradley B., 2000. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Marine Environmental Research*. **50**:337–340.

Sies H., 1991. Oxidative stress: Introduction. In Sies H., Oxydative Stress: Oxidants and Antioxydants (Eds). Academic Press, London. pp xv-xxii.

Silvestre F., Dierick J., Dumont V., Dieu M., Raes M. and Devos P., 2006. Differential protein expression profiles in anterior gills of *Eriocheir sinensis* during acclimation to cadmium. *Aquatic toxicology*. **76**:46–58

Sinha A., Singh C., Parmar D., Pratap Singh M., 2007. Proteomics in clinical interventions: achievements and limitations in biomarker development. *Life Sciences*. **80**: 1345–1354.

Sokolova I.M., Lannig G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research*. **37**: 181–2001.

Sornom P., Felten V., Medoc V., Sroda S., Rousselle P., Beisel JN., 2010. Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environmental Pollution*. **158** : 1288–1295.

Sparkes T.C., Keogh D.P., Pary R.A., 1996. Energetic costs of mate guarding behavior in male stream dwelling isopods. *Oecologia* **106**:166–171.

Spehar R.L., Fiandt J.T., Anderson R.L., DeFoe D.L., 1980. Comparative toxicity of Arsenic compounds and their accumulation in invertebrates and fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **9**: 53–63.

Spicer J.I., Weber R.E., 1991. Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **100**: 339–342

Sroda S., Cossu-Leguille C., 2011. Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere*. **83**: 538-544.

Stagg, R.M., 1998. The development of an international programme for monitoring the biological effects of contaminants in the OSPAR convention area. *Marine Environmental Research*. **46** (1-5): 307-313.

Staniek K, Nohl H, 2000. Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1460**:268-275

Stearns S., 1992, The evolution of life histories (POD), Lavoisier, 262p.

Stegeman J.J., Brouwer M., Di Giulio R.T., Förlin L., Fowler B.A., Sanders B.M., Van Veld P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In Huggett R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M., Bergman H.L. (Eds.), Biomarkers, Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Boca raton. pp 235-335.

Stillman M.J., 1995. Metallothioneins. *Coordination Chemistry Reviews*. **144**: 461-511.

Stoeckmann A.M., Garton D.W., 1992. Flexible energy allocation in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in response to different environmental conditions. *Journal of the North American Benthological Society*. **20**: 486-500.

Stuhlbacher A., Maltby L., 1992. Cadmium Resistance in *Gammarus pulex*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **22**: 319-324.

Sundelin B., 1983. Effects of cadmium on *Pontoporeia affinis* (Crustacea: Amphipoda) in laboratory soft-bottom microcosms. *Marine Biology*. **74**: 203-212.

Sutcliffe D.W., 1984. Quantitative aspects of oxygen uptake by *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): a critical review. *Freshwater Biology*. **15** (5): 443-489.

Sutcliffe D.W., 1992. Reproduction in gammarus (Crustacea :Amphipoda): basic processes. *Freshwater Forum*. **2**:102-128.

Swanson A., 1992. Physiologic coupling of glial glycogen metabolism to neuronal activity in brain. *Revue canadienne de physiologie et pharmacologie*. **70**(S1): S138-S144

7

Tachet H., Richoux P., Bournaud M., Usseglio-Polatera P., 2000. Invertébrés d'eau douce : systématique, biologie, écologie, CNRS éditions 2006.

Taylor D., 1983. The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental safety*. **7**: 33-42.

Taylor E.J., Underhill K.M., Blockwell S.J., Pascoe D., 1998. Haem biosynthesis in the freshwater macroinvertebrate *Gammarus pulex* (L.): Effect of copper and Lindane. *Water research*. **32**(7): 2202-2204.

Taylor H.H., Anstiss J.M., 1999. Copper and haemocyanin dynamics in aquatic invertebrate. *Marine Freshwater*. **50**: 907-931.

Tessier A., Buffle J., Campbell P.G.C., 1994. Uptake of trace metals by aquatic organisms. In Buffle J., De Vitre R.R. eds. *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems*. Lewis Publishers, Boca Raton, 197-230.

Thomas D.J., Styblo M., Lin S., 2001. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **176**: 127-144

Thomasson M.A., Johnson M.L., Strömberg J.O., Gaten E., 2003. Swimming capacity and pleopod beat rate as a function of sex, size and moult stage in northern krill meganyctiphanes Norvegica. *Marine Ecology Progress Series*. **250**: 205-213.

Timofeyev M.A., Shatilina Z.M., Bedulina D.S., Protopopova M.V., Pavlichenko V.V., Grabelnykh O.I., Kolesnichenko A.V., 2008. Evaluation of biochemical responses in Palearctic and Lake Baikal endemic amphipod species exposed to CdCl₂. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **70**: 99-105.

Topalian M.L., Castane P.M., Salibian R.A., 1999. Principal component Analysis of dissolved heavy metals in water of the Reconquista river (Buenos Air, Argentina). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **63**(4): 484-490.

Toplan S., Ozcelik D., Dariyerli N., Akyolcu M.C., 2003. Oxidant and antioxidant status of cadmium administered rats. *Journal de Physique IV*. **107**:1309

Toudal K., Riisgard H.U., 1987. Acute and sublethal effects of cadmium on ingestion, egg production and life-cycle development in the copepod *Acartia tonsa*. *Marine Ecology Progress Series*. **37**: 141-146.

Towle D.W., 1993. Ion transport systems in membrane vesicles isolated from crustacean tissues. *Journal of Experimental Zoology*. **265**: 387-396.

Tseng C., 2004. The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **197** (2): 67-83.

Tsubokura T., Kikuchi S., Nakao S., 1998. Distribution pattern, gills area relationships, and fine structural characteristics of the gills epithelia in supralittoral and terrestrial talidrid amphipods. *Journal of Crustacean Biology*. **18** (4): 625-642.

Tyson G.E., 1968. The fine structure of the maxillary gland of the brine shrimp, *Artemia salina*: the end sac. *Cell and Tissue Research*. **86**: 129-138



Ünlü, M., Morgan, M. E., Minden, J. S., 1997. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. **18**: 2071-2077.

Uthus E.O., 1992. Evidence for arsenic essentiality. *Environmental Geochemistry and Health*. **14** : 55-58.



Vahter M., 1994. Species differences in the metabolism of arsenic compounds. *Applied Organometallic Chemistry*. **8**: 175-182.

Vahter M., 2002. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*. **181-182**: 211-217.

Väinölä R., Witt J.D.S., Grabowski M., Bradbury J.H., Jazdzewski K. et Sket B., 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*. **595**: 241-255.

Valavanidis, Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullos M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **64**: 178-189.

Valenzula A., 1991. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sciences*. **48**: 301-309.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **39**: 44-84.

Van der Oost R., Beyer R., Vermeuleb N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **13**(2): 57-149.

Van harreveld A., 1936. A physiological solution for freshwater crustaceans. *Experimental Biology and Medicine*. **34**(4): 428-432.

Vasak M., 1991. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. In: Riodan, J.F., Vallee, B.L. (Eds.), *Methods in Enzymology Metallochemistry B*, vol. 205, pp. 452-458.

Vellinger C., Parant M., Rousselle P., Immel F., Wagner P., Usseglio-Polatera P., 2012a. Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*). *Environmental Pollution*, **160** (1): 66-73.

Vellinger C., Parant M., Rousselle P., Usseglio-Polatera P., 2012b. Antagonistic toxicity of arsenate and cadmium in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*). *Ecotoxicology*, **21** (7): 1817-1827.

Vellinger C., Felten V., Sornom P., Rousselle P., Beisel J.-N., Usseglio-Polatera P., 2012c. Behavioural and physiological responses of *Gammarus pulex* exposed to cadmium and arsenate at three temperatures: Individual and combined effects. *PLoS ONE*, **7**(6): e39153.

Vellinger C., Gismondi E., Felten V., Rousselle P., Mehennaoui K., Parant M., Usseglio-Polatera P. Single and combined effects of cadmium and arsenate in *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda): Understanding the links between physiological and behavioural responses. (Submitted).

Ventura-Lima J., De Castro M.R., Acosta D., Fattorini D., Regoli F., Machado de Carvalho L., Bohrer D., Geraticino L.A., Barros D.M., Marins L.F.F., Da Silva R.S., Bonan C.D., Reis Bono M., Moserrat J.M.,

2009. Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. **149**: 538-543.

Ventura-Lima, J., Reis Bogo, M.R., Monserrat, J.M., 2011. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: a comparative biochemical approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **74**: 211-218.

Verboost P.M., Flik G., Lock R.A.C., Wendelaar Bonga S.E., 1987. Cadmium inhibition of Ca^{2+} uptake in rainbow trout gills. *American Journal of Physiology*. **253**: 216-221.

Viarengo A., Nott J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **104** (3): 355-372.

Viarengo A., Burlando B., Ceratto N., Panfoli I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and Molecular Biology*. **46** (2): 407-417.

Vindimian E., Robaut C., Fillion G., 1983. A method for cooperative or noncooperative binding studies using nonlinear regression analysis on a microcomputer. *Journal of Applied Biochemistry* **5**: 261-268.

Vindimian E., Garric J., Flammarion P., Thybaud E., Babut M., 1999. An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic tests and expert judgements. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **18**: 386-2391.

Viswanathan S., Ünlü M., Minden J.S., 2006. Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nature Protocols*. **1**: 1351-1358

W

Wade C.R., Van Rij A., 1985. In vivo lipid peroxidation in man as measured by the respiratory excretion of ethane, pentane, and other low-molecular-weight hydrocarbons. *Analytical Biochemistry*. **150** (1): 1-7.

Walgren J.L., Thompson D.C., 2004. Application of proteomic technologies in the drug development process. *Toxicology Letters*. **149**: 377-385.

Wallace W.G., Estephan A., 2004. Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). *Aquatic Toxicology*. **69**: 289-297.

Weber R.E., Lykke-Madsen M., Bang A., De Zwaan A., Cortesi P., 1990. Effects of cadmium on anoxic survival, haematology, erythrocytic volume regulation and haemoglobin- oxygen affinity in the marine bivalve *Scapharca inaequivalvis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **144**: 29-38.

Wheatly M.G., 1989. Physiological responses of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) to environmental hyperoxia: I. Extracellular acid-base and electrolyte status and transbranchial exchange. *The Journal of Experimental Biology*. **143**: 33-51

Wheatly M.G., Zanutto F.P, Hubbard M.G., 2002. Calcium homeostasis in crustaceans: subcellular Ca dynamics. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. **132**: 163-178

Weihrauch D., Morris S., Towle D.W., 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *The Journal of Experimental Biology*. **207**: 4491-4504

Whitehurst I.T., Lindsey B.I., 1990. The impact of organic enrichment on the benthic macroinvertebrate communities of a lowland river. *Water Research*. **25**: 625-630.

Wicklund Glynn A., Norrgrenb L., Müssenera A., 1994. Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Aquatic Toxicology*. **30**: 13-26.

Wijnhoven S., Van Riel M.C., Van der Velde G., 2003. Exotic and indigenous freshwater gammarid species: physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water. *Aquatic Ecology*. **37**: 151-158.

Wilkins M.R., Sanchez J.C., Gooley A.A., Appel R.D., Humphery-Smith I., Hachstrasser D.F., Williams K.L., 1996. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. **13**: 19-50

Williams K.L., Appel R.D., Hochstrasser D.F., Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics. Berlin: Springer-Verlag. pp. 1-30.

Willmer P., Stone G., Johnston I., 2000. Environmental physiology of animals. Blackwell Science, Oxford. 664p.

Witter M.S., Cuthill I.C., 1993. The ecological cost of avian fat storage. *Philosophical Transactions of The Royal Society*. **340** (1291): 73-92.

Wright D.A., Frain J.W., 1981. The effect of calcium on Cadmium toxicity in the Freshwater amphipod, *Gammarus pulex*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **10**: 321-328.

Wolcott D.L., 1991. Nitrogen excretion is enhanced during urine recycling in two species of terrestrial crab. *The Journal of Experimental Zoology*. **259** : 181-187

Woolson, E. A., 1975. Bioaccumulation of arsenicals. In E. A. Woolson (ed.): Arsenical pesticides. ACS Symposium. Ser7 Washington, DC: American Chemical Society.

2

Yamaguchi S., Celino F.T., Ito A., Agusa T., Tanabe S., Tuyen B.C., Miura C., Miura T., 2008. Effects of arsenic on gonadal development in freshwater crab, *Somanniathelphusa pax*, in Vietnam and *Geothelphusa dehaani* in Japan. *Ecotoxicology*. **17**: 772-780.

Yanez L., Carrizales L., Zanatta M.T., Mejia J.D.J., Batres L., Diaz-Barriga F., 1991. Arsenic-cadmium intercation rats: toxics effects in the heart and tissue metal shifts. *Toxicology*. **67** (2): 227-234.

Yates J.R., 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of mass spectrometry*. **33**: 1-19.

Ye B., Maret W., Vallee B.L., 2001. Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**(5): 2317-2322

3

Zanders I.P., Rojas W.E., 1992. Cadmium accumulation, LC50 and oxygen consumption in the tropical marine amphipod *Elasmopus rapax*. *Marine Biology*. **113**: 409-413.

Zeiske W., Onken H., Schwartz H., Graszynski K., 1992. Invertebrate epithelial Na⁺ channels: amiloride-induced current-noise in crab gill. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1105**:245-252

Zhang W., Huang L., Wang W-X., 2012. Biotransformation and detoxification of inorganic arsenic in a marine juvenile fish *Terapon jarbua* after waterborne and dietborne exposure. *Journal of Hazardous Materials*. **221-222**: 162-169

Zhou J., Cai Z-H., Li L., GAO Y-F., Hutchinson T.H., 2010. Proteomics based approach to assessing the toxicity of bisphenol A and diallyl phthalate to the abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Chemosphere*. **79**: 595-604

Annexes

Annexe I. Résumé de l'article intitulé "Effects of sublethal cadmium exposure on antipredator behavioural and antitoxic responses in the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*"

OPEN ACCESS Freely available online



Effects of Sublethal Cadmium Exposure on Antipredator Behavioural and Antitoxic Responses in the Invasive Amphipod *Dikerogammarus villosus*

Pascal Sornom*, Eric Gismondi, Céline Vellinger, Simon Devin, Jean-François Férard, Jean-Nicolas Beisel

Laboratoire des Interactions, Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes, CNRS UMR 7146, Université de Lorraine, Metz, France

Abstract

Amphipods are recognised as an important component of freshwater ecosystems and are frequently used as an ecotoxicological test species. Despite this double interest, there is still a lack of information concerning toxic impacts on ecologically relevant behaviours. The present study investigated the influence of cadmium (Cd), a non-essential heavy metal, on both antipredator behaviours and antitoxic responses in the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus* under laboratory conditions. Amphipod behaviour (i.e. refuge use, aggregation with conspecifics, exploration and mobility) was recorded following a 4-min test-exposure to 500 µg Cd/L with or without a 24-h Cd pre-exposure and in the presence or absence of a high perceived risk of predation (i.e. water scented by fish predators and injured conspecifics). Following behavioural tests, malondialdehyde (MDA) levels, a biomarker for toxic effect, and energy reserves (i.e. lipid and glycogen contents) were assessed. Cd exposures induced (1) cell damage reflected by high MDA levels, (2) erratic behaviour quantified by decreasing refuge use and exploration, and increasing mobility, and (3) a depletion in energy reserves. No significant differences were observed between 4-min test-exposed and 24-h pre-exposed individuals. Gammarids exposed to Cd had a disturbed perception of the alarm stimuli, reflected by increased time spent outside of refuges and higher mobility compared to gammarids exposed to unpolluted water. Our results suggest that Cd exposure rapidly disrupts the normal behavioural responses of gammarids to alarm substances and alters predator-avoidance strategies, which could have potential impacts on aquatic communities.

Citation: Sornom P, Gismondi E, Vellinger C, Devin S, Férard J-F, et al. (2012) Effects of Sublethal Cadmium Exposure on Antipredator Behavioural and Antitoxic Responses in the Invasive Amphipod *Dikerogammarus villosus*. PLoS ONE 7(8): e42435. doi:10.1371/journal.pone.0042435

Editor: Kentaro Q. Sakamoto, Hokkaido University, Japan

Received: February 14, 2012; **Accepted:** July 6, 2012; **Published:** August 3, 2012

Copyright: © 2012 Sornom et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

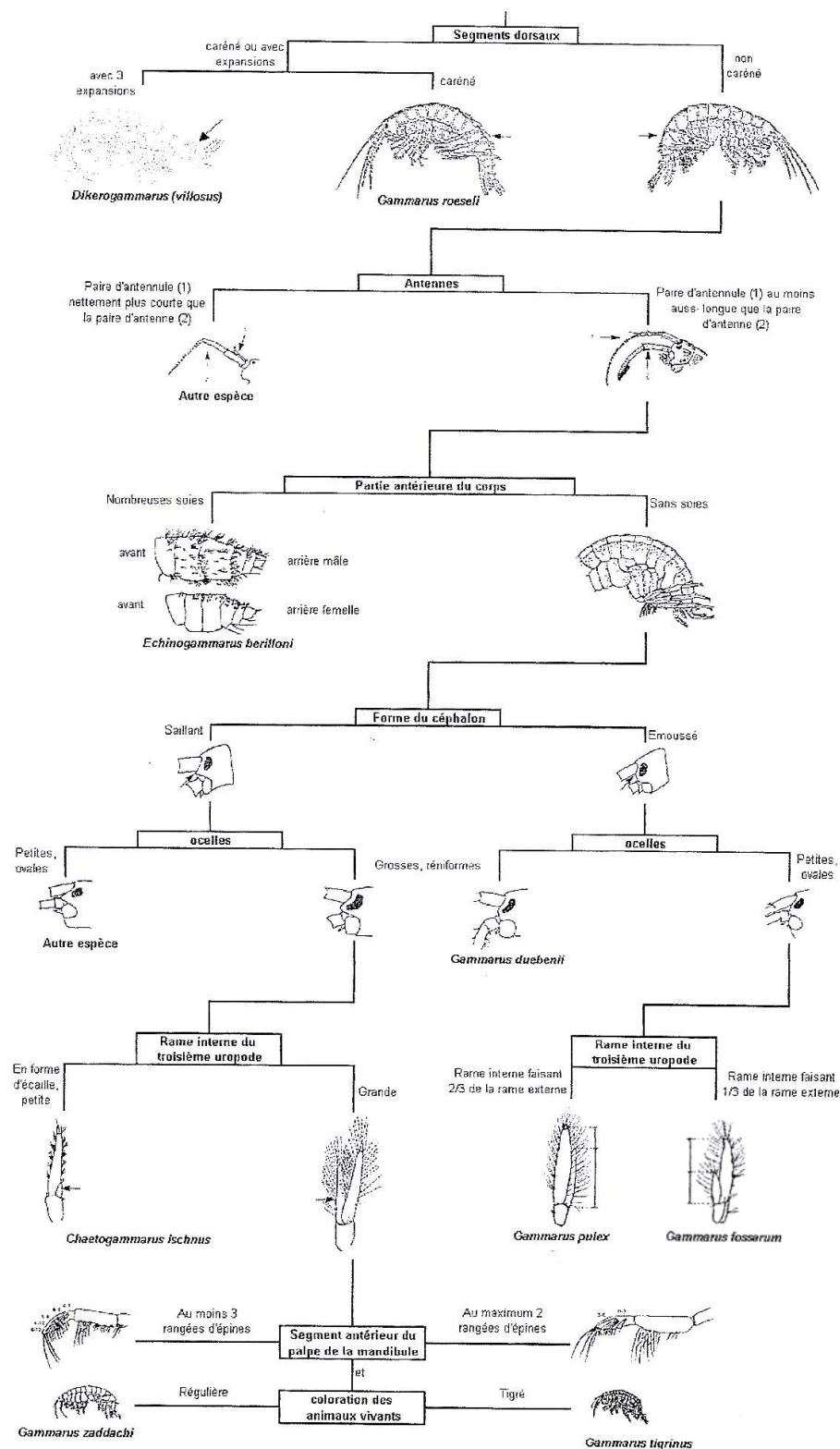
Funding: The authors have no funding or support to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pascal.sornom@univ-metz.fr

Annexe II.

Clé de détermination des espèces de Gammaridae les plus communément rencontrées en Lorraine (Felten, 2003)



Annexe III.

Choix des spots de protéines à identifier, réalisé sur la base des résultats d'analyses de variance à trois critères de classification.

Les différentes cartographies du protéome de *G. pulex* ont permis de mettre en évidence 1984 spots de protéines grâce au logiciel Samespot. Nous avons effectué, sur chacun des 1984 spots de protéines identifiés, des analyses de variance à trois critères de classification (ANOVA III); les trois critères de classification étant les facteurs « température », « arséniate » et « cadmium » pris en compte simultanément. Compte tenu du caractère significatif ou non de l'effet des facteurs isolés et des différentes interactions possibles entre facteurs, une typologie des réponses des spots de protéines aux différents effets a été établie. Cette typologie de réponse réalisée sur la base de l'ensemble des résultats fournis par les ANOVAs III, nous a permis, avec un seuil de significativité α de 0,05, de sélectionner 362 spots de protéines dont les volumes (normalisés) variaient significativement du fait :

- de l'effet « arséniate »
- de l'effet « cadmium »
- de l'effet « température »
- de l'effet de l'interaction « arséniate x cadmium »
- de l'effet de l'interaction « température x cadmium »
- de l'effet de l'interaction « température x arséniate »
- de l'effet de l'interaction « température x arséniate x cadmium »

Parmi ces 362 spots de protéines, 64 variaient uniquement du fait de l'effet « arséniate », 27 uniquement du fait de l'effet « cadmium », 18 uniquement du fait de l'effet « température », 76 uniquement du fait de l'effet de l'interaction « arséniate x cadmium », 3 uniquement du fait de l'effet de l'interaction « température x cadmium », 51 uniquement du fait de l'effet de l'interaction « arséniate x température » et 7 uniquement du fait de l'effet de l'interaction « température x arséniate x cadmium ». De plus, les volumes normalisés de 116 spots variaient significativement sous l'action simultanée de plusieurs effets. Ces 116 protéines ont été classées dans différents groupes selon leur profil de réponses aux différentes catégories établies sur la base des résultats des ANOVAs III.

Vu le nombre important de spots d'« intérêt » associés aux différents effets et compte tenu du coût d'identification élevé d'un nombre important des spots par spectrométrie, entre 30% et 60 % des spots d'intérêt seulement ont été identifiés dans chacune des catégories ayant un nombre de spots de protéines associées supérieur à 10. Dans les catégories regroupant un

nombre de spots inférieur à 10, tous les spots de protéines ont été identifiés. Les protéines choisies pour être identifiées étaient celles dont la *p-value*, obtenue au sein d'une catégorie donnée, était la plus faible et strictement inférieure à 0,03 (pour un effet donné testé au cours de l'ANOVA III). L'identification des protéines a été sous-traitée à l'institut Cochin de Paris. Au total, le nombre de protéines identifiées a été de 264.

Résumé

Les contaminations multiples par des métaux et métalloïdes menacent la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Pourtant, les mécanismes d'action des polluants, leurs interactions et leur toxicité dans un contexte de réchauffement climatique sont encore peu abordés. Parallèlement, nous avons un besoin urgent de marqueurs d'alerte (i.e., précoces, sub-létaux) des effets de ces substances. Par ailleurs, une attention croissante est actuellement portée au protéome des êtres vivants, considéré comme une entité dynamique, modifié par les conditions du milieu.

Dans ce contexte, nous avons travaillé en laboratoire avec comme espèce modèle le crustacé amphipode *Gammarus pulex* avec trois objectifs: (1) évaluer les effets de deux éléments métalliques (cadmium et arséniate) seuls ou en interaction sur des organismes exposés en conditions contrôlées, (2) appréhender les effets de la température en tant que facteur confondant potentiel des réponses mesurées, et (3) rechercher l'existence d'une réponse singulière potentielle du protéome d'individus exposés aux éléments métalliques seuls ou en mélange; à plusieurs températures. Il s'agissait donc à la fois de réaliser une analyse diagnostique susceptible de fournir des marqueurs d'intérêt aptes à révéler précocement un stress chimique et de dresser les bases d'une approche pronostique permettant de mieux prédire les conséquences à l'échelle individuelle d'une dégradation anthropique du milieu.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons d'abord caractérisé les concentrations létales ainsi que la concentration métallique interne des gammarus exposés à l'un ou l'autre des deux métaux étudiés (Cd ou AsV), pendant 240 h à 10 °C (article 1). Puis, nous avons exploré dans les mêmes conditions de durée et de température d'exposition, les effets interactifs des deux métaux (antagonisme, additivité ou synergisme) sur la mortalité et la bioconcentration (article 2). A la suite de ces investigations, nous avons procédé à l'analyse d'une batterie de biomarqueurs pour mieux appréhender les réponses comportementales, physiologiques et cellulaires des organismes soumis à un stress métallique simple ou en mélange binaire (article 3). Ces mesures réunissaient (i) des biomarqueurs physiologiques (mortalité, pression osmotique), (ii) des biomarqueurs comportementaux (fréquence de battement des pléopodes, activité locomotrice), (iii) des biomarqueurs de défenses anti-toxiques [Y-glutamyl-cystéine ligase (GCL), teneur en glutathion réduit (GSH), concentrations en métallothionéines (MT)], et (iv) des mesures de réserves énergétiques (lipides, glycogène, protéines). Un effort particulier a été alloué à l'étude des effets de la température sur un ensemble de paramètres mesurés chez *G. pulex* soumis à une exposition métallique simple ou binaire (article 4). Enfin, pour identifier une signature singulière du protéome révélatrice d'un stress métallique spécifique d'un métal donné, et afin de déterminer si la réponse des organismes est température dépendante ou indépendante, nous avons réalisé des cartographies d'expression de protéines à l'aide d'une approche de protéomique comparative (chapitre 4).

La discussion des résultats d'expositions simples est basée sur la similarité des réponses de biomarqueurs entre les deux métaux, malgré d'éventuelles variations dans l'intensité des réponses selon le métal testé, et la nette différence obtenue avec d'autres marqueurs (osmolarité par exemple). Les hypothèses pour expliquer les différences observées, reposent principalement sur une compétition (i) entre arséniate et phosphate, et (ii) entre cadmium et calcium. Lors d'une exposition au mélange binaire, les liens entre biomarqueurs sont plus complexes. Toutefois, à 10°C, des effets antagonistes sur la mortalité ont été démontrés chez des *G. pulex* exposés aux plus faibles combinaisons de concentrations métalliques. Enfin, toutes les réponses néfastes observées, à l'exception de l'activité ventilatoire, étaient amplifiées à la température la plus élevée. L'étude protéomique a mis en évidence l'existence de difficultés techniques, notamment liées à l'espèce modèle choisie, à résoudre au préalable avant d'envisager une quelconque utilisation du protéome comme outil de bioindication. Une méthode de travail originale, permettant de s'affranchir des effets de la température, est proposée pour de futures investigations.

Mots clés: Amphipoda, arséniate, cadmium, mélanges binaires, effet de la température, réponses comportementales, réponses physiologiques, biomarqueurs, protéomique, bioindication.

Summary

Multiple metal and metalloid contaminations impair aquatic ecosystem community structure and functioning. However, the mechanistic understanding of individual pollutant toxic effects, but also of their interaction effects in a “global warming” context are still rarely tackled. However, aquatic ecosystem managers have an urgent need of early warning indicators (i.e. early, sublethal) of toxicant effects. Recently, an increasing attention has been turned to studies of the proteome of species/populations, which is considered as a dynamic entity modified by environmental conditions.

In this context, we have worked with a model organism, *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda), under laboratory controlled conditions. Three objectives have been defined: (1) assessing the single and combined effects of two metals (i.e. arsenate and/or cadmium), (2) understanding the potential confounding effect of temperature on measured physiological and behavioural responses of gammarids and (3) investigating the existence of a singular response of the proteome of individuals exposed to different single or combined metal concentrations, at several tested temperatures. The major goals were first applying a diagnostic analysis to provide valuable biomarkers early indicating metallic stress, and second developing the foundations for a prognostic approach better predicting the organismal consequences of toxic contaminations due to the anthropogenic degradation of aquatic ecosystems.

To reach these goals, we have first characterized the lethal concentrations but also the metal body concentrations of gammarids after 240h exposure to different Cd or AsV concentrations, at 10°C (article 1). Then, we have examined the interactive effects of the two metals, for the same exposure time and temperature (article 2). We have also studied a battery of biomarkers to understand the behavioural, physiological and cellular responses of organisms facing single or combined metal exposures. This battery included (i) physiological biomarkers (mortality, osmotic pressure), (ii) behavioural biomarkers (pleopod beat frequency, locomotory activity), (iii) anti-toxic defense indicators [γ -glutamyl-cysteine ligase activity (GCL), reduced glutathione content (GSH) and metallothionein concentrations (MT)], and (iv) energy reserve estimators (glycogen, lipids, proteins). A special effort has been devoted to studying the effects of temperature on a set of parameters measured on *G. pulex* exposed to single or binary metallic mixture exposures (Article 4). Finally, using a comparative proteomic approach, we have analysed the protein expression of gammarids (i) to identify a singular signature of the proteome potentially indicative of a specific metal stress, and (ii) to determine if the response of organisms is temperature-dependent or not (Chapter 4).

The discussion of observed results on gammarids subjected to single exposure has been based on (i) biomarker response similarity for the two metals, despite potential variations in the intensity of these responses depending of the studied metal, and (ii) a clear difference with other biomarker responses (e.g. osmolarity). The hypotheses explaining the observed differences have been mainly based on the competition existing (i) between arsenate and phosphate, and (ii) between cadmium and calcium. For binary mixture exposures, the among-biomarker links are more complex to interpret. However, at 10°C, an antagonistic effect of Cd and AsV has been demonstrated on mortality in *G. pulex* exposed to the lowest combination of metal concentrations. Finally, all the adverse responses obtained (except for pleopod beats) have been amplified with an increase in temperature. The proteomic analysis has highlighted the technical difficulty of using the *G. pulex* proteome as a bioassessment tool, in particular because of some attributes (e.g. a high body concentration of myosine) of the selected model species, without previously performing specific preliminary analyses. However, an original working strategy to overcome the confounding effects of temperature has been presented for future metal effect investigations.

Key-words: *Amphipoda*, *arsenate*, *cadmium*, *binary mixtures*, *temperature effect*, *behavioural responses*, *physiological responses*, *biomarkers*, *proteomic*, *bioassessment*