



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 DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité : ECOTOXICOLOGIE, BIODIVERSITE, ECOSYSTEMES

Délivré par :

Université de Lorraine (UFR Sciences Fondamentales et Appliquées)

Soutenue par :

Pascal SORNOM

Indicateurs populationnels de pollution : marqueurs comportementaux chez des crustacés d'eau douce face à un stress métallique

Le **14 Décembre 2012** devant la commission d'examen :

<u>Directeur</u>	Jean-Nicolas BEISEL	<i>MCF - HDR (Université de Lorraine)</i>
<u>Co-directeur</u>	Simon DEVIN	<i>MCF (Université de Lorraine)</i>
<u>Rapporteurs</u>	Loïc BOLLACHE	<i>Professeur (Université de Bourgogne)</i>
	Jean-Pierre THOME	<i>Professeur (Université de Liège - Belgique)</i>
<u>Examineurs</u>	Benoit FERRARI	<i>Chercheur (IRSTEA de Lyon)</i>
	Alain GEFFARD	<i>Professeur (Université de Reims)</i>

*« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.
La pratique, c'est quand tout fonctionne et que
personne ne sait pourquoi.
Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne
fonctionne... et personne ne sait pourquoi ! »*

Albert Einstein

REMERCIEMENTS

La première partie de ce manuscrit est, paradoxalement, la dernière que je rédige, comme un ultime chapitre qui conclue ces quelques années passées à « chercher ». Redoutant l'épreuve des remerciements, je m'étais promis de faire court et simple. Mais me voilà inspiré en ce mercredi soir (*Ou plutôt jeudi matin*), alors, je me lance, dans un style qui se veut résolument léger.

Avant toute chose, je souhaiterais adresser mes plus sincères remerciements aux membres du jury qui ont endossé la responsabilité d'évaluer ce travail. Ma reconnaissance s'adresse ici à M. Loïc Bollache de l'Université de Bourgogne et à M. Jean-Pierre Thomé de l'Université de Liège pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également M. Benoit Ferrari de l'IRSTEA de Lyon et M. Alain Geffard de l'Université de Reims pour avoir accepté de partager leur savoir scientifique en tant qu'examineurs de ce travail doctoral. *Je vous remercie d'avoir donné de votre temps.*

Pour commencer, s'il fallait comparer la thèse à une chose bien concrète, je la qualifierais de montagnes russes, sans l'ombre d'une hésitation. Au début, on suit le mouvement, on se mêle à la foule, parfois en sachant pertinemment ce qui nous attend, parfois en partant à l'aventure, parfois entraîné ou poussé par des proches ou des amis, parfois mu par sa propre volonté. Mais ce n'est qu'en levant la tête aux pieds de ce géant de fer que l'on réalise toute l'ampleur de la tâche... Trop tard pour reculer... On s'installe rapidement, on se pose des questions et en moins de temps qu'il n'en faut pour le dire, le bouton *Start* est enclenché et tout s'accélère. On passe par des hauts, des bas, des moments de joie, d'excitation, des moments de doutes, de grosses frayeurs, tantôt les esprits en place, tantôt la tête à l'envers (*L'abus d'alcool est dangereux pour la santé... Et pour nos chers macroinvertébrés que l'on conserve...*). Et puis en un rien de temps on aperçoit la fin du tunnel et la lueur tout au bout (*Non, rien à voir avec l'au-delà*)... On se dirige tant bien que mal vers la sortie, le pas tremblant, et là on passe par l'endroit incontournable : le stand des photos souvenirs. Il est grand temps maintenant de repenser aux gens qui ont partagé (*Et parfois subit*) ce voyage avec nous, de près ou de loin...

Mes premières pensées vont naturellement vers Monsieur le Professeur Jean-François Férard, précédent directeur de ce parc d'attractions et également celui qui me gratifia d'un : « c'est bon petit, tu es au-dessus de la taille limite, tu peux y aller ! »... *Plus sérieusement, je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du laboratoire LIEBE, de m'avoir permis de participer au projet DIESE et d'avoir répondu présent à chaque sollicitation.*

Lorsque l'on s'installe pour la toute première fois dans un des wagons de cette fameuse attraction, la personne assise à vos côtés joue un rôle tout particulier... Surtout quand elle en est à son

énième tour et qu'elle vous regarde avec un sourire béat et vous lâche un : « tu verras, c'est géniaaaaal ! », ce qui ne vous rassure guère plus... Vous l'aurez compris, mes remerciements s'adressent ici à celui qui a su m'encadrer, m'accompagner, me conseiller et me motiver : mon directeur de thèse, Jean-Nicolas Beisel. Derrière ses idées parfois farfelues se cachent le plus souvent des résultats « sexy », pour reprendre ses mots. *Je te remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir transmis une partie de ton savoir. Je te remercie également de m'avoir aidé en toute circonstance : non non, je ne faisais pas spécialement allusion à cette fameuse journée de prélèvement de gammars en plein hiver... Même si je te revoie, la goutte au nez, les mains bleues et les joues rouges, me demander, blasé : « Dis, c'est bon là non, on a le compte ?!... On peut rentrer là, dis ? ». Et moi de te répondre, navré : « Euh... Non, on a à peine 10 pré-cop', il en faut 300... Et la semaine prochaine, il faudra recommencer... ». Ce n'est qu'une petite anecdote parmi tant d'autres, mais elle restera, comme les autres, gravée quelque part dans ma tête. Au-delà du scientifique débordant d'idées, j'ai découvert au fil du temps une personne sincère, vraie, vivante, joyeuse et gentille. Tu as su devenir plus qu'un « simple » compagnon de wagon à mes yeux. Merci pour tout.*

Je tiens également à remercier mon co-directeur de thèse, Simon Devin. *Merci pour toute l'aide apportée durant ce travail, pour tes conseils avisés et pour la bonne ambiance que tu as su apporter lors de nos quelques sorties terrains.*

Et puis, dans cette attraction, il y a parfois des gens assis dans d'autres wagons qu'il vaut mieux ne pas regarder si on ne veut pas paniquer davantage. Je pense notamment à Céline Vellinger (*C'est une énième boutade, bien-sûr*). *Merci pour tous ces moments, bons et moins bons (Quand on n'a pas connu le vinaigre, comment apprécier le miel ?...) partagés au labo, et également en dehors de ses murs. Durant ces quelques années, tu as su non seulement te montrer (à l'image de ta petite famille) simple, généreuse et profondément gentille, mais également forte et intelligente. Je suis ravi de t'avoir connu grâce à cette thèse, et particulièrement impatient de voir ce que l'avenir nous réserve...*

Par la même occasion, je tiens à remercier mes chers collègues de bureau d'avoir contribué à une bonne atmosphère de travail, et d'avoir su trouver ce subtil équilibre entre sérieux et détente. *Encore une fois, un grand merci à toi Céline, mais également à Cédric Mondy.*

Je tiens également à remercier l'ensemble des doctorants et étudiants stagiaires que j'ai eu l'occasion de côtoyer pendant cette thèse, dans les conditions confortables du bureau ou selon les dures lois du terrain (*Parfois l'inverse...*). Qu'aurait été cette attraction sans toutes ces personnes ? De peur d'en oublier (*Hey oui, il y en a eu du monde qui est passé dans ce petit labo durant ces quelques années...*) et en espérant que chacun se reconnaitra dans ce qui suit, je tiens à remercier tous ceux avec qui j'ai pu échanger et discuter au détour des couloirs, partager les fou-rires, les moments de détentes, les sorties extra-labo, les repas, les soirées parfois très animées, les congrès, les déménagements, bref, tous ces moments qui ont rendus l'aventure plaisante.

Je tiens à adresser des remerciements particuliers aux étudiants que j'ai eu l'occasion d'encadrer et dont j'ai pu apprécier la rigueur et la qualité des travaux. Je remercie notamment Romain Payot, Céline Montazeau (*La parasitologue du 34*) et Maxime Uriarte pour leur participation active au cours de ce travail doctoral.

Par la même occasion, je remercie vivement les personnes avec lesquelles j'ai pu collaborer durant cette thèse : Vincent Médoc (*Merci de m'avoir transmis la fibre du chercheur lors des stages que j'ai pu effectuer par le passé sous ton encadrement, outres tes qualités professionnelles, tu m'auras marqué par tes nombreuses qualités humaines*), Sophie Sroda (*J'espère que certains de tes étudiants t'amusez toujours autant, ne les martyrises pas trop*), Vincent Felten (*Si je devais te décrire en deux mots, je dirais « Simple et Efficace » ! Merci pour ta participation dans le premier article, j'aurais été ravi de pouvoir retravailler avec toi*), Eric Gismondi (*Merci de nous avoir fait confiance pour les manip « Dikero » et « Roeseli », et merci d'avoir mis tes compétences et ton temps à notre disposition ! T'as vu, on a chacun fait notre « PLOS ». Comme dirait un célèbre JN que l'on connaît tous les deux et qui a su nous encourager à sa manière : « On est pas à l'abri d'une erreur, hein. Ça peut passer, sur un malentendu... »*), et enfin Céline Vellinger (*Encore toi !!!!*). Je vous souhaite à tous le meilleur et une bonne continuation.

Je souhaiterais également remercier toutes les personnes de l'ombre, qui entretiennent la mécanique et qui font que l'attraction tourne sans accrocs. Je pense notamment à Jean-François Poinssaint (*Tu devrais attaquer l'enseigne « Mr. Bricolage » en justice pour pouvoir récupérer ce titre*), à Philippe Wagner (*Toujours souriant, même quand le terrain ne voulait définitivement pas de nous... J'ai été ravi de partager avec toi les grandes discussions scientifiques ou autres pendant les trajets en camion, les verres de Macvin bien mérités après les journées terrains bien remplies dans le Jura, d'avoir participé à ton jeu de notation des différents hôtels et restaurants - à quand ton Guide Michelin spécial terrain ?...*), à Philippe Rousselle (*Toi, ce sont les créateurs de la série « MacGyver » que tu devrais traîner en justice. Jamais à court d'idées, un vrai génie ! Je suis persuadé que tu serais capable de faire du feu avec un verre d'eau...*) et à Etienne Morhain (*Toujours partant pour dépanner et apporter une aide, même quand cela dépassait le cadre de l'enseignement*). Merci messieurs pour votre bonne humeur quotidienne, votre disponibilité et vos compétences. Je n'oublie pas Nathalie Nauer (*Toujours ce peps dès le matin, de quoi vous mettre de bonne humeur à coup sûr*) et Rosy Toda, mais aussi celles qui ont le mérite de savoir dompter une administration souvent capricieuse et compliquée, à savoir Nathalie Kleinen, Catherine Drui, Maryline Georgen et Valérie Grzybowski (*Chapeau bas pour les nœuds que vous démêlez chaque jour*). Je remercie également notre documentaliste Mireille Ollivier, celle par qui toute information chemine, celle cachée derrière les fameux Info-Docs (*Précieux pense-bêtes pour les têtes en l'air comme moi*).

Parce qu'il y a souvent une vie (*Ou plutôt un ersatz de vie...*) en dehors de la thèse, je souhaiterais ici faire un clin d'œil artistique à Wilfried « Sweet » Koumba (*Quelle créativité !...*), Stéphane « TomK » Kingué (*« Pas besoin d'être Kurt Cobain pour étaler ce que j'ai dans le crâne !...*

». *Epique !...*), Olivier Ebequoi et Cédric Kengueleoua (*Les grands manitous*). *J'espère que la route sera longue et pleine de surprises. Merci pour votre confiance : « Real recognize real ».*

Je ne pouvais aborder la partie des remerciements sans en tirer des enseignements utiles. J'ai appris qu'il ne fallait pas tenter de coup de pied sauté pendant une démonstration de Kick Boxing... Surtout quand on a eu plusieurs entraînements dans la semaine et que l'on boxe avec l'engouement d'un dimanche après-midi... Cela peut vous coûter un genou et quelques mois de galère... *Je remercie sincèrement les membres du club de Kick Boxing KBCC de m'avoir aidé et soutenu durant cette période, mais également toutes les personnes qui ont pu se déplacer pour me rendre visite ou qui ont su manifester leur soutien autrement (Elles se reconnaîtront).*

En m'approchant de la fin de ces remerciements, mes pensées les plus chaleureuses se tournent évidemment vers ma famille, et plus particulièrement mes parents, Marie-Rose et Jean-Claude, auxquels je dédie ce travail. Il faudrait bien plus que des mots pour décrire tout ce qu'ils m'ont apporté jusqu'à maintenant. *Je remercie mon père de m'avoir montré l'exemple à suivre et ma mère de m'avoir inculqué sa philosophie de la vie, entre autres. Un immense merci pour votre soutien moral et financier, malgré la distance. Merci de n'avoir jamais douté de moi, même devant les plus grandes difficultés (Comme on dit chez nous : « Ti hach' y coup' gros bwa »).*

Je remercie également mon frère et ma sœur d'être toujours présents et disponibles quand il le faut. Je n'oublie pas non plus la famille éloignée, pour laquelle j'ai toujours une petite pensée, dans un coin de ma tête. J'ai également une pensée particulière pour ma belle-famille, avec qui j'ai pris plaisir à partager beaucoup de choses, qui m'a accueillie à bras ouverts, soutenue et aidé.

Enfin, on garde toujours le meilleur pour la fin... Ou plutôt, la meilleure pour la fin... Je profite de ce dernier paragraphe pour exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance envers celle qui a su faire preuve de patience, d'attention et de compréhension, et qui a su m'apporter soutien, réconfort et conseils durant bien plus que ces quelques années de doctorat. *Je te remercie, Nathalie Mergy, pour tout ce que tu m'apportes. Merci d'être là et d'être toi, tout simplement...*

Alors, si on me demande si ma « recherche » s'est avérée fructueuse, je dirais qu'effectivement, au cours de cette aventure, j'y ai trouvé plein de belles choses...

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	21
 CHAPITRE I : CADRE THEORIQUE ET OBJECTIFS	23
1. Contamination des milieux aquatiques	25
1.1. Les différentes sources de contaminations	25
1.2. Les différents types de contaminants chimiques	26
1.3. Les sédiments : sites privilégiés d'accumulation des contaminants	27
1.4. Diffusion des contaminants des sédiments vers la colonne d'eau	28
1.5. Le cadmium dans les écosystèmes aquatiques	29
1.5.1. <u>Généralités et origines</u>	29
1.5.2. <u>Toxicité du cadmium</u>	30
2. Les biomarqueurs comportementaux	31
2.1. Des outils d'alerte précoce	32
2.2. Intérêts en écotoxicologie	34
2.3. Un trait d'union entre écotoxicologie et écologie	36
3. Les changements comportementaux de crustacés dans un contexte de pollution métallique	37
3.1. Avantages et inconvénients des crustacés comme organismes modèles	38
3.2. Les mesures comportementales chez les crustacés	39
3.3. Définition des objectifs	43
 CHAPITRE II : MODELES BIOLOGIQUES, SITES D'ETUDES ET METHODES	49
1. Choix des modèles biologiques et spécificités	51
1.1. Le décapode <i>Astacus astacus</i>	51
1.2. L'isopode <i>Asellus aquaticus</i>	53
1.3. Les amphipodes <i>Gammarus pulex</i> , <i>Gammarus roeseli</i> et <i>Dikerogammarus villosus</i>	55

1.4. Le poisson <i>Cottus gobio</i> utilisé en tant que prédateur potentiel	58
---	----

2. Les sites d'études 59

2.1. Milieux de provenance des organismes	59
---	----

2.2. Sédiments	62
----------------------	----

2.2.1. <u>Provenance des sédiments</u>	62
--	----

2.2.2. <u>Méthode de prélèvement et de stockage</u>	63
---	----

3. Méthodes..... 64

3.1. Mesure des comportements.....	64
------------------------------------	----

3.2. Analyse des comportements	65
--------------------------------------	----

3.3. Analyses statistiques.....	66
---------------------------------	----

CHAPITRE III : IMPACT COMPORTEMENTAL D'UNE ALTERATION DE LA QUALITE DES SEDIMENTS 67

* Sornom, P., Devin, S., Férard, J.F. & Beisel, J.N. (2012) Substrate avoidance and antipredator behaviour of freshwater crustaceans exposed to contaminated sediments. <i>Soumis</i>	71
---	----

CHAPITRE IV : STRATEGIE DE REPONSE DE TROIS AMPHIPODES FACE A UN RISQUE DE PREDATION..... 89

* Sornom, P., Médoc, V. & Beisel, J.N. (2012) Species differences in how a native, a naturalised and an invasive freshwater amphipod behave under predation risk. <i>Soumis</i>	93
---	----

CHAPITRE V : MODIFICATION DES REPONSES D'AMPHIPODES EN PRESENCE DE CADMIUM 117

1. Réponses antitoxiques, comportements d'anti-prédation et réserves énergétiques de *Dikerogammarus villosus* 119

* 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 <i>Dikerogammarus villosus</i> . <i>PLOS ONE</i> 7, e42435.....	121
---	-----

2. Réponses antitoxiques, comportements d'anti-prédation et réserves énergétiques de *Gammarus roeseli*..... 149

2.1. Résultats	150
2.1.1. <u>Biomarqueur d'effets toxiques</u>	150
2.1.2. <u>Réponses comportementales</u>	153
2.1.3. <u>Réserves énergétiques</u>	156
2.2. Discussion	158
2.2.1. <u>Effets du cadmium</u>	158
Biomarqueur d'effets toxiques	158
Réponses comportementales	159
Réserves énergétiques	159
2.2.2. <u>Réponses à un risque de prédation</u>	160

3. Comportements d'appariement de *Dikerogammarus villosus*... 162

3.1. Matériels et méthodes	162
3.1.1. <u>Prélèvement des organismes et maintien au laboratoire</u>	162
3.1.2. <u>Solution cadmiée</u>	163
3.1.3. <u>Tests comportementaux</u>	163
Expérience #1	164
Expérience #2	164
3.1.4. <u>Analyses statistiques</u>	164
3.2. Résultats	165
3.2.1. <u>Expérience #1</u>	165
3.2.2. <u>Expérience #2</u>	166
3.3. Discussion	166

CHAPITRE VI : DISCUSSION GENERALE 171

1. Variabilité des réponses comportementales 173

1.1. Variabilité inter-espèces	173
1.1.1. <u>Différences de perceptions de la contamination liées à l'intimité de l'espèce au substrat</u>	175
1.1.2. <u>Variabilité de réponses comportementales entre espèces d'amphipodes</u>	175
1.2. Variabilité inter-sexes	177

2. Effets du cadmium sur les réponses testées 180

2.1. Altérations du comportement	180
2.2. Conséquence écologique de la réponse comportementale : une approche du changement d'échelle	181

3. Précocité et cohérence des réponses comportementales testées 182

3.1. Précocité des réponses comportementales	182
3.2. Approche multicritères : intérêt de la prise en compte de marqueurs comportementaux.....	183
 CHAPITRE VII : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	187
 BIBLIOGRAPHIE	193
 ANNEXES.....	217
Annexe I	219
Annexe II	247
Annexe III	249

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I : CADRE THEORIQUE ET OBJECTIFS

Tableau I-1. Exemples non-exhaustifs de traits comportementaux déjà utilisés en tant que biomarqueurs chez divers crustacés exposés à un stress chimique..... 42

Tableau I-2. Synthèse du contenu des chapitres abordés en fonction des questions posées en objectifs 46

CHAPITRE III : IMPACT COMORTEMENTAL D'UNE ALTERATION DE LA QUALITE DES SEDIMENTS

Table 1. Chemical characterisation of both sediments and water from SIR, CHA and GAL sampling sites 76

Table 2. Chemical characterisation of GAL control and Cd-spiked sediments. Cd, cadmium; P, phosphorus; N, nitrogen; C, carbon; DW, dry weight. Data are means±SD 77

CHAPITRE IV : STRATEGIE DE REPONSE DE TROIS AMPHIPODES FACE A UN RISQUE DE PREDATION

Table 1. Analyses of variance investigating variations in the time spent in refuges (TIR) and aggregation (AGG) measured in experiment #1 and the highest swimming speed (HSS) and the number of refuge areas used (NRU) measured in experiment #2 in *G. pulex*, *G. roeseli* and *D. villosus*, according to species and water scent 102

CHAPITRE V : MODIFICATION DES REPONSES D'AMPHIPODES EN PRESENCE DE CADMIUM

Table 1. Analysis of variance (three-factor ANOVA) in biomarkers for toxicity (MDA) and energetic reserves (lipid and glycogen) in *D. villosus*, according to gender, predation risk and cadmium (Cd) contamination 132

Table 2. Analysis of variance (two-factor ANOVA) in hiding, exploration and mobility behaviour in *D. villosus* measured with device #1, and hiding, aggregation and mobility behaviour measured with device #2, in response to predation risk and cadmium (Cd) contamination. Significant values are shown in bold 134

Tableau V-1. Analyse de variance (ANOVA à trois facteurs) des mesures du biomarqueur d'effets toxiques (MDA) et des réserves énergétiques (lipides et glycogène) chez *G.*

<i>roeseli</i> , en fonction du genre, du risque de prédation et de la contamination au cadmium (Cd).....	151
---	-----

Tableau V-2. Analyse de variance (ANOVA à deux facteurs) des mesures d'utilisation des refuges, d'exploration et de mobilité chez <i>G. roeseli</i> obtenues avec le dispositif #1, et des mesures d'utilisation des refuges, d'agrégation et de mobilité obtenues avec le dispositif #2, en réponse à un risque de prédation et à une contamination au cadmium (Cd)	153
---	-----

ANNEXES

Annexe II. Analyses physico-chimiques de l'eau superficielle et des sédiments de la Nied française à Rémyilly, et des sédiments de la Moselle à Metz (Saulcy). *MS : Matière Sèche	247
---	-----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : CADRE THEORIQUE ET OBJECTIFS

- Figure I-1.** Identification de compromis inter-traits dans les stratégies d'évitement d'un stress. Existence d'un équilibre potentiel entre les traits comportementaux 33
- Figure I-2.** Position des biomarqueurs biologiques lors d'une réponse à un stress environnemental en fonction de leur sensibilité, leur pertinence écologique et le temps de réponse (d'après Sanchez & Porcher, 2009; Shinn, 2010) 36
- Figure I-3.** Courbes théoriques. Patrons de réponse de l'activité ventilatoire chez un amphipode soumis à différents types de stress 41

CHAPITRE II : MATERIELS BIOLOGIQUES, SITES D'ETUDES ET METHODES

- Figure II-1.** Morphologie générale d'*Astacus astacus* et dimorphisme sexuel. A) Vue dorsale d'un individu adulte ; B) Vue ventrale d'une femelle (à gauche) et d'un mâle (à droite). Le mâle présente des appendices copulateurs au niveau de l'abdomen, mais également des pinces plus grosses et un abdomen plus fin que la femelle (Photo : R. Franckhauser)..... 52
- Figure II-2.** Morphologie générale d'*Asellus aquaticus*. A) Vue dorsale d'un individu adulte ; B) Vue latérale droite d'individus en pré-copulât, avec le mâle au-dessus et la femelle en dessous (Photo : M. Renou) 54
- Figure II-3.** Morphologie générale d'un gammare et différences inter-spécifiques. A) Vue latérale gauche d'un individu adulte (Croquis : V. Médoc) ; B) Vue latérale gauche de *Gammarus pulex* en pré-copulât, avec le mâle au-dessus et la femelle en dessous (Photo : D. Hollingworth) ; C) Vue latérale gauche de *Gammarus roeseli* adulte. Les épines dorsales sont indiquées par des flèches (Photo : M. Mañas) ; D) Vue latérale gauche de *Dikerogammarus villosus* adulte. Les pointes dorsales sont indiquées par des flèches (Photo : J.F. Cart) 57
- Figure II-4.** Morphologie générale du chabot commun *Cottus gobio*. A) Vue de face d'un individu adulte au contact du substrat (Photo : T. Dietsche) ; B) Vue latérale gauche d'un individu adulte 59
- Figure II-5.** Cartes localisant les différents sites de prélèvements des organismes. A) Région lorraine en France ; B) Carte du département de la Meurthe-et-Moselle (54) situant la rivière Esch et la commune de Jezainville ; C) Carte du département de la Moselle (57) situant la rivière Moselle et les communes de Metz, Rémillly et Meisenthal ; D) Carte des trois parties de la rivière Nied situant les stations RNB de suivi de la qualité de l'eau 60
- Figure II-6.** Carte localisant les différents sites de prélèvement des sédiments. Les sites 1 et 2 se situent dans le département du Jura. Le site 3 se situe dans le département de l'Ain. 63

Figure II-7. Illustrations du dispositif expérimental. A) Vue latérale de l'enceinte hermétique pouvant accueillir les dispositifs expérimentaux ; B) Exemple d'un dispositif expérimental utilisé dans l'acquisition des réponses comportementales d'anti-prédation des amphipodes (voir détails et légendes dans le Chapitre V.1).....	64
---	-----------

CHAPITRE III : IMPACT COMORTEMENTAL D'UNE ALTERATION DE LA QUALITE DES SEDIMENTS

Fig. 1. Time (in min) spent in contact with control SIR or contaminated CHA sediment measured during 1h in <i>Asellus aquaticus</i> , <i>Gammarus pulex</i> , <i>Gammarus roeseli</i> , <i>Dikerogammarus villosus</i> and <i>Astacus astacus</i> . Significant differences are indicated by asterisks (Student t tests, *** $P < 0.001$). Data are means $\pm$ SD (N=30).....	79
Fig. 2. Number of area changes between control SIR and contaminated CHA sediments measured during 1 h in <i>Asellus aquaticus</i> , <i>Gammarus pulex</i> , <i>Gammarus roeseli</i> , <i>Dikerogammarus villosus</i> and <i>Astacus astacus</i> . Significant differences are indicated by different letters (Tukey HSD post-hoc test after ANOVA, $P < 0.05$). Data are means $\pm$ SD (N=30)	80
Fig. 3. Time (in min) spent in contact with control GAL (white full bars) or Cd-spiked (white hatched bars) GAL sediment and hiding inside refuges of control (black full bars) and Cd-spiked (black hatched bars) areas measured during 1 h in <i>Dikerogammarus villosus</i> exposed to three experimental conditions. Significant differences are indicated by different letters (Tukey HSD post-hoc test after ANOVA, $P < 0.05$). Data are means $\pm$ SD (N=60).....	81
Fig. 4. Number of area changes between control GAL and Cd-spiked GAL sediments measured during 1 h in <i>Dikerogammarus villosus</i> exposed to three experimental conditions. Significant differences are indicated by different letters (Tukey HSD post-hoc test after ANOVA, $P < 0.05$). Data are means $\pm$ SD (N=60)	81

CHAPITRE IV : STRATEGIE DE REPONSE DE TROIS AMPHIPODES FACE A UN RISQUE DE PREDATION

Fig. 1. Proportion of the time spent in refuges (mean $\pm$ SD) by <i>G. pulex</i> , <i>G. roeseli</i> and <i>D. villosus</i> in the presence of control (open bars) or scented water (filled bars). Significant differences are indicated by different letters (N=60; Tukey HSD post-hoc test after ANOVA; $P < 0.05$)	101
Fig. 2. Proportion of the time spent close to conspecifics (mean $\pm$ SD) by <i>G. pulex</i> , <i>G. roeseli</i> and <i>D. villosus</i> in the presence of control (open bars) or scented water (filled bars). Significant differences are indicated by different letters (N=60; Tukey HSD post-hoc test after ANOVA; $P < 0.05$)	102
Fig. 3. Highest swimming speed recorded between two refuge areas (mean $\pm$ SD) in <i>G. pulex</i> , <i>G. roeseli</i> and <i>D. villosus</i> in the presence of control (open bars) or scented water (filled bars). A filled triangle indicates the absence of movement between refuge	

areas in scented water for <i>D. villosus</i> . Significant differences are indicated by different letters (N=60; Tukey HSD post-hoc test after ANOVA; P<0.05)	104
Fig. 4. Number of refuge areas used (mean±SD) by <i>G. pulex</i> , <i>G. roeseli</i> and <i>D. villosus</i> in the presence of control (open bars) or scented water (filled bars). Significant differences are indicated by different letters (N=60; Tukey HSD post-hoc test after ANOVA; P<0.05)	104

CHAPITRE V : MODIFICATION DES REPONSES D'AMPHIPODES EN PRESENCE DE CADMIUM

Figure 1. Schematic views of the experimental devices. A) device #1, used to assess hiding, exploration and mobility behaviour; B) device #2, used to assess hiding, aggregation and mobility behaviour	128
Figure 2. Malondialdehyde (MDA) levels measured in the presence/absence of predation risk. A) device #1; B) device #2. <i>D. villosus</i> females and males are represented by filled and hatched bars, respectively. MDA levels were measured following behavioural tests in which amphipods were exposed to the following conditions: Control = 24-h pre-exposure to Cd-free water + 4-min test exposure to Cd-free water (white bars); Cd-free pre-exposure = 24-h pre-exposure to Cd-free water + 4-min test exposure to 500 µg Cd/L (grey bars); Cd pre-exposure = 24-h pre-exposure to 500 µg Cd/L + 4-min test exposure to 500 mg Cd/L (black bars). All data are means of N=10±SD. Significant differences are indicated by different letters (Tukey HSD post-hoc test after ANOVA, P<0.05)	133
Figure 3. Behavioural responses measured in the presence/absence of predation risk. A) hiding in device #1 (i.e. proportion of time spent in holes); B) environmental exploration in device #1 (i.e. number of refuge areas used); C) mobility in device #1 (i.e. proportion of time spent moving when outside of refuges); D) hiding in device #2 (i.e. proportion of the time spent clinging to cages); E) aggregation in device #2 (i.e. proportion of the time spent clinging to cages filled with conspecifics); F) mobility in device #2 (i.e. proportion of the time spent moving when outside of refuges). <i>D. villosus</i> were exposed to the following conditions: Control = 24-h pre-exposure to Cd-free water + 4-min test exposure to Cd-free water (white dots); Cd-free pre-exposure = 24-h pre-exposure to control water + 4-min test exposure to 500 µg Cd/L (grey dots); Cd pre-exposure = 24-h pre-exposure to 500 µg Cd/L + 4-min test exposure to 500 µg Cd/L (black dots). All data are means of N=60±95% confidence intervals. Significant differences are indicated by different letters (Tukey HSD post-hoc test after ANOVA, P<0.05)	135
Figure 4. Energy reserves measured in the presence/absence of predation risk. A) lipid content in amphipods from device #1; B) lipid content in amphipods from device #2; C) glycogen content in amphipods from device #1; D) glycogen content in amphipods from device #2. <i>D. villosus</i> females and males are represented by filled and hatched bars, respectively. Energy reserves were measured following behavioural tests in which amphipods were exposed to the following conditions: Control = 24-h pre-exposure to Cd-free water + 4-min test exposure to Cd-free water (white bars); Cd-free pre-exposure = 24-h pre-exposure to Cd-free water + 4-min test exposure to 500 µg Cd/L (grey bars); Cd pre-exposure = 24-h pre-exposure to 500	

$\mu\text{g Cd/L}$ + 4-min test exposure to 500 $\mu\text{g Cd/L}$ (black bars). All data are means of $N=10\pm\text{SD}$. Significant differences are indicated by different letters (Tukey HSD post-hoc test after ANOVA, $P<0.05$)..... 137

Figure V-1. Niveaux de Malondialdehyde (MDA) mesurés en présence/absence d'un risque de prédation. A) dispositif #1 ; B) dispositif #2. Les femelles et mâles *G. roeseli* sont respectivement représentés par des barres pleines ou hachurées. Les niveaux de MDA ont été mesurés à la suite des tests comportementaux durant lesquels les amphipodes ont été exposés aux conditions suivantes : Témoin = pré-exposition de 24 h à une eau non cadmiée + exposition test de 4-min à une eau non cadmiée (barres blanches) ; Sans pré-exposition au Cd = pré-exposition de 24 h à une eau non cadmiée + exposition test de 4 min à 250 $\mu\text{g Cd/L}$ (barres grises) ; Avec pré-exposition au Cd = pré-exposition de 24 h à 250 $\mu\text{g Cd/L}$ + exposition test de 4 min à 250 $\mu\text{g Cd/L}$ (barres noires). Chaque barre représente une moyenne de $N = 5 \pm$ écart type. Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (test post-hoc HSD de Tukey à la suite de l'ANOVA, $P<0,05$) 152

Figure V-2. Réponses comportementales mesurées en présence/absence d'un risque de prédation. A) utilisation des refuges dans le dispositif #1 (i.e. proportion du temps passé dans les trous) ; B) exploration de l'environnement dans le dispositif #1 (i.e. nombre de zones refuges différentes utilisées) ; C) mobilité dans le dispositif #1 (i.e. proportion du temps passé en mouvement en dehors des refuges) ; D) utilisation des refuges dans le dispositif #2 (i.e. proportion du temps passé accroché aux cages) ; E) agrégation dans le dispositif #2 (i.e. proportion du temps passé accroché aux cages contenant des congénères) ; F) mobilité dans le dispositif #2 (i.e. proportion du temps passé en mouvement en dehors des refuges). *G. roeseli* a été exposé aux conditions suivantes : Témoin = pré-exposition de 24 h à une eau non cadmiée + exposition test de 4-min à une eau non cadmiée (points blancs) ; Sans pré-exposition au Cd = pré-exposition de 24 h à une eau non cadmiée + exposition test de 4 min à 250 $\mu\text{g Cd/L}$ (points gris) ; Avec une pré-exposition au Cd = pré-exposition de 24 h à 250 $\mu\text{g Cd/L}$ + exposition test de 4 min à 250 $\mu\text{g Cd/L}$ (points noirs). Chaque point représente une moyenne de $N = 60 \pm 95\%$ d'intervalle de confiance. Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (test post-hoc HSD de Tukey à la suite de l'ANOVA, $P<0,05$) 154

Figure V-3. Réserves énergétiques mesurées en présence/absence d'un risque de prédation. A) teneur en lipides des amphipodes du dispositif #1 ; B) teneur en lipides des amphipodes du dispositif #2 ; C) teneur en glycogène des amphipodes du dispositif #1 ; D) teneur en glycogène des amphipodes du dispositif #2. Les femelles et mâles *G. roeseli* sont respectivement représentés par des barres pleines ou hachurées. Les réserves énergétiques ont été mesurées à la suite des tests comportementaux durant lesquels les amphipodes ont été exposés aux conditions suivantes : Témoin = pré-exposition de 24 h à une eau non cadmiée + exposition test de 4-min à une eau non cadmiée (barres blanches) ; Sans pré-exposition au Cd = pré-exposition de 24 h à une eau non cadmiée + exposition test de 4 min à 250 $\mu\text{g Cd/L}$ (barres grises) ; Avec pré-exposition au Cd = pré-exposition de 24 h à 250 $\mu\text{g Cd/L}$ + exposition test de 4 min à 250 $\mu\text{g Cd/L}$ (barres noires). Chaque barre représente une moyenne de $N = 5 \pm$ écart type. Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (test post-hoc HSD de Tukey à la suite de l'ANOVA, $P<0,05$) 157

- Figure V-4.** Effet du cadmium sur la capacité de maintien de l'appariement chez *D. villosus*. Evolution du nombre de pré-copulâts séparés en fonction du temps d'exposition à une solution témoin (eau déchlorée) ou une solution cadmiée (500 µg Cd/L)..... **165**
- Figure V-5.** Effet du cadmium sur la capacité d'appariement chez *D. villosus*. A) Temps moyen avant la reformation d'un pré-copulât à la suite d'une séparation du mâle et de la femelle ; B) Nombre moyen de contacts entre le mâle et la femelle avant appariement. Les données représentent des moyennes de $N = 30 \pm$ Ecart-type. Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (tests post-hoc HSD de Tukey après l'ANOVA, $P < 0.001$)..... **166**

CHAPITRE VI : DISCUSSION GENERALE

- Figure VI-1.** Exemple d'un patron de réponse théorique de l'activité locomotrice modifiée à la suite de l'induction d'un stress environnemental chez trois espèces différentes (réponse cumulée à celle observée en condition non-stressante, non représentée ici). A) Quelques réponses possibles de l'espèce 1 ; B) Comparaison des réponses simplifiées des espèces 1, 2 et 3..... **174**

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications internationales

Sornom Pascal, Devin Simon, Férard Jean-François, Beisel Jean-Nicolas. Substrate avoidance and antipredator behaviour of freshwater crustaceans exposed to contaminated sediments. *Short Communication* (Soumis).

Sornom Pascal, Médoc Vincent, Beisel Jean-Nicolas. Species differences in how a native, a naturalised and an invasive freshwater amphipod behave under predation risk. *Research article* (Soumis).

Sornom Pascal, Gismondi Eric, Vellinger Céline, Devin Simon, Férard Jean-François, Beisel Jean-Nicolas (2012) Effects of sublethal cadmium exposure on antipredator behavioural and antitoxic responses in the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*. *PLOS ONE* 7(8), e42435.

Sornom Pascal, Gismondi Eric, Vellinger Céline, Devin Simon, Férard Jean-François, Beisel Jean-Nicolas (2012) Effects of sublethal cadmium exposure on antipredator behavioural and antitoxic responses in two freshwater gammarids: comparison between *Gammarus roeseli* and *Dikerogammarus villosus*. *Research article* (En préparation).

Sornom Pascal, Felten Vincent, Médoc Vincent, Sroda Sophie, Rousselle Philippe, Beisel Jean-Nicolas (2010) Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environmental Pollution* 158, 1288-1295. (Annexe I).

Publications internationales (Collaborations)

Vellinger Céline, Felten Vincent, **Sornom Pascal**, Rousselle Philippe, Beisel Jean-Nicolas, Usseglio-Polatera Philippe (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. (Annexe III).

Communications orales

Sornom Pascal, Gismondi Eric, Devin Simon, Férard Jean-François, Beisel Jean-Nicolas (2011) Behavioural markers as relevant tools in applied ecotoxicology: effects of cadmium on antipredation behaviours and antitoxic responses in the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*. MEB. New frontiers in Monitoring European Biodiversity. The role and importance of amphipod crustaceans. Palermo, Italy, 27-29/09/2011.

Communications orales (Collaborations)

- Beisel Jean-Nicolas, **Sornom Pascal** (2010) The importance and usefulness of behavioural traits in basic and applied ecological studies. ASLO/NABS Meeting. Aquatic sciences: global changes from the center to the edge. Santa Fe, New Mexico, USA, 06-11/06/2010.
- Médoc Vincent, **Sornom Pascal**, Beisel Jean-Nicolas (2009) The swimming performance in native and exotic amphipods as a part of their anti-predator strategy. ICAIS. 16th International conference on aquatic invasive species. Montréal, Canada, 19-23/04/2009.
- Sroda Sophie, **Sornom Pascal**, Cossu-Leguille Carole (2009) Sensibilité, caractéristiques biochimiques et comportementales : contribution dans la compréhension du phénomène invasif d'un amphipode exotique. 9^{ème} Journées Internationales de Limnologie. Luxembourg, 06-09/04/2009.
- Sroda Sophie, **Sornom Pascal**, Cossu-Leguille Carole (2009) A biochemical approach to understand the invasion success of an exotic amphipod. ICAIS. 16th International conference on aquatic invasive species. Montréal, Canada, 19-23/04/2009.

Communications affichées

- Vellinger Céline, Felten Vincent, **Sornom Pascal**, Rousselle Philippe, Beisel Jean-Nicolas, Usseglio-Polatera Philippe (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.
- Sornom Pascal**, Médoc Vincent, Rousselle Philippe, Beisel Jean-Nicolas (2011) Variabilité des comportements d'anti-prédation chez trois amphipodes phylogénétiquement proches. Séminaire de l'Ecole Doctoral RP2E. Nancy, UHP, France, 20/01/2011. Prix du meilleur poster.
- Sornom Pascal**, Devin Simon, Férard Jean-François, Beisel Jean-Nicolas (2009) Development stability: potential applications in ecotoxicology. ISTA14. 14th International symposium on toxicity assessment. Metz, France, 30/08-04/09/2009.
- Sornom Pascal**, Felten Vincent, Médoc Vincent, Sroda Sophie, Rousselle Philippe, Beisel Jean-Nicolas (2009) Le sexe influence-t-il la tolérance à la salinité de l'amphipode *Gammarus roeseli* ? 9^{ème} Journées Internationales de Limnologie. Luxembourg, 06-09/04/2009. Prix du meilleur poster.

CHAPITRE I

Cadre Théorique Et Objectifs

a



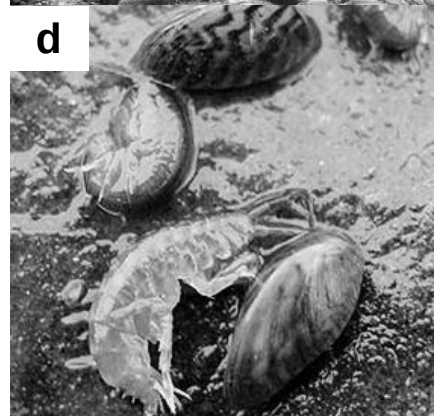
b



c



d



**a**

La rivière Moselle près du Temple Neuf situé au cœur de la ville de Metz (Moselle, France) (Photo : T. Loury).

**b**

Station d'épuration (STEP) de Metz (Moselle, France) (Photo : ac-nancy-metz.fr)

**c**

Substrat rocheux situé au fond d'une rivière d'eau douce européenne (Photo : P. Steinmann).

**d**

Les pierres se trouvant au niveau du lit de la rivière constituent un habitat fréquemment utilisé par *Dikerogammarus villosus* et *Dreissena polymorpha*, deux espèces invasives rencontrées dans les cours d'eau du nord-est de la France (Photo : P. Steinmann).

Les écosystèmes aquatiques, d'eau douce comme d'eau salée, sont constamment exposés à de multiples sources et types de stress. Cette dégradation des écosystèmes aquatiques constitue un problème environnemental mondial en raison des effets qu'elle produit sur la faune et la flore associées à ces milieux. En Europe, suite à une prise de conscience des conséquences de la dégradation de ces écosystèmes, les autorités ont mis en place différentes mesures afin d'évaluer la qualité des milieux et réglementer la gestion des substances qui menacent ces systèmes. Parmi ces mesures, l'application de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE - 2000/60/CE) vise à atteindre un « bon état » écologique et chimique des eaux de surface d'ici 2027, avec des étapes clefs en 2015 et 2021. L'Europe fait partie des régions du monde qui ont des écosystèmes aquatiques dont la biodiversité est la plus menacée par les activités anthropiques (Vörösmarty *et al.*, 2010). Des indicateurs globaux montrent par ailleurs à une échelle globale que durant ces dernières décades les écosystèmes d'eau douce se sont dégradés beaucoup plus rapidement que les écosystèmes terrestres ou marins (Millennium Ecosystem Assessment, 2005).

1. Contamination des milieux aquatiques

Déjà contraintes par les variations de facteurs physico-chimiques, tels que la température, la salinité ou les régimes hydrauliques, et par la disponibilité des ressources nutritives, la faune et la flore sont désormais également façonnées par des expositions variables dans l'espace et dans le temps à des mélanges de composés chimiques (Phillips & Rainbow, 1994).

1.1. Les différentes sources de contaminations

Les composés chimiques de base que l'on retrouve dans l'eau naturelle des cours d'eau sont régis par deux principaux facteurs que sont la géologie et le climat. Si l'on prend l'exemple du sodium et des chlorures, ces deux composés proviennent de la météorisation naturelle de la roche et du transport atmosphérique de substances d'origine océanique. Aujourd'hui, nous observons en outre une salinisation secondaire des eaux d'origine anthropique qui peut engendrer des modifications considérables de la concentration de ces

composés à une échelle locale. Il est généralement admis que la dose (concentration et temps d'exposition) conditionne le caractère toxique de ces composés pour les êtres vivants.

Si de nombreuses substances chimiques se retrouvent de façon naturelle dans les écosystèmes, le nombre de molécules d'origine anthropique ne cesse d'augmenter. Les multiples activités humaines occasionnent des rejets de substances chimiques qui se retrouvent inévitablement dans le milieu aquatique continental ou marin. Cette pollution est la résultante des grandes activités industrielles telles que le raffinage des produits pétroliers, les charbonnages, la synthèse organique et la manufacture des produits synthétiques, la sidérurgie, l'industrie textile et l'industrie de la pâte à papier. Cependant, malgré leur poids prépondérant, les industries ne constituent pas les seules sources de pollution de l'environnement aquatique : l'agriculture, l'urbanisation et l'utilisation de produits domestiques constituent les autres sources de contaminations.

Les sources de pollution des écosystèmes aquatiques peuvent être (1) localisées, incluant les effluents urbains, les effluents industriels et les infiltrations à partir des lieux de décharge, ou (2) diffuses, incluant les ruissellements en zones agricoles, en zones urbaines et les retombées atmosphériques. Il convient également de considérer les substances chimiques ajoutées ou formées durant les processus de traitement des eaux résiduaires ou des eaux potables.

1.2. Les différents types de contaminants chimiques

Parmi les composés chimiques impliqués dans la contamination des milieux aquatiques, on distingue les **polluants organiques**, en particulier les polluants organiques persistants (POPs) tels que les hydrocarbures aliphatiques halogénés, les hydrocarbures mono-aromatiques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les dérivés aromatiques chlorés et nitrés, les phtalates, les nitrosamines, les éthers halogénés, les phénols et dérivés ou encore les organochlorés comme les polychlorobiphényles (PCBs), mais également les **polluants inorganiques** composés majoritairement par les métaux essentiels (naturellement présents dans l'organisme) et non-essentiels. La différence entre ces deux catégories réside dans le fait qu'il n'existerait pas de dose bénéfique pour un organisme vivant pour les métaux non essentiels. Ainsi, certains métaux tels que le cuivre (Cu) ou le zinc (Zn) s'avèrent, à de

faibles quantités, nécessaires pour les organismes vivants et interviennent au cours de divers processus biologiques. Un déficit comme un excès de ces métaux essentiels peut néanmoins avoir des effets délétères chez un individu. A l’opposé, les métaux non-essentiels tels que le cadmium (Cd), le mercure (Hg) ou le plomb (Pb) n’ont à ce jour aucune fonction biologique significative connue et possèdent des propriétés toxiques, même à de faibles concentrations. Ces contaminants, pour la plupart, sont en effet caractérisés non seulement par une forte écotoxicité, mais également par une capacité de bioaccumulation dans les tissus des organismes, de biomagnification tout au long de la chaîne alimentaire, et une persistance à long terme dans l’environnement. Ces substances peuvent donc constituer une menace significative pour l’équilibre ou l’état de santé des écosystèmes aquatiques et, *in fine*, pour la santé humaine.

1.3. Les sédiments : sites privilégiés d’accumulation des contaminants

Les sédiments désignent tout matériel particulaire tel que le sable, le limon, les argiles, ou la matière organique qui a été déposé sur le fond des masses d’eau et qui est susceptible d’être transporté par l’eau (Stronkhorst *et al.*, 2004). Les sédiments constituent le lit des rivières et représentent ainsi un habitat favorable à l’installation d’une large diversité d’organismes (Palmer *et al.*, 2000). Ils contribuent aux processus de décomposition de la matière organique et de production primaire et abritent différentes sources d’alimentation (Minshall, 1984). Leur rôle de refuge contre la prédation (Brusven & Rose, 1981) ou les perturbations physiques (Dole-Olivier *et al.*, 1997; Gayraud *et al.*, 2000) est également important tant pour les macroinvertébrés que pour les poissons. Les sédiments représentent de ce fait un compartiment dynamique de l’écosystème (Wetzel, 1975), mais fonctionnent à la fois comme un réservoir et un vecteur des polluants chimiques organiques et inorganiques.

En effet, en fonction de caractéristiques intrinsèques telles que la taille des particules, la quantité de matière organique ou le type de contenu en carbone organique, les sédiments peuvent constituer des zones préférentielles d’accumulation des contaminants organiques et inorganiques. L’étude de la toxicité des sédiments, initiée dans les années 1970, s’est considérablement développée durant ces dernières décennies en raison de la menace constituée par la capacité de « piégeage » des contaminants et leur toxicité pour les organismes directement ou indirectement liés aux sédiments. En effet, les sédiments

possèdent une forte capacité d'adsorption des polluants (Cairns *et al.*, 1984) qui se lient préférentiellement aux particules fines (Estebe *et al.*, 1997), induisant souvent une contamination plus forte dans ce compartiment que celle observée au niveau de l'ensemble de la colonne d'eau (Chapman, 1989; Piol *et al.*, 2006).

1.4. Diffusion des contaminants des sédiments vers la colonne d'eau

Les contaminants stockés dans les sédiments peuvent être remobilisés dans la colonne d'eau et ainsi se disperser le long du profil amont-aval d'un cours d'eau. Il est ainsi possible d'observer un impact sur des écosystèmes situés à l'aval de sédiments contaminés suite à divers processus de relargage de polluants liés à des variations des propriétés chimiques de l'eau et à la remise en suspension des sédiments (Lafont *et al.*, 2007). La bioturbation des sédiments est un phénomène de perturbations des couches de sédiments meubles induites par l'activité biologique qui joue ainsi un rôle particulier dans le transfert d'éléments chimiques au sein du sédiment mais également entre le sédiment et la colonne d'eau (Peterson *et al.*, 1996).

La fraction la plus fine des sédiments est susceptible de stocker la plus grande quantité de contaminants en raison d'un plus grand rapport surface/volume et d'une plus grande disponibilité en sites d'adsorption. Cependant, cette partie fine est également la fraction la plus facilement remise en suspension, ce qui en fait un vecteur majeur du transport des contaminants, pouvant induire une toxicité par voie aqueuse (contaminants relargués par les particules sédimentaires) ou par ingestion des particules sédimentaires (Bonnet *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2009).

La toxicité des contaminants piégés dans les sédiments ne dépend pas uniquement de leur charge totale mais également de leur biodisponibilité. La disponibilité pour les organismes du milieu est fonction de la présence de ligands tels que la matière organique ou l'argile, de processus physico-chimiques (liés au pH, au potentiel d'oxydoréduction) et de processus microbiens (dégradation de la matière organique, etc.). Au sein de retenues (plans d'eau créés artificiellement par la construction d'un ouvrage au fil de l'eau), le passage de conditions anoxiques (sédiment en place) à des conditions oxiques (sédiment en suspension), modifie la partition des polluants, et la spéciation des contaminants de type métallique. Ce

processus peut entraîner une solubilisation des métaux associés aux particules et une dégradation de la qualité de l'eau de surface sur un temps court (Petersen *et al.*, 1996).

Dans les retenues destinées à la production d'électricité, des modes de gestion par mise en place de batardeaux sont parfois appliqués afin d'empêcher le transport sédimentaire lors de vidanges, sans toutefois empêcher la diffusion de polluants dans la colonne d'eau à partir des particules sédimentaires du fait de changements de conditions physico-chimiques. La pollution est alors aiguë, c'est à dire qu'elle atteint des concentrations fortes sur de courtes durées.

1.5. Le cadmium dans les écosystèmes aquatiques

1.5.1. Généralités et origines

Parmi les métaux observés dans les sédiments de retenues, notre attention s'est portée plus particulièrement sur le cadmium (Cd). Le cadmium est un sous-produit de la métallurgie du zinc et dans une moindre mesure de celle du plomb et du cuivre. Le cadmium est utilisé dans divers domaines industriels tels que l'électrotechnique (accumulateurs), l'électronique (photopiles), la métallurgie (alliages divers), le traitement des surfaces (galvanoplastie) et les peintures (pigments). La pollution par le cadmium provient également des incinérateurs de déchets urbains et se retrouve aussi au niveau des terres cultivées via l'usage d'engrais phosphatés et les épandages de boues de stations d'épuration. De nos jours, les usages de cadmium restent importants et même si la production mondiale présente une tendance à la baisse, elle a été estimée à 17 200 t en 2004 (contre plus de 20 000 t/an dans les années 1980) (Klimasauskas, 2006). Contrairement à la plupart des éléments toxiques, moins de 10% de la quantité annuellement produite est recyclée, le reste étant rejeté, directement ou non, dans l'air, les sols et les eaux. Les retombées de poussières de cadmium transportées par voie atmosphérique et l'incorporation directe aux sols par usage des engrais chimiques sont les deux vecteurs majeurs de contamination des écosystèmes continentaux. Le transfert du cadmium vers les écosystèmes aquatiques est ensuite assuré par les processus d'infiltration, d'épandage, de ruissellement ou de déversement direct.

1.5.2. Toxicité du cadmium

En tant que métal non essentiel pour les organismes vivants, le cadmium a reçu une attention particulière durant ces dernières années (Canadian Environmental Protection Act, 1994). Cette forte préoccupation s'explique globalement par une écotoxicité élevée de ce métal, même à des concentrations très faibles, et d'une capacité de bioaccumulation dans de nombreuses espèces aquatiques (Taylor, 1983; Wright & Welbourn, 1994). Parmi les espèces aquatiques, les crustacés d'eau douce comptent parmi les plus sensibles au cadmium (Williams *et al.*, 1985). Felten *et al.* (2008) ont par exemple mis en évidence une forte toxicité du cadmium chez l'amphipode *Gammarus pulex* à des concentrations très faibles et donc pertinentes d'un point de vue environnemental, et également une accumulation significative et rapide du métal dans le corps des organismes. L'accumulation du cadmium au sein des organismes est un phénomène bien connu (McGeer *et al.*, 2000; Nunez-Nogueira *et al.*, 2005), en particulier chez les gammarés (Stuhlbacher & Maltby, 1992; Wright, 1980; Zauke *et al.*, 2003). Chez les crustacés, il a été montré que le cadmium s'accumulait préférentiellement au niveau des branchies et de l'hépatopancréas (Soegianto *et al.*, 1999), induisant alors des dommages cellulaires (Silvestre *et al.*, 2005; Xu, 1995). Le cadmium est ainsi à l'origine de certaines anomalies de développement et destructions tissulaires, comme il a été montré par exemple chez le décapode *Penaeus japonicus* (Soegianto *et al.*, 1999) ou l'amphipode *Gammarus fossarum* (Issartel *et al.*, 2010). Le cadmium peut également induire un stress oxydant chez les organismes exposés, avec des effets délétères sur les défenses antioxydantes des individus (Gismondi, 2012; Overnell & Trewhella, 1979; Roméo *et al.*, 2006). Les modifications des réponses des systèmes antitoxiques par le cadmium chez diverses espèces d'amphipodes ont par exemple permis de mettre en évidence une augmentation des protéines de choc thermique (Hsp) ou encore une diminution des activités peroxydases (Schill *et al.*, 2003; Timofeyev *et al.*, 2008). Le cadmium a également été décrit comme toxique pour la reproduction ou la fécondité de diverses espèces, comme par exemple le cladocère *Daphnia magna* (Biesinger & Christensen, 1972) ou le copépode *Acartia tonsa* (Toudal & Riisgard, 1987). Enfin, chez les invertébrés aquatiques, en plus d'une capacité de bioaccumulation (Geffard *et al.*, 2010; Sundelin, 1983) et des effets néfastes sur la survie des organismes (Alonso *et al.*, 2009; McCahon & Pascoe, 1988a), plusieurs études ont montré que le cadmium pouvait affecter de manière significative diverses réponses telles que l'alimentation,

la ventilation ou la locomotion (Felten *et al.*, 2008; Roast *et al.*, 2001; Vellinger *et al.*, 2012a,b,c; Wallace *et al.*, 2000; Wallace & Estephan, 2004).

2. Les biomarqueurs comportementaux

Le terme de biomarqueur désigne tout changement au niveau biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental pouvant être observé et/ou mesuré dans les tissus ou les fluides d'un organisme ou sur l'organisme entier, et révélant une exposition présente ou passée de l'individu à un ou plusieurs contaminants ou stress (Depledge, 1994; Lagadic *et al.*, 1997). De façon globale, les biomarqueurs en écotoxicologie regroupent les outils mis en œuvre pour établir un diagnostic de risque environnemental.

Deux principales catégories de biomarqueurs ont été établies selon la réponse apportée (Schlenk, 1999). Ainsi, on distingue (1) les biomarqueurs d'exposition mettant en évidence l'exposition d'un organisme à au moins une substance à caractère polluant, sans pour autant démontrer les effets induits par celle-ci (*e.g.* enzymes des systèmes antioxydants, protéines de choc thermique, etc.), et (2) les biomarqueurs d'effet mettant en évidence un ou plusieurs effets toxiques subits par un organisme suite à une exposition à au moins une substance polluante (*e.g.* malondialdéhyde, activité acétylcholinestérase, etc.).

Dans un contexte réglementaire d'évaluation du risque environnemental, les premiers tests écotoxicologiques se sont initialement tournés vers des mesures simples et directes de la toxicité des contaminants à l'échelle de l'organisme avec des paramètres tels que la mortalité ou la survie. Ainsi par exemple l'établissement de Concentrations Létales (*e.g.* CL50 ou concentration de toxique induisant la mort de 50% des individus exposés) constitue une base importante dans l'évaluation de la toxicité d'une substance (Ankley *et al.*, 2010). Au fil du temps, les tests basés sur la croissance, la reproduction, l'alimentation ou l'assimilation de nourriture, les échanges ioniques ou encore les activités enzymatiques se sont imposés au sein des tests de toxicité.

Face à l'augmentation croissante des sources et types de pollution, le développement d'outils d'évaluation fiables et pertinents est devenu une nécessité. Dans cette optique, un intérêt croissant est porté à l'étude des comportements à l'échelle de l'organisme dans les

tests d'écotoxicités. Le comportement, à l'échelle individuelle, se définit comme toute action, réaction ou fonctionnement d'un système sous l'effet de circonstances spécifiques. Le comportement est donc le fruit de l'intégration des conditions auxquelles l'organisme est exposé et représente souvent une réponse quasi-immédiate. Les outils comportementaux englobent ainsi une multitude d'activités plus ou moins complexes (Clotfelter *et al.*, 2004) et aux multiples avantages en terme d'outil de bioindication.

2.1. Des outils d'alerte précoce

Le comportement est à la pointe de l'interaction organisme-milieu, car il détermine où et comment les organismes vivent et se reproduisent, comment ils obtiennent leur nourriture, maintiennent leur homéostasie, évitent les prédateurs, choisissent des partenaires, réagissent aux parasites, et répondent à leurs concurrents conspécifiques et hétérospécifiques (Duckworth, 2009; Huey *et al.*, 2003; Wcislo, 1989). Un animal est en constante évolution au sein de son répertoire comportemental en réponse à des stimuli internes et externes. Dans ce contexte, les biomarqueurs comportementaux sont considérés comme des « réponses d'alerte précoces » face aux contaminants et stress environnementaux (Beketov *et al.*, non publié; Gerhardt, 1995; Hellou, 2011). Le mouvement de truitelles ou de vairons mesurés par une différence d'ultrasons entre une source d'émissions et de réception (effet Doppler) est utilisé dans des systèmes commercialisés (système Truitel de TruitoSEM, mis au point par la Société des Eaux de Marseille) pour surveiller la qualité d'eaux de surface ou d'eaux de nappes destinées à la potabilisation, des eaux brutes et des eaux usées avant rejets (Bourgeois & Leger, 1998). Cette approche fait suite aux travaux pionniers de Waller & Cairns (1972) qui utilisaient une série d'aquariums traversés par des rayons lumineux. Les interruptions du rayonnement consécutives au passage des poissons étaient comptabilisées à intervalles réguliers et interprétées en terme de mobilité des organismes. Un changement de l'activité des individus traduisait un stress chimique. Le même principe de détection par infra-rouge a été utilisé dans le dispositif appelé « Fischwamtest » mis en place sur le Rhin avec l'Idé mélanote *Leuciscus idus* (Osbuild *et al.*, 1995).

Afin de mettre en évidence les effets de contaminants sur les organismes, de nombreuses activités peuvent être évaluées à l'échelle de l'individu telles que la locomotion, la respiration, la ventilation, l'alimentation ou encore l'appariement sexuel. Les changements

de comportement d'un organisme peuvent modifier considérablement les pressions de sélection, ce qui place le changement de comportement sur un pied d'égalité avec les changements environnementaux comme cause potentielle de changements évolutifs (Duckworth, 2009). Les traits comportementaux peuvent rapidement être façonnés par la sélection naturelle, car ils sont susceptibles d'évoluer à un rythme plus rapide que des traits morphologiques ou des traits d'histoire de vie par exemple (Blomberg *et al.*, 2003; Borcharding & Magnhagen, 2007; Wimberger & Queiroz, 1996).

Les réponses comportementales peuvent être classées selon la rapidité des ajustements qu'opère l'organisme, ce qui détermine le caractère d'alerte précoce de la réponse face à un stress. Ces mesures sont par conséquent sublétales, non-invasives et pourraient être appliquées à des espèces rares ou qui possèdent un statut de protection. Il est possible de différencier les réponses de protection immédiate ou quasi/immédiate des réponses latentes. Les profils de réponses et leur intensité peuvent varier d'une espèce à l'autre ou encore être spécifiques à certaines espèces. Des compromis de traits comportementaux (**Figure I-1**) sont susceptibles de se mettre en place lors d'une réponse à un stress, par exemple entre l'évitement d'un stress chimique et la diminution de ses impacts sur l'individu, mais ces aspects ont encore peu été étudiés dans un contexte d'anthropisation.

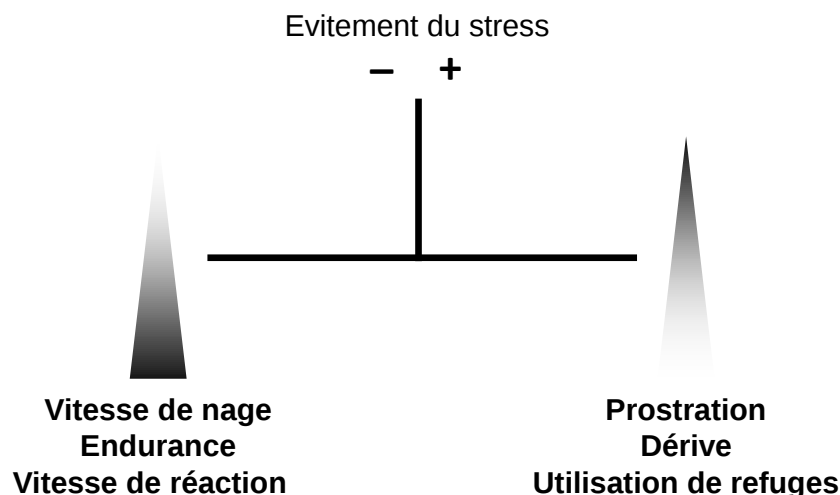


Figure I-1. Identification de compromis inter-traits dans les stratégies d'évitement d'un stress. Existence d'un équilibre potentiel entre les traits comportementaux.

2.2. Intérêts en écotoxicologie

Outre la précocité de leur réponse, les biomarqueurs comportementaux présentent de nombreux autres intérêts pertinents pour l'écotoxicologie. En effet, ils représentent des outils **sensibles**, avec parfois des niveaux de sensibilité 100 à 1000 fois supérieurs aux CL50 conventionnelles (Hellou *et al.*, 2008; Robinson, 2009). En 1987, Atchison *et al.* ont proposé une synthèse de nombreux travaux ayant évalué la toxicité de plusieurs métaux (Cd, Zn, Hg, Cu, Pb, etc.) chez diverses espèces de poissons, dans laquelle ils comparaient les doses induisant des changements comportementaux à celles associés aux tests de toxicité classiques. Bien que cette étude ait plus de deux décennies, elle permettait déjà de souligner la plus grande sensibilité du comportement d'évitement par rapport à la survie, la croissance ou la reproduction par exemple. Little & Finger (1990) synthétisèrent que les modifications de comportement de nage de poissons ont pu être détectées lors de l'exposition à divers contaminants à des concentrations aussi faibles que 0,7 à 5% de leurs valeurs de CL50. Peu d'études ont été dévolues à des espèces autres que piscicoles. Hellou *et al.* (2008) ont cependant constaté une plus grande sensibilité du comportement d'évitement/préférence au substrat par rapport à la bioaccumulation (concentration interne) chez l'amphipode *Corophium volutator* exposé à des sédiments naturellement et artificiellement contaminés aux HAPs.

Cette sensibilité des tests comportementaux permet de mesurer les effets d'une contamination à des niveaux **sublétaux** et dans des contextes où les analyses chimiques sont peu pertinentes (multiplicité des polluants, variabilité temporelle des concentrations, par exemple).

La détection et surtout la compréhension des effets de mélanges complexes de substances xénobiotiques sont difficiles en raison de la grande diversité des contaminants chimiques présents dans l'environnement. Les marqueurs comportementaux présentent la qualité d'être **ubiquistes**, c'est à dire qu'ils répondent d'une manière homologue à des stressors qui peuvent être très différents sur un plan chimique et avoir des modes d'action très différents à une échelle physiologique.

De plus, les traits comportementaux peuvent être plus **stables** que d'autres mesures sur de grandes échelles spatiales et temporelles et à travers différents types d'habitats. Peu d'études concernent des échelles de comparaisons macroscopiques et aucune à notre connaissance n'a traité d'aspects comportementaux. Kefford *et al.* (2012) ont montré une très faible variabilité de la sensibilité (CL50) à la salinité de l'eau entre les mêmes groupes taxonomiques prélevés en France, en Australie, en Afrique du Sud et en Israël (même composition ionique, même méthode). Par contre, ces groupes (ordres et classes) présentaient entre eux une très grande variabilité de leur sensibilité. Pour des tests comportementaux, il est également probable qu'une grande stabilité de réponse serait obtenue entre les espèces d'un même taxon prélevées sur des zones biogéographiques différentes. Cependant, à l'inverse des résultats sur la tolérance à la salinité à large échelle de Kefford *et al.* (2012), il est également probable qu'il existe une forte **unicité** de réponses du comportement entre organismes appartenant à des groupes zoologiques différents.

L'application de tests comportementaux présentent également plusieurs **avantages pratiques** : (1) rapidité d'analyse, (2) simplicité de mise en œuvre, aussi bien dans le cadre d'expérimentations menées en laboratoire que dans le cadre d'études de terrain, (3) faible coût, et (4) caractère non invasif pour l'individu testé. Leur mise en œuvre technique est par conséquent à la portée du plus grand nombre.

Une autre de leur qualité, et non des moindres, est de permettre de faire le **lien** entre les effets toxiques observés à l'échelle cellulaire/biochimique et les impacts observés à l'échelle des populations ou des communautés (Mills *et al.*, 2006; Rinderhagen *et al.*, 2000; Wallace & Estephan, 2004).

L'ensemble des caractéristiques énumérées précédemment explique l'intégration croissante des biomarqueurs comportementaux, qui assurent une certaine complémentarité aux outils classiques, dans les tests d'écotoxicité et dans le suivi de la qualité de l'eau (**Figure I-2**).

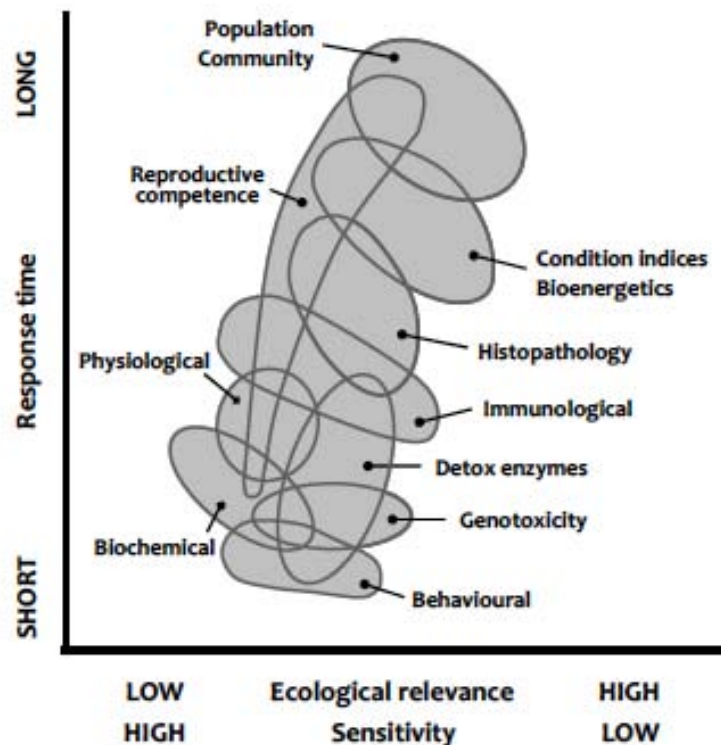


Figure I-2. Position des biomarqueurs biologiques lors d'une réponse à un stress environnemental en fonction de leur sensibilité, leur pertinence écologique et le temps de réponse (d'après Sanchez & Porcher, 2009; Shinn, 2010).

2.3. Un trait d'union entre écotoxicologie et écologie

Le caractère de forte pertinence écologique de certains biomarqueurs comportementaux permet un changement d'échelle de l'organisme vers la population ou les communautés. Le comportement d'un individu intervient dans de nombreux processus clefs tels que la recherche de nourriture ou d'un partenaire sexuel, ou encore l'évitement d'un substrat ou d'un événement de prédation. Un stress ou un contaminant interférant avec de telles activités à forte pertinence écologique est susceptible de réduire le succès reproducteur ou l'aptitude phénotypique (*fitness*) des organismes et peut conduire à leur « mort écologique » (Scott & Sloman, 2004) : les impacts au niveau individuel se transposent alors en conséquences au niveau populationnel.

Des traits comportementaux liés à la nutrition ou à des relations prédateurs-proies interviennent également de manière forte dans l'efficacité de processus écosystémiques

fonctionnels. L'utilisation de proies pour des espèces carnassières ou l'efficacité de la décomposition de matière organique pour des détritivores peuvent se répercuter en cascade sur l'ensemble du réseau trophique. Ces traits comportementaux présentent par conséquent à la fois une dimension écologique, de par leur importance dans les transferts d'énergie, et une dimension écotoxicologique, en tant que révélateur précoce d'un stress toxique. Les marqueurs comportementaux contribuent finalement à l'objectif ultime en écotoxicologie : déterminer et prédire les effets de contaminants sur des écosystèmes écologiques réels à des larges échelles spatiales (Beketov & Liess, 2012).

Pour donner une dimension écologique à une expertise écotoxicologique, l'approche la plus utilisée est dite « *bottom-up* » et elle est basée sur des tests réalisés à l'échelle de l'individu ou en deçà. L'utilisation de marqueurs comportementaux fait partie de ce type d'expertise. Lors de cette approche, l'objet d'étude est un composant de l'écosystème. Les patrons de réponses, les processus ou les mécanismes sous-jacents à de faibles échelles d'observation sont alors utilisés pour décrire et prédire des systèmes et processus à large échelle (Beketov & Liess, 2012; Gaston & Blackburn, 2000).

Le caractère détritivore de certaines espèces de gammares est essentiel pour des processus écologiques tels que la décomposition de la litière, au point que l'on désigne souvent les gammares comme des espèces ingénieurs. Si il a déjà été prouvé que les invertébrés influencent significativement la libération de métaux par un taux plus élevé de bioturbation, l'effet de la bioturbation peut également favoriser la fixation des métaux dans les sédiments (Petersen *et al.*, 1998). En effet, la production de particules fines par des détritivores procure à l'écosystème des substrats favorables à l'accumulation de métaux par adsorption par exemple. Il en résulte que les rivières polluées avec un compartiment benthique efficace en terme de décomposition présentent des taux plus élevés d'accumulation de métaux au sein du substrat que des rivières où la décomposition est moins efficace (Schaller *et al.*, 2011).

3. Les changements comportementaux de crustacés dans un contexte de pollution métallique

Après une rapide synthèse sur l'intérêt de travailler avec des crustacés en milieu d'eau douce, nous proposons un résumé des travaux en écotoxicologie incluant des mesures comportementales d'individus exposés à un stress métallique. A la suite de ces synthèses, nous exposons le contexte des trois objectifs fixés lors de ce travail doctoral.

3.1. Avantages et inconvénients des crustacés comme organismes modèles

Au sein de ce sous-embranchement, de nombreuses espèces constituent des modèles biologiques couramment utilisés en écotoxicologie en raison de certaines de leurs caractéristiques (Gentile *et al.*, 1984; LeBlanc, 2007; Rinderhagen *et al.*, 2000). En effet, il s'agit souvent d'espèces (1) holobiotiques (toutes les phases de leur cycle se déroulent en milieu aquatique), (2) présentant une large répartition géographique, (3) présentes à de fortes densités *in situ* et relativement faciles à collecter, (4) faciles à identifier jusqu'au niveau de l'espèce, (5) sensibles à un large spectre de stress, (6) considérées comme une réserve importante de nourriture pour de nombreuses autres espèces de macroinvertébrés, de poissons, d'oiseaux et d'amphibiens (MacNeil *et al.*, 2000) et (7) jouant un rôle majeur dans l'ensemble de la chaîne alimentaire aquatique en raison du rôle de décomposition de la matière organique assuré par de nombreux déchiqueteurs omnivores (Forrow & Maltby, 2000). Les crustacés fournissent une grande variété de services écologiques et représentent ainsi des éléments majeurs des écosystèmes aquatiques. Certaines espèces sont désignées comme des espèces clefs et comme des organismes ingénieurs.

Une qualité recherchée chez les organismes modèles utilisés est la possibilité de les élever en laboratoire. En écotoxicologie, deux espèces ont plus particulièrement été utilisées du fait de la possibilité d'en faire des élevages : l'amphipode *Hyallela azteca* et le cladocère *D. magna*. Les Daphnies sont couramment utilisées depuis de nombreuses années pour évaluer les effets de substances toxiques selon une norme homologuée (Association Française de Normalisation AFNOR NF ISO 6341, 1996). Ce test a pour objectif d'évaluer la toxicité aiguë de la substance testée en déterminant la concentration de produit qui, en 24 h, immobilise 50% des daphnies mises en expérimentation. Ce test est donc proche d'une mesure comportementale mais il s'en éloigne par le fait que la plupart des animaux considérés comme immobiles (*i.e.* dont les antennes ne bougent pas) sont morts. Les daphnies sont des organismes planctoniques qui vivent dans la colonne d'eau et sont par conséquent peu aptes à

révéler un stress chimique au niveau de sédiments. Au contraire, une norme AFNOR en cours de validation (PR NF ISO 16303) vise à déterminer la toxicité des sédiments d'eau douce vis à vis de l'amphipode *H. azteca*. L'utilisation en France de cet organisme manque cependant de réalisme écologique dans la mesure où cette espèce de petite taille est strictement nord-américaine et n'a jamais été observée en Europe dans le milieu naturel.

Il existe peu de publications sur la façon d'élever des gammares en laboratoire. La plupart des études qui utilisent ces modèles recueillent des individus dans le milieu naturel en essayant de cibler des sites exempts de perturbations chimiques. Seul un nombre limité d'études ont utilisé des animaux cultivés en laboratoire (Bloor *et al.*, 2005; McCahon & Pascoe, 1988b), ce qui illustre la relative difficulté de mise en place d'élevages en laboratoire et plus particulièrement la maîtrise de la reproduction des gammares (Kunz *et al.*, 2010). Le choix de travailler avec des espèces du milieu naturel est par conséquent un compromis entre (1) volonté de réalisme écologique, (2) souhait d'aborder les questions de changements d'échelle et (3) contraintes de laboratoire.

3.2. Les mesures comportementales chez les crustacés

En écotoxicologie aquatique, de nombreux paramètres comportementaux sont utilisés chez les poissons, les écrevisses, les copépodes et les gammares depuis environ 20 ans (Atchison *et al.*, 1987; Beitinger, 1990; Kunz *et al.*, 2010). De nos jours, les batteries de tests réalisées sur une espèce donnée sont devenues un standard des études écotoxicologiques (Schmitt-Jansen *et al.*, 2008). Ils couvrent un large éventail de modes d'action des toxiques, et sont par conséquent des outils prédictifs pertinents des conséquences individuelles d'un stress chimique.

L'approche multi-marqueurs s'impose aujourd'hui pour mieux appréhender l'impact d'un polluant sur les organismes et pour faciliter les changements d'échelle entre mesures écotoxicologiques et impacts écosystémiques. Gerhardt *et al.*, dès 1994, ont proposé une approche pour mesurer simultanément locomotion et ventilation chez plusieurs espèces dont l'amphipode *G. pulex* et le cladocère *D. magna* (*e.g.*, the *Multispecies Freshwater Biomonitor*, *MFB*). Ce système de biosurveillance en continu est capable d'évaluer quantitativement plusieurs aspects du comportement *in situ* et *ex situ*, et ce, en temps réel. Le

système est basé sur une technique de conversion d'impédance qui enregistre simultanément plusieurs paramètres. Pendant l'exposition, les organismes se déplacent librement entre les deux paires d'électrodes sur chaque paroi latérale de la chambre d'essai qui reçoit de l'eau selon différents modes d'exposition (*i.e.* en continu ou avec ajouts de composés). Le mouvement des organismes dans la chambre d'essai conduit à des changements de champ électrique, mesurés comme des changements de l'impédance du système. L'examen des mesures d'impédance s'avère être une approche sensible et quantitative d'aspects comportementaux, ce qui fait du MFB un outil potentiel de biosurveillance en continu (De Lange *et al.*, 2006a, 2009; Gerhardt, 1999).

Felten *et al.* (2008) ont utilisé une combinaison de paramètres comportementaux et de l'activité d'alimentation pour étudier les effets du cadmium (7,5 et 15 µg Cd/L après 120 et 168 h d'exposition) sur les réponses physiologiques et comportementales de *G. pulex*. La mortalité et la concentration de cadmium dans l'ensemble du corps des gammarés exposés étaient significativement plus élevées que chez les témoins. L'exposition au cadmium a induit une importante diminution de l'osmolarité et une augmentation de l'activité Na^+/K^+ -ATPase (adénosine triphosphatase) pour maintenir l'homéostasie. L'exposition au cadmium a également entraîné une réduction significative des réponses comportementales (taux d'alimentation, nombre d'animaux en mouvement, fréquence de battements de pléopodes), probablement pour limiter les pertes d'énergie, et réallouer l'énergie vers les mécanismes d'osmo-régulation et de détoxication (Felten *et al.*, 2008). Les résultats de cette étude ont montré l'importance des marqueurs comportementaux dans la compréhension de mécanismes physiologiques et leur intérêt pour évaluer la santé d'organismes soumis à un stress.

Certains traits comportementaux ont un caractère intégrateur de multiples activités réalisées par un individu au cours de sa vie. La locomotion est par exemple nécessaire dans la stratégie de recherche de nourriture, intervient pour obtenir des partenaires sexuels, pour échapper à la prédation ou pour migrer. La locomotion peut rapidement être affectée par une déplétion énergétique suite à une perturbation chimique. Finalement, l'activité locomotrice représente une mesure de la performance globale d'un organisme, compte tenu de sa dépendance à de nombreux traits co-adaptés sur un plan morphologique, physiologique et comportemental. Ce trait est par conséquent à la fois d'intérêt écologique, potentiellement sensible et intégrateur de multiples atteintes de l'individu.

D'autres traits, au contraire, sont assignés à une mesure singulière de la physiologie de l'individu. La consommation d'oxygène est corrélée avec l'activité ventilatoire des pléopodes chez le gammare. L'individu crée un flux d'eau sur ses branchies par un mouvement rythmique de ses trois paires de pléopodes, qui renouvellent ainsi l'eau au niveau des branchies (Hervant *et al.*, 1995, 1999; Harris & Musko, 1999). A mesure que les conditions du milieu changent, la fréquence des battements de pléopodes (BP) varie pour assurer l'oxygénation et/ou pour économiser l'énergie dépensée par ces mouvements. Par conséquent, les BP ne dépendent pas uniquement de la disponibilité de l'oxygène ou des besoins de l'individu liés à son activité, mais également de son état physiologique (**Figure I-3**).

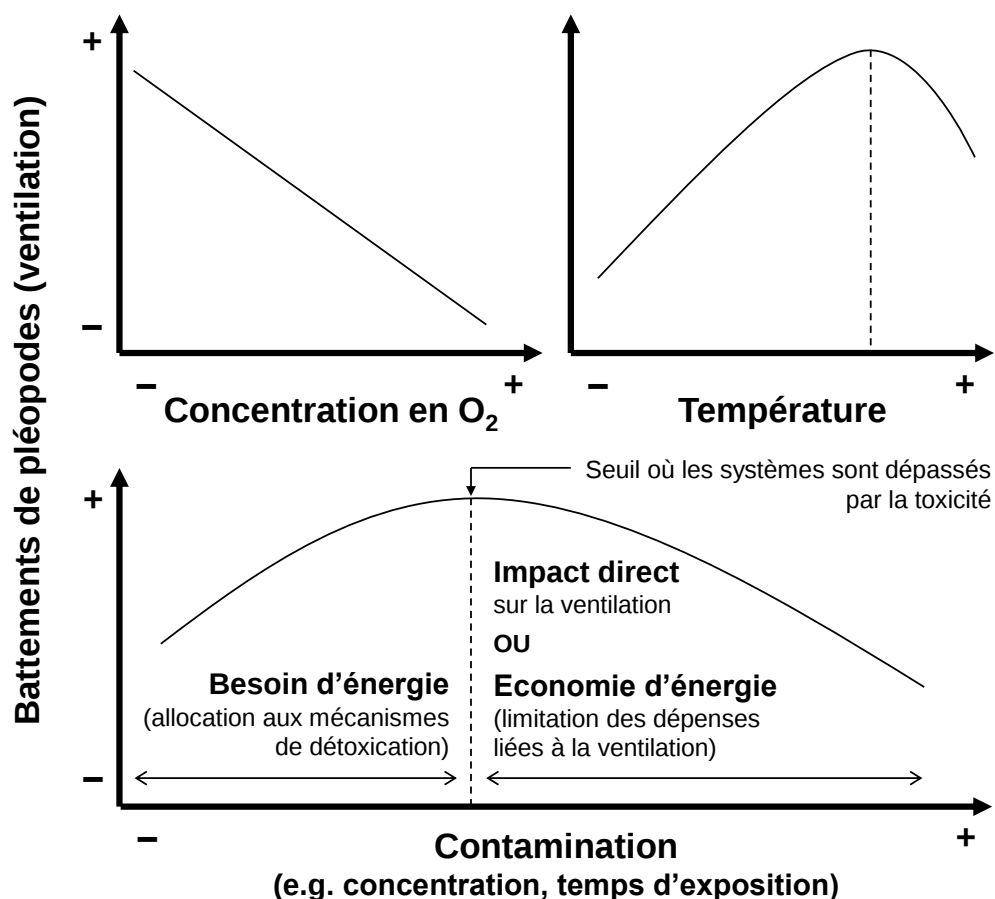


Figure I-3. Courbes théoriques. Patrons de réponse de l'activité ventilatoire chez un amphipode soumis à différents types de stress.

D'une manière générale, parmi les mesures comportementales couramment utilisées chez les crustacés d'eau douce, on distingue ceux relatifs aux déplacements, ceux relatifs à la nutrition et ceux relatifs à la reproduction (**Tableau I-1**). Sur le plan de la reproduction, les traits mesurables sont par exemple la capacité des mâles et des femelles à se détecter les uns les autres, leur aptitude à former des pré-copulâts pendant la période précédant l'accouplement, et leur capacité à conserver un pré-copulât formé pendant l'exposition à un stress (Watts *et al.*, 2001). Les premières utilisations de l'observation de séparation de pré-copulâts exposés à un stress l'ont été dès les années 1970 sur des espèces marines (Davis, 1978; Linden, 1976; Wildish, 1972). Poulton & Pascoe (1990) ont été les premiers à utiliser ce principe chez une espèce d'eau douce (*G. pulex*) et face à un polluant métallique (Cd). Malbouisson *et al.* (1995) utilisèrent à la fois le taux d'alimentation et l'aptitude à reformer des pré-copulâts artificiellement séparés lors d'expositions de *G. pulex* à du lindane. Une exposition de 48 h à 5 µg/L de lindane réduisait significativement l'activité d'alimentation mais ne perturbait pas la reformation des pré-copulâts. Au contraire, à des concentrations beaucoup plus fortes (1 ou 2 mg/L pendant 10 ou 20 min d'exposition), les pré-copulâts étaient significativement affectés.

Tableau I-1. Exemples non-exhaustifs de traits comportementaux déjà utilisés en tant que biomarqueurs chez divers crustacés exposés à un stress chimique.

Traits mesurés	Stresseur	Espèce	Référence
Ventilation/mouvements respiratoires	Cd	<i>G. pulex</i>	Felten <i>et al.</i> (2008)
	Cd	<i>G. pulex</i>	Vellinger <i>et al.</i> (2012a,c)
	Cu	<i>G. pulex</i>	Gerhardt <i>et al.</i> (1998)
	Cu, PCP, B[a]P	<i>G. duebeni</i>	Lawrence & Poulter (1998)
Alimentation	Cuivre (Cu)	<i>G. pulex</i>	Taylor <i>et al.</i> (1993)
	Cu, Lindane (LD), 3,4-Dichloroaniline (DCA)	<i>G. pulex</i> , <i>A. aquaticus</i>	Blockwell <i>et al.</i> (1998b)
	Mélange d'antibiotiques	<i>G. fossarum</i>	Bundschuh <i>et al.</i> (2009)
	LD	<i>G. pulex</i>	Malbouisson <i>et al.</i> (1995)
	Ammoniac non ionisé	<i>E. toletanus</i>	Alonso & Camargo (2004)
	Fer	<i>G. pulex</i>	Maltby & Crane (1994)
	Zinc (Zn), LD, alkylbenzène linéaire, pirimiphosméthyl, perméthrine	<i>G. pulex</i>	McLoughlin <i>et al.</i> (2000)
	4-Nonylphénol	<i>G. pulex</i>	Gross-Sorokin <i>et al.</i> (2003)
	Cadmium (Cd)	<i>G. pulex</i>	Brown & Pascoe (1989)
	Cd	<i>G. pulex</i>	Felten <i>et al.</i> (2008)
	Cd, Zn	<i>A. desmarestii</i> , <i>E. meridionalis</i>	Pestana <i>et al.</i> (2007)

Tableau I-1 (suite). Exemples non-exhaustifs de traits comportementaux déjà utilisés en tant que biomarqueurs chez divers crustacés exposés à un stress chimique.

Traits mesurés	Stresseur	Espèce	Référence
Locomotion	Cd	<i>G. pulex</i>	Felten <i>et al.</i> (2008)
	Cd	<i>G. pulex</i>	Vellinger <i>et al.</i> (2012a)
	Cu	<i>G. pulex</i>	Gerhardt <i>et al.</i> (1998)
	Substances pharmaceutiques, surfactants	<i>G. pulex</i>	De Lange <i>et al.</i> (2006a)
	Cu, pentachlorophénol (PCP), benzo[a]pyrène (B[a]P)	<i>G. duebeni</i>	Lawrence & Poulter (1998)
	Cu, PCP, B[a]P	<i>C. marinus</i>	Lawrence & Poulter (2001)
	Phthalates	<i>G. pulex</i>	Thurén & Woin (1991)
	Cu, Cd	<i>E. affinis</i>	Sullivan <i>et al.</i> (1983)
	Huile	<i>G. oceanicus</i>	Linden (1970)
Appariement sexuel/déformation de pré-copulâts	LD	<i>G. pulex</i>	Malbouisson <i>et al.</i> (1995)
	Cd	<i>G. pulex</i>	Poulton & Pascoe (1990)
	3,4-dichloroaniline, atrazine, Cu, LD	<i>G. pulex</i>	Pascoe <i>et al.</i> (1994)
	Huile de chauffage N°2	<i>G. oceanicus</i>	Butler <i>et al.</i> (1982)
	Huile	<i>G. oceanicus</i>	Linden (1970)
	Aluminium (Al)	<i>G. pulex</i>	McCahon & Poulton (1991)
	Eptam, propiconazole, LD	<i>G. kischineffensis</i>	Meliyan (1991)
	LC	<i>G. pulex</i>	Heckmann <i>et al.</i> (2005)
	Esfenvalérate	<i>G. pulex</i>	Cold & Forbes (2004)
	LD	<i>H. azteca</i>	Blockwell <i>et al.</i> (1998a)
	Atrazine	<i>H. azteca</i>	Pandey <i>et al.</i> (2011)
	Polychlorobiphényles (PCB)	<i>G. oceanicus</i>	Wildish (1972)
Choix d'habitat/évitement au substrat	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	<i>G. pulex</i> , <i>A. aquaticus</i>	De Lange <i>et al.</i> (2006b)
	HAPs	<i>E. estuarius</i>	Kravitz <i>et al.</i> (1999)
	HAPs	<i>C. volutator</i>	Hellou <i>et al.</i> (2008)
Utilisation de refuges /Prostration/Dérive/Fuite d'un prédateur	Insecticide Pyrethroïde lambda-cyhalothrine (LC)	<i>G. pulex</i> , <i>B. rhodani</i> , <i>L. fusca</i>	Lauridsen & Friberg (2005)
	Cu, Cd	<i>E. affinis</i>	Sullivan <i>et al.</i> (1983)

3.3. Définition des objectifs

Ce travail doctoral s'inscrit en grande partie dans le projet DIESE (Outils de Diagnostic de l'Ecotoxicité des Sédiments - ANR PRECODO). D'une manière générale, ce projet avait pour but de proposer une méthodologie robuste d'évaluation des risques environnementaux associés à l'accumulation de sédiments contaminés dans les écosystèmes

aquatiques d'eaux douces. L'objectif principal était de développer une approche graduée d'évaluation des risques en associant des approches écotoxicologiques et écologiques en intégrant des réponses à différentes échelles d'organisation et pour différents compartiments biologiques.

L'objectif principal de cette thèse était d'évaluer la qualité des sédiments par des marqueurs biologiques autorisant un changement d'échelle potentiel. Notre choix s'est porté sur les marqueurs comportementaux d'espèces de crustacés qui jouent un rôle fonctionnel important dans les écosystèmes aquatiques considérés. Dans le contexte du projet DIESE, notre intérêt s'est porté sur une pollution métallique des sédiments, d'abord en mélange, puis par mono-contamination du sédiment ou de la colonne d'eau par du cadmium.

Les principales questions abordées au cours de ce travail doctoral étaient au nombre de trois:

Q1. (a) Un intérêt théorique des tests comportementaux est l'ubiquité des réponses entre taxons différents exposés à un stress donné. Aussi nous souhaitons **évaluer la variabilité de réponses comportementales entre différentes espèces de crustacés dont l'écologie ou le lien au sédiment peut être très différent.**

(b) Dans le même esprit et compte tenu de notre expérience passée dans l'utilisation de tests comportementaux, nous nous sommes interrogés sur **les effets du genre** dans la réponse comportementale face à un stress. Une étude de la tolérance à la salinité globale du milieu avait en effet permis de mettre en évidence des différences de CL50s, de ventilation et d'osmo-régulation entre mâles et femelles chez l'amphipode *Gammarus roeseli* (Sornom, 2008; Sornom *et al.*, 2010 - Annexe I). **Dans ce contexte, nous avons examiné si le genre est ou non un facteur confondant susceptible d'influencer significativement les réponses comportementales des organismes exposés à un stress biotique ou toxique.**

Q2. La dimension écologique des traits comportementaux compte parmi les principaux intérêts de ces biomarqueurs et permet parfois le changement d'échelle. Nous nous sommes focalisés sur **l'incidence du cadmium (i) dans les réactions d'anti-prédation**

de crustacés et avons testé l'hypothèse que la perception du danger est effacée face au stress induit par le toxique, ce qui surexpose potentiellement ces proies, et **(ii) dans les réactions pré-copulatoires de crustacés et avons testé l'hypothèse que l'appariement sexuel est diminué face au stress induit par le toxique**, ce qui réduit potentiellement le succès reproducteur des individus.

Q3. Enfin, les marqueurs comportementaux sont censés être sensibles et répondre d'une manière précoce. Nous avons **testé la précocité de cette réponse (i) en mesurant de concert des réactions comportementales d'anti-prédation, les réserves énergétiques et des marqueurs d'effet cellulaires** (*i.e.* malondialdéhyde - MDA). Des destructions membranaires, appelées peroxydation des lipides ou lipoperoxydation, amènent dans la plupart des cas à une diminution de fluidité membranaire ainsi qu'à une inactivation des récepteurs membranaires. Le MDA est le composé le plus étudié pour définir l'effet toxique d'un xénobiotique sur l'organisme, ce qui lui vaut le qualificatif de biomarqueur d'effets toxiques ; **(ii) en évaluant les réactions d'appariement pendant la phase pré-copulatoire** des amphipodes. L'objectif était à la fois de **vérifier la cohérence de la réponse comportementale par rapport à d'autres indicateurs et de mettre en évidence une mise en place rapide.**

La présentation des résultats obtenus suit une démarche chronologique. Les expérimentations n'ont pas été réalisées selon un protocole qui isolait une question unique. Le travail doctoral s'inscrivant dans le projet DIESE, nous avons d'abord utilisé des sédiments prélevés en milieu naturel et avec lesquels nous avons testé les réactions comportementales de cinq espèces de crustacés différentes, en prenant soin de prendre en compte le genre des individus lors de nos expériences (Chapitre III). A l'issue de ces premiers tests, nous avons orienté le choix du stresser vers l'utilisation du cadmium et avons procédé à des dopages de sédiments naturels non perturbés (Chapitre III). L'ensemble de ces résultats nous a conduit à retenir pour la suite les amphipodes comme organismes modèles. Le comportement de base de ces espèces peut être très différent, tant en situation de stress qu'en l'absence de stress aigue. Pour caractériser ces comportements de base, nous avons réalisé une étude sans toxique afin de préciser les stratégies de réponses des trois espèces testées lorsqu'elles sont ou non face à un risque de prédation par des poissons (Chapitre IV). Les amphipodes constituent en effet des proies abondantes et recherchées par nombre de prédateurs et les stratégies

d'évitement des espèces considérées se sont avérées très différentes. Comme il est peu contrôlable que du cadmium piégé dans des sédiments diffuse dans la colonne d'eau selon un processus répétable, nous avons par la suite uniquement travaillé avec une contamination directe de l'eau par du cadmium (Chapitre V).

Le Chapitre II est dévolu à une présentation du matériel et méthodes qui ne reprend pas les informations déjà fournies dans les articles des Chapitres III, IV et V, mais présente des aspects qui n'ont pas pu y trouver leur place et qui sont d'intérêt pour le lecteur.

Enfin, les Chapitres VI et VII constituent les derniers volets de cette thèse et correspondent respectivement à une discussion générale articulée autour des trois questions posées initialement, ainsi qu'à une conclusion globale suivie des perspectives offertes par notre étude.

Afin de proposer au lecteur une vue synthétique des chapitres de résultats et des questions posées lors de l'établissement des objectifs de ce travail doctoral, nous avons regroupé l'ensemble des données dans le **Tableau I-2**.

Tableau I-2. Synthèse du contenu des chapitres abordés en fonction des questions posées en objectifs.

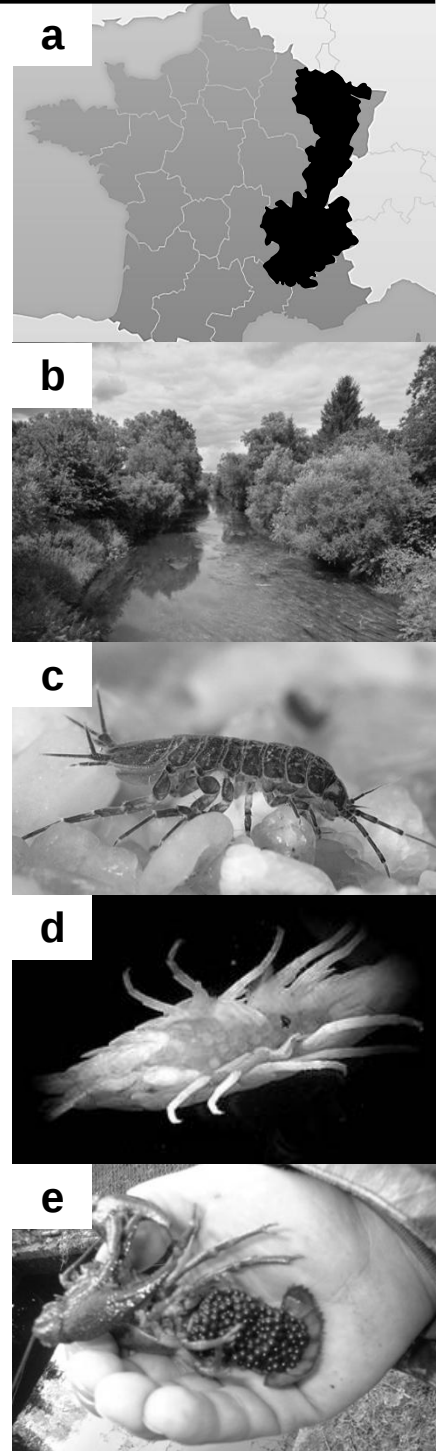
	Chapitre III :	Chapitre IV :	Chapitre V :
	Impact comportemental d'une altération de la qualité des sédiments.	Stratégie de réponse de trois amphipodes face à un risque de prédation	Modification des réponses d'amphipodes en présence de cadmium
Q1.			
(a) Variabilité des réponses entre espèces ?	Ecrevisse : <i>A. astacus</i> Aselle : <i>A. aquaticus</i> Trois amphipodes : ▪ <i>G. pulex</i> ▪ <i>G. roeseli</i> ▪ <i>D. villosus</i>	Trois amphipodes : ▪ <i>G. pulex</i> ▪ <i>G. roeseli</i> ▪ <i>D. villosus</i>	Deux amphipodes : ▪ <i>G. roeseli</i> ▪ <i>D. villosus</i>
(b) Variabilité des réponses entre mâles et femelles - Effet genre ?	Genre pris en compte	Genre pris en compte	Genre pris en compte
Q2. Modification comportementale sous l'effet d'un stress	Evitement du substrat contaminé	Anti-prédation (caractérisation hors toxique)	Anti-prédation (en présence de cadmium) Appariement sexuel

Tableau I-2 (suite). Synthèse du contenu des chapitres abordés en fonction des questions posées en objectifs.

Q3. Précocité et cohérence de la réponse comportementale	Test pendant 1 h	Test court (exposition de 4min)	Comportement d'anti-prédation + MDA + réserves énergétiques de <i>G. roeseli</i> et <i>D. villosus</i> : ▪ Pré-exposition de 24 h ou non ▪ Test court (exposition de 4 min) Comportement pré-copulatoire de <i>D. villosus</i> : ▪ Test pendant 10 h ▪ Test court (exposition 30 min)
---	------------------	---------------------------------	---

CHAPITRE II

Modèles Biologiques, Sites D'études Et Méthodes



a Départements français concernés par le prélèvement d'organismes ou de sédiments au cours de notre travail doctoral.

b La Nied française en amont de Rémy (Moselle, France) (Photo : P. Sornom)

c L'isopode *Asellus aquaticus* (Photo : J. Neuswanger).

d Poche incubatrice (marsupium) contenant les œufs chez un gammaride femelle appartenant à l'espèce *Dikerogammarus villosus* (Photo : P. Steinmann).

e Marsupium contenant les œufs chez une écrevisse femelle appartenant à l'espèce *Astacus astacus* (Photo : R. Franckhauser).

Les protocoles expérimentaux et démarches statistiques utilisés afin de répondre aux objectifs précédemment définis sont détaillés dans les articles présentés au sein des Chapitres III et IV. Dans ce Chapitre II, nous précisons les spécificités des modèles biologiques choisis ainsi que les principaux traits qui ont motivés nos choix. Nous décrivons également plus spécifiquement les sites de prélèvement des organismes et des substrats, ainsi que les protocoles d'échantillonnage. Enfin, les outils développés au sein de notre laboratoire et ayant servi à l'évaluation des réponses comportementales sont décrits.

1. Choix des modèles biologiques et spécificités

1.1. Le décapode *Astacus astacus*

L'écrevisse à pattes rouges *A. astacus* est une espèce native originaire d'Europe du Nord et commune dans les cours d'eau du nord-est de la France (Cukerzis, 1988).

Astacus astacus présente en moyenne une durée de vie comprise entre 8 et 10 ans, même si certaines observations font état d'une longévité supérieure (Curkezis, 1984). D'un point de vue morphologique, son corps se divise en quatre parties distinctes, dont les deux premières sont recouvertes par une carapace (**Figure II-1A**) :

- le protocéphalon est composé du rostre long et effilé, de deux paires d'antennes, des yeux et de deux paires de pièces buccales (mandibules).
- le thorax se compose de cinq segments, portant chacun une paire de péréiopodes (membres locomoteurs), dont la première paire est constituée par les pinces.
- l'abdomen se compose de six segments articulés et mobiles, portant chacun une paire de pléopodes, organes impliqués dans la ventilation.
- le telson termine le corps de l'écrevisse et constitue, avec la dernière paire de pattes abdominales (uropodes), la nageoire caudale également impliquée dans la locomotion.

La reproduction chez l'écrevisse est de type sexué et ovovivipare. Les œufs arrivant des oviductes pénètrent un liquide muqueux et sont regroupés dans la cavité abdominale de la femelle où ils sont maintenus par les pléopodes abdominaux. Outre la taille des pinces (*i.e.*

plus larges chez les mâles) et la forme du corps (*i.e.* abdomen plus large chez les femelles et présentant une cavité servant à accueillir les œufs), le mâle se distingue de la femelle par la présence de gonopodes (*i.e.* stylets copulateurs). Ces appendices, localisés au niveau de l'abdomen, proviennent d'une modification de la première paire de pléopodes (**Figure II-1B**).

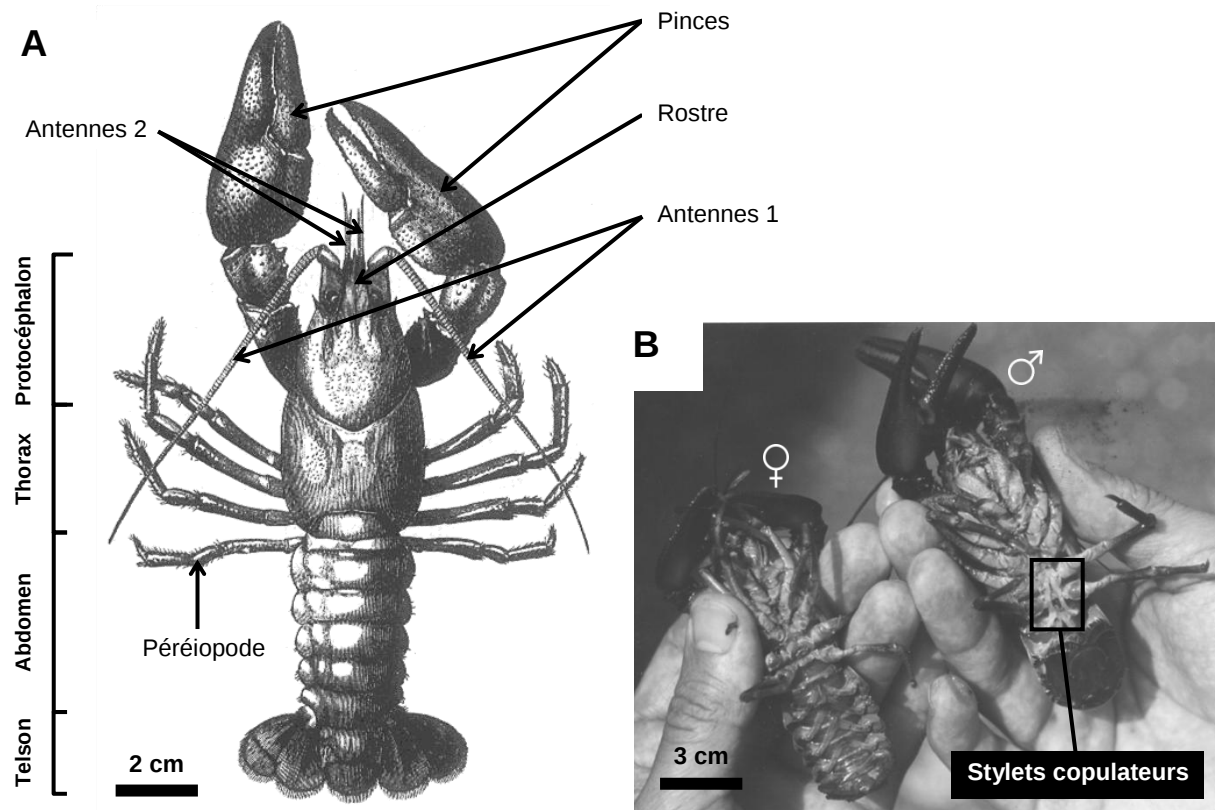


Figure II-1. Morphologie générale d'*Astacus astacus* et dimorphisme sexuel. A) Vue dorsale d'un individu adulte ; B) Vue ventrale d'une femelle (à gauche) et d'un mâle (à droite). Le mâle présente des appendices copulateurs au niveau de l'abdomen, mais également des pincés plus grosses et un abdomen plus fin que la femelle (Photo : R. Franckhauser).

La respiration de l'écrevisse est assurée par la présence de branchies insérées en position ventrale au niveau des segments du thorax. En fonction de leur lieu d'insertion, on distingue trois types de branchies : les podobranchies (fixées directement aux péréiopodes), les arthrobranchies (fixées à l'articulation des membres et du tronc) et les pleurobranchies (fixées directement au tronc). La croissance de l'écrevisse est discontinue et caractérisée par une succession de mues (de 5/an lors de la première année de vie à 2/an vers la cinquième année de vie).

Le régime alimentaire de l'écrevisse se compose à 70-90% de végétation aquatique micro- et macro-phytique et de détritus organiques. Un complément de son alimentation est basé sur la consommation de vers, de mollusques et de crustacés, et l'écrevisse peut occasionnellement consommer des poissons et les œufs de poissons, surtout en période de mue, de reproduction ou de pré-hivernage. Les écrevisses constituent une composante importante des écosystèmes aquatiques, notamment au niveau de la chaîne trophique en tant que consommateurs de matière organique morte (Hessen *et al.*, 1993). Ils assurent ainsi la décomposition et la minéralisation de cette matière organique, alors que le zooplancton et les poissons agissent uniquement comme des consommateurs et des re-minéraliseurs. C'est une différence fondamentale entre les rôles trophiques des écrevisses et ceux des organismes pélagiques des écosystèmes d'eau douce.

Même si l'écrevisse à pattes rouges *A. astacus* a déjà fait l'objet de nombreuses études (Appelberg, 1984; Jussila *et al.*, 1995; Styriahave *et al.*, 1995; Styriahave & Depledge, 1996), très peu de travaux ont utilisé ce modèle en écotoxicologie dans un contexte de contamination métallique (Meyer, 1991; Simon *et al.*, 2000). Nous avons choisi d'inclure cette espèce dans les tests d'évitement du substrat (Chapitre III) en raison de l'intimité de cette espèce benthique avec les sédiments et de son activité bioturbatrice bien connue (Usio & Townsend, 2004).

1.2. L'isopode *Asellus aquaticus*

Asellus aquaticus est une espèce abondante et commune dans la plupart des écosystèmes d'eau douce Européens (Helawell, 1986). L'aselle est généralement décrite comme relativement résistante à divers types de stress environnementaux (Mulliss *et al.*, 1994), capable de survivre dans des conditions de faible oxygénation et présentant un large spectre de tolérance au pH allant de 4,5 à 11 (Berezina, 2001).

L'aselle présente une durée de vie comprise entre 1 et 2 ans, selon l'espèce. Son corps se divise en trois parties distinctes (**Figure II-2**) :

- le céphalothorax est composé de deux paires d'antennes, des yeux et des pièces buccales.

- le thorax comprend sept segments libres, portant chacun une paire de péréiopodes, appendices impliqués dans la locomotion.
- le pléotelson termine le corps de l'aselle et porte les uropodes, organes jouant également un rôle dans la locomotion.

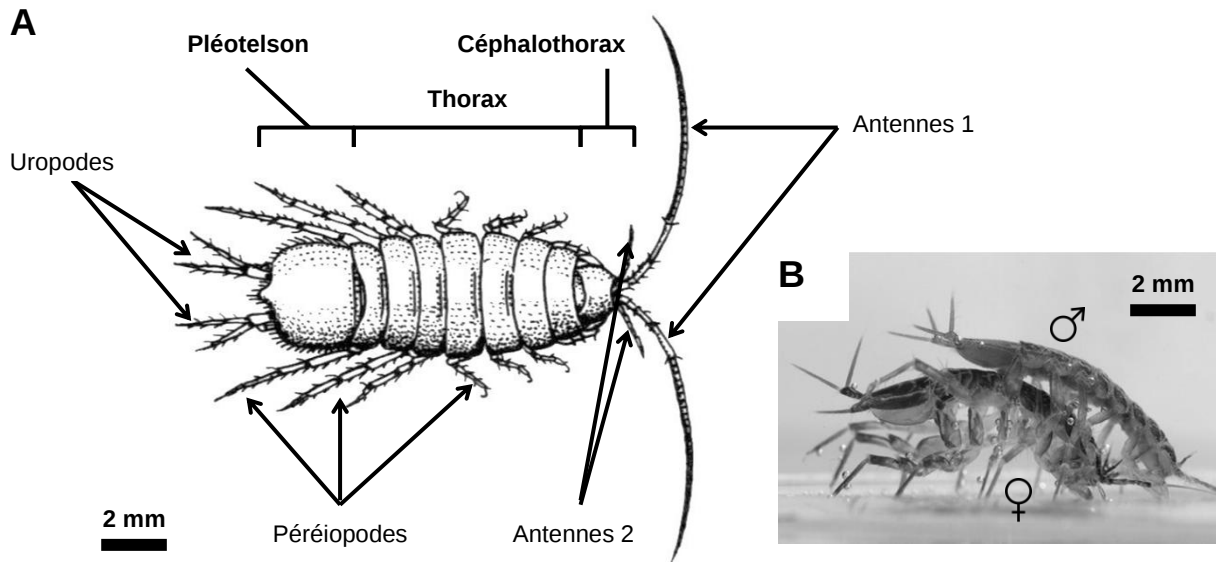


Figure II-2. Morphologie générale d'*Asellus aquaticus*. A) Vue dorsale d'un individu adulte ; B) Vue latérale droite d'individus en pré-copulât, avec le mâle au-dessus et la femelle en dessous (Photo : M. Renou).

La reproduction chez l'aselle est de type sexué et ovovivipare. Elle se caractérise par une phase de gardiennage constituée par l'appariement (pré-copulât) entre mâle et femelle (Ridley & Thompson, 1979). La formation du pré-copulât permet un sexage rapide des individus, le mâle étant placé au-dessus de la femelle, le deuxième critère de sexage, plus fiable, étant la présence de crochets spécifiques au mâle, localisées sur les péréiopodes du premier segment du thorax et permettant au mâle de maintenir la femelle. Cet appariement entre le mâle et la femelle fait de cette espèce un modèle souvent utilisé en écotoxicologie, comme par exemple dans des tests de formation/déformation de pré-copulâts (Bertin & Cézilly, 2005). Après fécondation, la femelle garde les œufs dans une poche incubatrice située en position ventrale sous les segments du thorax où les embryons se développent jusqu'à la libération des juvéniles.

La respiration de l'aselle est assurée par des branchies localisées au niveau du thorax et insérées à la base des péréiopodes (Babula, 1979; Vandel, 1943). Les aselles, au corps aplati et de petite taille (8 à 16 mm environ pour un adulte), présentent une croissance discontinue caractérisée par une succession de mues. *Asellus aquaticus* est une espèce épibenthique présentant une intimité étroite à la fois avec les sédiments et la colonne d'eau (Van Hattum *et al.*, 1993).

Les aselles constituent un élément essentiel des écosystèmes aquatiques en raison de leur contribution dans la chaîne alimentaire, non seulement en tant que décomposeurs de la matière organique (Andersson, 1985) et consommateurs de plantes vertes et d'algues (Marcus *et al.*, 1978; Moore, 1975), mais également en tant que proies de nombreuses espèces de prédateurs invertébrés (Cockrell, 1984; MacNeil *et al.*, 2002) et de poissons (Jamet, 1995; Rask & Hiisivuori, 1985).

1.3. Les amphipodes *Gammarus pulex*, *Gammarus roeseli* et *Dikerogammarus villosus*

Les trois amphipodes choisis dans notre travail doctoral se distinguent principalement par leur chronologie d'introduction dans les cours d'eau du nord-est de la France. L'amphipode *G. pulex* est originaire d'Europe de l'ouest et est considéré comme une espèce native en raison de son introduction relativement ancienne. L'amphipode *G. roeseli*, originaire des Balkans, a été observé pour la première fois en France (près de Paris) il y a environ 180 ans (Jazdzewski, 1980) et est maintenant considéré comme une espèce naturalisée. L'amphipode *D. villosus*, originaire de la région ponto-caspienne, est une espèce invasive maintenant bien établie dans la Moselle (France) depuis sa première observation en 1999 (Devin *et al.*, 2001), après une expansion très rapide dans le quart nord-ouest de l'Europe (Bollache *et al.*, 2004).

Le gammare présente une durée de vie comprise entre 1 et 2 ans, selon l'espèce et les conditions du milieu (*e.g.* température). Son corps se divise en quatre parties distinctes (**Figure II-3A**) :

- le prosome (ou région céphalique) se compose de deux paires d'antennes, des yeux et des pièces buccales.
- le mésosome comprend sept segments. Les deux premiers segments portent chacun une paire de gnathopodes, organes dédiés à la préhension et jouant un rôle essentiel dans la reproduction (maintien de la femelle en pré-copulât). Les cinq autres segments portent les péréiopodes, organes impliqués dans la locomotion.
- le métasome porte les pléopodes, organes dont le battement continu assure un flux d'eau et d'oxygène vers les branchies situées sous le thorax et jouant donc un rôle essentiel dans la ventilation.
- l'urosome se termine par le telson et porte les uropodes, organes impliqués comme les péréiopodes dans la locomotion.

La distinction entre *G. pulex* et *G. roeseli* est fiable et rapide en raison de la présence, uniquement chez *G. roeseli*, d'une carène dorsale constituée par trois épines placées à l'extrémité postérieure des segments du métasome (**Figure II-3C**). *Gammarus roeseli* présente également un corps de taille généralement supérieure à celui de *G. pulex*. L'amphipode invasif *D. villosus* est l'espèce de plus grande taille parmi les trois et présente également des pointes dorsales au milieu des derniers segments de l'urosome, ce qui le singularise des deux autres espèces (**Figure II-3D**).

La reproduction chez le gammare est sexuée et ovovivipare. Les gammares ont la capacité de se reproduire tout au long de l'année, avec un pic de reproduction au printemps et en été, puis une diminution en automne (Pöckl, 1992). La reproduction des gammares se caractérise par une phase de gardiennage du partenaire sexuel constituée par l'appariement entre mâle et femelle, le mâle étant placé au-dessus de la femelle et la maintenant à l'aide de ses gnathopodes : le terme de pré-copulât désigne alors l'appariement ainsi formé (**Figure II-3B**). Le pré-copulât explique une part du dimorphisme sexuel des gammares. En effet, le mâle présente, en règle générale, des gnathopodes plus développés que ceux des femelles, ce qui en fait un critère permettant de sexer rapidement les individus. Le deuxième critère de sexage, plus fiable, est (1) la présence de papilles génitales (*i.e.* papilles péniennes) uniquement attribuées au mâle et localisées sur la face ventrale au niveau du septième segment du mésosome, ou (2) la présence d'oostégites entre les péréiopodes 2 et 5 chez la femelle (Schmitz, 1992). L'appariement perdure jusqu'à la mue de la femelle, condition indispensable

à la fécondation. Après la fécondation, les œufs sont libérés dans le marsupium (poche incubatrice située en position ventrale au niveau du mésosome) de la femelle où ils se développent jusqu'à la libération des juvéniles lors de la mue suivante.

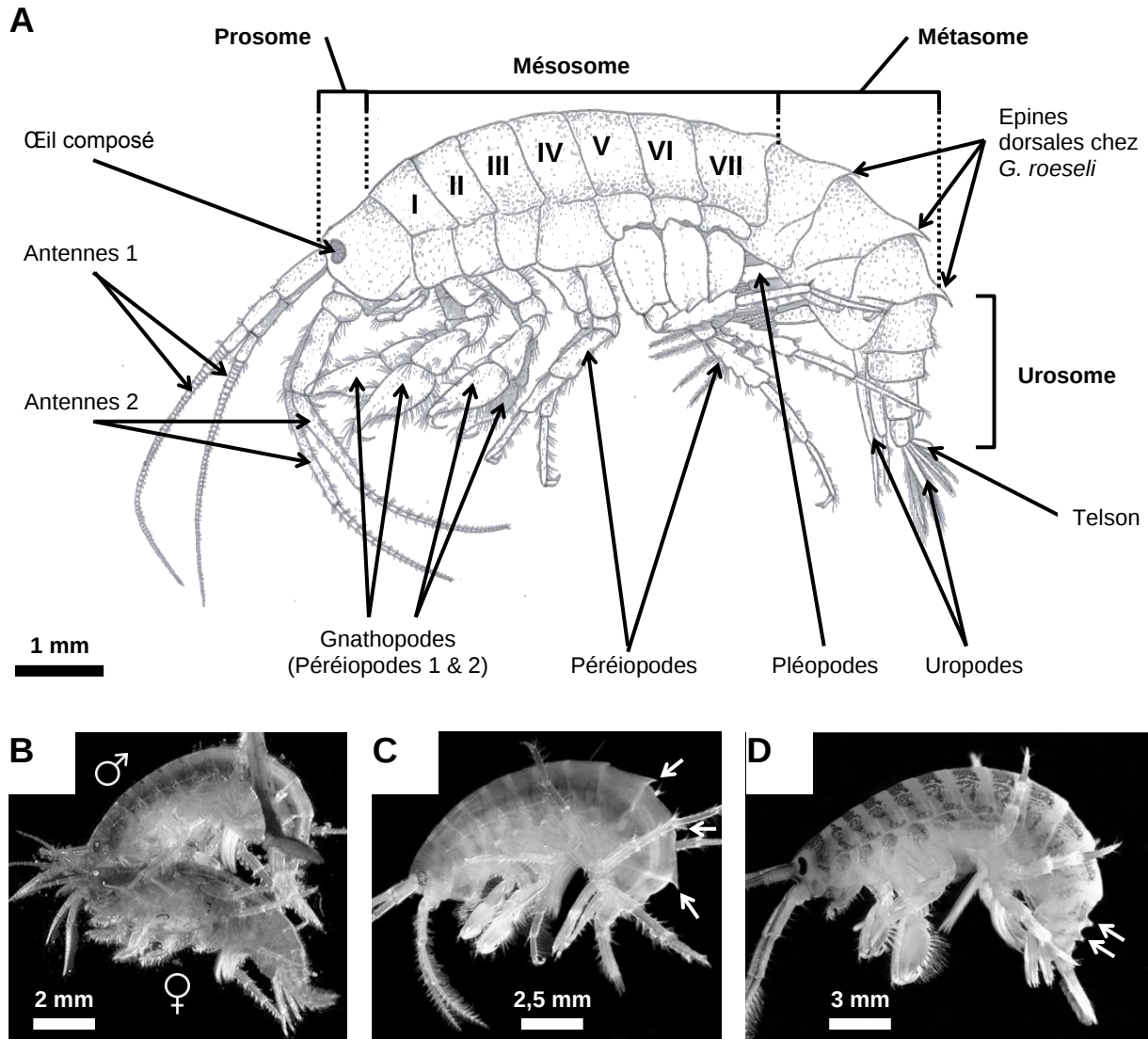


Figure II-3. Morphologie générale d'un gammare et différences inter-spécifiques. A) Vue latérale gauche d'un individu adulte (Croquis : V. Médoc) ; B) Vue latérale gauche de *Gammarus pulex* en pré-copulât, avec le mâle au-dessus et la femelle en dessous (Photo : D. Hollingworth) ; C) Vue latérale gauche de *Gammarus roeseli* adulte. Les épines dorsales sont indiquées par des flèches (Photo : M. Mañas) ; D) Vue latérale gauche de *Dikerogammarus villosus* adulte. Les pointes dorsales sont indiquées par des flèches (Photo : J.F. Cart).

La respiration du gammare est assurée par les branchies. La croissance du gammare est discontinue et se caractérise donc par de nombreuses mues successives. Le cycle de mue

se décompose en six étapes différentes et dure en moyenne une trentaine de jours (Sutcliffe, 1992) : deux stades de pré-mue durant lesquels la cuticule s'épaissit (1 et 3 jours respectivement), deux stades d'inter-mue durant lesquels l'ancienne cuticule se décolle (10 jours environ chacun) et deux stades de post-mue durant lesquels l'ancienne mue est rejetée (*i.e.* exuviation) tandis que la nouvelle apparaît (3 et 5 jours respectivement) (Xuereb, 2009).

Les gammares sont principalement décrits comme des organismes « déchetiers » détritivores participant à la production de la matière organique issue de la décomposition des feuilles (Farrow & Maltby, 2000). Cependant, ils sont également considérés comme des omnivores opportunistes et des prédateurs (Bollache *et al.*, 2008; Dick *et al.*, 2002, 2012; Kelly *et al.*, 2002; MacNeil *et al.*, 1997), et peuvent même présenter un cannibalisme prononcé selon les espèces (Dick, 1995; Kinzler *et al.*, 2009).

1.4. Le poisson *Cottus gobio* utilisé en tant que prédateur potentiel

Le Chabot commun *C. gobio* est une espèce native largement répandue dans les cours d'eau du nord-est de la France. Le chabot présente une durée de vie moyenne comprise entre 3 et 5 ans, parfois jusqu'à 8 ans selon les conditions du milieu. Dépourvu de vessie natatoire et donc caractérisé par une capacité de nage limitée, il s'agit d'un poisson typiquement benthique (**Figure II-4A**).

D'un point de vue morphologique, le chabot présente une large bouche lui permettant d'avaler des proies relativement grandes (*e.g.* *D. villosus* de plus de 2 cm de long), malgré un corps de petite taille (8 à 15 cm environ pour un adulte). Cette espèce présente un corps cylindrique allongé et tacheté, ayant la capacité d'homochromie (*i.e.* capacité d'adapter sa couleur à son environnement en l'éclaircissant ou en la fonçant). Ses yeux rapprochés sont localisés au sommet de la tête (**Figure II-4B**).

Le chabot est un chasseur à vue et son régime alimentaire est basé majoritairement sur la consommation de crustacés d'eau douce. *Cottus gobio* est ainsi un modèle fréquemment utilisé dans tests en laboratoire visant à évaluer les réponses comportementales d'anti-prédation chez de nombreuses espèces, incluant les amphipodes et les aselles (Andersson *et al.*, 1986; Åbjörnsson *et al.*, 2000; Kaldonski *et al.*, 2007; Perrot-Minnot *et al.*, 2007).

Dans notre travail doctoral, le chabot *C. gobio* a été utilisé uniquement pour obtenir une eau marquée par un risque de prédation et n'a pas été mis en contact direct avec une contamination du substrat ou de l'eau.

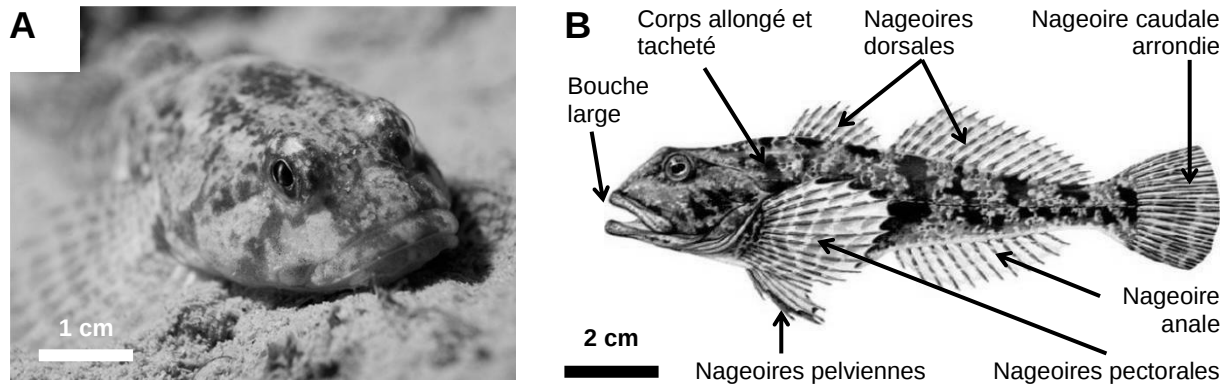


Figure II-4. Morphologie générale du chabot commun *Cottus gobio*. A) Vue de face d'un individu adulte au contact du substrat (Photo : T. Dietsche) ; B) Vue latérale gauche d'un individu adulte.

2. Les sites d'études

2.1 Milieux de provenance des organismes

La difficulté de la mise en place d'élevages en laboratoire pour les espèces retenues nous a conduits à réaliser nos expérimentations avec des organismes prélevés *in situ* et acclimatés par la suite en laboratoire.

Le choix des sites de prélèvement des organismes s'est principalement opéré selon les critères suivants : (1) la proximité géographique des cours d'eau par rapport au laboratoire (≈ 30 km), permettant ainsi un transfert rapide des organismes vers le laboratoire et autorisant des prélèvements réguliers, (2) le bon état écologique des cours d'eau, permettant ainsi le prélèvement d'individus peu acclimatés à des milieux perturbés, et (3) la présence et l'abondance des organismes sur les sites choisis. En raison de l'absence de sites réunissant l'ensemble des espèces testées, nous avons été contraints de prélever les différentes espèces testées au niveau de plusieurs cours d'eau distincts (**Figure II-5A**).

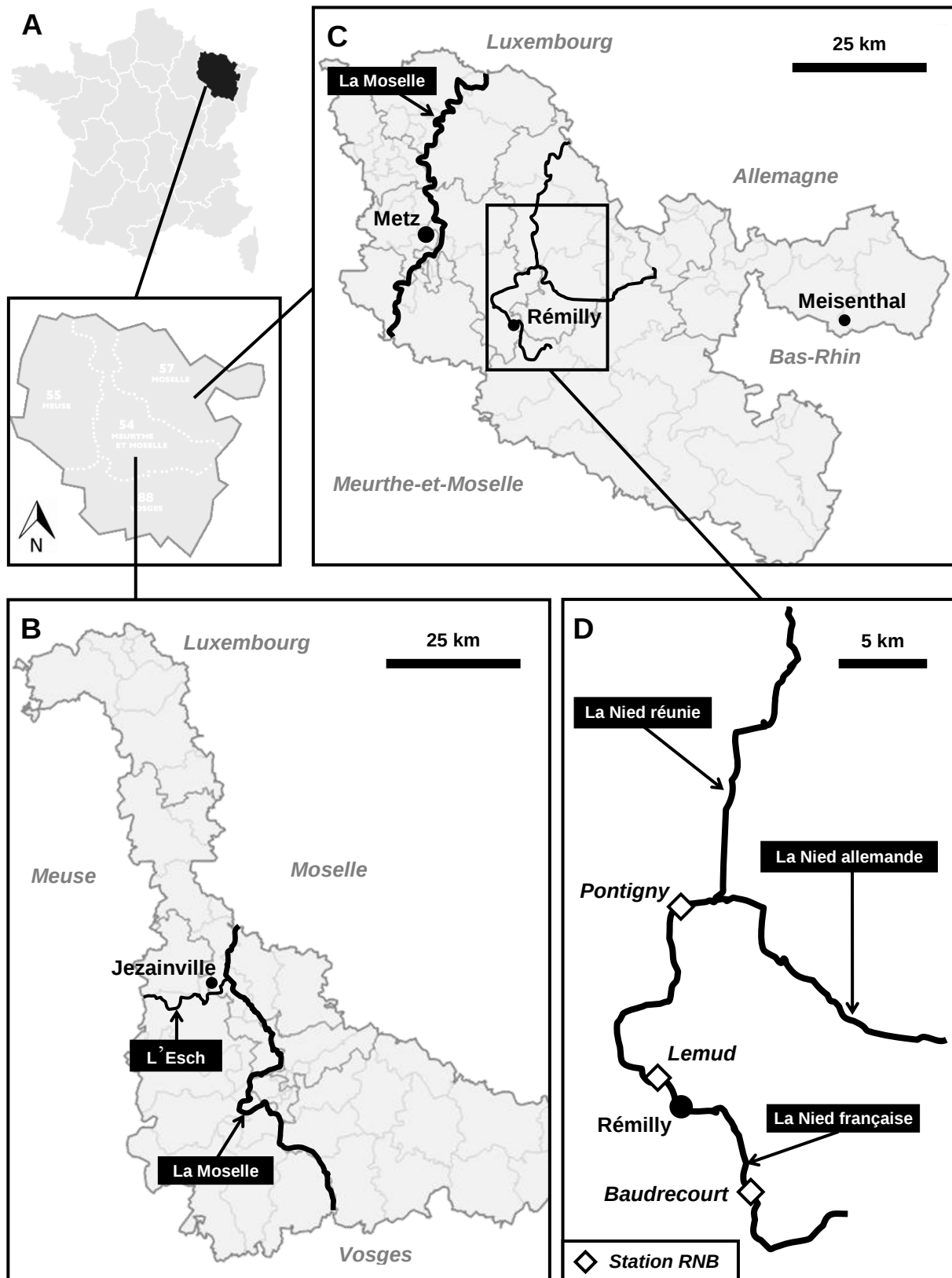


Figure II-5. Cartes localisant les différents sites de prélèvements des organismes. A) Région lorraine en France ; B) Carte du département de la Meurthe-et-Moselle (54) situant la rivière Esch et la commune de Jezainville ; C) Carte du département de la Moselle (57) situant la rivière Moselle et les communes de Metz, Rémilly et Meisenthal ; D) Carte des trois parties de la rivière Nied situant les stations RNB de suivi de la qualité de l'eau.

L'amphipode *G. pulex* utilisé dans les tests présentés dans les Chapitres III et IV a été échantillonné dans la rivière Esch, sur un site situé à proximité de la commune de Jezainville (48° 52' 16.85'' N, 6° 02' 33.65'' E) (Meurthe-et-Moselle, France) (**Figure II-5B**).

L'amphipode *G. roeseli* utilisé dans les tests présentés dans les Chapitres III, IV et V a été échantillonné dans la Nied française, sur un site situé à proximité de la commune de Rémilly (49° 00' 56.21'' N, 6° 23' 38.34'' E) (Moselle, France) (**Figure II-5C**). La Nied française est une petite rivière longue de 59 km. Le suivi de la qualité du milieu aquatique est assuré par trois stations du Réseau National de Bassin (RNB) implantées le long de la Nied française à Braudecourt, Lemud et Pontigny (de l'amont vers l'aval) (**Figure II-5D**). Les Indices Biologiques Globaux Normalisés (IBGN) mesurés de 2002 à 2009 par la DIREN Lorraine et l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse indiquent un niveau de qualité biologique bon sur l'ensemble des trois stations. Cet indice tient compte des peuplements de macroinvertébrés et reflète ainsi la qualité globale de la rivière (eau et habitat physique). Pour leur part, les Indices Biologiques Diatomiques (IBD) mesurés par la DIREN de 2004 à 2005, indiquent une qualité bonne à moyenne sur l'ensemble des stations. Cet indice est sensible à la qualité physico-chimique de l'eau. D'une manière globale, selon ces indices et les analyses physico-chimiques mesurées sur cette rivière, la Nied française présente une qualité d'eau et/ou d'habitat qui peut être qualifiée de moyenne à bonne (Annexe II).

L'isopode *A. aquaticus* utilisé dans les tests présentés dans le Chapitre III et l'amphipode *D. villosus* utilisé dans les tests présentés dans les Chapitres III, IV et V ont été tous les deux échantillonnés dans la rivière Moselle, sur un site situé à proximité de l'île-du-Saulcy (49° 07' 16.68'' N, 6° 10' 58.03'' E) et localisé dans la commune de Metz (Moselle, France) (**Figure II-5C**). Bien que situé à proximité d'infrastructures urbaines, l'analyse physico-chimique des sédiments du site révèle des caractéristiques comparables à celles rencontrées sur la Nied française au niveau de la commune de Rémilly, à l'exception des valeurs de HAPs et de quelques PCBs (Annexe II).

Le décapode *A. astacus* utilisé dans les tests présentés dans le Chapitre III provient d'un élevage d'écrevisses localisé dans la commune de Meisenthal (48° 57' 59'' N, 7° 21' 11'' E) (Moselle, France) (**Figure II-5C**). Tous les spécimens ont été extraits d'un étang,

appartenaient à la même population et étaient issus de pontes de la même année. La difficulté de prélèvement de cet organisme *in situ* nous a contraints à nous tourner vers l'astaciculture.

Le poisson *C. gobio* utilisé dans les tests d'anti-prédation présentés dans les Chapitres III, IV et V a été pêché dans la rivière Moselle par l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA). Les individus ont été transférés au laboratoire où ils ont été maintenus dans des conditions contrôlées. Après leur utilisation pour le marquage de l'eau, tous les individus ont été relâchés dans leur milieu de prélèvement.

2.2. Sédiments

2.2.1. Provenance des sédiments

Nous avons utilisé deux sédiments naturels témoin (SIR) et contaminé (CHA) et un sédiment de référence non contaminé (GAL) qui a servi de base pour le dopage (**Figure II-6**).

Les deux sédiments naturels ont été prélevés au niveau de deux retenues dites au fil de l'eau localisées dans le département du Jura (Franche-Comté, France). Le sédiment témoin SIR provient d'une retenue d'eau de référence relative située au niveau de la commune de Sirod (46° 44' 19.1'' N, 05° 54' 42.8'' E), et le sédiment contaminé CHA provient d'une retenue d'eau perturbée située au niveau de la commune de Champagnole (46° 20' 16.9'' N, 05° 41' 16.1'' E), les deux retenues étant alimentées par la rivière Ain. Ces sédiments ont fait l'objet d'une étude en commun au cours des travaux de thèse de Colas (2012) et de Burga Pérez (2012).

Le sédiment de référence (GAL) utilisé pour les expérimentations de dopage au cadmium a été prélevé par l'IRSTEA de Lyon qui nous en a fourni pour les expériences. Il provient d'une station non perturbée alimentée par la rivière Ain et située au lieu-dit Port Galland (45° 49' 00'' N, 5° 12' 46'' E), dans le département de l'Ain (Rhône-Alpes, France).

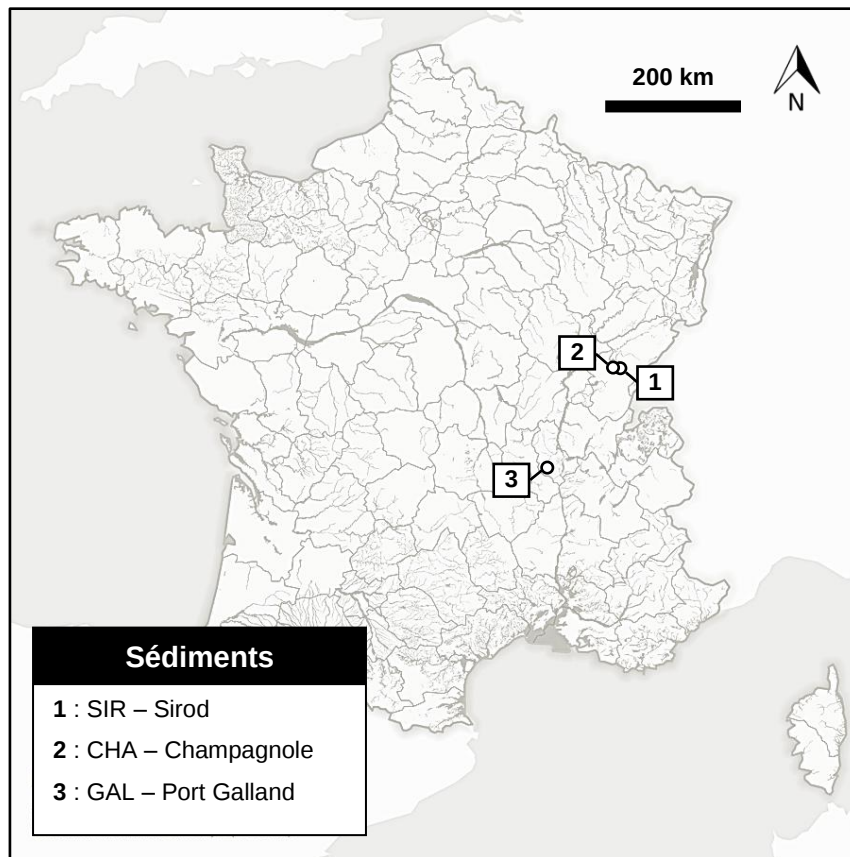


Figure II-6. Carte localisant les différents sites de prélèvement des sédiments. Les sites 1 et 2 se situent dans le département du Jura. Le site 3 se situe dans le département de l'Ain.

2.2.2. Méthode de prélèvement et de stockage

Les sédiments ont été prélevés à environ 1 m 50 de la berge et chaque prélèvement a été passé sur un tamis de maille 1 cm afin de séparer les éléments grossiers (pierres, feuilles) du sédiment proprement dit. Les sédiments ont été homogénéisés dans un bac, puis placés dans des flacons en polyéthylène de 2,5 litres, avec une alternance de repos et d'élimination de l'eau excédentaire. Une fois ramenés au laboratoire, les flacons ont été congelés à -20°C afin de fixer les organismes vivants. Les sédiments congelés ont été analysés dans un délai pouvant aller jusqu'à 6 mois.

3. Méthodes

3.1. Mesure des comportements

L'ensemble des analyses comportementales réalisées dans le cadre de ce travail doctoral a reposé sur le suivi en continu des paramètres relatifs aux traits considérés. Afin d'éviter ou de limiter d'éventuels biais induits par la présence de l'opérateur au niveau de l'expression des comportements mesurés, nous avons fait le choix de réaliser les expérimentations dans une enceinte hermétique. A l'intérieur du caisson, nous avons fixé une Webcam (Philips ToUcam Pro II Pcv840) et une source lumineuse constituée par trois luminaires LED (Philips LAC52AWZB) équipées chacun de trois LEDs à lumière rouge afin d'enregistrer les différentes réponses comportementales à l'abri de toute perturbation extérieure (**Figure II-7**). Le caisson recevait ensuite les différents dispositifs expérimentaux. Pour les protocoles détaillés des tests comportementaux, voir les Chapitres III, IV et V.

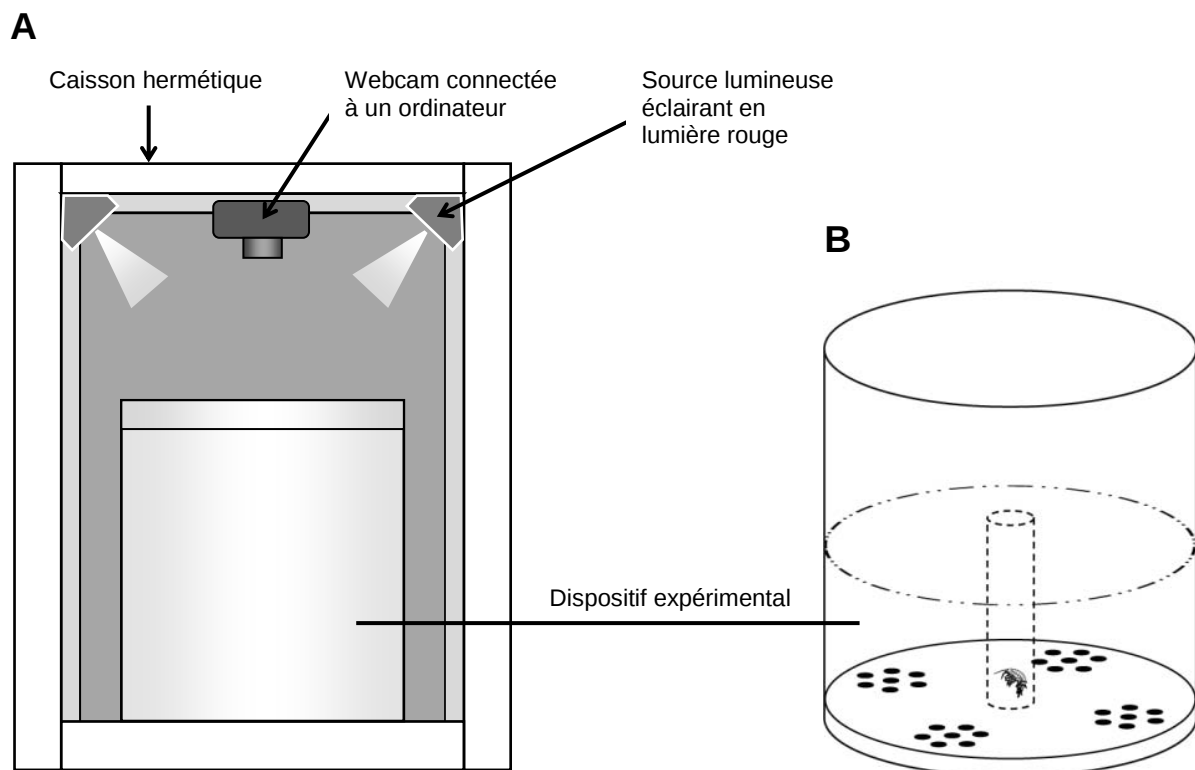


Figure II-7. Illustrations du dispositif expérimental. A) Vue latérale de l'enceinte hermétique pouvant accueillir les dispositifs expérimentaux ; B) Exemple d'un dispositif expérimental utilisé dans l'acquisition des réponses comportementales d'anti-prédation des amphipodes (voir détails et légendes dans le Chapitre V.1).

Même si la conception, l'optimisation et la mise en pratique de tels procédés passent par une succession d'essais-erreurs qui s'avèrent relativement chronophages, ce processus d'analyse présente des avantages par rapport aux protocoles classiquement utilisés dans la littérature : il offre (1) une analyse comportementale fiable et robuste qui réduit les éventuels biais liés à l'opérateur, (2) la possibilité de vérifier les données et de remonter à tout moment aux données sources, et (3) la possibilité d'acquérir différents paramètres à l'aide d'une seule et même vidéo.

3.2. Analyse des comportements

Les séquences vidéos (1 h pour les tests d'évitement au sédiment - Chapitre III ; 3 min pour les tests d'anti-prédation - Chapitres IV et V) ont été analysées avec le logiciel « *Gammarus tracking* » développé par Philippe Rousselle du laboratoire LIEBE (logiciel non publié). Ce logiciel détecte le sujet en mouvement dans une aire donnée (*i.e.* le dispositif expérimental vu de dessus) avec un taux de 20 images/sec et enregistre les coordonnées du sujet à chaque image. Les coordonnées sont par la suite traduites en différentes métriques de locomotion (*e.g.* vitesse de déplacement, temps de mobilité, etc.). Parallèlement à l'analyse informatique, un dépouillement manuel de chaque séquence nous a permis d'obtenir des informations en cas de limites de détection du logiciel ou complémentaires à celles apportées par le logiciel (*e.g.* nombre de zones refuges visitées, choix des refuges, etc.).

L'acquisition des réponses comportementales, en dehors du temps associé à l'acclimatation et la manipulation des organismes, repose sur un volume total de 1 494 h de d'enregistrement et d'analyse des vidéos, qui se répartissent de la façon suivante :

- Chapitre III : l'expérience #1 a nécessité 30 h d'enregistrement (5 unités expérimentales pouvaient être placées simultanément dans l'enceinte hermétique) et 60 h d'analyse (30 h d'analyse pour l'évitement au substrat et 30 h d'analyse pour le nombre de déplacements). De la même manière, l'expérience #2 a nécessité 180 h d'enregistrement et 540 h d'analyse (180 h pour l'évitement au substrat, 180 h pour l'utilisation de refuges et 180 h pour le niveau d'activité).
- Chapitre IV : l'expérience #1 a nécessité 18 h d'enregistrement (individus placés seul dans l'unité expérimentale) et 72 h d'analyse (36 h pour l'utilisation des refuges et 36 h

pour l'agrégation). L'expérience #2 a nécessité 18 h d'enregistrement et 72 h d'analyse (36 h pour la vitesse de nage et 36 h pour l'exploration).

- Chapitre V.1 : l'expérience réalisée avec le dispositif expérimental #1 a nécessité 18 h d'enregistrement et 108 h d'analyse (36 h pour l'utilisation des refuges, 36 h pour l'exploration et 36 h pour la mobilité). L'expérience réalisée avec le dispositif expérimental #2 a nécessité 18 h d'enregistrement et 108 h d'analyse (36 h pour l'utilisation de refuges, 36 h pour l'agrégation et 36 h pour la mobilité).
- Chapitre V.2 : l'expérience réalisée avec le dispositif expérimental #1 a nécessité 18 h d'enregistrement et 108 h d'analyse (36 h pour l'utilisation des refuges, 36 h pour l'exploration et 36 h pour la mobilité). L'expérience réalisée avec le dispositif expérimental #2 a nécessité 18 h d'enregistrement et 108 h d'analyse (36 h pour l'utilisation de refuges, 36 h pour l'agrégation et 36 h pour la mobilité).

3.3. Analyses statistiques

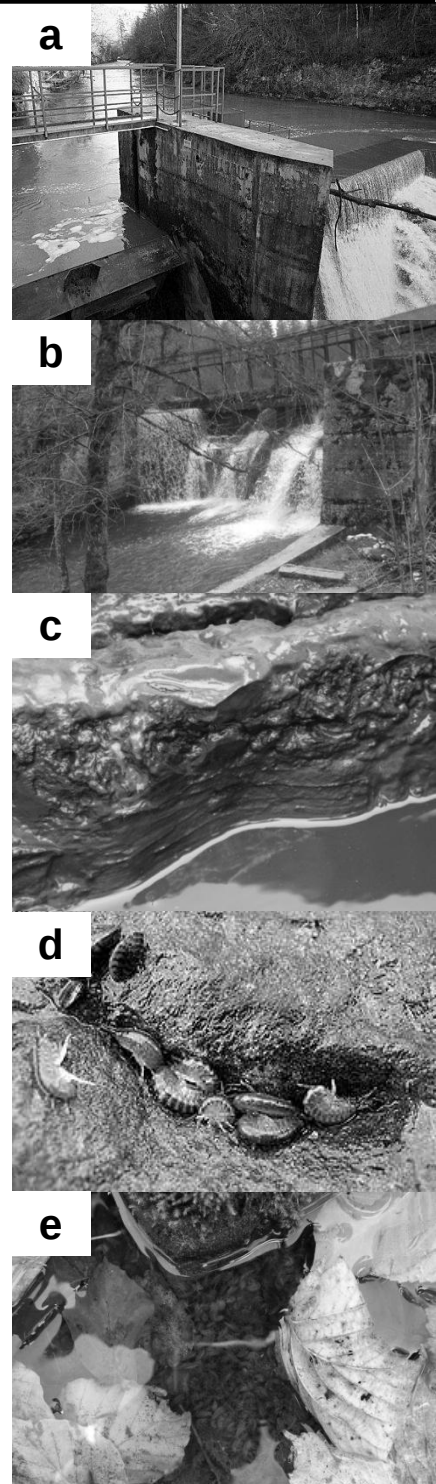
Les tests statistiques réalisés à partir des données se rapportant aux mesures comportementales et biologiques sont détaillés au sein des articles (cf. Chapitres III, IV et V). L'ensemble des résultats a été systématiquement analysé avec une différenciation entre mâles et femelles, pour chacune des espèces testées ceci afin de pouvoir répondre à la question Q1(b). Toutefois, en l'absence de différences inter-sexes significatives au niveau de certaines réponses, nous avons choisi de regrouper les données afin de rendre les résultats plus robustes et plus facilement interprétables.

De même, les individus testés ont été mesurés sous loupe binoculaire à la suite de chaque expérimentation afin d'évaluer l'effet potentiel de leur taille (et donc de leur âge) sur les réponses analysées. Nous avons pour cela réalisé des tests de corrélation de Pearson. En l'absence d'effets significatifs de la taille des individus sur leurs réponses comportementales, ces résultats ne sont pas présentés.

Plus généralement, les tests statistiques ont été réalisés à l'aide des logiciels *Statistica* 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, USA) et *R* 2.9.0 (The R Foundation for Statistical Computing c/o Institute for Statistics and Mathematics, Vienna, AUSTRIA). Le seuil de significativité alpha retenu fut fixé à 5%.

CHAPITRE III

Impact Comportemental D'une Altération De La Qualité Des Sédiments



a

Arrivée de l'eau de la rivière Ain dans la centrale hydroélectrique de Bourg de Sirod (Jura, France) (Photo : champa.over-blog.com).

b

Retenue au fil de l'eau localisée sur la rivière Ain (Jura, France) (Photo : champa.over-blog.com).

c

Prélèvement de sédiments (Photo : P. Sornom).

d

Gammares appartenant à l'espèce *Dikerogammarus villosus* prostrés dans une cavité rocheuse (Photo : P. Steinmann).

e

Grande densité de gammares appartenant à l'espèce *Gammarus pulex* dans une petite rivière allemande, à proximité de matière organique allochtone constituée par des feuilles mortes et des débris (Photo : de.wikipedia.org).

Dans un contexte de contamination croissante des sédiments par des métaux lourds tels que le cadmium (Cd) dans les zones industrialisées, le but de cette étude a été d'évaluer les effets d'une contamination métallique des sédiments sur diverses réponses comportementales chez cinq espèces distinctes de crustacés présentant un lien différent avec le substrat. L'originalité de la méthode utilisée réside dans l'utilisation d'un système d'acquisition vidéo, ce qui diffère des tests classiquement réalisés dans d'autres études. Ces vidéos nous ont permis d'effectuer un suivi continu des réponses comportementales sur 1 h, contrairement aux relevés ponctuels des tests d'évitement au substrat classiques. Cette étude s'est déroulée en deux parties.

Dans un premier temps, nous avons analysé les réponses d'évitement au substrat chez *A. aquaticus*, *A. astacus*, *G. pulex*, *G. roeseli* et *D. villosus* en leur donnant le choix, lors d'expositions séparées, entre un sédiment naturel témoin et un sédiment naturel multi-contaminé. Les résultats de cette expérience nous ont permis d'observer une préférence significative pour le sédiment contaminé chez *A. aquaticus* et un évitement chez *A. astacus*. Aucune préférence n'a été observée chez les trois amphipodes *G. pulex*, *G. roeseli* et *D. villosus*.

Dans un second temps, nous avons analysé à la fois l'évitement au substrat et les réponses d'anti-prédation chez *D. villosus*, en offrant aux individus un choix entre un sédiment naturel témoin et un sédiment naturel dopé au cadmium (CdCl_2), avec la présence/absence de refuges à l'intérieur du sédiment et également la présence/absence d'un signal de prédation par le poisson *Cottus gobio* ajouté à l'eau. Les résultats de cette expérience nous ont permis de mettre en évidence un évitement significatif du sédiment dopé au cadmium chez *D. villosus* dans toutes les conditions testées. Cependant, *D. villosus* n'a pas augmenté l'utilisation de refuges lorsqu'un risque de prédation était présent dans l'eau, comme cela a été montré dans la littérature en absence de perturbation du milieu.

Nos résultats démontrent la sensibilité des changements de comportement qui ont répondu à des concentrations relativement faibles de substances toxiques, et la conséquence d'une pollution métallique sur l'exposition d'une proie à un prédateur potentielle.

Substrate avoidance and antipredator behaviour of freshwater crustaceans exposed to contaminated sediments

Short Communication

Pascal Sornom ^{1*}, Simon Devin ¹, Jean-François Férard ¹, Jean-Nicolas Beisel ¹

¹ Laboratoire des Interactions, Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), CNRS UMR 7146, Université de Lorraine, France

* Author for correspondence : P. Sornom, Laboratoire des Interactions, Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), CNRS UMR 7146, Université de Lorraine, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France (email : pascal.sornom@umail.univ-metz.fr)

Abstract

In industrialised area, sediments are often contaminated with heavy metals which have adverse effects on a wide range of physiological and behavioural processes in aquatic organisms. In laboratory experiments we investigated (1) the substrate avoidance behaviour in five crustacean species have been given a choice between control and multi-contaminated field sediment and (2) both substrate avoidance and antipredator response in the amphipod *Dikerogammarus villosus* has been given a choice between control and cadmium (Cd)-spiked sediment. In the first experiment the isopod *Asellus aquaticus* significantly preferred the contaminated sediment while the decapod *Astacus astacus* avoided it, and no preference was observed in the three amphipods *Gammarus pulex*, *G. roeseli* and *D. villosus*. In the second experiment *D. villosus* avoided the Cd-spiked sediment in all the tested conditions but did not increase refuge use. Our findings highlight the sensitivity of behavioural changes which responded to relatively low concentrations of toxicants.

Keywords:

Antipredation; Substrate avoidance; Behaviour; Heavy metal; Spiked-sediment; Crustaceans

Abbreviations:

SIR: control sediment sampled in the vicinity of Bourg de Sirod (Ain River, France)

CHA: polluted sediment sampled in the vicinity of Champagnole (Ain River, France)

GAL: control sediment sampled in the vicinity of Port Galland (Ain River, France)

1. Introduction

Sediment contamination is a rising environmental problem for aquatic ecosystems and associated fauna. Sediment toxicity research activity began in the 1970s and dramatically increased during the last decades (Bird *et al.*, 2003; Li and Thornton, 2001; Relić *et al.*, 2005; Roos and Åström, 2005; Smolders *et al.*, 2002; Veeresh *et al.*, 2003). According to some intrinsic factors (*e.g.* particle size, organic matter and type of organic carbon content), sediments can be preferential areas of accumulation for trace metals and organic/inorganic contaminants which cause adverse effects on organisms directly or indirectly linked to sediment through their habitat choice and feeding habits. For example, cadmium (Cd) is a non-essential heavy metal which naturally occurs in insignificant amounts in the environment. However, its impact is steadily increasing due to anthropogenic human activities. Some heavy metals are well known for their high ecotoxicity, their ability to incorporate into food chains and their environmental persistence (Spehar *et al.*, 1978; Taylor, 1983; van Hattum *et al.*, 1989; Wright and Welbourn, 1994).

Besides sediment chemical analysis, many tools have been developed using organisms to assess the acute or chronic toxicity and bioaccumulation of contaminants associated with sediments: biological or physiological endpoints (*e.g.* survival, growth, life-cycle, reproduction, nutrition, etc.), community structure and more recently behavioural endpoints. Behavioural changes, which are considered as ‘early warning responses’ to contaminants and environmental stresses (Gerhardt, 1995), have already proved their utility in ecotoxicity testing and quality monitoring (De Lange *et al.*, 2009; Hellou, 2011; Maltby *et al.*, 2002; Peeters *et al.*, 2009a,b; Poulton and Pascoe, 1990; Sornom *et al.*, 2010, 2012). Avoidance behaviour has been widely used for terrestrial tests in ecotoxicology and is now considered as a relevant screening tool to assess soil contamination (Garcia *et al.*, 2008; Loureiro *et al.*, 2005, 2009; Natal da Luz *et al.*, 2004; Stephenson *et al.*, 1997), leading to the development of standardised tests (ISO/CD, 2003). Despite its great potential, few studies have used avoidance behaviour in aquatic tests whereas the problem of contaminated sediments increased (Hare and Shooner, 1995; De Lange *et al.*, 2006).

In this study we investigated the effects of sublethal exposure to contaminated sediment on substrate avoidance of five crustacean species (experiment #1) and on both substrate avoidance and antipredator response of an invasive freshwater amphipod (experiment #2). Benthic invertebrates are useful bioindicators and biomonitors in various

aquatic systems (Rinderhagen *et al.*, 2000). For example, amphipods are easy to sample thanks to their holobiotic cycle, widespread distribution and high densities. Individuals collected are easy to identify down to the species level and can be sorted by gender according to a sexual dimorphism. Several species sensitive to a large range of stressors are currently used in ecotoxicological tests. By using these organisms, we can both detect pollution but also evaluate its ecological impact. Indeed, gammarids are considered as an important reserve of food for macroinvertebrates, fish, bird and amphibian species. They play a major role in the leaf litter breakdown process as an omnivorous shredder and consequently in the entire aquatic food web.

2. Materials and methods

2.1. Biological material

For experiment #1, the isopod *A. aquaticus* and the amphipod *D. villosus* were collected from the river Moselle (Saulcy, 49°07'N and 6°10'E). The amphipods *G. pulex* and *G. roeseli* were collected from the river Esch (Jezainville, 48°52'N and 6°02'E) and from the river Nied (Remilly, 49°00'N and 6°23'E), respectively. The decapod *A. astacus* was obtained from a farm crayfish (in the vicinity of Meisenthal, 48°57'N and 7°21'E) and all specimens belong to the same population. All tested species were collected between May and June 2009 from unpolluted streams. For experiment #2, the amphipod *D. villosus* was selected according to its higher probability of contact with sediments in comparison with *G. pulex* or *G. roeseli*. Indeed, in field conditions, *D. villosus* is more frequently found in contact with stream bottom substratum (*i.e.* a substrate which favours prostration and little swimming time) whereas the two other species are found more frequently in the water layer (Kley *et al.*, 2009; Van Riel *et al.*, 2007). Specimens were collected in November 2009 in the same sampling site and housed in the same conditions as for experiment #1.

Organisms were rapidly transferred (< 1 h) in plastic vessels filled with site water to the laboratory, where they were acclimatised for 72 h. During acclimatisation, test organisms were housed in aquaria equipped with benthic refuges to minimise cannibalism and filled with dechlorinated, UV-treated, and oxygenated tap water. Each species was maintained separately at a maximum density of 20 individuals per litre. Amphipods and isopods were fed *ad libitum* with alder leaf disks during acclimatisation, while decapods were fed *ad libitum* with

chironomids, gammarids, fish, macrophytes, carrots and potatoes. The room temperature was kept constant at $18 \pm 1^\circ\text{C}$ and the light:dark cycle was 12:12 h.

2.2. Experimental devices

For experiment #1, field sediments were collected in May 2009 from impoundments in an unpolluted station (Bourg de Sirod, abridged SIR) and a polluted one (Champagnole, abridged CHA) along the river Ain (Jura, France). Both sediment and water physical-chemical characterisations were performed in May 2009 (Table 1).

Substrate avoidance behaviours were assessed based on a protocol adapted from De Lange *et al.* (2006). Experimental units were composed of 30 separate cylindrical plastic dishes ($\varnothing$ 8.5 cm, height 4.6 cm) open to the air. A plastic permanent barrier (1.5 cm height) was placed in the middle of each dish, dividing it in two similar parts. At each side of the barrier, one type of sediment was placed to a level as high as the barrier, which corresponded to 100 g of each sediment type. 80 mL of dechlorinated tap water was carefully added using a syringe to avoid sediment disturbance. Using 80 mL of surface water provided a water level of 2 cm which prevented the tested organisms from vertically displacing and thus favoured horizontal movements with a continuous contact with the sediment. The dishes were then placed in a climate-controlled room (18°C and a 12:12 h light:dark cycle), and the sediments were allowed to settle for 24 h before being used for the tests. After 24 h organisms were gently placed alone in the dish centre. Each individual was given a choice between unpolluted (SIR) and polluted (CHA) sediment. The dishes were then placed in a hermetic box linked to a digital video camera. Individual behaviour was filmed under red light for 1 h. The videos allowed us to analyse the organism displacement in order to assess (1) the substrate avoidance by measuring the time spent in each area and (2) the activity level by counting the number of area changes.

Habitat choice experiment was assessed in a total of 30 individuals per condition (15 individuals of each gender). Gender was assessed according to sexual dimorphisms such as abdominal appendages only present in males for both decapods (*i.e.* gonopods) and isopods, and such as both gnathopod size (typically larger in males) and genital papillae (only present in the 7th ventral segment in males) for amphipods.

Table 1. Chemical characterisation of both sediments and water from SIR, CHA and GAL sampling sites.

		SIR	CHA	GAL
Sediments				
Total Dry Weight (%)	TDW	69.65	75.2	33
Total Organic Carbon (g C/kg DW)	TOC	12.9	20.2	8.2
Calcium Carbonate (%)	CaCO ₃	62	75	67.1
Metals (mg/kg DW)	Aluminium (Al)	3720	2500	-
	Arsenic (As)	10.6	4.6	6.3
	Cadmium (Cd)	< 0.2	< 0.2	0.25
	Chromium (Cr)	21.3	12.8	33.5
	Cobalt (Co)	3.4	2.5	4.2
	Copper (Cu)	4.1	45.3	14
	Iron (Fe)	9860	4850	14619
	Lead (Pb)	9.1	11.5	16.5
	Manganese (Mn)	284.1	150.2	188
	Mercury (Hg)	< 0.02	< 0.02	0.071
	Nickel (Ni)	9.4	6.5	17.1
	Zinc (Zn)	26.9	85.7	65
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) (µg/kg DW)	Anthracene (Anth)	< 20	< 20	35
	Benzo(a)anthracene (BaA)	20	46	178
	Benzo(a)pyrene (BaP)	23	62	163
	Benzo(k)fluoranthene (BkF)	12	28	112
	Benzo(ghi)perylene (BgP)	< 10	47	63
	Chrysene (Chry)	< 50	< 50	119
	Fluoranthene (Fluo)	46	127	46
	Indenol(1,2,3-cd)pyrene (Ind)	21	29	180
	Phenanthrene (Phen)	< 50	< 50	206
	Naphtalene (Naph)	< 25	< 25	< 25
Polychloro Byphenyls (PCBs) (µg/kg DW)	PCB28	< 5	< 5	< 5
	PCB52	< 5	< 5	< 5
	PCB101	Presence (P)	5	< 5
	PCB118	P	P	< 5
	PCB138	P	P	< 5
	PCB153	P	8	< 5
	PCB180	< 5	5	< 5
Water				
Potential of Hydrogen	pH	8.1	8.15	7.23
Conductivity (µs/cm)	Cond	416	364	-
Complete Alcalimetric Title (°Fr)	CAT	21.6	18.6	-
Carbonate (mg/L)	CO ₃	< 6	< 6	-
Bicarbonate (mg/L)	HCO ₃	263.5	226.9	-
Dissolved Organic Carbon (mg C/L)	DOC	1.4	1.7	-
Chemical Oxygen Demand (mg O ₂ /L)	COD	< 10	< 10	-
Biochemical Oxygen Demand (mg O ₂ /L)	BOD	< 0.5	0.6	-
Calcium (mg/L)	Ca	82	74	-
Magnesium (mg/L)	Mg	7.2	4.2	-
Potassium (mg/L)	K	< 1	< 1	-
Ammonium (mg/L)	NH ₄	< 0.05	< 0.05	-
Chlorine (mg/L)	Cl	3.4	3.4	-
Nitrate (mg NO ₃ /L)	NO ₃	4.1	3	-
Nitrogen Dioxide (mg NO ₂ /L)	NO ₂	< 0.02	0.03	-
Sulphate (mg/L)	SO ₄	4.4	3.6	-
Phosphate (mg P/L)	PO ₄	< 0.005	< 0.005	-
Total Phosphorus (mg P/L)	P tot	0.006	< 0.005	-

Table 1-bis. Chemical characterisation of both sediments and water from SIR, CHA and GAL sampling sites.

Metals (µg/L)	As	0.2	< 0.2	-
	Cd	< 2	< 2	-
	Cr	< 2	< 2	-
	Co	< 5	< 5	-
	Cu	< 2	< 2	-
	Ni	< 5	< 5	-
	Pb	< 5	< 5	-
	Zn	< 2	< 2	-

For experiment #2, field sediment was collected in October 2009 from an unpolluted station (Port Galland, abridged GAL hereafter) along the river Ain (Jura, France) (Table 1). Cd-spiked GAL sediments were prepared according to the protocol described in Dabrin *et al.* (2012). A toxic stock solution was prepared by dissolving cadmium chloride (CdCl₂) in Milli-Q water. The stock solution was stabilised with 0.1% of HNO₃ (65%, Suprapure, Merck). The Cd-spiked solution was mixed with wet GAL sediment using a liquid-solid ratio of 3.6 so as to obtain a final sediment Cd concentration of 12 µg/g (dry weight). The content was mixed on a rotating wheel for 6 h. After particles settling (48 h), the supernatant water was removed using a vacuum pump and the sediment was homogenised with a plastic spoon prior to its introduction in the experimental units. The same procedure was used for the control GAL sediment, but with Cd-free water. The measured Cd concentrations of both sediments are presented in Table 2.

Table 2. Chemical characterisation of GAL control and Cd-spiked sediments. Cd, cadmium; P, phosphorus; N, nitrogen; C, carbon; DW, dry weight. Data are means±SD.

Sediment	Cd (µg/g DW)	P (mg/g)	N (%)	C (%)
GAL	0.46±0.08	0.69±0.02	0.33±0.01	9.44±0.06
Cd-spiked GAL	11.77±0.41	0.69±0.01	0.34±0.02	9.49±0.11

The experimental units and protocol used in experiment #2 were similar to those of experiment #1. The 1-h videos allowed us to analyse the organism displacement in order to assess (1) the substrate avoidance by measuring the time spent in each area, (2) the refuge use by measuring the time spent hidden inside holes of each area and (3) the activity level by counting the number of area changes. Habitat choice and antipredator response experiment

was assessed in a total of 60 individuals per condition (30 individuals of each gender per condition), and three different experimental conditions were tested. In the first condition, *D. villosus* substrate avoidance was measured using GAL sediment as the unpolluted area and GAL Cd-spiked sediment as the polluted one. In the second condition, *D. villosus* substrate avoidance was measured as previously described but hiding was also measured by adding some refuges in both areas. Three plastic cylindrical tubes ($\varnothing$ 0.6 mm, 1.5 cm height) were equidistantly inserted inside each sediment at 1 cm from the periphery of the dish so as to create three holes (six holes in total) inside which *D. villosus* can take refuge by hiding its entire body. In the third condition, *D. villosus* both substrate avoidance and refuge use were assessed as previously described but antipredator responses were also assessed by replacing the 80 mL of dechlorinated tap water with 80 mL of scented water in each experimental unit. The scented water was prepared based on the protocol described in Sornom *et al.* (2012). Six starved bullheads *Cottus gobio* were placed for 24 h in a plastic aquarium (31×28×14 cm) filled with 6 L of dechlorinated, UV-treated, and oxygenated tap water. Thirty amphipods were offered to the bullheads to obtain a mean of five predation events per fish and per litre after 24 h. The procedure was expected to provide a predation signal close to that observed under natural conditions as it includes both the fish odour and the chemical cues released by injured amphipods (Åbjörnsson *et al.*, 2000; Wisenden *et al.*, 2001; Wudkevich *et al.*, 1997). Antipredator responses were assessed within the next 24 h following the preparation of scented water.

2.3. Statistical analysis

All data are reported as means $\pm$ SD. We used Student *t*-tests to assess the differences in the time spent in contact with each tested sediment. As normality and homogeneity of variances were observed in original data, statistically significant differences in the time spent in each refuge area and the number of area changes were assessed using analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey HSD post-hoc tests. All statistical tests were performed using STATISTICA software (Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

To verify if significant relationships existed between behavioural responses and individual lengths, correlations were performed and tested using Pearson correlation tests. As no significant effect of individual length was observed in the tested behaviours, the correlations are not illustrated. As no significant differences were observed between males

and females during behavioural tests, we decided to pool the genders for each condition in order to make the results more robust.

3. Results

3.1. Experiment #1

The isopod *A. aquaticus* significantly preferred the contaminated CHA sediment by spending about 60% of its time in contact with it during 1 h (Fig. 1). In contrast, the decapod *A. astacus* significantly avoided the contaminated sediment by spending about 60% of its time in contact with the control SIR sediment. The three amphipod species *G. roeseli*, *G. pulex* and *D. villosus* did not show any significant preference for either of the two tested sediments. The activity level of the tested species was ranged according to the following order: *G. pulex* > *G. roeseli* > *D. villosus* = *A. aquaticus* = *A. astacus* (Fig. 2).

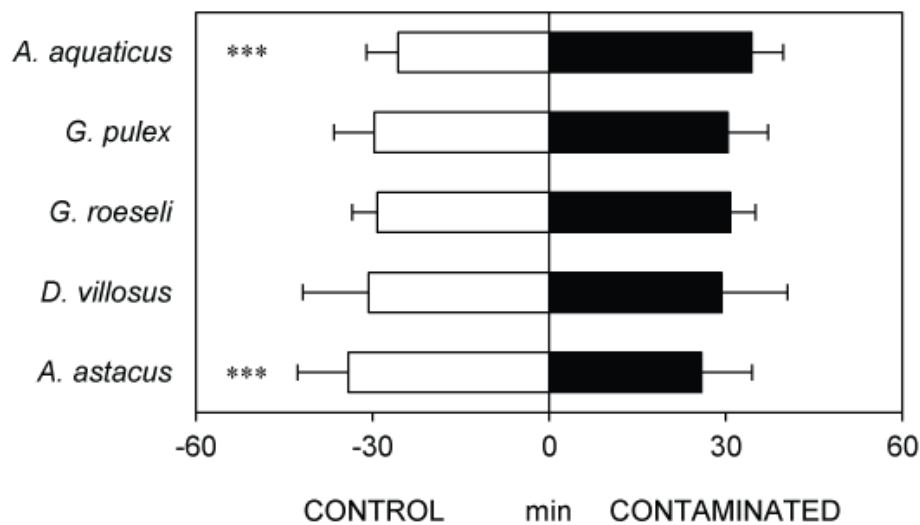


Fig. 1. Time (in min) spent in contact with control SIR or contaminated CHA sediment measured during 1h in *Asellus aquaticus*, *Gammarus pulex*, *Gammarus roeseli*, *Dikerogammarus villosus* and *Astacus astacus*. Significant differences are indicated by asterisks (Student *t* tests, *** $P < 0.001$). Data are means $\pm$ SD (N=30).

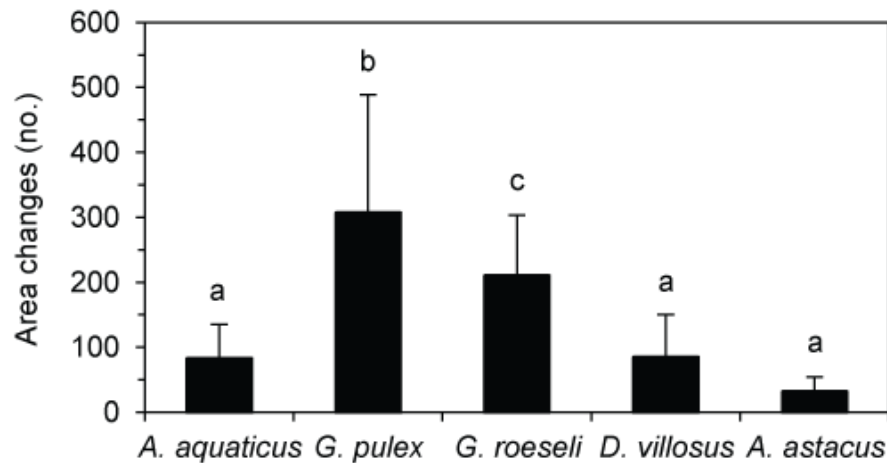


Fig. 2. Number of area changes between control SIR and contaminated CHA sediments measured during 1 h in *Asellus aquaticus*, *Gammarus pulex*, *Gammarus roeseli*, *Dikerogammarus villosus* and *Astacus astacus*. Significant differences are indicated by different letters (Tukey HSD post-hoc test after ANOVA, $P < 0.05$). Data are means $\pm$ SD (N=30).

3.2. Experiment #2

Dikerogammarus villosus significantly avoided the Cd-spiked GAL sediment by spending about 61%, 56% and 59% of its time within 1 h in contact with the control GAL sediment in the first, second and third experimental condition, respectively (Fig. 3). Whatever the tested condition, *D. villosus* spent less than 15% of its time inside refuges within 1 h and the presence of a high perceived risk of predation in the third condition did not induce a significant use of refuges. The number of area changes in all tested conditions was fairly similar and the presence of predation risk in the third condition did not induce a decrease in activity level (Fig. 4).

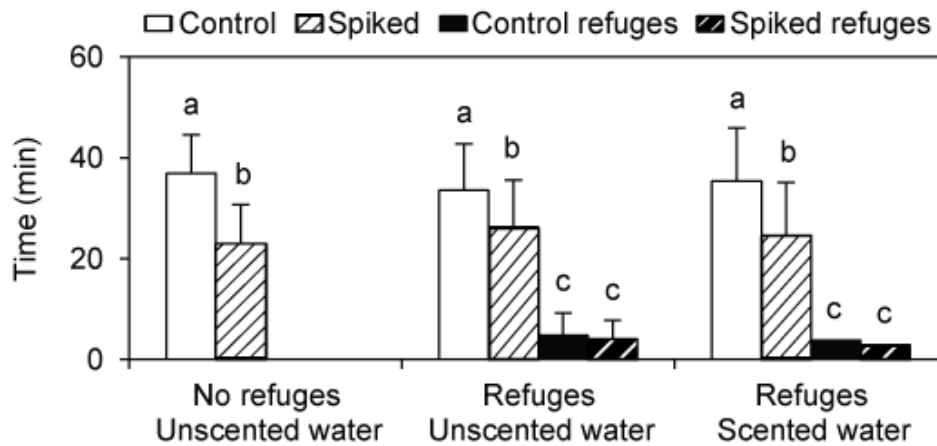


Fig. 3. Time (in min) spent in contact with control GAL (white full bars) or Cd-spiked (white hatched bars) GAL sediment and hiding inside refuges of control (black full bars) and Cd-spiked (black hatched bars) areas measured during 1 h in *Dikerogammarus villosus* exposed to three experimental conditions. Significant differences are indicated by different letters (Tukey HSD post-hoc test after ANOVA, $P < 0.05$). Data are means $\pm$ SD (N=60).

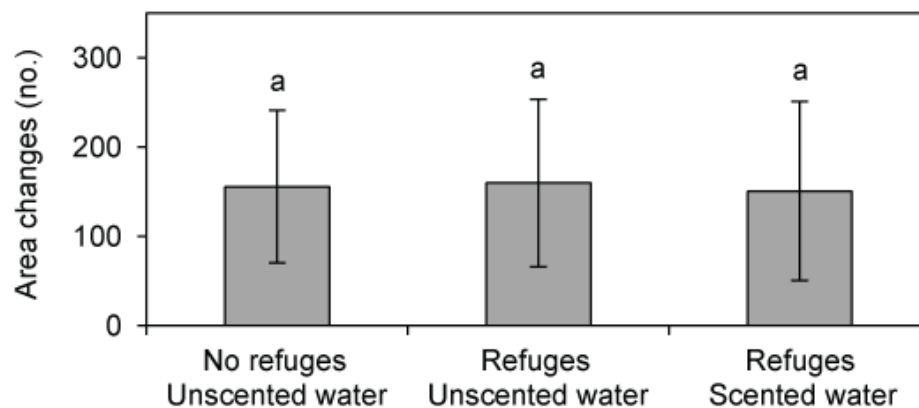


Fig. 4. Number of area changes between control GAL and Cd-spiked GAL sediments measured during 1 h in *Dikerogammarus villosus* exposed to three experimental conditions. Significant differences are indicated by different letters (Tukey HSD post-hoc test after ANOVA, $P < 0.05$). Data are means $\pm$ SD (N=60).

4. Discussion

According to our results in experiment #1, the decapod *A. astacus* seemed to be the most sensitive species when considering its avoidance behaviour of the contaminated sediment. This escape behaviour could make this crayfish a good candidate to develop a

behavioural test of contaminated sediment, but crayfishes have a long development time, can be difficult to keep in laboratory conditions and to use all year long. At the opposite, the isopod *A. aquaticus* are easy to keep alive and to make reproduce in laboratory but, in contrast to crayfish, *A. aquaticus* was the most insensitive species to the tested conditions. This result is in accordance with the high tolerance toward a wide range of pollutants reported for this species in the literature (Cao *et al.*, 1996; Gledhill *et al.*, 1993; Hynes, 1960) and its presence at high densities in polluted areas, including those exhibiting discharges of organic pollution (Hawkes, 1979; Moldovan *et al.*, 2001; Verdonshot, 1990). Asellids are also relatively tolerant to episodes of oxygen deficiency and low pH, having an intermediate sensitivity towards various substances, including metals (Maltby *et al.*, 1987; Økland, 1980). One of the most plausible hypotheses to explain the significant occurrence of *A. aquaticus* on the contaminated sediment is the use of field sediment which contained allochthonous organic matter (*e.g.* leaves), a palatable food source for isopods (Graça *et al.*, 1993; Marcus *et al.*, 1978). *Asellus aquaticus* is commonly found in areas with high levels of naturally occurring organic matter (Murphy and Leaner, 1982). This hypothesis is supported by a higher value of Total Organic Carbon observed in CHA sediment in comparison to SIR sediment.

Moreover, the toxicity differences between SIR and CHA sediments were not as high as expected. This could explain the absence of avoidance behaviour in the three tested amphipod species, while some studies have shown that amphipods can avoid contaminated sediments. For example, Kravitz *et al.* (1999) shown that the estuarine amphipod *Eohaustorius estuarius* significantly avoided sediments with both moderate and high PAH concentrations. A significant avoidance of contaminated sediments was also observed in the phoxocephalid amphipod *Rhepoxynius* spp. exposed to sediments mixed with domestic sewage or with Zn and Cd (Oakden *et al.*, 1984), in the amphipod *Monoporeia affinis* exposed to zinc pyrithione-spiked sediments (Eriksson Wiklund *et al.*, 2006) or in the amphipod *G. pulex* exposed to PAH-spiked sediments (De Lange *et al.*, 2006). In De Lange *et al.* (2006), the authors observed avoidance behaviours in both *G. pulex* and *A. aquaticus* exposed to clean field sediment spiked with four PAHs (*i.e.* fluoranthene, pyrene, chrysene, and benzo[k]fluoranthene) to a total concentration of 30 mg PAH/kg dry weight, a hundred-fold higher level than those observed in CHA sediment used in our study. If we wish to further investigate the potential use of the avoidance behaviour of crustaceans in ecotoxicological tests, there is a need to test the choice between clean artificial sediment and a laboratory

spiked one, which makes practical the control of conditions such as sediment toxicity or organic carbon content.

In the rest of our study, we chose to make this kind of approach (control vs spiked sediments) with the species that seems a good compromise between its sensitivity to contaminated sediment and its facility to sample in field, to keep alive in laboratory and to use in test. Hence, *D. villosus* was chosen because within amphipods, it showed the behaviour with the more important contact with the sediment. We can assume that *D. villosus* perceived the Cd-spiked sediment and avoided it significantly by spending more time upon the control sediment. This behaviour was not obtained in the first experiment with multi-contaminated sediment sampled in field. We can only speculate on the hypotheses sustaining this opposite results and several studies are needed to test if, for example, there are thresholds below which such gammarids are not disturbed by pollutants.

In amphipods, hiding and minimising displacements are supposed to reduce the risk to be spotted by a potential predator, which favours survival (Åbjörnsson *et al.*, 2004; Starry *et al.*, 1998; Wisenden *et al.*, 1999). Here, in experiment #2, both the use of refuge (in both control and spiked sediments) and the activity level were not modified by the addition of scented water. The absence of refuge use in *D. villosus* may be explained by a Cd stress-induced response which aims at reducing the probability of contact with the toxicant. This result suggests a possible deregulation of internal signalling pathways of information transfer by heavy metals such as Cd. Such pattern of Cd action on individuals (*e.g.* impairment of environment exploration performance) has already been shown in other studies (Honda *et al.*, 2008; Kusch *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2003; Somom *et al.*, 2012; Sullivan *et al.*, 1983). The ecological dimension of such results is of interest because amphipods may represent a key link in a trophic web. All modifications of predator-prey behaviours have severe potential consequences on the ecosystem functioning.

To conclude, the results observed in this study show that substrate avoidance behaviour tests can be proposed as an easy, quick and sensitive tool to assess the effects of sublethal exposure to contaminants. However, this approach should be used in complementarity of other ecotoxicological tests. Additionally, different species should be used in this kind of tests since species react and respond differently to chemicals.

Acknowledgements

We thank Philippe Rousselle for his technical support, Céline Vellinger for her help in gammarid sampling and Fanny Colas and Karen Burga Pérez for their help in sediment sampling.

References

- Åbjörnsson, K., Dahl, J., Nystrom, P., Bronmark, C., 2000. Influence of predator and dietary chemical cues on the behaviour and shredding efficiency of *Gammarus pulex*. *Aquat. Ecol.* 34, 379-387.
- Åbjörnsson, K., Hansson, L.A., Bronmark, C., 2004. Responses of prey from habitats with different predator regimes: local adaptation and heritability. *Ecology* 85, 1859-1866.
- Bird, G., Brewer, P.A., Macklin, M.G., Balteanu, D., Driga, B., Serban, M., Zaharia, S., 2003. The solid state partitioning of contaminant metals and As in river channel sediments of the mining affected Tisa drainage basin, northwestern Romania and eastern Hungary. *Appl. Geochem.* 18, 1583-1595.
- Cao, Y., Bark, A.W., Williams, W.P., 1996. Measuring the responses of macroinvertebrate communities to water pollution: a comparison of multivariate approaches, biotic and diversity indices. *Hydrobiologia.* 341, 1-19.
- Dabrin, A., Durand, C., Garric, J., Geffard, O., Ferrari, B.J.D., Coquery, M., 2012. Coupling geochemical and biological approaches to assess the availability of cadmium in freshwater sediment. *Sci. Total Environ.* 424, 308-315.
- De Lange, H.J., Peeters, E.T.H.M., Lüring, M., 2009. Changes in ventilation and locomotion of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) in response to low concentrations of pharmaceuticals. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15(1), 111-120.
- De Lange, H.J., Sperber, V., Peeters, E.T.H.M., 2006. Avoidance of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments by the freshwater invertebrates *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 452-457.
- Eriksson Wiklund, A.K., Börjesson, T., Wiklund, S.J., 2006. Avoidance response of sediment living amphipods to zinc pyrithione as a measure of sediment toxicity. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 96-99.

- Garcia, M., Römbke, J., Torres de Brito, M., Scheffczyk, A., 2008. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environ. Pollut.* 153, 450-456.
- Gerhardt, A., 1995. Monitoring behavioural responses to metals in *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea) with impedance conversion. *Environ. Sci. Pollut. R.* 2, 15-23.
- Gledhill, T., Sutcliffe, D.W., Williams, W.D., 1993. British freshwater malacostraca: a key with ecological notes. *Freshwater Biol. Assoc. Sci. Publ.* 52, 1-172.
- Graça, M.A.S., Maltby, L., Calow, P., 1993. Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus* I: feeding strategies. *Oecologia* 93(1), 139-144.
- Hare, L., Shooner, F., 1995. Do aquatic insects avoid cadmium-contaminated sediments? *Environ. Toxicol. Chem.* 14(6), 1071-1077.
- Hawkes, H.A., 1979. Invertebrates as indicators of river water quality; Chapter 2, in: James, A., Evinson, L. (Eds.), *Biological Indicators of Water Quality*. John Wiley and Sons, Ltd.
- Hellou, J., 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environ. Sci. Pollut. R.* 18(1), 1-11.
- Honda, R.T., Fernandes-de-Castilho, M., Val, A.L., 2008. Cadmium-induced disruption of environmental exploration and chemical communication in matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Aquat. Toxicol.* 89, 204-206.
- Hynes, H.B.N., 1960. *The biology of polluted waters*. Liverpool: Liverpool University Press.
- ISO/CD, 2003. Soil Quality - Avoidance test for testing the quality of soils and the toxicity of chemicals - Test with earthworms (*Eisenia fetida*). ISO 17512. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
- Kley, A., Kinzler, W., Schank, Y., Mayer, G., Waloszek, D., Maier, G., 2009. Influence of substrate preference and complexity on co-existence of two non-native gammarideans (Crustacea: Amphipoda). *Aquat. Ecol.* 43, 1047-1059.
- Kravitz, M.J., Lamberson, J.O., Ferraro, S.P., Swartz, R.C., Boese, B.L., Specht, D.T., 1999. Avoidance response of the estuarine amphipod *Eohaustorius estuarius* to polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated, field-collected sediments. *Environ. Toxicol.* 18, 1232-1235.
- Kusch, R.C., Krone, P.H., Chivers, D.P., 2008. Chronic exposure to low concentrations of waterborne cadmium during embryonic and larval development results in the long-

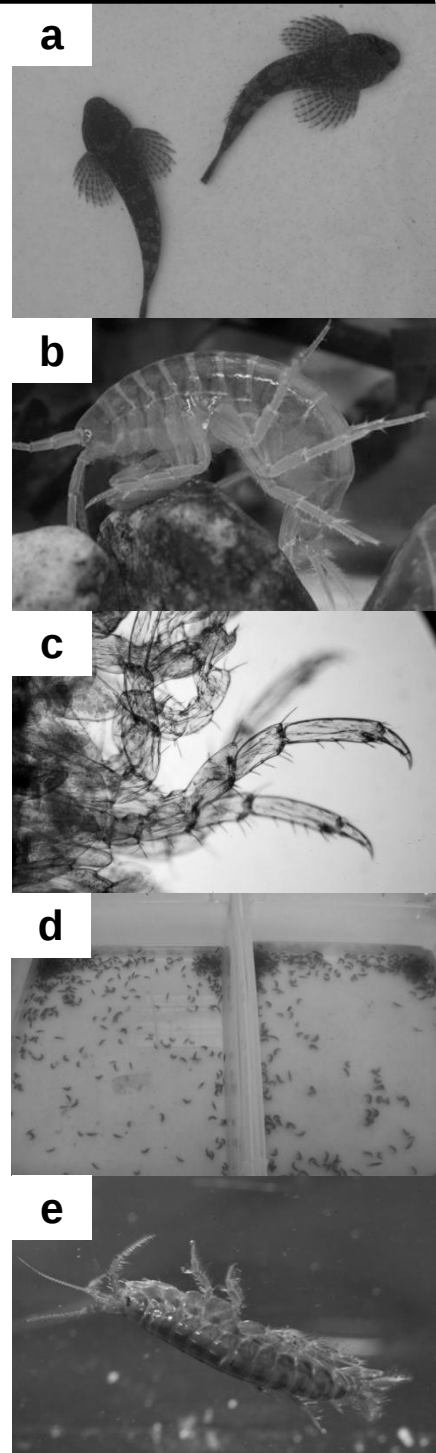
- term hindrance of antipredator behavior in zebrafish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 705-710.
- Li, X., Thornton, I., 2001. Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities. *Appl. Geochem.* 16, 1693-1706.
- Loureiro, S., Amorim, M.J.B., Campos, B., Rodrigues, S.M.G., Soares, A.M.V.M., 2009. Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae) and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda) using avoidance behaviour as an endpoint. *Environ. Pollut.* 157(2), 625-636.
- Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A., 2005. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environ. Pollut.* 138, 121-131.
- Maltby, L., Clayton, S.A., Wood, R.M., McLoughlin, N., 2002. Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as a bioindicator of water quality: robustness, responsiveness, and relevance. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 361-368.
- Maltby, L., Snart, J.O.H., Calow, P., 1987. Acute toxicity tests on the freshwater isopod, *Asellus aquaticus* using $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, with special reference to techniques and the possibility of intraspecific variation. *Environ. Pollut.* 43(4), 271-279.
- Marcus, J.H., Sutcliffe, D.W., Willoughby, L.G., 1978. Feeding and growth of *Asellus aquaticus* (Isopoda) on food items from the littoral of Windermere, including green leaves of *Elodea Canadensis*. *Freshwat. Biol.* 8, 505-519.
- Murphy, P.M., Learner, M.A., 1982. The life history and production of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) in the River Ely, South Wales. *Freshwat. Biol.* 12, 435-444.
- Natal da Luz, T., Ribeiro, R., Sousa, J.P., 2004. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site specific assessment of polluted soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(9), 2188-2193.
- Oakden, J.M., Oliver, J.S., Flegal, A.R., 1984. Behavioral responses of a phoxocephalid amphipod to organic enrichment and trace metals in sediment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 14, 253-257.
- Økland, K.A., 1980. Ecology and distribution of *Asellus aquaticus* (L.) in Norway, including relation to acidification lakes. Oslo, SNSF Project, report nr. IR 52/80, 1-70.
- Peeters, E.T.H.M., De Lange, H.J., Lüring, M., 2009a. Variation in the behavior of the amphipod *Gammarus pulex*. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15(1), 41-52.

- Peeters, E.T.H.M., Gerhardt, A., Amiard-Triquet, C., 2009b. Behavioral ecotoxicology: mechanisms, effects, applications, and biomonitoring. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15(1), 7-10.
- Poulton, M., Pascoe, D., 1990. Disruption of precopula in *Gammarus pulex* (L.): development of a behavioural bioassay for evaluating pollutant and parasite induced stress. *Chemosphere* 20, 403-415.
- Relić, D., Dordević, D., Popović, A., Blagojević, T., 2005. Speciations of trace metals in the Danube alluvial sediments within an oil refinery. *Environ. Int.* 31, 661-669.
- Rinderhagen, M., Ritterhof, J., Zauke, G.P., 2000. Crustaceans as bioindicators, in: Gerhardt, A. (Eds.), *Biomonitoring of Polluted Water - Reviews on Actual Topics*. Environ Res Forum, 9. Trans Tech Publications - Scitech Publications, pp. 161-194.
- Roos, M., Åström, M., 2005. Seasonal and spatial variations in major and trace elements in a regulated boreal river (Esse river) affected by acid sulphate soils. *River Res. Appl.* 21, 351-361.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., Rouleau, C., Wood, C.M., 2003. Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 206, 1779-1790.
- Smolders, A.J.P., Guerrero Hiza, M.A., van der Velde, G., Roelofs, G.M., 2002. Dynamics of discharge, sediment transport, heavy metal pollution and Sábalo (*Prochilodus linetaus*) catches in the lower Pilcomayo river. *River Res. Appl.* 18, 415-427.
- 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.
- 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: e42435.
- 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.
- Starry, O., Wanzenböck, J., Danielpool, D.L., 1998. Tendency of the amphipod *Gammarus roeseli* GERVAIS to colonize coarse sediment habitats under fish predation pressure. *Int. Rev. Hydrobiol.* 83, 371-380.
- Stephenson, G.L., Kausshik, A., Kausshik, N.K., Solomon, K.R., Steele, T., Scroggins, R.P., 1997. Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to

- earthworms, in: Sheppard, S., Bembridge, J., Holmstrup, M., Phostuma, L. (Eds.), *Advances in earthworms ecotoxicology*. A Technical Publication of SETAC, Amsterdam, pp. 67-81.
- Sullivan, B.K., Buskey, E., Miller, D.C., Ritacco, P.J., 1983. Effects of copper and cadmium on growth, swimming and predator avoidance in *Eurytemora affinis* (Copepoda). *Mar. Biol.* 77, 299-306.
- Taylor, D., 1983. The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotox. Environ. Safe.* 7, 33-42.
- van Hattum, B., de Voogt, P., van den Bosh, L., van Straalen, N.M., Joose, E.N.G., 1989. Bioaccumulation of cadmium by the freshwater isopod *Asellus aquaticus* (L.) from aqueous and dietary sources. *Environ. Pollut.* 62, 129-151.
- Van Riel, M.C., Healy, E.P., Van der Velde, G., Bij de Vaate, A., 2007. Interference competition among native and invader amphipods. *Acta Oecol.* 31, 282-289.
- Veeresh, H., Tripathy, S., Chaudhuri, D., Hart, B.R., Powell, M.A., 2003. Sorption and distribution of adsorbed metals in three soils of India. *Appl. Geochem.* 18, 1723-1731.
- Verdonschot, P.F.M., 1990. Ecological characterization of surface waters in the Province of Overijssel (the Netherlands). Ph.D. Thesis. Provinciale waterstaat van Overijssel/R.I.N, the Netherlands, 255 pp.
- Wisenden, B.D., Cline, A., Sparkes, T.C., 1999. Survival benefit to antipredator behavior in the amphipod *Gammarus minus* (Crustacea: Amphipoda) in response to injury-released chemical cues from conspecifics and heterospecifics. *Ethology* 105, 407-414.
- Wisenden, B.D., Pohlman, S.G., Watkin, E.E., 2001. Avoidance of conspecific injury released chemical cues by free-ranging *Gammarus lacustris* (Crustacea: Amphipoda). *J. Chem. Ecol.* 27, 1249-1258.
- 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.
- Wudkevich, K., Wisenden, B.D., Chivers, D.P., Smith, R.J.F., 1997. Reactions of *Gammarus lacustris* to chemical stimuli from natural predators and injured conspecifics. *J. Chem. Ecol.* 23, 1163-1173.

CHAPITRE IV

Stratégie De Réponse De Trois Amphipodes Face A Un Risque De Prédation



a

Le chabot commun *Cottus gobio* en acclimatation au laboratoire (Photo : P. Sornom).

b

L'amphipode *Gammarus pulex* au contact du substrat rocheux (Photo : H. Baktoft).

c

Les soies sensorielles des péréiopodes jouent un rôle majeur dans la détection de signaux chimiques dans l'eau, notamment ceux liés à un risque de prédation (Photo : photomacrography.net).

d

Séparation des gammares mâles et femelles avant leur acclimatation en laboratoire (Photo : P. Sornom).

e

Position du corps d'un gammare lors d'une réaction de fuite suite à la détection d'un risque de prédation, par exemple (Photo : N. Phillips).

Le but de cette étude a été d'évaluer les stratégies de réponse de trois espèces d'amphipodes face à des signaux chimiques de danger. Les invertébrés aquatiques constituent un compartiment essentiel du réseau trophique et les amphipodes fournissent des modèles biologiques pertinents pour étudier les stratégies d'anti-prédation. Généralement très abondants dans le milieu, les amphipodes constituent une part importante du régime alimentaire d'invertébrés, de poissons, d'oiseaux et d'amphibiens. Parmi les amphipodes exotiques introduits en France, certaines espèces, comme *Dikerogammarus villosus*, sont clairement invasives. Leur stratégie pour faire face à la prédation peut aider à expliquer leur succès par rapport à d'autres espèces.

Nous avons comparé comment l'espèce autochtone *Gammarus pulex*, l'espèce naturalisée *Gammarus roeseli*, et l'espèce invasive *Dikerogammarus villosus* se comportent face à un risque de prédation. Pour cela, nous les avons observés par un système de capture vidéo en conditions contrôlées après les avoir soumis à de l'eau exempte de tout signal de danger ou à de l'eau marquée à la fois par des poissons prédateurs et les congénères consommés par ces prédateurs. Lorsqu'ils sont exposés au risque de prédation, les trois espèces augmentent le temps passé dans les refuges. Un phénomène d'agrégation avec des congénères n'a été observé que chez *G. pulex*. Une augmentation de la vitesse de nage a été observée dans l'eau marquée à la fois chez *G. pulex* et *G. roeseli*, tandis que *D. villosus*, qui est en condition témoin le nageur le plus rapide, cesse de bouger lorsqu'il y a un risque élevé de prédation. *G. roeseli* et *D. villosus* réduisent également leurs activités d'exploration du milieu dans l'eau marquée, *D. villosus* étant de loin le moins actif. Dans l'ensemble, l'amphipode invasif *D. villosus* montre un comportement nettement différent de celui des deux autres espèces : ses réponses d'anti-prédation tendraient à le sous-exposer à la prédation, ce qui semble conforme à son succès invasif.

Les trois amphipodes testés montrent finalement des stratégies de comportements anti-prédateurs relativement différentes. Ces observations constituent une base que nous pouvons comparer à des comportements anti-prédateurs en présence de cadmium (Chapitres V.1 et V.2) pour explorer une dimension écologique de l'impact de ce polluant.

Species differences in how a native, a naturalised and an invasive freshwater amphipod behave under predation risk

Research article

Pascal Sornom ^{1*}, Vincent Médoc ², Jean-Nicolas Beisel ¹

¹ Laboratoire des Interactions, Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), CNRS UMR 7146, Université de Lorraine, Metz, France

² Laboratoire Ecologie et Evolution, CNRS UMR 7625, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, France

* Author for correspondence: P. Sornom, Laboratoire des Interactions, Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), CNRS UMR 7146, Université de Lorraine, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France (e-mail: pascal.sornom@univ-metz.fr)

Abstract

Aquatic invertebrates and especially amphipods provide relevant biological models to study antipredator strategies as they dominate the diet of various upper trophic level consumers including larger invertebrates, fish, birds and amphibians. Among amphipods, some species are strong invaders and inter-specific differences in their ability to face predation may help explain their success compared to native ones. Here, we investigated how the native *Gammarus pulex*, the naturalised *Gammarus roeseli*, and the invasive *Dikerogammarus villosus* behave under predation risk by subjecting them to water scented by both fish and injured conspecifics in laboratory experiments. When exposed to predation risk, the three species increased the time spent in refuges. Aggregation with conspecifics was observed only in *G. pulex*. An increase of swimming speed was observed in both *G. pulex* and *G. roeseli* whereas *D. villosus*, which was the fastest amphipod in control water, stopped moving under predation risk. Both *G. roeseli* and *D. villosus* also decreased their exploration activity, with *D. villosus* being the less active. Overall, *D. villosus* behaviour clearly differed from that of the two other amphipods and we expect it to be less exposed to predation as a consequence of our behavioural observations, which is consistent with its invasive success.

Keywords

Activity level; Aggregation; Freshwater amphipod; Antipredator behaviour; Refuge use; Swimming speed

1. Introduction

Predation is considered as a major selective force in the evolution of numerous traits developed by the interacting organisms (Sih, 1987; Abrams, 2001; Kinzler & Maier, 2006). In aquatic ecosystems, predator recognition can be mediated by visual, hydrodynamical and auditory cues (Peckarsky, 1980; Kalmijn, 1988; De Meester, 1993; Åbjörnsson *et al.*, 1997), but mostly relies on the perception of chemical cues (Kats & Dill, 1998; Brönmark & Hansson, 2000; Krang & Baden, 2004). It can be the scent of the predator itself (Dahl *et al.*, 1998), that of its diet (Chivers *et al.*, 1996), or the cues emitted by injured conspecifics (Sih, 1987; Chivers & Smith, 1998). These signals are used by prey to assess not only the presence but also the activity and the hunger of predators (Alexander & Covich, 1991; Appelberg *et al.*, 1993; Mathis & Hoback, 1997). In response to predator presence, prey can display chemical, structural or behavioural defences that reduce their profitability, or compromise other activities such as foraging or mating to avoid encounters with predators (Endler, 1991).

Amphipods are the prey of various upper trophic-level predators including other invertebrates, vertebrates and especially fish (MacNeil *et al.*, 1999a, b; Grabowska & Grabowski, 2005; Kakareko, 2005). Amphipods are known to be sensitive to the scent of fish (Williams & Moore, 1986; Dezfuli *et al.*, 2003; Baldauf *et al.*, 2007; Perrot-Minnot *et al.*, 2007; Pennuto & Keppler, 2008), crayfish (Williams & Moore, 1985; Hesselschwerdt *et al.*, 2009), and also to the cues emitted from damaged conspecifics (Wudkevich *et al.*, 1997; Wisenden *et al.*, 1999, 2001). Under predation risk, they increase the time spent in refuges (Baumgärtner *et al.*, 2002; Åbjörnsson *et al.*, 2004) and decrease their activity level (Williams & Moore, 1985; Holomuzki & Hoyle, 1990; Wudkevich *et al.*, 1997). These behavioural adjustments reduce the probability of encounters with predators and thus increase the survival of amphipods (Williams & Moore, 1982; Holomuzki & Hoyle, 1990; Starry *et al.*, 1998; Wooster, 1998; Wisenden *et al.*, 1999). Gregarious behaviour is considered as a form of cover-seeking which also tends to decrease the individual risk of predation (Williams, 1964; Hamilton, 1971; Campbell & Meadows, 1974). Grouping with conspecifics can be an effective antipredator behaviour displayed by amphipods as it has been shown in *Gammarus pulex* placed in stickleback-conditioned water (Kullmann *et al.*, 2008).

Although amphipods are increasingly used as model organisms, little is known about inter-species variability in antipredator strategies (but see Bollache *et al.*, 2006). Understanding how closely related amphipods differ in their antipredator responses may

nevertheless be of importance when it comes to predict the response of aquatic communities to changing biotic conditions, for instance, in the context of biological invasions. Of the 43 alien freshwater invertebrates reported in France, nine are amphipods (Devin *et al.*, 2005) and some of them are strong invaders that greatly affect the indigenous fauna (*e.g.* *Dikerogammarus villosus*, Van der Velde *et al.*, 2000; Dick *et al.*, 2002; Krisp & Maier, 2005). Discovering interspecific differences in the ability to face predation may thus help us to explain the establishment and persistence of such invaders, and why they sometimes contribute to the exclusion of native species.

Here, we addressed the question of interspecific differences in predation-induced behavioural changes using three freshwater amphipods: *Gammarus pulex*, *Gammarus roeseli* and *Dikerogammarus villosus*. They are well distributed in Western Europe and can occasionally be found living in sympatry (Bauer *et al.*, 2000; Moret *et al.*, 2007). *Gammarus pulex* and *G. roeseli* are of equivalent sizes whereas *D. villosus* is much larger (Dick & Platvoet, 2000; Dick *et al.*, 2002). Of the three amphipods, *G. roeseli* is the only species having dorsal spines, which are effective against predatory fish (Bollache *et al.*, 2006). In the study area (northeastern France), *G. pulex* is considered native whereas *G. roeseli*, which is of Balkan-European origin, was first observed in France (vicinity of Paris) about 177 years ago (Jazdzewski, 1980) and is now considered as naturalised. *Dikerogammarus villosus*, which is well established in the River Moselle (France) since 1999 (Devin *et al.*, 2001), is a more recent invader native to the Ponto-Caspian region. According to Pöckl (2009), this exotic species is characterised by a (1) long reproductive period, (2) early sexual maturity, (2) short generation time, (3) a short life, (4) high growth rates resulting in large body size, (5) short duration of embryonic development, (6) large numbers of small eggs in the brood pouch, (7) large reproductive capacity, and (8) optimal timing to release the maximum number of neonates per female. Such life history traits have been shown to be among the most important traits which determine the success of invasive gammarids (Van der Velde *et al.*, 2000; Devin & Beisel, 2007; Grabowski *et al.*, 2007). It has also been shown that other factors such as *D. villosus* aggressiveness and voracity sometimes explain the replacement of local invertebrates including already established amphipods (MacNeil & Platvoet, 2005; Kinzler *et al.*, 2009).

In the present study, we measured refuge use, activity and aggregation for each amphipod species, in control and scented water. Contrary to refuge use and aggregation, adjustments in swimming speed have, to our knowledge, rarely been regarded as a response to predation risk in amphipods (see Médoc & Beisel, 2008). They may nevertheless decrease

their swimming speed to reduce their conspicuousness or conversely increase it to better escape the predator. Furthermore, trade-offs may occur between refuge use, aggregation and swimming speed. We expected the three amphipods to react to predation risk by increasing refuge use, aggregation, and swimming speed.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and housing

Specimens of *G. roeseli*, *G. pulex* and *D. villosus* were collected using a hand net (5 mm mesh) during summer 2009, from three unpolluted stations in northeastern France; the river Nied (Remilly, 49°00'N and 6°23'E), the river Esch (Jezainville, 48°52'N and 6°02'E) and the river Moselle (Saulcy, 49°07'N and 6°10'E), respectively. To avoid bias induced by gammarid length/age, we selected intermediate-sized adults (≈ 11 mm for *G. pulex* and *G. roeseli*, and 14 mm for *D. villosus*). Similarly, to standardise the physiological condition, juveniles or females carrying eggs were not sampled. Since acanthocephalan parasites are known to modify amphipod behaviours (Bauer *et al.*, 2000; Kaldonski *et al.*, 2007; Perrot-Minot *et al.*, 2007; Baldauf *et al.*, 2008; Médoc & Beisel, 2008), infected individuals (only observed in *G. pulex* and *G. roeseli*) were excluded from the study. The infective stages could easily be detected, as they are visible through amphipod translucent cuticle. Specimens were brought to the laboratory within one hour in 3 L opaque plastic tanks filled with site water. We placed some leafs collected from the sites in each tank to reduce the stress induced by handling and transport. In the laboratory, the three amphipod species were maintained separately at a maximum density of 20 individuals per litre in plastic aquaria (31×28×14 cm, length×width×height) filled with dechlorinated, UV-treated, and oxygenated tap water and equipped with glass pebbles ($\varnothing=15$ mm, convex side down) and artificial plants which provide benthic refuges to avoid cannibalism. They were fed ad libitum with Alder-leaf disks. The room temperature was kept constant at $18\pm 1^\circ\text{C}$ and the light:dark cycle was 12:12 h. Amphipods were housed under these conditions for 72 h before experiments. Unused *G. pulex* and *G. roeseli* specimens that remained after testing were brought back to their respective sampling site within a maximum time of one week, while *D. villosus* specimens, as an invasive species, were used to feed fish and were not released to the field.

As predator, we selected the bullhead *Cottus gobio*, a native and widespread fish species in northeastern France. The bullhead is known to include amphipods in its diet and is frequently used to assess invertebrate antipredator behaviours (Perrot-Minnot *et al.*, 2007; Kaldonski *et al.*, 2008). *Cottus gobio* was found at all three gammarid sampling sites. A total of 20 fish of equivalent sizes (≈ 9 cm) were collected in summer 2009 using a pond net (5 mm mesh) from the river Moselle. Fishing was made and supervised by the Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA). Bullheads were transported within one hour in a 30 L aerated opaque plastic tank filled with site water. In the laboratory, they were maintained at a density that did not exceed one fish per litre in aquaria (60×29×31 cm) filled with dechlorinated, UV-treated, and oxygenated tap water. In each housing unit, we added coarse gravel and stones (>1 cm) and some artificial plants to minimise aggression between individuals. Housing took place in the same room as for amphipods to benefit from the same conditions regarding temperature and light:dark cycle. Fish were maintained under these laboratory conditions for one week before experiments began. During this time, fish were fed ad libitum with living gammarids randomly sampled from the amphipod collection sites and were deprived of food for 72 h before being used for the preparation of the scented water. All bullheads were later released at the fishing site within a maximum time of one week.

2.2. Preparation of the scented water

Based on a protocol described in Somom *et al.* (2012), three groups of six starved bullheads (one group per amphipod species) were placed for 24 h in three plastic aquaria (31×28×14 cm), each filled with 6 L of dechlorinated, UV-treated, and oxygenated tap water. Different amounts of amphipods depending on the species were offered to the bullheads (36 for *G. roeseli* and *G. pulex*, 30 for *D. villosus* that is larger than the previous) to obtain a mean of five predation events per fish and per litre after the 24 h exposure. This process was expected to provide a predation signal close to that observed under natural conditions as it includes both the fish odour and the chemical cues released by injured amphipods (Wudkevich *et al.*, 1997; Åbjörnsson *et al.*, 2000; Wisenden *et al.*, 2001). Behavioural tests were performed within the next 24 h following the preparation of the scented water.

2.3. Experiment #1: refuge use and aggregation

Description of the experimental units. The experimental unit was made of a plastic cylindrical tank ($\varnothing=25$ cm, 31 cm height) open to the air and filled with 6 L of water, which represented a water level of 11 cm. Four equidistant plastic cylindrical cages ($\varnothing=4$ cm, 13 cm height, 1 mm mesh) were placed vertically on the bottom of the unit at 2 cm from the edge. Two diametrically opposed cages received 10 conspecifics (five individuals of each gender) and the two others were kept empty (for details see Sornom *et al.*, 2012).

Experimental design. Experimental units were placed alone in a hermetic box (50×46×62 cm) with three red-light emitting lamps and a digital video camera inside to film the horizontal plan (see Médoc *et al.*, 2009; Sornom *et al.*, 2010, 2012). Red light was preferred to white light as amphipods display negative phototaxis. Before the start of the test, a translucent plastic tube ($\varnothing=3$ cm, 14 cm height) open to the air was placed at the middle of the experimental unit. A single amphipod was introduced inside the tube using a brush. After a 1 min acclimatisation period, the tube was removed and filming began for 3 min at a rate of 20 frames per second. Each amphipod was used only once and experiments were conducted first with control and then with scented water, and repeated 30 times per gender, which represented 360 individuals on the whole for each experiment. Every five amphipods the water was renewed and a 90° rotation of the experimental unit was performed to avoid a position effect. The 10 conspecifics enclosed in the cages were not changed throughout the experiment to keep the level of attractiveness constant. At the end of each experiment, all amphipods were sacrificed, measured to the nearest mm (from the tip of the rostrum to the base of the telson) under a binocular magnifying glass (Leica MZ 125) fitted with an eyepiece micrometer (Zeiss, 10×) and were dissected to control for the absence of manipulative parasite. To test the potential effect of gender in the measured responses, amphipod gender was determined a priori based on gnathopods, which are typically larger in males and was confirmed a posteriori by examining the 7th ventral segment (genital papillas only present in males).

Data analysis. We analysed the videos by first measuring the proportion of the time spent in refuges (TIR), *i.e.* the time spent close to both empty cages and cages filled with conspecifics. We secondly estimated aggregation (AGG) by focusing on the periods during which amphipods clung to cages and measuring the proportion of the time spent close to

cages containing conspecifics. Individuals were considered in a refuge area only when being immobile and clinging to cages during more than one second.

2.4. Experiment #2: swimming speed and activity level

Description of the experimental units. The second experimental unit was made of a similar plastic cylindrical tank as described in experiment #1 section, filled with 6 L of water. A round plexiglass plate ($\varnothing=25$ cm, 13 mm height) was placed at the bottom of the unit. The plate was drilled so as to create, at 2 cm from the periphery, four equidistant groups of holes called refuge areas hereafter. Each refuge area was composed of seven equidistant holes ($\varnothing=8$ mm, 10 mm depth) inside which amphipods can take refuge by hiding its entire body (for details see Sornom *et al.*, 2012).

Experimental design. The experimental design used in experiment #2 was similar to experiment #1.

Data Analysis. The highest swimming speed (HSS) of amphipods between two refuge areas was calculated using unpublished software developed at the LIEBE laboratory. The software locates the moving subject in a given area and computes its XY coordinates into displacement metrics. We also recorded the number of refuge areas used (NRU) by a single amphipod as an estimate of its activity level. A refuge was considered as used by amphipods only when its body (excluding antennae) was inside a hole during more than one second.

2.5. Statistics

As no significant differences were observed between males and females during behavioural tests, we decided to pool the genders for each species and each condition in order to make the results more robust. All data are reported as means $\pm$ SD. As normality and homogeneity of variances were observed in original data, two way analyses of variance (ANOVA) were performed to detect statistically significant effects of (1) species and (2) water scent in antipredator behaviours and to highlight the potential interactions between those factors. Moreover we determined significant differences in TIR, AGG, HSS and NRU among species and water conditions by Tukey HSD post-hoc tests after ANOVA.

Correlations were performed to verify if significant relationships existed between behavioural indices and individual lengths (for each species) and were tested using Pearson correlation tests (not illustrated).

3. Results

3.1. Experiment #1: refuge use and aggregation

In control water, TIR values for *G. pulex* and *G. roeseli* were fairly similar while *D. villosus* spent significantly more time in refuge than the two other species (Fig. 1). In the presence of scented water, both *G. roeseli* and *G. pulex* significantly increased refuge use while *D. villosus* showed the same level of refuge use regardless of fish cues, with the following TIR gradient: *D. villosus* > *G. roeseli* = *G. pulex*. The ANOVA confirmed the significant effect of species, water scent and a species $\times$ water scent interaction in TIR (Table 1). Concerning AGG, the time spent close to conspecifics was fairly similar in control water between the three species (Fig. 2). In the presence of scented water, *G. pulex* was the only species to increase its refuge use by aggregation. The ANOVA also confirmed the significant species $\times$ water scent interaction in AGG (Table 1).

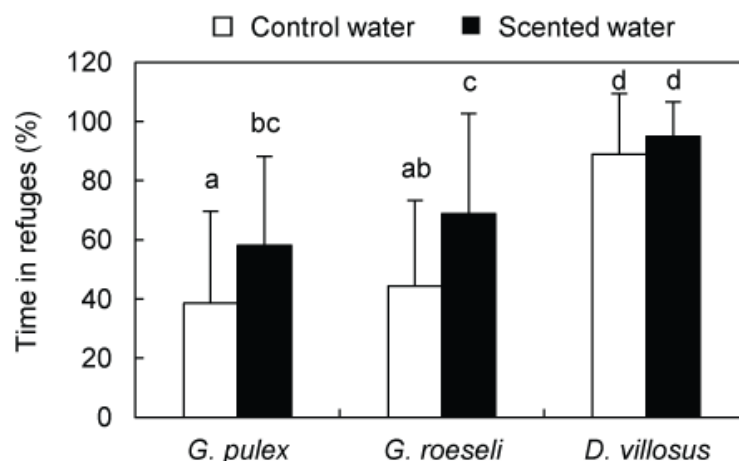


Fig. 1. Proportion of the time spent in refuges (mean $\pm$ SD) by *G. pulex*, *G. roeseli* and *D. villosus* in the presence of control (open bars) or scented water (filled bars). Significant differences are indicated by different letters (N=60; Tukey HSD post-hoc test after ANOVA; $P < 0.05$)

Table 1. Analyses of variance investigating variations in the time spent in refuges (TIR) and aggregation (AGG) measured in experiment #1 and the highest swimming speed (HSS) and the number of refuge areas used (NRU) measured in experiment #2 in *G. pulex*, *G. roeseli* and *D. villosus*, according to species and water scent.

Parameter	Source of variation	DF	F	P
TIR	Species	2	87.413	<0.0001
	Water scent	1	34.005	<0.0001
	Species × Water scent	2	3.684	0.0261
AGG	Species	2	1.190	0.3056
	Water scent	1	1.397	0.2381
	Species × Water scent	2	4.747	0.0092
HSS	Species	2	67.230	<0.0001
	Water scent	1	20.396	<0.0001
	Species × Water scent	2	45.891	<0.0001
NRU	Species	2	18.9090	<0.0001
	Water scent	1	14.1390	0.0002
	Species × Water scent	2	3.1858	0.0425

Significant *P* values are shown in bold

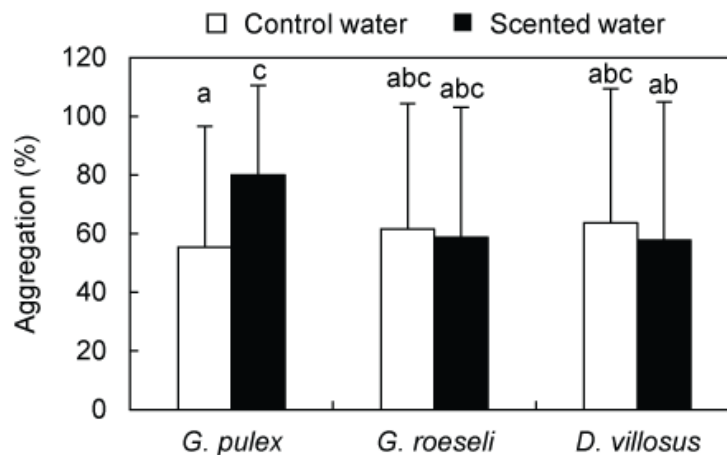


Fig. 2. Proportion of the time spent close to conspecifics (mean±SD) by *G. pulex*, *G. roeseli* and *D. villosus* in the presence of control (open bars) or scented water (filled bars). Significant differences are indicated by different letters (N=60; Tukey HSD post-hoc test after ANOVA; $P < 0.05$)

Gammarus pulex length ranges were 7.91–12.56 and 8.14–11.63 mm for females and 10.35–16.05 and 11.28–15.93 mm for males, with control and scented water, respectively. *Gammarus roeseli* length ranges were 8.49–11.05 and 8.72–11.40 mm for females and 9.88–

13.72 and 9.53–13.37 mm for males, with control and scented water, respectively. *Dikerogammarus villosus* length ranges were 11.97–16.32 and 10.53–14.61 mm for females and 14.87–19.21 and 13.16–19.08 mm for males, with control and scented water, respectively. No significant effect of gammarid length was observed for TIR or AGG (Pearson correlation tests, $P > 0.05$; not illustrated).

3.2. Experiment #2: swimming speed and activity level

In control water, *G. pulex* and *G. roeseli* swam at a comparable speed when moving from one refuge area to another while *D. villosus* swam significantly faster than the two other species (Fig. 3). In scented water, both *G. pulex* and *G. roeseli* significantly increased its swimming speed, with *G. roeseli* being the fastest. On the contrary, *D. villosus* did not show any displacements between two groups of refuge areas in scented water, all the individuals being prostrated during the 3 min video. The ANOVA emphasised a significant effect of species, water scent and a species $\times$ water scent interaction in HSS (Table 1). Concerning NRU, in control condition *G. roeseli* was the more active amphipod and *D. villosus* the less active, with *G. pulex* NRU values being intermediate (Fig. 4). In the presence of scented water, NRU values significantly decreased in *G. roeseli* and *D. villosus*, with *D. villosus* remaining the least active species when faced with predation risk, whereas no significant effect of scented water was observed in *G. pulex*. The ANOVA confirmed a significant effect of species, water scent and a species $\times$ water scent interaction in NRU.

Gammarus pulex length ranges were 7.79–11.63 and 8.14–11.16 mm for females and 10.70–15.81 and 10.93–14.88 mm for males, with control and scented water, respectively. *Gammarus roeseli* length ranges were 8.84–11.86 and 8.49–11.40 mm for females and 10.47–13.26 and 9.88–13.72 mm for males, with control and scented water, respectively. *Dikerogammarus villosus* length ranges were 10.66–16.18 and 11.32–14.34 mm for females and 14.74–20.00 and 13.68–19.08 mm for males, with control and scented water, respectively. No significant effect of gammarid length was found for HSS or NRU (Pearson correlation tests, $P > 0.05$; not illustrated).

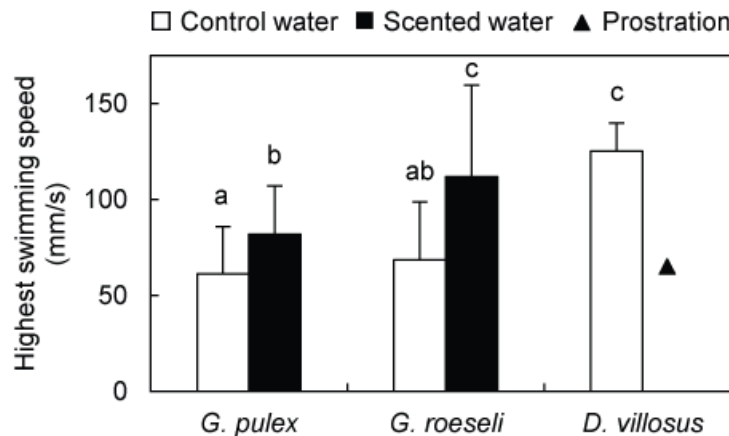


Fig. 3. Highest swimming speed recorded between two refuge areas (mean±SD) in *G. pulex*, *G. roeseli* and *D. villosus* in the presence of control (open bars) or scented water (filled bars). A filled triangle indicates the absence of movement between refuge areas in scented water for *D. villosus*. Significant differences are indicated by different letters (N=60; Tukey HSD post-hoc test after ANOVA; $P < 0.05$)

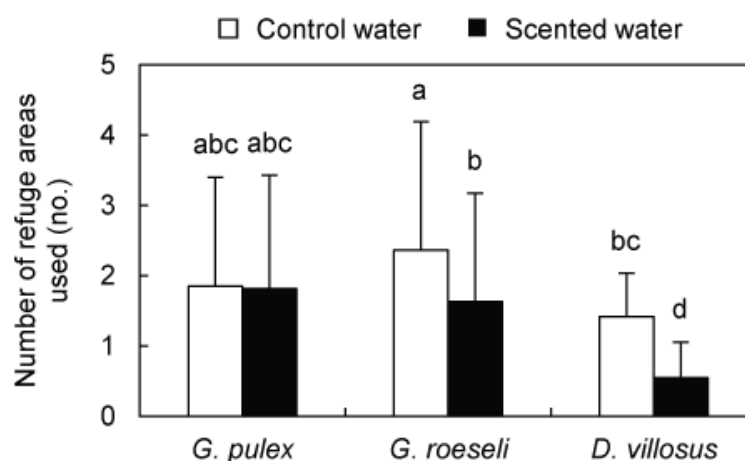


Fig. 4. Number of refuge areas used (mean±SD) by *G. pulex*, *G. roeseli* and *D. villosus* in the presence of control (open bars) or scented water (filled bars). Significant differences are indicated by different letters (N=60; Tukey HSD post-hoc test after ANOVA; $P < 0.05$)

4. Discussion

In control conditions, we observed behavioural differences among the three tested species. *Gammarus pulex* and *G. roeseli* spent less time in refuges and visited more refuge areas than *D. villosus*, which coincides with their habitat use in natural conditions: *D. villosus*

prefers hard and stony substrates, which favour prostration and induce little swimming time (Devin *et al.*, 2003; Van Riel *et al.*, 2006; MacNeil *et al.*, 2010; Boets *et al.*, 2012), whereas *G. pulex* or *G. roeseli* are found more frequently in the water layer (Van Riel *et al.*, 2007; Kley *et al.*, 2009). Although amphipods in general are opportunistic feeders displaying a wide range of feeding habits, *D. villosus* differs from the others by its strong predatory behaviour, to such an extent that it has been nicknamed “killer shrimp” (Dick & Platvoet, 2000; Dick *et al.*, 2002; MacNeil & Platvoet, 2005). Some morphological adaptations to predation have been reported in this species, like well-developed second antennae with hooked setae and adapted gnathopods to facilitate prey capture, adapted mouthparts allowing invertebrate predation during intermoult, and a very large body size (Platvoet *et al.*, 2009). From a behavioural perspective, adaptations to this lifestyle are also perceptible and *D. villosus* is described as an ambush predator that attacks from a “den”, a place that both offers protection and allows a quick attack (Platvoet *et al.*, 2009). Even if invasive species have been proved to be less active than native ones (Kinzler & Maier, 2006; Van Riel *et al.*, 2007), little is known about swimming speed comparisons. Our results showed that *D. villosus* was less active than *G. pulex* and *G. roeseli* by visiting a smaller number of refuge areas, but swam significantly faster. In other words, *D. villosus* did not move often, but when it did it moved fast. In general, fast individuals should be favoured by natural selection in predator-prey systems (Watkins, 1996; Plaut, 2001; Walker *et al.*, 2005): (1) from the predator’s perspective, the faster the attack, the higher the probability to successfully capture the prey and (2) from the prey’s perspective and if the prey does not display morphological defences such as shells, then the faster the escape, the higher the probability of surviving a predator attack. Contrary to *G. pulex* and *G. roeseli*, *D. villosus* spent most of its time in refuges even in control water. Even if such behaviour is probably a result of its predatory life style and not a direct anti-predator response, it may give an advantage when facing predators. This is also consistent with the fact that during experiment #2, *D. villosus* visited a smaller number of refuge areas than both *G. pulex* and *G. roeseli*, therefore minimising its displacements and the associated risk of being spotted by a potential predator.

In the presence of scented water, we not only observed behavioural adjustments in response to a high perceived predation risk but also significant interspecific differences. When exposed to chemical signals of predation, *G. pulex* and *G. roeseli* decreased their activity level by spending more time in refuges and *G. roeseli* also decreased the number of refuge areas visited, which has already been observed by Baumgärtner *et al.* (2002) and Kaldonski *et al.*

(2007). These responses are in accordance with the general decrease in locomotor activity and drift rate reported in several gammarid species when exposed to predation risk (Williams & Moore, 1982, 1985; Andersson *et al.*, 1986; Andersen *et al.*, 1993; Wudkevich *et al.*, 1997; Åbjörnsson *et al.*, 2000; Bollache *et al.*, 2006). Increasing the time spent in refuges is a key antipredator behaviour and invertebrate prey that display it under predation risk are assumed to reduce their conspicuousness and hence their vulnerability to visual feeding fish (Van Son & Thiel, 2006). *Gammarus pulex* was the only amphipod to show a tendency to gather with conspecifics under predation risk. This is consistent with recent literature on *G. pulex* (Kullmann *et al.*, 2008; Thünken *et al.*, 2010) whereas aggregation had not yet been investigated in *G. roeseli* and *D. villosus*. Aggregation may confuse predators because of the large amount of prey items and decreases individual predation risk since the larger the group, the smaller the probability for a single individual to be caught by the predator (Codella & Raffa, 1995; Krakauer, 1995). In turn, it may also facilitate detection by predators and induce competition for food, refuge, mating, in addition to promoting cannibalism, and facilitating parasite transmission (Krause & Ruxton, 2002). The extent to which an individual gathers with conspecifics is thus a trade-off between reduced predation risk and aggregation-induced costs. Contrary to *G. pulex*, *G. roeseli* has dorsal spines that increase handling time by predators and thereby reduce individual predation risk (Bollache *et al.*, 2006). This morphological advantage together with aggregation-induced costs may explain why *G. roeseli* did not invest in aggregation. *Dikerogammarus villosus* has no dorsal spines but is larger and more robust than *G. pulex* and *G. roeseli*. Since prey-handling time generally increases with prey size (Hoyle & Keast, 1987; Nilsson *et al.*, 1995; Nilsson & Brönmark, 2000), the size of *D. villosus* represents a morphological advantage against predation compared to smaller amphipods. Furthermore, *D. villosus* has a sit-and-wait strategy and shows aggressiveness towards any potential prey including conspecifics. Aggregation might thus induce important costs regarding competition for food and cannibalism. This, together with the advantage of a large body size may explain why *D. villosus* did not show interest in grouping with conspecifics.

Next to the questions of refuge use and aggregation, we investigated whether the tested amphipods adapt their swimming speed when leaving a refuge under predation risk. *Gammarus pulex* and *G. roeseli* both reacted to chemical stimulation by increasing their swimming speed. At the opposite, *D. villosus* did not use the water column to swim from one refuge area to another but remained almost motionless in confined spaces (*i.e.* within refuge

areas or at the periphery of the experimental unit), to such an extent that we could not measure its swimming speed when leaving a refuge area as for *G. pulex* and *G. roeseli*. As hypothesised by Ábjörnsson *et al.* (2004), amphipods may display different antipredator strategies according to the type of predators they are exposed to: (1) large invertebrate predators may be avoided by swimming away from dense structures (*e.g.* vegetation) where they can be found (*i.e.* decreasing refuge use/increasing activity level); (2) fish predators may be avoided by hiding in dense structures (*i.e.* increasing refuge use/decreasing activity level). Thus a difference in the range of predators amphipods are exposed to may help to explain behavioural interspecific differences in the presence of scented water: in natural conditions *G. pulex* and *G. roeseli* are consumed by both fish and other invertebrates whereas *D. villosus* experiences few invertebrate predators and is assumed to occupy the same trophic level as some predatory fish species (Marguillier, 1998). Further investigations including predation tests are needed to compare the efficiency of each strategy in terms of attractiveness and survival to various predators.

Furthermore, our findings can be placed in the context of biological invasions. Predation is a key factor which can structure prey population dynamics in a given area. *Dikerogammarus villosus* as an invasive species has been shown to have a lower predation risk by fish than native amphipods, including *G. pulex* and *G. roeseli* (Kinzler & Maier, 2006; Kley *et al.*, 2009), which can be partly explained by the behaviours observed in our study. Pennuto & Keppler (2008) suggested that superiority in predator avoidance behaviour in invasive gammarids when faced with fish may lead to increased predation on native ones. We also assume that effective antipredator responses to a wide array of predators could be characteristic for invasive gammarids and could contribute to their success in their novel habitats. More efficient responses to predation than native amphipods could be cumulative to life history traits and reproductive capacity (Pöckl, 2009) to explain the invasive success of this Ponto-Caspian amphipod. Lagrue & Bollache (2006) have shown that *G. roeseli* degraded slower than *G. pulex* in the stomachs of bullhead *C. gobio*, probably due to the presence of dorsal spines and perhaps a more resistant exoskeleton in *G. roeseli*. In parallel, Bollache *et al.* (2006) found that *G. roeseli* was more often rejected by fish predators than *G. pulex*. If the differences of antipredator behavioural responses in the three tested gammarid species significantly influences their survival when facing a predator can be the next step to be investigated.

To conclude, the behaviour of the three tested amphipods not only differed in control condition but was also significantly impacted by the presence of chemical cues from a fish predator and from damaged conspecifics, underlining (1) the relevance and the sensitivity of behavioural endpoints as early warning signals of physical or chemical stressors, (2) the concordance with interspecific differences in the habitat use in natural condition and (3) the presence of elaborated antipredator mechanisms in invertebrates. Most of all, the results clearly demonstrated a difference in term of antipredation strategy between native and invasive gammarids, and also a plausible link between responses and the installation success of each species in Western Europe. In addition to the study of life history traits, the comparison of amphipod antipredator responses seems to be an interesting approach which could help to predict the consequences of a species invasion.

Acknowledgments

Thanks go to Philippe Rousselle for software conception. We also thank Anatole Boiché, Karen Burga Pérez, Cédric Mondy and Céline Vellinger for their help for gammarid sampling. All experiments therein have been conducted in accordance with the current laws in France.

References

- Åbjörnsson, K., B. M. A. Wagner, A. Axelsson, R. Bjerselius & K. H. Olsén, 1997. Responses of *Acilius sulcatus* (Coleoptera: Dytiscidae) to chemical cues from perch (*Perca fluviatilis*). *Oecologia* 111: 166-171.
- Åbjörnsson, K., J. Dahl, P. Nyström & C. Brönmark, 2000. Influence of predator and dietary chemical cues on the behaviour and shredding efficiency of *Gammarus pulex*. *Aquatic Ecology* 34: 379-387.
- Åbjörnsson, K., L. A. Hansson & C. Brönmark, 2004. Responses of prey from habitats with different predator regimes: local adaptation and heritability. *Ecology* 85: 1859-1866.
- Abrams, P. A., 2001. Predator-prey interactions. In Fox, C. W., D. A. Roff & D. J. Fairbairn (eds), *Evolutionary ecology*. Oxford University Press, Oxford: 277-289.
- Alexander, J. E. & A. P. Covich, 1991. Predator avoidance by the freshwater snail *Physella virgata* in response to the crayfish *Procambarus simulans*. *Oecologia* 87: 435-442.

- Andersen, T. H., N. Friberg, H. O. Hansen, T. M. Iversen, D. Jacobsen & L. Krojgaard, 1993. The effects of introduction of brown trout (*Salmo trutta* L.) on *Gammarus pulex* L. drift and density in two fishless Danish streams. *Archiv für Hydrobiologie* 126: 361-371.
- Andersson, K. G., C. Brönmark, J. Hermann, B. Malmqvist, C. Otto & P. Sjöström, 1986. Presence of sculpins (*Cottus gobio*) reduces drift and activity of *Gammarus pulex* (Amphipoda). *Hydrobiologia* 133: 209-215.
- Appelberg, M., B. Söderbäck & T. Odelström, 1993. Predator detection and perception of predation risk in the crayfish *Astacus astacus* L. *Nordic Journal of Freshwater Research* 68: 55-62.
- Baldauf, S. A., T. Thünken, J. G. Frommen, T. C. M. Bakker, O. Heupel & H. Kullman, 2007. Infection with an acanthocephalan manipulates an amphipod's reaction to a fish predator's odours. *International Journal for Parasitology* 37: 61-65.
- Bauer, A., S. Trouvé, A. Grégoire, L. Bollache & F. Cézilly, 2000. Differential influence of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) on the behaviour of native and invader gammarid species. *International Journal for Parasitology* 30: 1453-1457.
- Baumgärtner, D., A. D. Jungbluth, U. Koch & E. Von Elert, 2002. Effects of infochemicals on microhabitat choice by the freshwater amphipod *Gammarus roeseli*. *Archiv für Hydrobiologie* 155: 353-367.
- Boets, P., G. J. E. Holguin, K. Lock & P. L. M. Goethals, 2012. Data-driven habitat analysis of the Ponto-Caspian amphipod *Dikerogammarus villosus* in two invaded regions in Europe. *Ecological Informatics*. In press.
- Bollache, L., N. Kaldonski, J. P. Troussard, C. Lagrue & T. Rigaud, 2006. Spines and behaviour as defences against fish predators in an invasive freshwater amphipod. *Animal Behaviour* 72: 627-613.
- Brönmark, C. & L. A. Hansson, 2000. Chemical communication in aquatic systems: an introduction. *Oikos* 88: 103-109.
- Campbell, J. I. & P. S. Meadows, 1974. Gregarious behaviour in a benthic marine amphipod (*Corophium volutator*). *Cellular and Molecular Life Sciences* 30: 1396-1397.
- Chivers, D. P. & R. J. F. Smith, 1998. Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: A review and prospectus. *Ecoscience* 5: 338-352.
- Chivers, D. P., B. D. Wisenden & R. J. F. Smith, 1996. Damselfly larvae learn to recognize predators from chemical cues in the predator's diet. *Animal Behaviour* 52: 315-320.

- Codella, S. G. & K. F. Raffa, 1995. Contributions of female oviposition patterns and larval behavior to group defense in conifer sawflies (Hymenoptera, Diprionidae). *Oecologia* 103: 24-33.
- Dahl, J., P.A. Nilsson & L. B. Pettersson, 1998. Against the flow: chemical detection of downstream predators in running waters. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265: 1339-1344.
- De Meester, L., 1993. Genotype, fish mediated chemicals, and phototactic behaviour in *Daphnia magna*. *Ecology* 74: 1467-1474.
- Devin, S. & J. N. Beisel, 2007. Biological and ecological characteristics of invasive species: a gammarid study. *Biological Invasions* 9: 13-24.
- Devin, S., C. Piscart, J. N. Beisel & J. C. Moreteau, 2003. Ecological traits of the amphipod invader *Dikerogammarus villosus* on a mesohabitat scale. *Archiv für Hydrobiologie* 158: 43-56.
- Devin, S., J. N. Beisel, V. Bachman & J. C. Moreteau, 2001. *Dikerogammarus villosus* (Amphipoda: Gammaridae): another invasive species newly established in the Moselle river and French hydrosystems. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 37: 21-27.
- Dezfuli, B. S., B. J. Maynard & T. A. Wellnitz, 2003. Activity levels and predator detection by amphipods infected with an acanthocephalan parasite, *Pomphorhynchus laevis*. *Folia Parasitologica* 50: 129-134.
- Dick, J. T. A. & D. Platvoet, 2000. Invading predatory crustacean *Dikerogammarus villosus* eliminates both native and exotic species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267: 977-983.
- Dick, J. T. A., D. Platvoet & D. W. Kelly, 2002. Predatory impact of the freshwater invader *Dikerogammarus villosus* (Crustacea: Amphipoda). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 1078-1084.
- Endler, J. A., 1991. Interactions between predators and prey. In Krebs, J. R. & N. B. Davies (eds), *Behavioural ecology: an evolutionary approach*. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 169-196.
- Grabowska, J. & M. Grabowski, 2005. Diel-feeding activity in early summer of racer goby *Neogobius gymnotrachelus* (Gobiidae): a new invader in the Baltic basin. *Journal of Applied Ichthyology* 21: 282-286.

- Grabowski, M., K. Bacela & A. Konopacka, 2007. How to be an invasive gammarid-comparison of life history traits. *Hydrobiologia* 590: 75-84.
- Hamilton, W. D., 1971. Geometry for the selfish herd. *Journal of Theoretical Biology* 31: 295-311.
- Hesselschwerdt, J., S. Tschärner, J. Necker & K. M. Wantzen, 2009. A local gammarid uses kairomones to avoid predation by the invasive crustaceans *Dikerogammarus villosus* and *Orconectes limosus*. *Biological Invasions* 11: 2133-2140.
- Holomuzki, J. R. & J. D. Hoyle, 1990. Effect of predatory fish presence on habitat use and diel movement of the stream amphipod, *Gammarus minus*. *Freshwater Biology* 24: 509-517.
- Hoyle, J. A. & A. Keast, 1987. The effect of prey morphology and size on handling time in a piscivore, the large-mouth bass (*Micropterus salmoides*). *Canadian Journal of Zoology* 65: 1972-1977.
- Jazdzewski, K., 1980. Range extensions of some gammaridean species in European inland waters caused by human activity. *Crustaceana* 6: 84-107.
- Kakareko, T., J. Zbikowski & J. Zytkowicz, 2005. Diet partitioning in summer of two syntopic neogobiids from two different habitats of the lower Vistula River, Poland. *Journal of Applied Ichthyology* 21: 292-295.
- Kaldonski, N., C. Lagrue, S. Motreuil, T. Rigaud & L. Bollache, 2008. Habitat segregation mediates predation by the benthic fish *Cottus gobio* on the exotic amphipod species *Gammarus roeseli*. *Naturwissenschaften* 95: 839-844.
- Kaldonski, N., M. J. Perrot-Minot & F. Cézilly F, 2007. Differential influence of two acantocephalan parasites on the antipredator behaviour of their common intermediate host. *Animal Behaviour* 74: 1311-1317.
- Kalmijn, A. J., 1988. Hydrodynamic and acoustic field detection. In Atema J., R. R. Fay, A. N. Popper & W. N. Tavolga (eds), *Sensory biology of aquatic animals*. Springer-Verlag, New York: 83-130.
- Kats, L. B. & L. M. Dill, 1998. The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience* 5: 361-394.
- Kinzler, W. & G. Maier, 2006. Selective predation by fish: a further reason for the decline of native gammarids in the presence of invasives? *Journal of Limnology* 65: 27-34.

- Kinzler, W., A. Kley, G. Mayer, D. Waloszek & G. Maier, 2009. Mutual predation between and cannibalism within several freshwater gammarids: *Dikerogammarus villosus* versus one native and three invasives. *Aquatic Ecology* 43: 457-464.
- Kley, A., W. Kinzler, Y. Schank, G. Mayer, D. Waloszek & G. Maier, 2009. Influence of substrate preference and complexity on co-existence of two non-native gammarideans (Crustacea: Amphipoda). *Aquatic Ecology* 43: 1047-1059.
- Krakauer, D. C., 1995. Groups confuse predators by exploiting perceptual bottlenecks: a connectionist model of the confusion effect. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 36: 421-429.
- Krang, A. S. & S. P. Baden, 2004. The ability of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas) to follow chemical signals from con-specifics. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 310: 195-206.
- Krause, J. & G. D. Ruxton, 2002. *Living in groups*. Oxford University Press, London.
- Krisp, H. & G. Maier, 2005. Consumption of macroinvertebrates by invasive and native gammarids: a comparison. *Journal of Limnology* 64: 55-59.
- Kullmann, H., T. Thünken, S. A. Baldauf, T. C. M. Bakker & J. G. Frommen, 2008. Fish odour triggers conspecifics attraction behaviour in an aquatic invertebrate. *Biology Letters* 4: 458-460.
- Lagrange, C. & L. Bollache, 2006. Effects of temperature on persistence times of native and invasive gammarid species in the stomachs of *Cottus gobio*. *Journal of Fish Biology* 68: 318-322.
- MacNeil, C. & D. Platvoet, 2005. The predatory impact of the freshwater invader *Dikerogammarus villosus* on native *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda); influences of differential microdistribution and food resources. *Journal of Zoology* 267: 31-38.
- MacNeil, C., D. Platvoet, J. T. A. Dick, N. Fielding, A. Constable, N. Hall, D. Aldridge, T. Renals & M. Diamond, 2010. The Ponto-Caspian 'killer shrimp', *Dikerogammarus villosus* (Sowinsky, 1894), invades the British Isles. *Aquatic Invasions* 4: 441-445.
- MacNeil, C., J. T. A. Dick, R. W. Elwood, 1999a. The dynamics of predation on *Gammarus* spp. (crustacean: Amphipoda). *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 74: 375-395.

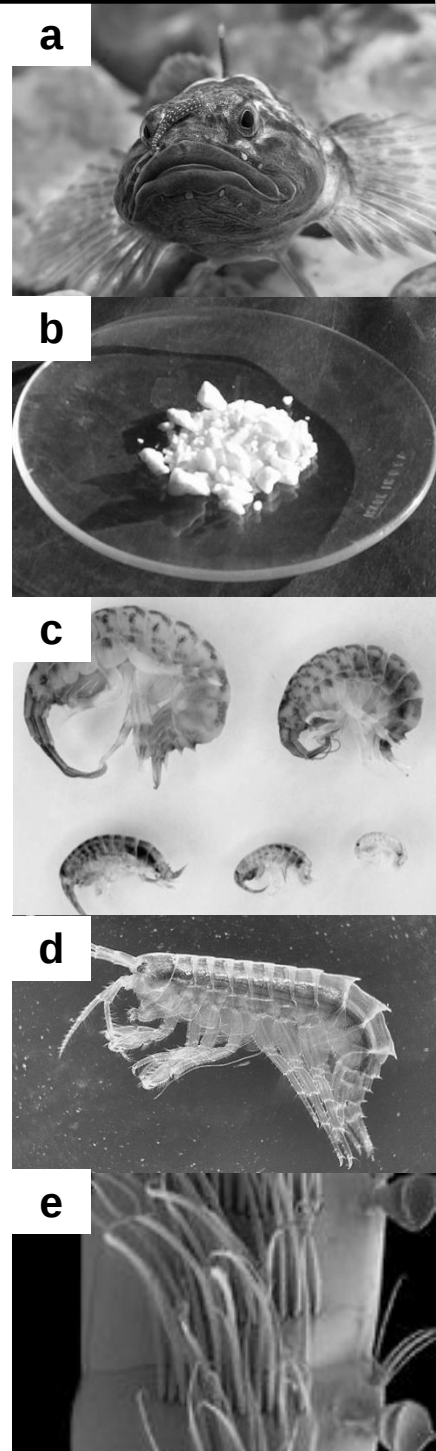
- MacNeil, C., R. W. Elwood & J. T. A. Dick, 1999b. Predator-prey interaction between brown trout *Salmo trutta* and native and introduced amphipods; their implication for fish diets. *Ecography* 22: 686-696.
- Marguillier, S., 1998. Stable isotope ratios and food web structure of aquatic ecosystems. PhD thesis, Vrije Universiteit Brussel, Brussels.
- Mathis, A. & W. W. Hoback, 1997. The influence of chemical stimuli from predators on precopulatory pairing by the amphipod, *G. pulex pseudolimnaeus*. *Ethology* 103: 33-40.
- Médoc, V. & J. N. Beisel, 2008. An acanthocephalan parasite boosts the escape performance of its intermediate host facing non-host predators. *Parasitology* 135: 977-984.
- Médoc, V., T. Rigaud, L. Bollache & J. N. Beisel, 2009. A manipulative parasite increasing an antipredator response decreases its vulnerability to a nonhost predator. *Animal Behaviour* 77: 1235-1241.
- Moret, Y., L. Bollache, R. Wattier & T. Rigaud, 2007. Is the host or the parasite the most locally adapted in an amphipod-acanthocephalan relationship? A case study in a biological invasion context. *International Journal for Parasitology* 37: 637-644.
- Nilsson, P. A. & C. Brönmark, 2000. Prey vulnerability to a gape-size limited predator: behavioural and morphological impacts on northern pike piscivory. *Oikos* 88: 539-546.
- Nilsson, P. A., C. Brönmark & L. B. Pettersson, 1995. Benefits of a predator-induced morphology in crucian carp. *Oecologia* 104: 291-296.
- Peckarsky, B., 1980. Predator-prey interactions between stoneflies and mayflies: behavioral observations. *Ecology* 61: 932-943.
- Pennuto, C. & D. Keppler, 2008. Short-term predator avoidance behaviours by invasive and native amphipods in the Great Lakes. *Aquatic Ecology* 42: 629-641.
- Perrot-Minnot, M. J., N. Kaldonski & F. Cézilly, 2007. Increased susceptibility to predation and altered anti-predator behaviour in an acanthocephalan-infected amphipod. *International Journal for Parasitology* 37: 645-651.
- Platvoet, D., G. Van der Velde, J. T. A. Dick & S. Li, 2009. Flexible omnivory in *Dikerogammarus villosus* (Sowinsky, 1894) (Amphipoda). Amphipod pilot species project (AMPIS) report 5. *Crustaceana* 82: 703-720.
- Plaut, I., 2001. Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 131: 41-50.

- Pöckl, M., 2009. Success of the invasive Ponto-Caspian amphipod *Dikerogammarus villosus* by life history traits and reproductive capacity. *Biological Invasions* 11: 2021-2041.
- Sih, A., 1987. Predators and prey lifestyles: an evolutionary and ecological overview. In Kerfoot, W. C. & A. Sih (eds), *Predation: direct and indirect impacts on aquatic communities*. University Press of New England, Hanover, New Hampshire: 203-224.
- Sornom, P., E. Gismondi, C. Vellinger, S. Devin, J. F. Férard & J. N. Beisel, 2012. Effects of sublethal cadmium exposure on antipredator behavioural and antitoxic responses in the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*. *PLOS ONE* 7: e42435.
- Sornom, P., V. Felten, V. Médoc, S. Sroda, P. Rousselle & J. N. Beisel, 2010. Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environmental Pollution* 158: 1288-1295.
- Starry, O., J. Wanzenböck & D. L. Danielopol, 1998. Tendency of the amphipod *Gammarus roeseli* Gervais to colonize coarse sediment habitats under fish predation pressure. *International Review of Hydrobiology* 83: 371-380.
- Thünken, T., S. A. Baldauf, N. Bersau, T. C. M. Bakker, H. Kullmann & J. G. Frommen, 2010. Impact of olfactory non-host predator cues on aggregation behaviour and activity in *Polymorphus minutus* infected *Gammarus pulex*. *Hydrobiologia* 654: 137-145.
- Van der Velde, G., S. Rajagopal, I. Musko & A. Bij de Vaate, 2000. Ecological impact of crustacean invaders. General considerations and examples from the Rhine River. In von Vaupel Klein, J. C. & F. R. Schram (eds), *The biodiversity crisis and Crustacea*. Proc. 4th Intern. Crustacean Congress, vol. 2, Brill, Leiden. *Crustacean Issues* 12: 3-33.
- Van Riel, M. C., E. P. Healy, G. Van der Velde & A. Bij de Vaate, 2007. Interference competition among native and invader amphipods. *Acta Oecologica* 31: 282-289.
- Van Riel, M. C., G. Van der Velde, S. Rajagopal, S. Marguillier, F. Dehairs & A. Bij de Vaate, 2006. Trophic relationships in the Rhine food web during invasion and after establishment of the Ponto-Caspian invader *Dikerogammarus villosus*. *Hydrobiologia* 565: 39-58.
- Van Son, T. C. & M. Thiel, 2006. Multiple predator effects in an intertidal food web. *Journal of Animal Ecology* 75: 25-32.

- Walker, J. A., C. K. Ghalambor, O. L. Griscti, D. McKenney & D. N. Reznick, 2005. Do faster starts increase the probability of evading predators? *Functional Ecology* 19: 808-815.
- Watkins, T. B., 1996. Predator-mediated selection on burst swimming performance in tadpoles of the pacific tree frog, *Pseudacris regilla*. *Physiological Zoology* 69: 154-167.
- Williams, D. D. & K. A. Moore, 1982. The effect of environmental factors on the activity of *Gammarus pseudolimnaeus* (Amphipoda). *Hydrobiologia* 96: 137-147.
- Williams, D. D. & K. A. Moore, 1985. The role of semiochemicals in benthic community relationships of the lotic amphipod *Gammarus pseudolimnaeus*: a laboratory analysis. *Oikos* 44: 280-286.
- Williams, D. D., & K. A. Moore, 1986. Microhabitat selection by a stream-dwelling amphipod: a multivariate-analysis approach. *Freshwater Biology* 16: 115-122.
- Williams, G. C., 1964. Measurement of consociation among fishes and comments on the evolution of schooling. *Publications of the Museum, Michigan State University, Biological Series* 2: 351:383.
- Wisenden, B. D., A. Cline & T. C. Sparkes, 1999. Survival benefit to antipredator behavior in the amphipod *Gammarus minus* (Crustacea: Amphipoda) in response to injury-released chemical cues from conspecifics and heterospecifics. *Ethology* 105: 407-414.
- Wisenden, B. D., S. G. Pohlman & E. E. Watkin, 2001. Avoidance of conspecific injury-released chemical cues by free-ranging *Gammarus lacustris* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Chemical Ecology* 27: 1249-1258.
- Wooster, D. E., 1998. Amphipod (*Gammarus minus*) responses to predators and predation impact on amphipod density. *Oecologia* 115: 253-259.
- Wudkevich, K., B. D. Wisenden, D. P. Chivers & R. J. F. Smith, 1997. Reactions of *Gammarus lacustris* to chemical stimuli from natural predators and injured conspecifics. *Journal of Chemical Ecology* 23: 1163-1173.

CHAPITRE V

Modification Des Réponses D'amphipodes En Présence De Cadmium



a

Le chabot commun *Cottus gobio* (Photo : B. Perry).

b

Le Chlorure de cadmium CdCl_2 est un composé du cadmium élémentaire, sous forme solide cristallisée (Photo : M. Walker).

c

Différents stades de développement de l'amphipode invasif *Dikerogammarus villosus* (Photo :secure.fera.defra.gov.uk).

d

L'amphipode naturalisé *Gammarus roeselii* (Photo : G. Nowack).

e

Image en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) de la partie postérieure d'une antenne de gammar, organe impliqué, entre autres, dans la détection de signaux chimiques de prédation (Photo : Central Facility for Electron Microscopy, Ulm University).

1. Réponses antitoxiques, comportements d'anti-prédation et réserves énergétiques de *Dikerogammarus villosus*

L'étude présentée dans cette partie a fait l'objet d'une publication dans le journal PLOS ONE en 2012. L'article est présenté ci-après dans une version Word modifiée afin non seulement d'optimiser la lisibilité pour le lecteur mais également d'homogénéiser la présentation des résultats tout au long de ce manuscrit.

L'objectif principal de ce travail était d'examiner l'influence du cadmium sur certaines réponses biologiques de l'amphipode invasif *Dikerogammarus villosus*. Pour cela, nous avons ainsi étudié en conditions de laboratoire l'utilisation de refuges, l'agrégation avec des congénères, l'exploration de l'environnement et la mobilité, en faisant varier deux facteurs : une exposition à du cadmium et la présence ou non d'un risque élevé de prédation (eau marquée à la fois par les poissons prédateurs, les congénères blessés et les composés issus de la digestion des congénères consommés). Concernant l'exposition au cadmium, trois conditions ont été examinées : (1) sans Cd (témoins dans de l'eau déchlorée), (2) après une exposition test de 4 min à 500 µg Cd/L, et (3) après une exposition test de 4 min à 500 µg Cd/L qui faisait suite à une pré-exposition de 24 h à la même concentration. Parallèlement aux traits comportementaux, nous avons dosé le malondialdéhyde (MDA), un biomarqueur d'effet toxique, et les réserves énergétiques (lipides et glycogène) des gammarés testés.

L'exposition au cadmium a induit des dommages cellulaires révélés par des niveaux élevés de MDA, alors que les comportements de déplacement se sont avérés être modifiés dans le sens d'une diminution de l'utilisation de refuges, une diminution du comportement d'exploration de l'environnement et une mobilité accrue. Dans le même temps, nous avons pu mesurer une diminution des réserves énergétiques. Aucune différence significative n'a été observée entre le test réalisé immédiatement après seulement 4 min d'exposition et celui incluant une pré-exposition de 24 h. Il s'avère que les individus exposés au cadmium semblent avoir une perception perturbée des stimuli d'alerte de prédation, ce qui se traduit par l'augmentation du temps passé à l'extérieur des refuges et une plus grande mobilité par rapport aux gammarés exposés à une eau sans cadmium. Le faisceau de réactions des gammarés laisse penser qu'ils cherchent à se soustraire au stress chimique, qu'il y ait ou pas présence d'un risque de prédation, mais sans que l'on sache, *in fine*, si ce risque est perçu ou

ignoré. Il est probable que le signal chimique soit moins bien perçu en présence d'un stress généré par le cadmium, ce qui fait l'objet d'une partie de notre discussion.

Dans tous les cas, ces résultats suggèrent que l'exposition au cadmium perturbe rapidement les réactions normales de comportement des gammarès à des signaux d'alarme et modifie les stratégies d'évitement des prédateurs, ce qui pourrait avoir des effets potentiels en cascade sur les communautés aquatiques.

Effects of sublethal cadmium exposure on antipredator behavioural and antitoxic responses in the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*

Research article, *PLOS ONE* (2012) 7(8): e42435

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

* Author for correspondence: P. Sornom, Laboratoire des Interactions, Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), CNRS UMR 7146, Université de Lorraine, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France (e-mail: pascal.sornom@univ-metz.fr)

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 and no support to report.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

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.

Keywords:

Amphipod; Antipredation; Behaviour; Cadmium ecotoxicity; Cell damage; *Dikerogammarus villosus*; Energy reserves; Heavy metal; Malondialdehyde levels

Short title:

Cadmium effect on *D. villosus* biological responses

Introduction

Aquatic ecosystems are constantly being exposed to chemical contaminants from industrial, agricultural and domestic sources. In recent decades, metals with no significant biological function, such as cadmium (Cd), have received particular attention due to their high ecotoxicity, even at very low concentrations, and their ability to bioaccumulate in many aquatic species [1]. Cd is a heavy metal toxicant that occurs naturally in the environment, in insignificant amounts; however, its impact is steadily increasing due to anthropogenic activities. Freshwater crustaceans are amongst the most sensitive of macroinvertebrate species to Cd [2]. This is especially so for gammarids, which are increasingly used as biological models in ecotoxicological studies. In addition to its ability to bioaccumulate and its adverse effects on survival, Cd has been shown to significantly affect an organism's behavioural patterns, including feeding, ventilation and locomotion [3-5]. Cd is also known to affect the transfer of chemical information between organisms [6]. Indeed, the phenomenon of Cd-induced info-disruption has been shown to impact on anti-predator behaviour in many aquatic species, including fish and crustaceans [7,8]. Although several studies have been devoted to the effects of heavy metals such as Cd on gammarids, the species most often used are either native or naturalised. Very little information is available on the responses of invasive European amphipods to chemical stress, despite a number of species now reaching dominant levels in some European waters.

In recent decades, a number of exotic amphipod species have increased their ranges in Europe, spreading west from their native Ponto-Caspian region. One of these, *Dikerogammarus villosus*, has become well established in the River Moselle (north-eastern France) since its first appearance in 1999 [9]. Its invasive success has been helped by life-history traits, predatory behaviour and reproductive characteristics [10,11] that have resulted in *D. villosus* becoming one of the dominant freshwater amphipod species in many large European hydrosystems. Due to its recent wide distribution and high densities in European inland waters [12], *D. villosus* is rapidly becoming a classical model species used in ecotoxicological tests to develop biomarkers [13] or assess effects of pollutants [14,15].

Many tools have been developed in amphipod testing to estimate and predict the effects of contaminants on organisms, the most widely used ecotoxicological endpoints being survival, growth, food consumption and assimilation, moult frequency, reproduction, enzymatic biomarkers and osmoregulation. The assessment of sublethal ecotoxicity is of

ecological relevance as mortality does not always occur in organisms exposed to pollutants. In such cases, behavioural changes are relevant tools for ecotoxicity testing and water quality monitoring [16]. Indeed, behavioural endpoints, previously described as “early warning responses” to toxicants and environmental stresses [17], are sensitive, fast and relatively easy to assess, and are cheap, non-invasive and useful indicators of sublethal exposure in both laboratory and field conditions. They are highly ecologically relevant and they have the potential to link physiological functions to ecological processes, *e.g.* locomotion is required not only to find food, to obtain mates and to migrate, but also to escape predation.

Amphipods constitute the prey of various upper trophic-level predators including other invertebrates, vertebrates and especially fish [18]. Hence, in the lower River Rhine, *D. villosus* rapidly became a regular food item for eel [19], while in Upper Lake Constance, five years after its first observation, *D. villosus* had readily been included into the diet of zoobenthivorous fish [20]. In aquatic environments, prey are able to assess the presence, activity and hunger of predators [21] through chemical signals [22], in addition to via visual, hydrodynamic or auditory cues [23,24]. Chemical cues can include the scent of the predator itself [25], that of its prey [26], or the scent emitted by injured conspecifics [27,28]. Earlier studies devoted to antipredator mechanisms in amphipods have highlighted their sensitivity to both fish scent [29] and injured conspecifics [30,31]. In order to avoid encounters with predators, amphipod prey can display chemical, structural or behavioural defences [32] such as increased refuge use and decreased locomotion activity, which have been shown to increase survival [30]. Further, gregarious behaviour, a form of cover-seeking, tends to decrease individual risk of predation in various organisms, including amphipods [33].

The aims of the present study were (1) to investigate antipredator responses of *D. villosus* to a predation alarm cue and (2) to test the hypothesis that Cd may interfere with the perception of predation risk chemical signals. In laboratory experiments, the perception of predation risk will be determined by measuring behavioural biomarkers such as refuge use, aggregation with conspecifics, environmental exploration and mobility. In parallel, we will measure malondialdehyde (MDA), a lipoperoxidation product used as a biomarker of toxic effect, and lipid and glycogen levels, to monitor energy expenditure in the organism. As gender has previously been shown to be a confounding factor in physiological biomarker responses assessment [34,35], all measurements were carried out separately on males and females.

Materials and methods

Ethics statement

All experiments therein have been conducted in accordance with current laws in France, including the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, Strasbourg, 18.III.1986 (Annex B). All organisms unexposed to toxicants (*i.e.* unused and untested amphipods and all fish) were later released at their respective sampling sites within one week. The sampling site locations are not privately-owned or protected in any way and macroinvertebrate sampling at these locations did not require any specific permit. The field studies did not involve endangered or protected species. The bullhead *Cottus gobio* is listed in Annex 2 of Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the Conservation of Natural Habitats and of Wild Fauna and Flora. In France, however, *C. gobio* is not a protected species and its use in scientific research does not require any specific permit. Fish sampling was performed by the Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA), the French national agency for water and aquatic environments, a state-owned company licensed to conduct scientific fishing, allowing sampling and the transport of the animals to the laboratory. All experiments were supervised by the holder of a Level 1 authorisation to conduct experiments on animals, as approved by the French Ministry of Agriculture and Fisheries (Dr. Michael Danger).

Sampling and housing

Specimens of *D. villosus* were collected using pond nets (5 mm mesh) during spring 2011, from an unpolluted station on the River Moselle in north-eastern France (Saulcy; 49°07'N and 6°10'E). We selected intermediate-sized adults of around 15 mm in order to avoid potential bias induced by gammarid length/age. Similarly, ovigerous females were not sampled in order to standardise physiological condition. Specimens were brought to the laboratory in 3 L opaque plastic tanks filled with water taken on site within one hour of sampling. Leaves collected from the site were placed into each tank in order to reduce the stress induced by handling and transport. In the laboratory, specimens were maintained at a maximum density of 20 individuals/L in plastic aquaria (31 cm long, 28 cm wide, 14 cm high) filled with dechlorinated, UV-treated, and oxygenated tap water. Glass pebbles (15 mm

diameter, convex side down) and artificial plants were added to provide refuges and minimise cannibalism. Gammarids were fed *ad libitum* with alder leaf disks and chironomids. The room's temperature was kept constant at $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ and the photoperiod kept at 12 h light:12 h dark. Amphipods were housed under these conditions for 72 h before pre-exposures.

The bullhead *C. gobio* was chosen as the test predator as it is a native and widespread fish species in north-eastern France. This typical benthic-feeding fish is known to include amphipods in its diet and is frequently used to assess invertebrate antipredator behavioural responses [36,37]. Twenty fish of similar size (approx. 9 cm) were collected from the River Moselle in spring 2011 using a pond net (5 mm mesh). Bullheads were transported to the laboratory in a 30 L aerated opaque plastic tank filled with water collected on site within one hour of sampling. In the laboratory, specimens were maintained at a density that did not exceed one fish/L in aquaria (60×29×31 cm) filled with 6 L of dechlorinated, UV-treated and oxygenated tap water. To each housing unit, we added coarse gravel and stones (>1 cm diameter) and some artificial plants to minimise aggression between individuals. The aquaria were maintained under the same temperature and photoperiod conditions as those for amphipods and the fish were maintained under these conditions for one week prior to the start of experimentation. During this time, the fish were fed *ad libitum* with living *D. villosus* taken randomly from the sample site. Bullheads were deprived of food for 72 h prior to use for preparation of scented water.

Scented water

Scented water was prepared using a protocol similar to that described in [38]. Six previously starved bullheads were placed in a plastic aquarium (31×28×14 cm) filled with 6 L of dechlorinated, UV-treated and oxygenated tap water for 24 h. Thirty amphipods were offered to the bullheads in order to obtain a mean of five predation events/fish/L over 24 h. The procedure was repeated for each test condition and was expected to provide a predation signal close to that observed under natural conditions, which includes both predator odour and chemical cues released by injured amphipods [31,39]. Behavioural tests were performed within 24 h following the preparation of scented water.

Cadmium solutions

A toxic stock solution was prepared by dissolving cadmium chloride (CdCl_2) in dechlorinated and UV-treated tap water. The stock solution was stabilised with 0.1% of HNO_3 (65%, Suprapure, Merck). Cd-spiked test solutions were prepared through dilution of the stock solution in either unscented or previously prepared scented water in order to obtain a nominal concentration of 500 $\mu\text{g Cd/L}$.

Pre-exposure and test exposure conditions

For all experiments, temperature and photoperiod were identical to those for amphipod housing. During pre-exposures, 120 specimens of *D. villosus* were placed in plastic aquaria (31×28×14 cm) filled with 6 L of oxygenated test solution, where they were kept unfed for 24-h prior to the behavioural tests. Amphipods were exposed to three conditions according to pre-exposure and test exposure: (1) Control - 24-h pre-exposure to Cd-free water (*i.e.* dechlorinated and UV-treated tap water) and 4-min test exposure to Cd-free water; (2) Cd-free pre-exposure - 24-h pre-exposure to Cd-free water and 4-min test exposure to 500 $\mu\text{g Cd/L}$; and (3) Cd pre-exposure - 24-h pre-exposure to 500 $\mu\text{g Cd/L}$ and 4-min test exposure to 500 $\mu\text{g Cd/L}$. These conditions were replicated twice, both with and without the addition of chemical signals from the predator and injured conspecifics in test solution (scented water).

Description of the experimental units

Device #1. The first experimental unit comprised a plastic cylindrical tank (25 cm diameter, 31 cm high) that was open to the air and filled with 6 L of test solution (providing a water level of 11 cm; Figure 1A). A round Plexiglas plate (25 cm diameter, 13 mm high), drilled so as to create four equidistant groups of holes 2 cm from the periphery (hereafter called refuge areas), was placed at the bottom of the unit. Each refuge area comprised seven equidistant holes (8 mm diameter, 10 mm deep) inside which amphipods could take refuge by hiding its entire body.

Device #2. The second experimental unit used a similar plastic cylindrical tank as for device #1, also filled with 6 L of test solution (Figure 1B). In order to test for aggregative behaviour of amphipods with conspecifics, four equidistant plastic cylindrical cages (4 cm

diameter, 13 cm high, 1 mm mesh) were placed vertically on the bottom of the unit, 2 cm from the edge. Two diametrically opposed cages received 10 conspecifics (five individuals of each gender) and the two others were kept empty.

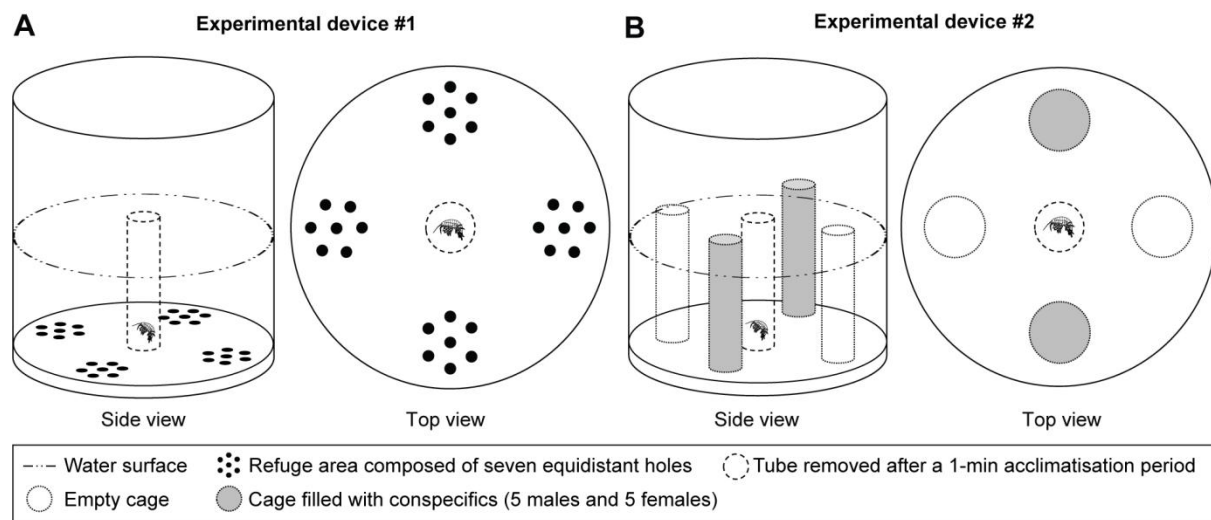


Figure 1. Schematic views of the experimental devices. A) device #1, used to assess hiding, exploration and mobility behaviour; B) device #2, used to assess hiding, aggregation and mobility behaviour. doi:10.1371/journal.pone.0042435.g001

Behavioural tests

Each experimental device was placed separately into an hermetic box (50×46×62 cm) fitted with three red-light emitting lamps and a digital video camera set to film the horizontal plan (see [34,38]). Red light was preferred to white light as amphipods display negative phototaxis. Before starting the test, a translucent plastic tube (3 cm diameter, 14 cm high), open to the air, was placed in the middle of the experimental unit and a single amphipod was introduced into the tube using a fine brush. After a 1-min acclimatisation period, the tube was removed and filming proceeded for 3-min at a rate of 20 frames per second. Each amphipod was used only once and experiments were conducted first with unscented and then with scented water. Each test was repeated 30 times per gender, representing 360 individuals for all experiments. The water was renewed after 5 amphipods had been tested and a 90° rotation of the experimental unit was performed in order to avoid a position effect. During aggregation tests with experimental device #2, the 10 conspecifics

enclosed in the cages were not changed throughout the experiment to keep the level of attractiveness constant. At the end of each experiment, all tested amphipods were measured to the nearest mm (from the tip of the rostrum to the base of the telson) under a binocular magnifying glass (Leica MZ 125) fitted with an eyepiece micrometer (Zeiss, 10×). To test the potential effect of gender on the measured responses, amphipod gender was determined *a priori* based on the size of gnathopods (typically larger in males) and was confirmed *a posteriori* by examining the 7th ventral segment (genital papillae only present in males).

In the first experiment, device #1 allowed us to assess (1) hiding, by measuring the proportion of time spent prostrate inside holes; (2) environmental exploration, by counting the number of refuge areas used by a single amphipod; and (3) mobility, by measuring the proportion of time spent moving when outside of refuges. A refuge was considered as used by amphipods only when 80% of its body (excluding antennae) was inside a hole for a period greater than one second.

For the second experiment, we analysed the videos made using device #2 to assess (1) hiding, by first measuring the proportion of time spent close to all cages (*i.e.* both empty cages and cages filled with conspecifics); (2) aggregation, by focusing on periods during which amphipods were attached to cages and by measuring the proportion of time spent attached to cages containing conspecifics; and (3) mobility, by measuring the proportion of time spent moving when outside of refuges. Individuals were considered as hidden in a refuge area only when immobile and clinging to a cage for a period greater than one second.

Biomarker measurement

After each behavioural test, ten pooled samples of 3 males and ten pooled samples of 3 females were prepared in order to analyse energy reserves and MDA levels [40]. Each pooled sample was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C awaiting biomarker measurement. Measurements were performed for females and males separately.

Sample preparation. Each pooled sample was homogenised with a manual Potter Elvehjem tissue grinder in 50 mM phosphate buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.6) supplemented with 1 mM phenylmethyl sulphonylfluoride (PMSF) and 1 mM L-serine-borate mixture as protease inhibitors and 5 mM phenylglyoxal as a γ -glutamyl transpeptidase inhibitor. The homogenisation buffer was adjusted to a volume of two times the wet weight of the pooled sample (*i.e.* 200 μL of homogenisation buffer for 100 mg of wet weight tissue). The total

homogenate was divided into two parts in order to measure each of the different parameters. For each replicate, two independent measures were conducted for each biomarker.

Energy reserve assessment. Measurement of total lipids and glycogen content was adapted from [41]. Twenty μL of 2% sodium sulphate (w/v) and 540 μL of chloroform/methanol at 1:2 (v/v) were added to 40 μL of total homogenate. After 1 h on ice, samples were centrifuged at $3000\times g$ for 5 min at 4°C . The resulting supernatant and pellet were used to determinate total lipid and glycogen content, respectively. One hundred μL of supernatant was transferred into a culture tube and placed into a dry bath at 95°C to evaporate the solvent, following which 200 μL of 95% sulphuric acid was added to each tube and left for 10 min. The culture tubes were then cooled on ice before addition of 4.8 mL of a vanillin-phosphoric acid reagent. After 10 min of reaction, absorbance was measured at 535 nm. Commercial cholesterol was used as a standard and lipid content was expressed in mg/mL. Total dissolution of the pellet was performed in 400 μL of deionized water for 10 min in an ultrasonic bath. One hundred μL of sample was placed into culture tubes and 4.9 mL of anthrone reagent added. The mixture was placed into a dry bath at 95°C for 17 min and then cooled on ice. Absorbance was measured at 625 nm, with glucose used as a standard and concentrations expressed in $\mu\text{g}/\text{mg}$ wet weight.

Toxic effect biomarker. MDA levels were measured using a high-pressure liquid chromatography (HPLC) method adapted from [42], with UV detection set at 267 nm. Seventy μL of the total homogenate was deproteinised by diluting four-fold with 95% ethanol (HPLC grade) and cooling on ice for 1.5 h. The mixture was then centrifuged at $18,000\times g$ for 30 min at 4°C . One hundred μL of the resultant supernatant was injected directly into a reversed-phase LiChrospher 100RP18-encapped HPLC column. Separation was conducted at 25°C and elution was carried out with sodium phosphate buffer (pH 6.5) containing 25% ethanol and 0.5 mM tetradecylmethylammonium bromide as an ion-pairing reagent. MDA levels were expressed in ng MDA/mg lipid.

Data Analysis and Statistics

As all data met assumptions of normality and homogeneity of variance, each response was analysed using ANOVA, followed by the post-hoc Tukey HSD test. All tests were performed with a 5% type I error risk, using R 2.9.0 Software. To verify if significant relationships existed between behavioural indices and individual lengths, correlations were

performed and tested using Pearson correlation tests (not illustrated). As no significant differences were observed between males and females during behavioural tests, we decided to pool the genders for each condition in order to make the results more robust.

Results

Toxic effect biomarker

The results of three-factor ANOVA analysis are presented in Table 1. In device #1, Tukey HSD post-hoc tests indicated that, without predation risk, males and females from the Cd-free pre-exposure and Cd pre-exposure groups had more than twofold higher MDA levels than control gammarids (Figure 2A). No significant differences were observed between Cd-free pre-exposure and Cd pre-exposure groups. In the presence of predation risk, MDA levels in both genders of the Cd pre-exposure group showed a significant increase of more than threefold compared to the control. No significant differences were observed between the control group and the Cd-free pre-exposure group. In addition, no significant inter-sex differences were observed, whatever the pre-exposure/exposure conditions.

In device #2, Tukey HSD post-hoc tests indicated that, without predation risk, MDA levels were significantly increased by twofold in males of the Cd-free pre-exposure group and more than fivefold in both genders from the Cd pre-exposure group, when compared to the control (Figure 2B). Gammarids pre-exposed to Cd showed significantly higher MDA levels than those not pre-exposed. In scented water, MDA levels of both genders in the Cd-free pre-exposure and Cd pre-exposure groups increased significantly by more than twofold compared to the control. A significant difference between the Cd-free pre-exposure and Cd pre-exposure groups was only observed in males, however, with MDA levels being higher in the Cd pre-exposure group. In scented water, a significant inter-sex difference was only observed in the Cd pre-exposure group, with MDA levels being significantly higher in males.

Table 1. Analysis of variance (three-factor ANOVA) in biomarkers for toxicity (MDA) and energetic reserves (lipid and glycogen) in *D. villosus*, according to gender, predation risk and cadmium (Cd) contamination.

Experimental unit	Parameter	Source of variation	DF	F	P
Device #1	MDA	Gender	1	4.57	0.0349
		Predation risk	1	13.88	<0.001
		Cd	2	223.16	<0.001
		Gender × Predation risk	1	0.002	0.9604
		Gender × Cd	2	0.40	0.6701
		Predation risk × Cd	2	161.15	<0.001
		Gender × Predation risk × Cd	2	0.06	0.9377
	Lipid	Gender	1	101.20	<0.001
		Predation risk	1	471.87	<0.001
		Cd	2	66.95	<0.001
		Gender × Predation risk	1	3.52	0.0635
		Gender × Cd	2	1.96	0.1462
		Predation risk × Cd	2	104.88	<0.001
		Gender × Predation risk × Cd	2	4.33	0.0155
	Glycogen	Gender	1	193.78	<0.001
		Predation risk	1	168.29	<0.001
		Cd	2	40.06	<0.001
		Gender × Predation risk	1	1.92	0.1688
		Gender × Cd	2	1.09	0.3402
		Predation risk × Cd	2	82.68	<0.001
		Gender × Predation risk × Cd	2	9.13	<0.001
Device #2	MDA	Gender	1	52.05	<0.001
		Predation risk	1	2.25	0.1364
		Cd	2	276.66	<0.001
		Gender × Predation risk	1	0.32	0.5715
		Gender × Cd	2	7.65	<0.001
		Predation risk × Cd	2	69.47	<0.001
		Gender × Predation risk × Cd	2	0.64	0.5273
	Lipid	Gender	1	106.75	<0.001
		Predation risk	1	338.02	<0.001
		Cd	2	82.21	<0.001
		Gender × Predation risk	1	8.11	0.0052
		Gender × Cd	2	1.76	0.1774
		Predation risk × Cd	2	64.05	<0.001
		Gender × Predation risk × Cd	2	8.03	0.0006
	Glycogen	Gender	1	205.04	<0.001
		Predation risk	1	93.58	<0.001
		Cd	2	95.04	<0.001
		Gender × Predation risk	1	7.59	0.0069
		Gender × Cd	2	14.37	<0.001
		Predation risk × Cd	2	72.01	<0.001
		Gender × Predation risk × Cd	2	3.54	0.0323

Significant values are shown in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0042435.t001

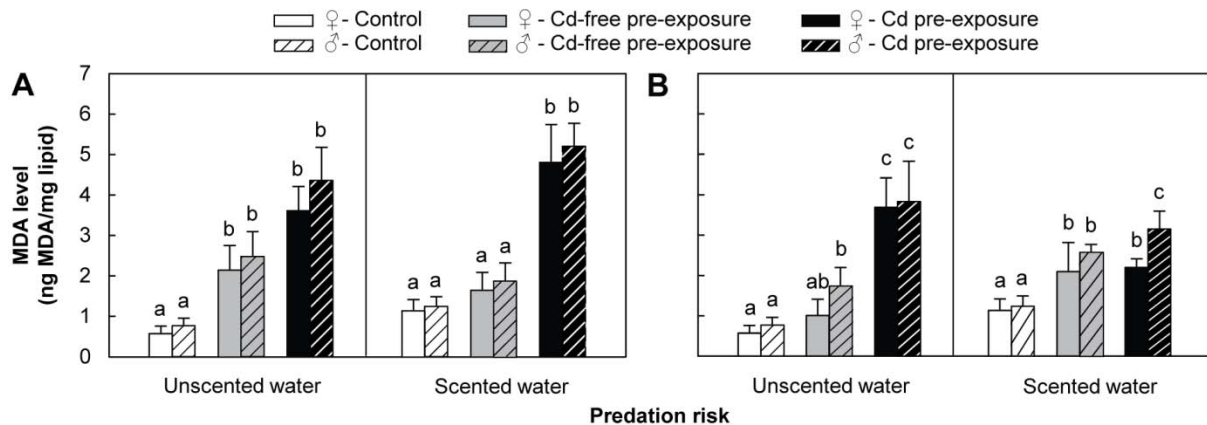


Figure 2. Malondialdehyde (MDA) levels measured in the presence/absence of predation risk. A) device #1; B) device #2. *D. villosus* females and males are represented by filled and hatched bars, respectively. MDA levels were measured following behavioural tests in which amphipods were exposed to the following conditions: Control = 24-h pre-exposure to Cd-free water + 4-min test exposure to Cd-free water (white bars); Cd-free pre-exposure = 24-h pre-exposure to Cd-free water + 4-min test exposure to 500 μg Cd/L (grey bars); Cd pre-exposure = 24-h pre-exposure to 500 μg Cd/L + 4-min test exposure to 500 mg Cd/L (black bars). All data are means of $N=10\pm\text{SD}$. Significant differences are indicated by different letters (Tukey HSD post-hoc test after ANOVA, $P<0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0042435.g002

Behavioural responses

The results of two-factor ANOVA analysis are presented in Table 2. In device #1, Tukey HSD post-hoc tests indicated that, whether in unscented or scented water, hiding and exploration decreased significantly by more than threefold, while mobility increased significantly by more than 50%, in Cd-free pre-exposure groups compared to the control (Figures 3A, B, C). For the Cd pre-exposure groups, hiding and exploration decreased significantly by more than twofold and mobility increased significantly by more than 50% compared with the control. No significant difference was observed in hiding, exploration and mobility values between the Cd-free pre-exposure and Cd pre-exposure groups. In the control groups, values for exploration and mobility decreased significantly by more than twofold, while hiding increased significantly by twofold, in scented water. No significant effect of predation risk was observed on antipredator behaviour in both the Cd-free pre-exposure and Cd pre-exposure groups, except that exploration decreased significantly by threefold in the Cd pre-exposure groups in scented water.

In device #2, Tukey HSD post-hoc tests indicated that, whether or not water was scented, hiding in the Cd-free pre-exposure groups decreased significantly by around 40%,

while mobility values increased significantly by more than twofold, compared with the controls (Figures 3D, F). In the Cd pre-exposure groups, hiding values decreased significantly by more than two fold and mobility values increased significantly by more than 40% compared to the control. Significant differences between the Cd-free pre-exposure and Cd pre-exposure groups were only observed for hiding in scented water and for mobility in unscented water. In both cases, values in the Cd pre-exposure groups were lower than in the Cd-free pre-exposure groups. No significant differences were observed in aggregation, whatever the test conditions (Figure 3E). No significant effect of predation risk was observed on antipredator behaviour in the three groups, except that, in the Cd-free pre-exposure groups, mobility was significantly lower in scented water.

Table 2. Analysis of variance (two-factor ANOVA) in hiding, exploration and mobility behaviour in *D. villosus* measured with device #1, and hiding, aggregation and mobility behaviour measured with device #2, in response to predation risk and cadmium (Cd) contamination. Significant values are shown in bold.

Experimental unit	Parameter	Source of variation	DF	<i>F</i>	<i>P</i>
Device #1	Hiding	Predation risk	1	8.22	0.0095
		Cd	2	63.57	<0.001
		Predation risk × Cd	2	1.74	0.1770
	Exploration	Predation risk	1	57.92	<0.001
		Cd	2	62.29	<0.001
		Predation risk × Cd	2	15.05	<0.001
	Mobility	Predation risk	1	65.48	<0.001
		Cd	2	70.74	<0.001
		Predation risk × Cd	2	8.13	0.0156
Device #2	Hiding	Predation risk	1	0.92	0.3382
		Cd	2	79.90	<0.001
		Predation risk × Cd	2	1.45	0.2367
	Aggregation	Predation risk	1	2.71	0.1007
		Cd	2	0.80	0.4519
		Predation risk × Cd	2	0.04	0.9603
	Mobility	Predation risk	1	6.48	0.0113
		Cd	2	22.98	<0.001
		Predation risk × Cd	2	2.31	0.1006

doi: 10.1371/journal.pone.0042435.t002

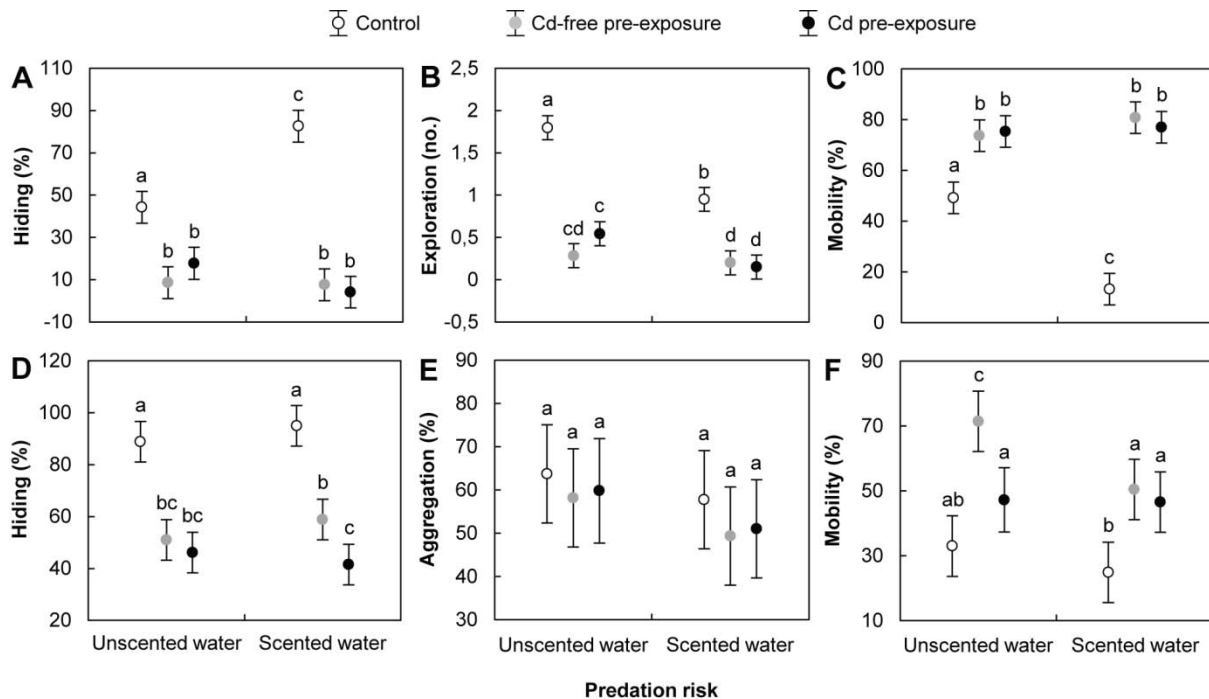


Figure 3. Behavioural responses measured in the presence/absence of predation risk. A) hiding in device #1 (*i.e.* proportion of time spent in holes); B) environmental exploration in device #1 (*i.e.* number of refuge areas used); C) mobility in device #1 (*i.e.* proportion of time spent moving when outside of refuges); D) hiding in device #2 (*i.e.* proportion of the time spent clinging to cages); E) aggregation in device #2 (*i.e.* proportion of the time spent clinging to cages filled with conspecifics); F) mobility in device #2 (*i.e.* proportion of the time spent moving when outside of refuges). *D. villosus* were exposed to the following conditions: Control = 24-h pre-exposure to Cd-free water + 4-min test exposure to Cd-free water (white dots); Cd-free pre-exposure = 24-h pre-exposure to control water + 4-min test exposure to 500 μg Cd/L (grey dots); Cd pre-exposure = 24-h pre-exposure to 500 μg Cd/L + 4-min test exposure to 500 μg Cd/L (black dots). All data are means of $N=60 \pm 95\%$ confidence intervals. Significant differences are indicated by different letters (Tukey HSD post-hoc test after ANOVA, $P < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0042435.g003

In device #1, length ranges for *D. villosus*, respectively with and without predation risk, were 15.32–19.08 and 14.66–20.00 mm in the control group; 15.00–19.50 and 16.88–20.39 mm in the Cd-free pre-exposure group; and 16.38–19.63 and 14.75–19.00 mm in the Cd pre-exposure group. In device #2, length ranges of *D. villosus*, respectively with and without predation risk, were 15.32–19.08 and 15.97–19.21 mm in the control group; 15.96–20.76 and 14.63–20.63 mm in the Cd-free pre-exposure group; and 16.64–19.50 and 16.47–21.06 mm in the Cd pre-exposure group. No significant effect of gammarid length was observed for hiding, exploration or mobility in device #1, and for hiding, aggregation or mobility in device #2 (Pearson correlation tests, $P > 0.05$; not illustrated).

Energy reserves

Results for three-factor ANOVA analysis are presented in Table 1. In device #1, Tukey HSD post-hoc tests revealed that, without predation risk, lipid content in both the Cd-free pre-exposure and Cd pre-exposure groups decreased significantly by about 30% compared to the control (both genders). No significant differences were observed between the Cd-free pre-exposure and Cd pre-exposure groups (Figure 4A).

Values for both genders in the Cd pre-exposure group showed a significant threefold decrease in glycogen content compared to both the control and the Cd-free pre-exposure group. No significant differences were observed between the control and the Cd-free pre-exposure group (Figure 4C). In the presence of predation risk, lipid content was significantly higher only in females of the Cd-free pre-exposure group and decreased significantly by threefold for both genders in the Cd pre-exposure group, compared to the control. For both genders, glycogen content did not differ significantly from the control in both the Cd-free pre-exposure and Cd pre-exposure groups. Values for females in the Cd pre-exposure group, however, were significantly lower than those in the Cd-free pre-exposure group. In both scented and unscented water, significant inter-sex differences were observed for all responses (female energy reserves being higher than those of males), except for lipid content in the Cd pre-exposure group in scented water and for glycogen content in the Cd pre-exposure group for unscented water.

In device #2, Tukey HSD post-hoc tests revealed that, without predation risk, lipid content values for both genders decreased significantly by more than 25% in the Cd-free pre-exposure group, while in the Cd pre-exposure group, lipid content decreased by around 10% in males only compared to the control. A significant difference was observed in both genders between the Cd-free pre-exposure and Cd pre-exposure groups, with lipid content in the Cd pre-exposure group being higher (Figure 4B).

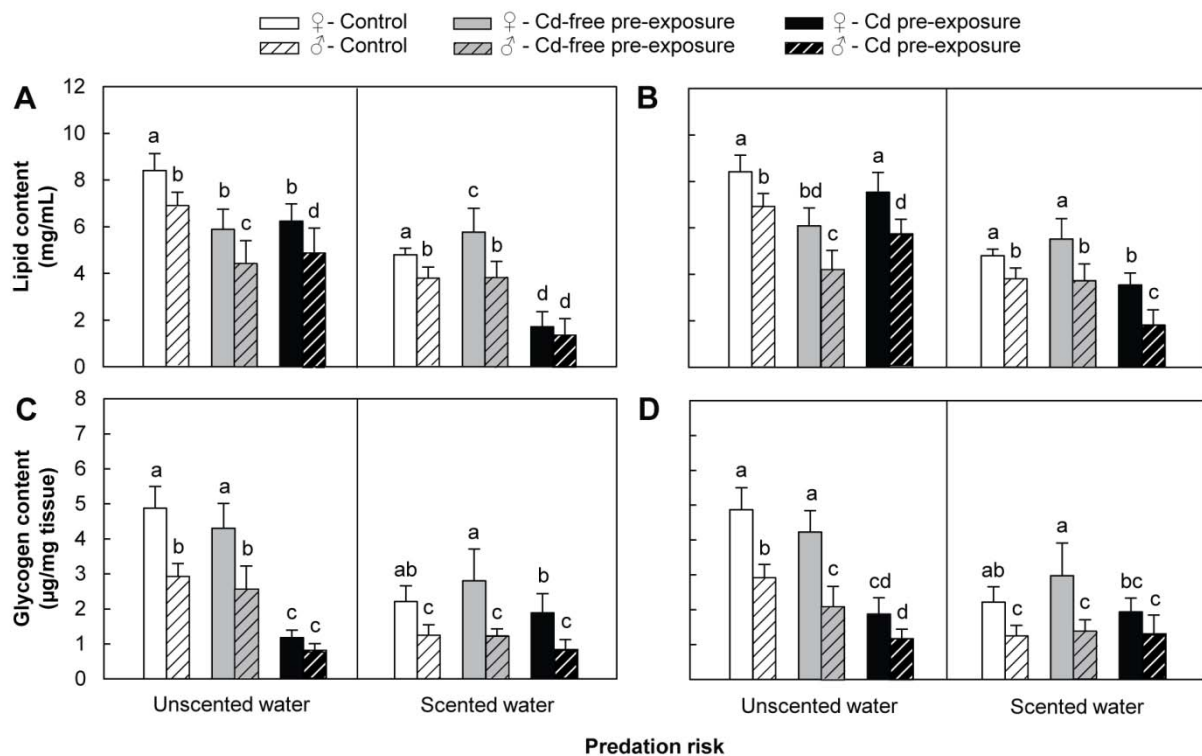


Figure 4. Energy reserves measured in the presence/absence of predation risk. A) lipid content in amphipods from device #1; B) lipid content in amphipods from device #2; C) glycogen content in amphipods from device #1; D) glycogen content in amphipods from device #2. *D. villosus* females and males are represented by filled and hatched bars, respectively. Energy reserves were measured following behavioural tests in which amphipods were exposed to the following conditions: Control = 24-h pre-exposure to Cd-free water + 4-min test exposure to Cd-free water (white bars); Cd-free pre-exposure = 24-h pre-exposure to Cd-free water + 4-min test exposure to 500 µg Cd/L (grey bars); Cd pre-exposure = 24-h pre-exposure to 500 µg Cd/L + 4-min test exposure to 500 µg Cd/L (black bars). All data are means of $N=10 \pm SD$. Significant differences are indicated by different letters (Tukey HSD post-hoc test after ANOVA, $P < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0042435.g004

Glycogen content values decreased significantly by around 30% in males in the Cd-free pre-exposure group and decreased significantly by more than twofold for both genders in the Cd pre-exposure group, compared to the control. Individuals in the Cd pre-exposure group contained significantly less glycogen than those in the Cd-free pre-exposure group (Figure 4D). In scented water, lipid content decreased significantly by more than 20% in both genders in the Cd pre-exposure group, compared with both the control and the Cd-free pre-exposure group. No significant differences were observed, however, between the control group and the Cd-free pre-exposure group. Glycogen content in both the Cd-free pre-exposure and Cd pre-exposure groups did not differ significantly from the control in both genders, though values for females from the Cd pre-exposure group were significantly lower than those of the Cd-

free pre-exposure group. Whether scented or unscented water, significant inter-sex differences were found for all responses (female energy reserves being higher than those of males), except for glycogen content in the Cd pre-exposure group for both scented and unscented waters.

Discussion

Cadmium responses

Toxic effect biomarker. Cd clearly had a significant effect on MDA values, with levels in *D. villosus* increasing upon exposure to the heavy metal in both experimental devices. A significant rise in MDA level has previously been reported for the amphipod *Gammarus pulex* after exposure to 300 µg Cd/L for 13 days [43]; and also in bivalves such as *Ruditapes decussatus* following exposure to 4, 40 and 100 g Cd/L for 28 days [44] and both *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* exposed to 200 µg Cd/L for 21 days [45]. MDA content is a reliable indicator of cell damage as it is a final product of membrane lipid degradation (*i.e.* lipoperoxidation). Indeed, the higher the MDA level the higher the level of cell damage [46]. Cd is known to generate reactive oxygen species that may act as signalling molecules in the induction of gene expression and apoptosis [47] and deplete endogenous radical scavengers. Cd is also known to cause damage to a variety of transport proteins including Na⁺/K⁺-ATPase, as has been demonstrated for *G. pulex* [48]. Our results indicated no significant difference between males and females, suggesting that responses to stress may not be gender-dependant in *D. villosus*, contrary to what has been shown in other amphipod species exposed to various stressors [34,35]. In addition, our study highlighted the rapidity of adverse effects to Cd, with significant increases in MDA levels being measured directly after a 4-min test exposure to 500 µg Cd/L without Cd pre-exposure.

Behavioural responses. Our results revealed a significant increase in *D. villosus* locomotion in both experimental devices when exposed to Cd, with both refuge use and exploratory activity decreasing, and mobility increasing when outside of refuges. Such stress-induced responses can be interpreted as a rapid evasion tactic and, in the field, may represent the first line of defence that reduces the probability of contact with the toxicant (*e.g.* upstream movement). In contrast, a significant decrease in locomotor activity has been reported in *G. pulex* following 120-h exposure to 7.5 µg Cd/L [48], and in *G. lawrencianus* following 72-h

exposure to 62 µg Cd/L [49], Cd concentrations that are ten- to fiftyfold lower than those used in this study. Differences to previous studies may be attributed to the assessment of a quasi-immediate/short-term locomotor response to Cd ecotoxicity in our experiments, which may reflect behaviour expressed under sudden discharges of highly concentrated toxic elements under natural conditions. Moreover, a 24-h pre-exposure to Cd did not result in any significant enhancement in behavioural response relative to that induced following a 4-min test exposure. Acclimation to Cd may explain why 24-h pre-exposed individuals were as mobile as instantaneously-exposed individuals. Indeed, a resistance to acute Cd ecotoxicity has been demonstrated in *G. pulex* pre-exposed for 24 h to different concentrations [50]. The induction of metallothionein-like proteins, which can sequester Cd in a less toxic form, is one of the most plausible hypotheses to explain the physiological acclimation of gammarids to Cd [51].

Energy reserves. In our study, total lipid and glycogen contents were assessed to estimate energy reserves of individuals. Lipids are stored in fat bodies and used during starvation and/or reproduction periods [52] while glycogen generally provides energy resources for short-term activities [53]. Both can be easily catabolised to supply the energy necessary for antitoxic defences involved in defence mechanisms [54]. Our results revealed that Cd affected energy reserves, especially when *D. villosus* individuals were pre-exposed. A similar decrease in both lipid and glycogen content has also been highlighted in *G. roeseli* exposed to Cd [40], and a decrease in lipid content has been observed in *Daphnia magna* following a 48-h exposure to Cd [55]. The decrease in energy content in organisms exposed to Cd could be explained by the energetic cost of tolerance offsetting the stress produced by the toxicant [54,56] as lipids and glycogen are both known to be first mobilised and rapidly used by organisms exposed to stressors [57]. A cumulative hypothesis might be the use of lipid and glycogen as an energy source for the increased locomotor activity observed in gammarids exposed to Cd. Our results also revealed higher energy reserves in females compared to males. These gender-based energy reserves differences can be explained by the reproductive process, oogenesis in females being more costly than spermatogenesis in males.

Responses to predation risk

Our results indicate that, in the absence of Cd, *D. villosus* were able to sense the alarm stimuli as, when exposed to chemical cues from a fish predator and/or injured

conspecifics, individuals expressed a more cautious behavioural strategy by (1) increasing the time spent hiding in holes, (2) decreasing exploratory activity (*i.e.* visiting refuge areas less), and (3) decreasing mobility when outside of refuges. These responses are in accordance with a general decrease in locomotor activity and drift rate reported for several gammarid species exposed to predation risk [39,58,59]. Minimising displacement is believed to reduce the risk of being spotted by a potential predator, and especially by a fish predator. As hypothesised in [60], fish predators may be avoided by hiding in dense structures and/or by decreasing activity levels, as fish swim faster than amphipods. The absence of aggregative behaviour in *D. villosus*, an efficient means reducing individual risk of predation, is coherent with the species' aggressiveness and voracity towards potential prey, including conspecifics, reported by other authors [61,62].

In Cd spiked water, gammarids exposed to predation risk spent most time outside of refuges and were more mobile when outside of refuges. The absence of antipredator behavioural adjustments following Cd exposure could be explained by a disruption in the transfer of chemical information. The deregulation of internal information transfer signalling pathways by chemical pollutants is well known in various organisms across the taxonomic spectrum [63] and concerns not only chemical information within animals (*i.e.* endocrine disruption) but also chemical information transfer between organisms. Several studies have demonstrated disruption of chemically induced antipredator responses by pollutants such as pesticides [64], surfactants [63] and heavy metals, which have all been shown to impair predator avoidance behaviour in fish [65], aquatic snails [66], amphibians [67] and water fleas [68]. In fish, for example, Cd has been demonstrated to significantly affect (1) environmental exploration performance and behavioural reactions to conspecific chemical communication in *Brycon amazonicus* exposed for 96 h to $9.04 \pm 0.07 \mu\text{g Cd/L}$ [6], and (2) the ability of *Oncorhynchus mykiss* to respond to natural pheromones after being exposed for 7 days to $2 \mu\text{g Cd/L}$ [65]. Even if the disruption mechanisms remain unresolved, three hypotheses can be proposed here: (1) a direct alteration to kairomone chemistry by Cd, (2) out-competing of kairomone molecules by Cd at the receptor sites, or (3) interference by Cd with some process along the signal transduction pathway from kairomone reception to behavioural response. Such impairments to chemosensory functioning may have a strong effect on highly ecological functions. Organisms use chemical messengers not only to detect enemies but also to sense prey and to locate food, obtain mates, recognise close kin or mark a territory and impairment could lead to important ecological perturbations in populations inhabiting contaminated

systems. We would suggest that assessing whether the absence of antipredator behavioural responses in Cd-exposed gammarids significantly compromises their survival when facing a predator should be the next step investigated. Additionally, more research is needed to determine the large-scale ecological implications of chemosensory dysfunction in metal-contaminated systems.

Conclusions

The results of this study demonstrate that 24-h exposure of *D. villosus* to Cd at non-lethal concentrations can (1) generate cell damage as revealed by higher MDA levels in exposed individuals, (2) induce short-term behavioural changes in locomotion, and (3) affect energy reserves. Our results also highlight that short-term Cd exposure can alter the olfactory-mediated behavioural responses of a freshwater gammarid to alarm substances from a predator or conspecifics. As a result, Cd could have important implications for predator avoidance strategies and, quite possibly, could affect other aspects of the animal–environment relationship, *e.g.* *D. villosus* prey population success, the leaf litter breakdown process, or toxicant biomagnification along the food chain. The mechanisms involved in Cd disturbance of olfactory functioning, depletion of energy reserves, and degradation of membrane lipid should be the subject of further studies.

Acknowledgments

We thank Céline Montazeau for her help in gammarid sampling and Romain Payot for his help in gammarid sampling and behavioural testing. The authors are also grateful to two anonymous referees for pertinent comments that helped to improve the manuscript and to Dr Kevin Roche for linguistic correction.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PS EG JNB. Performed experiments: PS EG CV. Analyzed the data: PS EG SD JNB. Contributed reagents/materials/analysis tools: PS EG CV. Wrote the paper: PS EG CV SD JFF JNB.

References

1. Wright DA, Welbourn PM (1994) Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ Rev* 2: 187-214.
2. Williams KA, Green WJ, Pascoe D (1985) Studies on the acute toxicity of pollutants to freshwater macroinvertebrates. 1. Cadmium. *Arch Hydrobiol* 102: 461-471.
3. 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.
4. Wallace WG, Hoexum-Brouwer TM, Brouwer M, Lopez GR (2000) Alterations in prey capture and induction of metallothioneins in grass shrimp fed cadmium-contaminated prey. *Environ Toxicol Chem* 19: 962-971.
5. Roast SD, Widdows J, Jones MB (2001) Impairment of mysid (*Neomysis integer*) swimming ability: an environmentally realistic assessment of the impact of cadmium exposure. *Aquat Toxicol* 52: 217-227.
6. Honda RT, Fernandes-de-Castilho M, Val AL (2008) Cadmium-induced disruption of environmental exploration and chemical communication in matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Aquat Toxicol* 89: 204-206.
7. Kusch RC, Krone PH, Chivers DP (2008) Chronic exposure to low concentrations of waterborne cadmium during embryonic and larval development results in the long-term hindrance of antipredator behavior in zebrafish. *Environ Toxicol Chem* 27: 705-710.
8. Sullivan BK, Buskey E, Miller DC, Ritacco PJ (1983) Effects of copper and cadmium on growth, swimming and predator avoidance in *Eurytemora affinis* (Copepoda). *Mar Biol* 77: 299-306.
9. Devin S, Beisel JN, Bachmann V, Moreteau JC (2001) *Dikerogammarus villosus* (Amphipoda: Gammaridae): another invasive species newly established in the Moselle River and French hydrosystems. *Ann Limnol* 37: 21-27.
10. Pöckl M (2007) Strategies of a successful new invader in European fresh waters: fecundity and reproductive potential of the Ponto-Caspian amphipod *Dikerogammarus villosus* in the Austrian Danube, compared with the indigenous *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. *Freshw Biol* 52: 50-63.
11. Pöckl M (2009) Success of the invasive Ponto-Caspian amphipod *Dikerogammarus villosus* by life history traits and reproductive capacity. *Biol Invasions* 11: 2021-2041.

12. Bij de Vaate A, Jazdzewski K, Ketelaars HAM, Gollasch S, Van der Velde G (2002) Geographical patterns in range extension of Ponto-Caspian macroinvertebrate species in Europe. *Can J Fish Aquat Sci* 59: 1159-1174.
13. Guerlet E, Ledy K, Giambérini L (2008) Is the freshwater gammarid, *Dikerogammarus villosus*, a suitable sentinel species for the implementation of histochemical biomarkers? *Chemosphere* 72: 697-702.
14. Gonzalo C, Camargo JA, Masiero L, Casellato S (2010) Fluoride toxicity and bioaccumulation in the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus* (Sowinsky, 1894): a laboratory study. *Bull Environ Contam Toxicol* 85: 472-475.
15. Maazouzi C, Masson G, Izquierdo MS, Pihan JC (2008) Chronic copper exposure and fatty acid composition of the amphipod *Dikerogammarus villosus*: results from a field study. *Environ Pollut* 156: 221-226.
16. Hellou J (2011) Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environ Sci Pollut Res* 18: 1-11.
17. Gerhardt A (1995) Monitoring behavioural responses to metals in *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea) with impedance conversion. *Environ Sci Pollut Res* 2: 15-23.
18. MacNeil C, Elwood RW, Dick JTA (1999) Predator-prey interaction between brown trout *Salmo trutta* and native and introduced amphipods; their implication for fish diets. *Ecography* 22: 686-696.
19. Kelleher B, Bergers PJM, Van den Brink FWB, Giller PS, Van der Velde G, *et al.* (1998) Effects of exotic amphipod invasions on fish diet in the Lower Rhine. *Arch Hydrobiol* 143: 363-382.
20. Eckmann R, Mörtl M, Baumgärtner D, Berron C, Fischer P, *et al.* (2008) Consumption of amphipods by littoral fish after the replacement of native *Gammarus roeseli* by invasive *Dikerogammarus villosus* in Lake Constance. *Aquat Invasions* 3: 187-191.
21. Mathis A, Hoback WW (1997) The influence of chemical stimuli from predators on precopulatory pairing by the amphipod, *G. pulex pseudolimnaeus*. *Ethology* 103: 33-40.
22. Brönmark C, Hansson LA (2000) Chemical communication in aquatic systems: an introduction. *Oikos* 88: 103-109.
23. De Meester L (1993) Genotype, fish mediated chemicals, and phototactic behaviour in *Daphnia magna*. *Ecology* 74: 1467-1474.

24. Kalmijn AJ (1988) Hydrodynamic and acoustic field detection. In: Atema J, Fay RR, Popper AN, Tavolga WN, editors. *Sensory biology of aquatic animals*. New York: Springer-Verlag. pp. 83-130.
25. Dahl J, Nilsson PA, Pettersson LB (1998) Against the flow: chemical detection of downstream predators in running waters. *Proc Biol Sci* 265: 1339-1344.
26. Chivers DP, Wisenden BD, Smith RJF (1996) Damselfly larvae learn to recognize predators from chemical cues in the predator's diet. *Anim Behav* 52: 315-320.
27. Chivers DP, Smith RJF (1998) Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: a review and prospectus. *Ecoscience* 5: 338-352.
28. Sih A (1987) Predators and prey lifestyles: an evolutionary and ecological overview. In: Kerfoot WC, Sih A, editors. *Predation: direct and indirect impacts on aquatic communities*. Hanover, New Hampshire: University Press of New England. pp. 203-224.
29. Pennuto C, Keppler D (2008) Short-term predator avoidance behaviours by invasive and native amphipods in the Great Lakes. *Aquat Ecol* 42: 629-641.
30. Wisenden BD, Cline A, Sparkes TC (1999) Survival benefit to antipredator behavior in the amphipod *Gammarus minus* (Crustacea: Amphipoda) in response to injury-released chemical cues from conspecifics and heterospecifics. *Ethology* 105: 407-414.
31. Wisenden BD, Pohlman SG, Watkin EE (2001) Avoidance of conspecific injury-released chemical cues by free-ranging *Gammarus lacustris* (Crustacea: Amphipoda). *J Chem Ecol* 27: 1249-1258.
32. Endler JA (1991) Interactions between predators and prey. In: Krebs JR, Davies NB, editors. *Behavioural ecology: an evolutionary approach*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. pp. 169-196.
33. Campbell JI, Meadows PS (1974) Gregarious behaviour in a benthic marine amphipod (*Corophium volutator*). *Cell Mol Life Sci* 30: 1396-1397.
34. Somom P, Felten V, Médoc V, Sroda S, Rousselle P, *et al.* (2010) Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environ Pollut* 158: 1288-1295.
35. McCahon CP, Pascoe D (1988) Increased sensitivity to cadmium of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) during the reproductive period. *Aquat Toxicol* 13: 183-194.

36. Kaldonski N, Lagrue C, Motreuil S, Rigaud T, Bollache L (2008) Habitat segregation mediates predation by the benthic fish *Cottus gobio* on the exotic amphipod species *Gammarus roeseli*. *Naturwissenschaften* 95: 839-844.
37. Perrot-Minnot MJ, Kaldonski N, Cézilly F (2007) Increased susceptibility to predation and altered anti-predator behaviour in an acanthocephalan-infected amphipod. *Int J Parasitol* 37: 645-651.
38. Médoc V, Rigaud T, Bollache L, Beisel JN (2009) A manipulative parasite increasing an antipredator response decreases its vulnerability to a nonhost predator. *Anim Behav* 77: 1235-1241.
39. Åbjörnsson K, Dahl J, Nyström P, Brönmark C (2000) Influence of predator and dietary chemical cues on the behaviour and shredding efficiency of *Gammarus pulex*. *Aquat Ecol* 34: 379-387.
40. 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.
41. Plaistow SJ, Troussard JP, Cézilly F (2001) The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its inter-mediate host *Gammarus pulex*. *Int J Parasitol* 31: 346-351.
42. Behrens W, Madère R (1991) Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Lipids* 22: 232-236.
43. Khan FR, Bury NR, Hogstrand C (2010) Cadmium bound to metal rich granules and exoskeleton from *Gammarus pulex* causes increased gut lipid peroxidation in zebrafish following single dietary exposure. *Aquat Toxicol* 96: 124-129.
44. Geret F, Serafim A, Barreira L, Bebianno MJ (2002) Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers* 7: 242-256.
45. Geret F, Jouan A, Turpin V, Bebianno MJ, Cosson RP (2002) Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat Living Resour* 15: 61-66.
46. Del Rio D, Stewart AJ, Pelligrini N (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovas* 15: 316-328.

47. Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D (2003) Target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride. *Toxicology* 192: 95-117.
48. Felten V, Charmantier G, Mons R, Geffard A, Rousselle P, *et al.* (2008) Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquat Toxicol* 86: 413-425.
49. 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: 289-297.
50. Stuhlbacher A, Maltby L (1992) Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). *Arch Environ Con Tox* 22: 319-324.
51. Howell R (1985) Effect of zinc on cadmium toxicity to the amphipod *Gammarus pulex*. *Hydrobiologia* 123: 245-249.
52. Cargill AS, Cummins KW, Hanson BJ, Lowry RR (1985) The role of lipids as feeding stimulants for shredding aquatic insects. *Freshwater Biol* 15: 455-464.
53. Sparkes TC, Keogh DP, Pary RA (1996) Energetic costs of mate guarding behavior in male stream-dwelling isopods. *Oecologia* 106: 166-171.
54. Dutra BK, Fernandes F, Lauffer A, Oliveira G (2009) Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyaella castroi* (Crustacea, Amphipoda). *Comp Biochem Phys C* 149: 640-646.
55. Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C (2005) Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp Biochem Phys C* 140: 175-186.
56. Sancho E, Ferrando MD, Fernandez C, Andreu E (1998) Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. *Ecotoxicol Environ Saf* 41: 168-175.
57. Durou C, Mouneyrac C, Pellerin J, Péry A (2008) Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. In: Amiard JC, Amiard-Triquet C, editors. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Paris: Lavoisier. pp. 273-289.
58. Baumgärtner D, Jungbluth AD, Koch U, Von Elert E (2002) Effects of infochemicals on microhabitat choice by the freshwater amphipod *Gammarus roeseli*. *Arch Hydrobiol* 155: 353-367.

59. Williams DD, Moore KA (1985) The role of semiochemicals in benthic community relationships of the lotic amphipod *Gammarus pseudolimnaeus*: a laboratory analysis. *Oikos* 44: 280-286.
60. Åbjörnsson K, Hansson LA, Brönmark C (2004) Responses of prey from habitats with different predator regimes: local adaptation and heritability. *Ecology* 85: 1859-1866.
61. Kinzler W, Kley A, Mayer G, Waloszek D, Maier G (2009) Mutual predation between and cannibalism within several freshwater gammarids: *Dikerogammarus villosus* versus one native and three invasives. *Aquat Ecol* 43: 457-464.
62. Platvoet D, Dick JTA, MacNeil C, Van Riel MC, Van der Velde G (2009) Invader-invader interactions in relation to environmental heterogeneity leads to zonation of two invasive amphipods, *Dikerogammarus villosus* (Sowinsky) and *Gammarus tigrinus* Sexton: amphipod pilot species project (AMPIS) report 6. *Biol Invasions* 11: 2085-2093.
63. Lürling M, Scheffer M (2007) Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trends Ecol Evol* 22: 374-379.
64. Hanazato T (1999) Anthropogenic chemicals (insecticides) disturb natural organic chemical communication in the plankton community. *Environ Pollut* 105: 137-142.
65. Scott GR, Sloman KA, Rouleau C, Wood CM (2003) Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 206: 1779-1790.
66. Lefcort H, Amman E, Eiger SM (2000) Antipredator behavior as an index of heavy metal pollution? A test using snails and caddisflies. *Arch Environ Contam Toxicol* 38: 311-316.
67. Lefcort H, Meguire RA, Wilson LH, Ettinger WF (1998) Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis, and antipredator behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. *Arch Environ Contam Toxicol* 35: 447-456.
68. Hunter K, Pyle G (2004) Morphological responses of *Daphnia pulex* to *Chaoborus americanus* kairomone in the presence and absence of metals. *Environ Toxicol Chem* 23: 1311-1316.

2. Réponses antitoxiques, comportements d'anti-prédation et réserves énergétiques de *Gammarus roeseli*

A la suite des résultats obtenus avec l'amphipode *Dikerogammarus villosus*, nous avons reproduit les mêmes expérimentations avec l'amphipode naturalisé *Gammarus roeseli*. Les problématiques à l'origine de l'étude, les questions posées ainsi que les démarches expérimentales sont rigoureusement les mêmes que celles présentées dans l'article publié en 2012 dans le journal PLOS ONE, à l'exception de deux différences au niveau du protocole :

- la concentration de cadmium utilisée pour *G. roeseli* a été fixée à 250 µg Cd/L (au lieu de 500 µg Cd/L pour *D. villosus*). En effet, les effets de la toxicité du cadmium sur la survie de *G. roeseli* ont été très peu (voire pas) étudiés. En raison de l'absence de données disponibles de CL50-24 h dans la littérature, la concentration utilisée dans notre étude a été établie sur la base des données issues d'expérimentations préliminaires et de données non publiées acquises par d'autres membres du laboratoire (Eric Gismondi en particulier). Au cours de nos tests, nous avons relevé un taux moyen de mortalité légèrement inférieur à 50% chez les mâles comme chez les femelles après l'exposition de 24 h à 250 µg Cd/L qui servait dans notre plan d'expérience de pré-exposition avant la réalisation des tests comportementaux. Chez l'espèce *G. roeseli*, postérieurement à la réalisation de nos tests, Boets *et al.* (2012) ont publié une CL50-72 h de 29 µg Cd/L et une CL50-96 h de 8,6 µg Cd/L, alors que Gismondi *et al.* (2012b) ont observé des CL50-96 h de respectivement 146 et 107 µg Cd/L chez les mâles et les femelles.
- *G. roeseli* étant en général de plus petite taille que *D. villosus*, les contraintes analytiques concernant les mesures des niveaux de MDA et des réserves énergétiques nous ont conduits à réaliser systématiquement 5 groupes de 6 individus par genre et par condition testée (au lieu de 10 groupes de 3 individus pour *D. villosus*), de façon à obtenir une quantité de tissus équivalente entre les deux espèces.

En évaluant les effets d'une exposition sublétales de cadmium sur les réponses comportementales d'anti-prédation, les réponses antitoxiques et les réserves énergétiques de *G. roeseli*, notre objectif final était d'acquies les informations pour comparer le patron de réponses déjà observé chez *D. villosus* avec celui d'une espèce présentant une origine, un

mode de vie et un niveau trophique différents. Dans cette partie, nous présentons donc les résultats issus des mesures d'effets toxiques, des comportements d'anti-prédation et de réserves énergétiques de *G. roeseli* soumis ou non à une exposition au cadmium. Pour faciliter la lecture des résultats, leur description et présentation (figures et tableaux) reprennent la même chronologie et la même forme que celle de l'article publié présenté dans le Chapitre V.1. A l'issue de cette présentation, la discussion est axée à la fois sur les résultats obtenus pour *G. roeseli* et sur la comparaison avec *D. villosus*.

Concernant la méthodologie, une distinction entre mâles et femelles a également été effectuée afin d'évaluer l'effet potentiel du genre sur les réponses mesurées. Les individus ont été systématiquement mesurés à la fin de chaque test afin de vérifier l'influence de la taille sur les réponses comportementales. Cependant, en l'absence de corrélations significatives entre les réponses mesurées et la taille des individus, les résultats ne sont pas illustrés (Tests de corrélation de Pearson, $P > 0.05$). De plus, aucun effet significatif du genre n'a été observé sur les réponses comportementales testées, les données pour chaque sexe ont donc été couplées afin de rendre les résultats plus robustes.

2.1. Résultats

2.1.1. Biomarqueur d'effets toxiques

Les résultats de l'ANOVA à trois facteurs des mesures de MDA sont présentés dans le **Tableau V-1**. Pour le dispositif #1, les tests post-hoc HSD de Tukey ont montré que, en l'absence de risque de prédation, les mâles et les femelles pré-exposés au cadmium présentaient des niveaux de MDA plus de deux fois supérieurs à ceux des groupes témoins (**Figure V-1A**). Chez chacun des deux sexes, aucune différence significative n'a été observée entre les témoins et les individus du groupe sans pré-exposition au cadmium. En présence d'un risque de prédation, les niveaux de MDA de chaque sexe du groupe pré-exposé au cadmium ont présenté une augmentation de plus du double par rapport au niveau du groupe témoin correspondant. Pour chaque sexe, une différence significative des niveaux de MDA a été observée entre chacun des trois groupes. De plus, aucune différence inter-sexe n'a été observée, quelles que soient les conditions de pré-exposition/exposition testées.

Tableau V-1. Analyse de variance (ANOVA à trois facteurs) des mesures du biomarqueur d'effets toxiques (MDA) et des réserves énergétiques (lipides et glycogène) chez *G. roeseli*, en fonction du genre, du risque de prédation et de la contamination au cadmium (Cd).

Unité expérimentale	Paramètre	Sources de variation	DF	F	P
Dispositif #1	MDA	Genre	1	0,05	0,8273
		Risque de prédation	1	1,35	0,2509
		Cd	2	90,05	<0,001
		Genre × Risque de prédation	1	1,49	0,2280
		Genre × Cd	2	0,57	0,5672
		Risque de prédation × Cd	2	2,45	0,0967
		Genre × Risque de prédation × Cd	2	0,55	0,5798
	Lipides	Genre	1	138,00	<0,001
		Risque de prédation	1	2,13	0,1511
		Cd	2	7,70	0,0012
		Genre × Risque de prédation	1	0,02	0,8962
		Genre × Cd	2	4,88	0,0118
		Risque de prédation × Cd	2	8,31	<0,001
		Genre × Risque de prédation × Cd	2	0,92	0,4051
	Glycogène	Genre	1	195,28	<0,001
		Risque de prédation	1	106,22	<0,001
		Cd	2	34,52	<0,001
		Genre × Risque de prédation	1	2,53	0,1180
		Genre × Cd	2	4,15	0,0218
		Risque de prédation × Cd	2	37,57	<0,001
		Genre × Risque de prédation × Cd	2	0,69	0,5063
Dispositif #2	MDA	Genre	1	2,08	0,1557
		Risque de prédation	1	0,80	0,3749
		Cd	2	105,75	<0,001
		Genre × Risque de prédation	1	0,53	0,4688
		Genre × Cd	2	1,89	0,1617
		Risque de prédation × Cd	2	0,97	0,3876
		Genre × Risque de prédation × Cd	2	0,50	0,6083
	Lipides	Genre	1	112,93	<0,001
		Risque de prédation	1	8,14	0,0064
		Cd	2	10,82	<0,001
		Genre × Risque de prédation	1	0,09	0,7690
		Genre × Cd	2	9,54	<0,001
		Risque de prédation × Cd	2	2,76	0,0736
		Genre × Risque de prédation × Cd	2	0,46	0,6347
	Glycogène	Genre	1	267,01	<0,001
		Risque de prédation	1	9,37	0,0036
		Cd	2	2,48	0,0948
		Genre × Risque de prédation	1	0,81	0,3729
		Genre × Cd	2	0,68	0,5128
		Risque de prédation × Cd	2	8,85	<0,001
		Genre × Risque de prédation × Cd	2	0,90	0,4140

Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

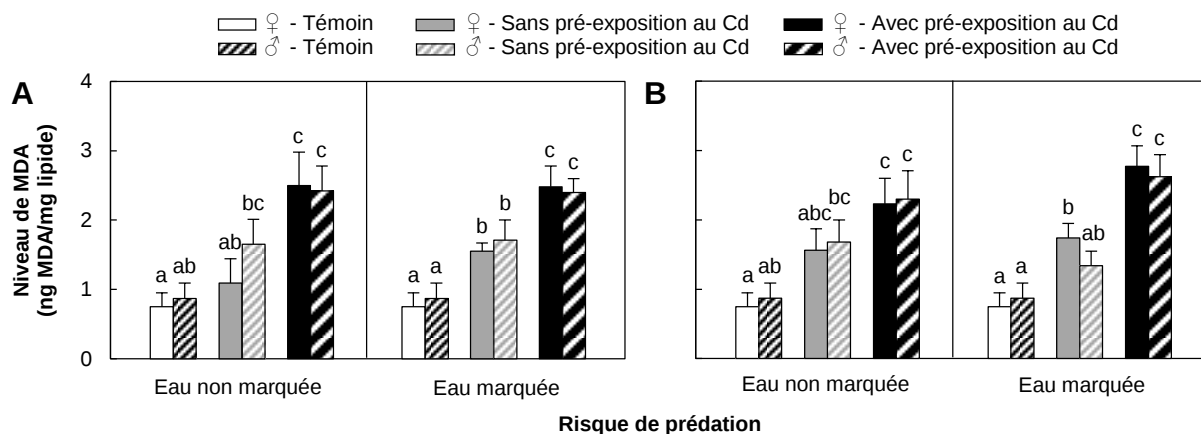


Figure V-1. Niveaux de Malondialdéhyde (MDA) mesurés en présence/absence d'un risque de prédation. A) dispositif #1 ; B) dispositif #2. Les femelles et mâles *G. roeseli* sont respectivement représentés par des barres pleines ou hachurées. Les niveaux de MDA ont été mesurés à la suite des tests comportementaux durant lesquels les amphipodes ont été exposés aux conditions suivantes : Témoin = pré-exposition de 24 h à une eau non cadmiée + exposition test de 4-min à une eau non cadmiée (barres blanches) ; Sans pré-exposition au Cd = pré-exposition de 24 h à une eau non cadmiée + exposition test de 4 min à 250 µg Cd/L (barres grises) ; Avec pré-exposition au Cd = pré-exposition de 24 h à 250 µg Cd/L + exposition test de 4 min à 250 µg Cd/L (barres noires). Chaque barre représente une moyenne de $N = 5 \pm$ écart type. Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (test post-hoc HSD de Tukey à la suite de l'ANOVA, $P < 0,05$).

Pour le dispositif #2, les tests post-hoc HSD de Tukey ont mis en évidence, en l'absence de risque de prédation, des niveaux de MDA de plus de deux fois supérieurs chez les mâles et femelles pré-exposés au cadmium en comparaison avec les niveaux de MDA du groupe témoin (**Figure V-1B**). Sans risque de prédation, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les niveaux de MDA des gammarès non pré-exposés au cadmium et ceux du groupe témoin. En présence d'un risque de prédation, une augmentation significative du niveau de MDA entre les individus non pré-exposés au cadmium et les témoins n'a été observée que chez les femelles. Les niveaux de MDA des groupes pré-exposés au cadmium étaient de plus de deux fois supérieurs à ceux des groupes témoins, et étaient également significativement supérieurs à ceux des groupes non pré-exposés au cadmium. Enfin, aucune différence inter-sexe n'a été observée, quelles que soient les conditions de pré-exposition/exposition testées.

2.1.2. Réponses comportementales

Les résultats de l'ANOVA à deux facteurs sont présentés dans le **Tableau V-2**. Pour le dispositif #1, les tests post-hoc HSD de Tukey ont indiqué que, en l'absence d'un risque de prédation, l'exploration de l'environnement et la mobilité des gammarès non pré-exposés au cadmium ont significativement diminué par rapport au groupe témoin, tandis qu'aucune différence marquée n'a été observée au niveau de l'utilisation des refuges (**Figures V-2A, B, C**). Pour le groupe pré-exposé au cadmium, des diminutions significatives de l'exploration et de la mobilité ont été observées par rapport au témoin, tout comme l'absence de différences au niveau de l'utilisation de refuges. Aucune différence n'a été mise en évidence pour les valeurs d'utilisation de refuges, d'exploration et de mobilité entre le groupe non pré-exposé au cadmium et celui avec pré-exposition au cadmium.

Table V-2. Analyse de variance (ANOVA à deux facteurs) des mesures d'utilisation des refuges, d'exploration et de mobilité chez *G. roeseli* obtenues avec le dispositif #1, et des mesures d'utilisation des refuges, d'agrégation et de mobilité obtenues avec le dispositif #2, en réponse à un risque de prédation et à une contamination au cadmium (Cd).

Unité expérimentale	Paramètre	Sources de variation	DF	F	P
Dispositif #1	Utilisation de refuges	Risque de prédation	1	17,66	<0,001
		Cd	2	9,12	0,0351
		Risque de prédation × Cd	2	1,94	0,1547
	Exploration	Risque de prédation	1	48,21	<0,001
		Cd	2	59,92	<0,001
		Risque de prédation × Cd	2	17,33	<0,001
	Mobilité	Risque de prédation	1	55,84	<0,001
		Cd	2	52,13	<0,001
		Risque de prédation × Cd	2	6,99	0,0223
Dispositif #2	Utilisation de refuges	Risque de prédation	1	8,92	0,0102
		Cd	2	29,90	<0,001
		Risque de prédation × Cd	2	2,15	0,1367
	Agrégation	Risque de prédation	1	2,36	0,1512
		Cd	2	0,63	0,3980
		Risque de prédation × Cd	2	0,06	0,8205
	Mobilité	Risque de prédation	1	16,43	<0,001
		Cd	2	9,91	0,0278
		Risque de prédation × Cd	2	2,17	0,1026

Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

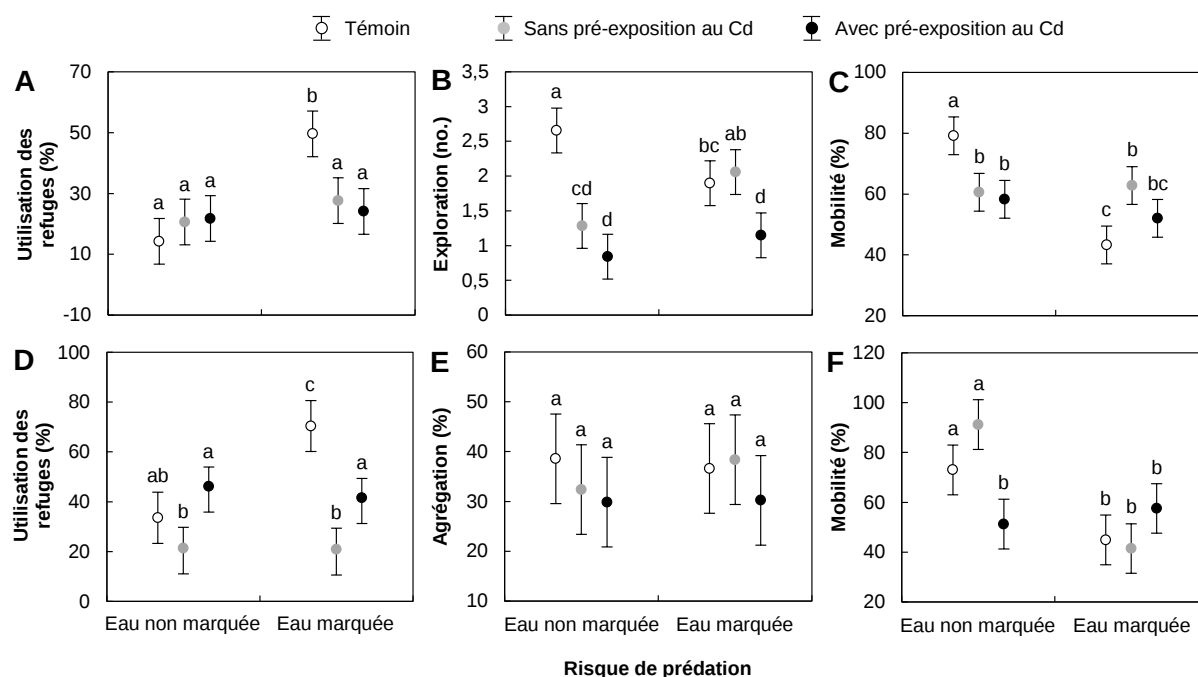


Figure V-2. Réponses comportementales mesurées en présence/absence d'un risque de prédation. A) utilisation des refuges dans le dispositif #1 (*i.e.* proportion du temps passé dans les trous) ; B) exploration de l'environnement dans le dispositif #1 (*i.e.* nombre de zones refuges différentes utilisées) ; C) mobilité dans le dispositif #1 (*i.e.* proportion du temps passé en mouvement en dehors des refuges) ; D) utilisation des refuges dans le dispositif #2 (*i.e.* proportion du temps passé accroché aux cages) ; E) agrégation dans le dispositif #2 (*i.e.* proportion du temps passé accroché aux cages contenant des congénères) ; F) mobilité dans le dispositif #2 (*i.e.* proportion du temps passé en mouvement en dehors des refuges). *G. roeseli* a été exposé aux conditions suivantes : Témoin = pré-exposition de 24 h à une eau non cadmiée + exposition test de 4-min à une eau non cadmiée (points blancs) ; Sans pré-exposition au Cd = pré-exposition de 24 h à une eau non cadmiée + exposition test de 4 min à 250 µg Cd/L (points gris) ; Avec une pré-exposition au Cd = pré-exposition de 24 h à 250 µg Cd/L + exposition test de 4 min à 250 µg Cd/L (points noirs). Chaque point représente une moyenne de $N = 60 \pm 95\%$ d'intervalle de confiance. Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (test post-hoc HSD de Tukey à la suite de l'ANOVA, $P < 0,05$).

Dans de l'eau marquée par un risque de prédation, les valeurs d'exploration et de mobilité du groupe témoin ont diminué significativement, alors que celles de l'utilisation des refuges ont significativement augmenté de plus du double par rapport aux réponses comportementales observées dans de l'eau non marquée. Aucun effet significatif du risque de prédation n'a été observé sur le comportement anti-prédateur à la fois dans le groupe sans pré-exposition au cadmium et dans le groupe pré-exposé au cadmium, à l'exception d'une valeur moyenne d'exploration significativement supérieure dans le groupe non pré-exposé au

cadmium en présence d'une eau marquée par rapport à la valeur obtenue dans une eau non marquée.

Pour le dispositif #2, les tests post-hoc HSD de Tukey ont montré que, en l'absence de risque de prédation, aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'utilisation de refuges et de la mobilité entre le groupe non pré-exposé au cadmium et le groupe témoin (**Figures V-2D, F**). Au sein du groupe pré-exposé au cadmium, nous avons observé une augmentation de l'utilisation de refuges par rapport au groupe non pré-exposé au cadmium, mais non significativement différente du témoin, ainsi qu'une diminution marquée de la mobilité par rapport au groupe témoin et au groupe non pré-exposé au cadmium.

En présence d'un risque de prédation, les résultats ont mis en évidence une augmentation significative de l'utilisation de refuges ainsi qu'une diminution marquée de la mobilité au sein du groupe témoin. Aucun effet significatif du risque de prédation n'a été observé dans les groupes avec ou sans pré-exposition au cadmium, excepté au niveau de la mobilité du groupe non pré-exposé au cadmium qui était significativement réduite dans de l'eau marquée. Aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'agrégation avec les congénères, quelles que soient les conditions testées (**Figure V-2E**).

Pour le dispositif #1, les spectres de taille de *G. roeseli*, respectivement en présence et en absence de risque de prédation, étaient de 9,56–13,05 et 10,44–14,40 mm dans le groupe témoin ; de 9,79–12,11 et 11,88–15,37 mm dans le groupe non pré-exposé au cadmium ; et de 10,02–12,98 et 9,53–13,97 mm dans le groupe pré-exposé au cadmium. Pour le dispositif #2, les spectres de taille de *G. roeseli*, respectivement en présence et en absence de risque de prédation, étaient de 10,72–12,41 et 10,26–13,57 mm dans le groupe témoin ; de 9,58–12,51 et 10,50–14,99 mm dans le groupe non pré-exposé au cadmium ; et de 10,69–15,27 et 9,09–14,66 mm dans le groupe pré-exposé au cadmium. Aucun effet significatif de la taille des gammarès n'a été observé au niveau de l'utilisation de refuges, l'exploration ou la mobilité pour le dispositif #1, et au niveau de l'utilisation de refuges, de l'agrégation ou de la mobilité pour le dispositif #2 (tests de corrélations de Pearson, $P > 0,05$; non illustré).

2.1.3. Réserves énergétiques

Les résultats de l'ANOVA à trois facteurs sont présentés dans le **Tableau V-1**. Pour le dispositif #1, les tests post-hoc HSD de Tukey ont révélés que, en l'absence de risque de prédation, l'unique différence significative au niveau de la teneur lipidique a été observée chez les femelles, entre le groupe non pré-exposé au cadmium et le groupe témoin. Aucune différence au niveau de la teneur en lipides n'a été mise en évidence entre les différents groupes chez les mâles (**Figure V-3A**). Les résultats chez les mâles et les femelles du groupe pré-exposé au cadmium ont mis en évidence une diminution d'environ 50% au niveau de la teneur en glycogène en comparaison avec le groupe témoin et une diminution significative a également été observée chez les amphipodes du groupe non pré-exposé au cadmium par rapport aux témoins (**Figure V-3C**).

En présence d'un risque de prédation, la teneur en lipides était significativement inférieure chez les femelles du groupe non pré-exposé au cadmium par rapport au groupe témoin, alors qu'aucune différence n'a été observée entre les groupes non pré-exposés et exposés au cadmium. Pour les mâles, aucune variation significative de la teneur lipidique n'a été mise en évidence entre les différents groupes. La teneur en glycogène n'a montré aucune différence significative entre les groupes. Cependant, les mâles du groupe pré-exposé au cadmium ont montré des valeurs inférieures à celles des mâles du groupe non pré-exposé au cadmium.

En présence ou absence d'un risque de prédation, des différences inter-sexes significatives ont été observées au niveau de toutes les réponses (les réserves énergétiques des femelles étant supérieures à celles des mâles), à l'exception des valeurs de teneurs lipidiques du groupe non pré-exposé au cadmium en présence d'une eau marquée ou non par un risque de prédation.

Pour le dispositif #2, les tests post-hoc HSD de Tukey ont montré que, en l'absence de risque de prédation, les valeurs de teneur lipidique étaient différentes du témoin uniquement chez les femelles du groupe non pré-exposé au cadmium, alors qu'aucune variation significative entre les groupes n'a été observée chez les mâles, de même qu'aucune différence n'a été mise en évidence entre les groupes non pré-exposés et pré-exposés au

cadmium (**Figure V-3B**). Les valeurs de teneur en glycogène ont montré une baisse significative d'environ 50% chez les femelles et les mâles du groupe pré-exposé au cadmium par rapport aux témoins, alors que les individus du groupe non pré-exposé au cadmium ne présentaient pas de teneurs en glycogène significativement différentes des témoins (**Figure V-3D**).

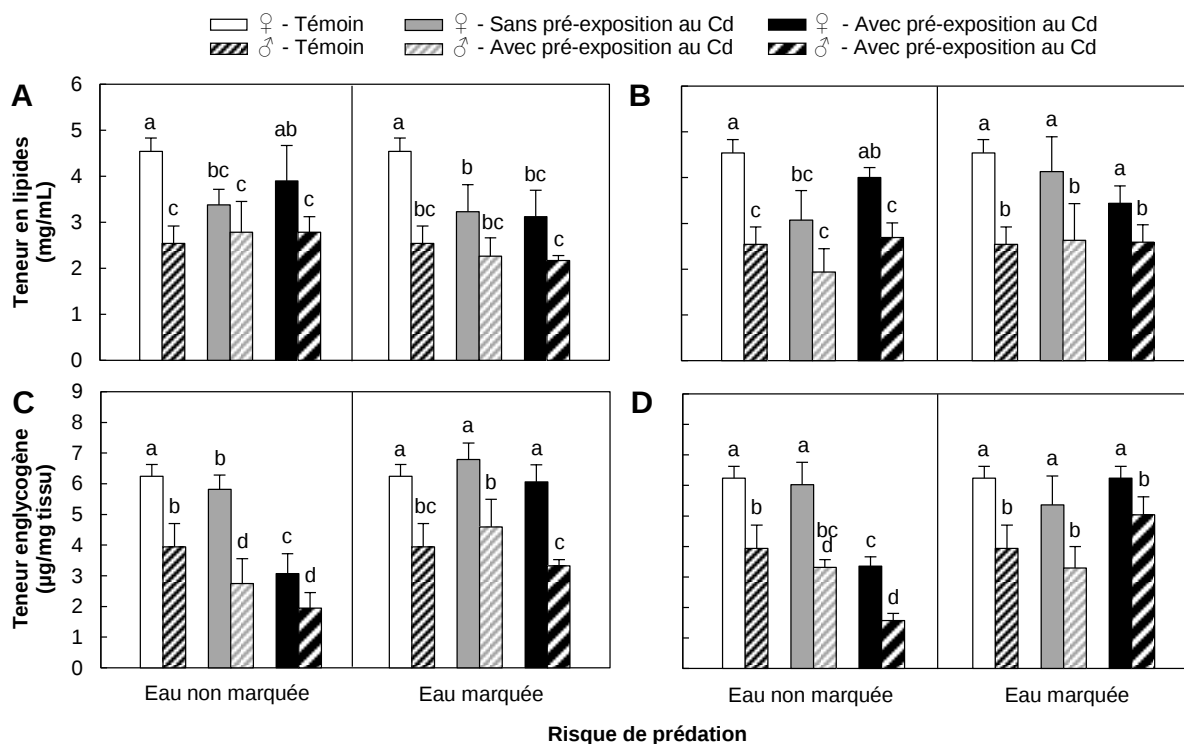


Figure V-3. Réerves énergétiques mesurées en présence/absence d'un risque de prédation. A) teneur en lipides des amphipodes du dispositif #1 ; B) teneur en lipides des amphipodes du dispositif #2 ; C) teneur en glycogène des amphipodes du dispositif #1 ; D) teneur en glycogène des amphipodes du dispositif #2. Les femelles et mâles *G. roeseli* sont respectivement représentés par des barres pleines ou hachurées. Les réserves énergétiques ont été mesurées à la suite des tests comportementaux durant lesquels les amphipodes ont été exposés aux conditions suivantes : Témoin = pré-exposition de 24 h à une eau non cadmiée + exposition test de 4-min à une eau non cadmiée (barres blanches) ; Sans pré-exposition au Cd = pré-exposition de 24 h à une eau non cadmiée + exposition test de 4 min à 250 µg Cd/L (barres grises) ; Avec pré-exposition au Cd = pré-exposition de 24 h à 250 µg Cd/L + exposition test de 4 min à 250 µg Cd/L (barres noires). Chaque barre représente une moyenne de $N = 5 \pm$ écart type. Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (test post-hoc HSD de Tukey à la suite de l'ANOVA, $P < 0,05$).

En présence d'un risque de prédation, les teneurs lipidiques n'ont présenté aucune variation significative entre les groupes, quel que soit le sexe testé. De la même manière, aucune différence marquée n'a été observée au niveau des teneurs en glycogène entre les groupes, quel que soit le sexe des individus.

En présence ou absence d'un risque de prédation, des différences inter-sexes significatives ont été observées au niveau de toutes les réponses (les réserves énergétiques des femelles étant supérieures à celles des mâles), à l'exception des valeurs de teneur lipidique du groupe non pré-exposé au cadmium en présence d'une eau non marquée.

2.2. Discussion

2.2.1. Effets du cadmium

Biomarqueur d'effets toxiques. Nos résultats ont clairement mis en évidence un effet significatif du cadmium sur les valeurs de MDA, avec parfois une augmentation significative des niveaux relevés chez *G. roeseli* en fonction de la pré-exposition au cadmium, et ce quel que soit le dispositif expérimental utilisé. Une augmentation des niveaux de MDA avait également été observée chez *D. villosus*. Des différences significatives apparaissent lors d'une exposition directe de 4 minutes (sans pré-exposition) que ce soit à des concentrations de 250 ou 500 µg Cd/L pour *G. roeseli* et *D. villosus*, respectivement. Cette sensibilité des niveaux de MDA relevée dans nos résultats coïncide avec le fait que la peroxydation des lipides (traduite par une augmentation de MDA, qui est le produit final de la lipoperoxydation des membranes) est une conséquence précoce et sensible d'une exposition au cadmium chez divers organismes vivants, comme cela a par exemple été montré chez la souris après une exposition de 24 h à des concentrations allant de 25 à 1250 µg Cd/kg (CdCl₂) (Manca *et al.*, 1991) ou après seulement 6 h d'exposition à 20 mg Cd/kg (CdCl₂) (Djukić-Ćosić *et al.*, 2008). Cette rapidité de réponse n'a toutefois pas vraiment été étudiée jusqu'à présent chez des organismes aquatiques, en particulier les crustacés d'eau douce, la plupart des tests étant basés sur des mesures de niveaux de MDA après des expositions de plusieurs jours. Gismondi *et al.* (2012d) ont par exemple mis en évidence une augmentation significative des niveaux de MDA chez *G. roeseli* à des concentrations en cadmium de 2 et 8 µg/L, après une exposition de 96 h.

Si dans notre étude les niveaux de MDA se sont avérés comparables entre *G. roeseli* et *D. villosus*, nous avons toutefois noté une augmentation supérieure chez *D. villosus* en présence de cadmium par rapport aux niveaux observés chez *G. roeseli*. L'hypothèse la plus probable pour expliquer la différence observée entre les deux amphipodes au niveau de leur niveau de MDA serait la différence de concentration en cadmium utilisée pour chaque expérimentation. Il serait intéressant de comparer les réponses obtenues chez les deux espèces à la suite d'expositions à des concentrations en métal identiques, voir à des gammes de concentrations.

Réponses comportementales. Nos résultats ont montré un impact significatif d'une exposition au cadmium sur la locomotion de *G. roeseli* pour les deux dispositifs testés, avec notamment une augmentation de l'utilisation de refuges (dispositif #2) et une diminution (1) de la mobilité lorsque les individus étaient en dehors de ces refuges (dispositifs #1 et #2) et (2) de l'exploration de l'environnement. Contrairement aux précédents résultats avec *D. villosus*, les réponses obtenues avec *G. roeseli* concordent avec la diminution de l'activité locomotrice rapportée par d'autres travaux. Ainsi, Felten *et al.* (2008) ont observé une diminution de l'activité locomotrice chez *G. pulex* à la suite d'une exposition de 120 h à une concentration de 7,5 µg Cd/L, de même que pour Vellinger *et al.* (2012a) (Annexe III) à la suite d'une exposition de 96 h à 27 µg Cd/L, ou encore avec l'espèce *G. lawrencianus* à la suite d'une exposition de 72 h à une concentration de 62 µg Cd/L (Wallace & Estephan, 2004). Cependant, la concentration utilisée dans notre cas était de 4 à 40 fois supérieure à celles utilisées dans ces études, en raison d'une durée d'exposition plus courte. De plus, comme pour *D. villosus*, une pré-exposition au cadmium n'a pas entraîné de différence significative au niveau des réponses comportementales par rapport à celles induites par une exposition test de 4 minutes au cadmium, à l'exception de l'utilisation de refuges et de la mobilité dans le dispositif #2 qui se sont avérées respectivement supérieure et inférieure à celles du groupe non pré-exposé au cadmium.

Réserves énergétiques. Nos résultats ont montré un impact significatif du cadmium sur les réserves énergétiques de *G. roeseli*, dans certaines des conditions testées. D'une manière globale, les valeurs obtenues ont mis en évidence une diminution des contenus en lipides et en glycogène chez les individus exposés. Toutefois, les résultats n'ont pas été aussi marqués que pour *D. villosus*, et l'absence de diminution significative des réponses dans

certaines conditions pourrait s'expliquer par une concentration en toxique trop faible pour induire une demande énergétique suffisamment conséquente de la part des mécanismes de défenses des individus. Une hypothèse non exclusive pour expliquer l'absence de diminution significative des réserves énergétiques dans certaines des conditions testées est le lien potentiel de ces paramètres avec les réponses comportementales mesurées. En effet, nous avons observé pour *D. villosus* une diminution marquée des contenus en lipides et en glycogène chez les individus exposés au cadmium probablement en lien avec une diminution de l'utilisation de refuges et une augmentation significative de la mobilité quel que soit le dispositif testé. Au contraire, chez *G. roeseli*, nous avons observé une diminution moins marquée des réserves énergétiques en même temps qu'une diminution de la mobilité chez les individus exposés au cadmium. D'une manière générale, le glycogène constitue la source d'énergie sollicitée dans les activités à court terme telles que la locomotion ou la ventilation (Sparkes *et al.*, 1996) et les lipides sont plutôt impliqués dans les activités à long terme telles que la reproduction (Cargill *et al.*, 1985). Toutefois, ces deux sources peuvent être rapidement catabolisées pour fournir l'énergie nécessaire aux défenses antitoxiques impliquées dans les mécanismes de défense (Dutra *et al.*, 2009), incluant probablement les réactions comportementales telles que l'activité de locomotion liée aux réponses d'anti-prédation. Nos résultats ont également montré des différences inter-sexes significatives au niveau des réserves énergétiques, les femelles présentant des contenus en lipides et en glycogène plus grands que ceux des mâles. Ces résultats coïncident avec ceux précédemment obtenus pour *D. villosus* au cours de notre travail doctoral et également avec ceux obtenus dans d'autres travaux chez le gammare (Clarke *et al.*, 1985; Gismondi *et al.*, 2012a,c).

2.2.2. Réponses à un risque de prédation

Nos résultats ont montré, en l'absence de cadmium, que les signaux de danger constitués par l'odeur du prédateur et l'odeur de congénères blessés ont été perçus par *G. roeseli*. En effet, en présence d'une eau marquée, les individus ont adopté une stratégie comportementale plus prudente que celle exprimée dans de l'eau non marquée en (1) augmentant le temps passé dans les refuges (*i.e.* en étant prostrés dans les trous ou accrochés aux cages), (2) diminuant l'exploration de l'environnement (*i.e.* en visitant moins de zones refuges différentes), et (3) diminuant la mobilité en dehors des refuges. Des travaux sur les comportements d'anti-prédation de *G. roeseli* ont également mis en évidence une diminution

de l'activité locomotrice (Bollache *et al.*, 2006) ainsi qu'une augmentation de l'utilisation de zones de refuge (Baumgärtner *et al.*, 2003; Bollache *et al.*, 2006; Starry *et al.*, 1998) en réponse à un risque de prédation. L'absence de comportement d'agrégation chez *G. roeseli*, à la fois en la présence et en l'absence de risque de prédation, pourrait s'expliquer par la présence des épines dorsales qui caractérisent cette espèce. Ces épines constituent parfois une défense efficace contre une prédation par les poissons (Bollache *et al.*, 2006), cependant, en présence d'une prédation par *C. gobio*, Kaldonski *et al.* (2008) n'ont observé aucun avantage significatif des épines sur le taux de prédation de *G. roeseli*. Par ailleurs, l'hypothèse que les épines dorsales de *G. roeseli* inhiberaient de manière indirecte les contacts entre congénères reste à vérifier.

En présence de cadmium, les gammares exposés à un risque de prédation ont adopté une stratégie comportementale risquée par rapport aux réponses comportementales exprimées dans de l'eau marquée sans cadmium en (1) passant plus de temps à l'extérieur des zones refuges (*i.e.* en les utilisant moins) et (2) en étant immobiles en dehors des refuges (*i.e.* en augmentant l'exposition à un prédateur potentiel). Tout comme pour *D. villosus*, une absence d'ajustements au niveau des comportements d'anti-prédation a donc été observée chez *G. roeseli* suite à une exposition au cadmium. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une dérégulation probable du transfert de l'information au niveau des voies de signalisation chimique internes par des polluants chimiques tels que le cadmium (cf. Sornom *et al.*, 2012 - Chapitre V.1).

3. Comportements d'appariement de *Dikerogammarus villosus*

Chez les amphipodes, le comportement de maintien pré-copulatoire, intervenant lors de la phase de gardiennage du partenaire sexuel pendant le cycle de reproduction des organismes, est un phénomène bien connu et a déjà été utilisé en tant que biomarqueur de substances toxiques (Blockwell *et al.*, 1998a; Pascoe *et al.*, 1994). L'étude de ce comportement présente un réel intérêt en écotoxicologie en raison, entre autres, de sa haute pertinence écologique. En effet, le pré-copulât est un prérequis qui conditionne directement le succès reproducteur de ces espèces. Même si de nombreux travaux se sont déjà intéressés aux effets de nombreux stress environnementaux, incluant les métaux lourds, sur les comportements pré-copulatoires de crustacés d'eau douce (Blockwell *et al.*, 1998a; Cold & Forbes, 2004; Davis, 1978; Linden, 1976; Malbouisson *et al.*, 1995; Pandey *et al.*, 2011; Poulton & Pascoe, 1990; Wildish, 1972), ces paramètres n'ont, à notre connaissance, pas encore été étudiés chez l'amphipode invasif *Dikerogammarus villosus*. Le but de cette étude a été d'évaluer, lors d'expérimentations en conditions contrôlées, les effets d'une exposition sublétales de cadmium en mesurant les comportements pré-copulatoires de *D. villosus*. Pour cela, deux types d'expérimentations ont été mis en place. Dans la première, il s'agissait d'évaluer la capacité de maintien de l'appariement des individus malgré le stress chimique. Dans la seconde, nous avons cherché à évaluer la capacité de reformation de pré-copulâts à la suite d'une séparation, en présence ou absence d'une contamination au cadmium.

3.1. Matériels et méthodes

3.1.1. Prélèvement des organismes et maintien au laboratoire

Les individus appartenant à l'espèce *D. villosus* ont été prélevés en automne 2011 à l'aide d'un tamis (5 mm de vide de maille) au niveau d'une station de la rivière Moselle dans le nord-est de la France (Ile du Saulcy, 49°07'N et 6°10'E). Des individus non appariés et en pré-copulâts ont été échantillonnés et transportés au laboratoire dans l'heure suivant leur échantillonnage dans des flacons en plastique opaque d'une contenance de 3 L et remplis d'eau de rivière prélevée sur place. Des feuilles collectées sur le site ont été placées dans chaque flacon afin de réduire les contraintes induites par la manipulation et le transport. Au laboratoire, les individus encore appariés ont été séparés et les gammares ont été maintenus à

une densité maximale de 20 individus/L dans des aquariums en plastique (31 cm de long, 28 cm de large, 14 cm de haut) rempli d'eau du robinet déchlorée, traitée contre les UVs et oxygénée. Des billes de verre (15 mm de diamètre, côté convexe vers le bas) et des plantes artificielles ont été ajoutées à chaque aquarium pour fournir des refuges aux amphipodes et limiter ainsi le cannibalisme. Les gammarès n'ont pas été nourris pendant la phase d'acclimatation, qui s'est déroulée dans une pièce thermostatée ($18 \pm 1^\circ\text{C}$) avec une photopériode de 12:12 h (lumière:obscurité). Les amphipodes ont été maintenus dans ces conditions pendant 48 h avant la réalisation des tests comportementaux.

3.1.2. Solution cadmiée

Selon la méthode décrite dans Sornom *et al.* (2012) (Chapitre V.1), une solution mère toxique a été préparée par dissolution de chlorure de cadmium (CdCl_2) puis stabilisée. Les solutions utilisées dans les tests comportementaux ont été préparées par dilution de la solution mère afin d'obtenir une concentration nominale de 500 $\mu\text{g Cd/L}$ dans les solutions filles.

3.1.3. Tests comportementaux

Les tests comportementaux ont été réalisés dans la même pièce thermostatée que pour l'acclimatation des gammarès, cependant, une lumière rouge a été préférée comme source d'éclairage afin de limiter le stress induit par l'expérimentation (les gammarès assimilant la lumière rouge à l'obscurité). Après avoir été maintenus pendant 48 h au laboratoire, les pré-copulâts formés pendant l'acclimatation ont été prélevés afin d'être utilisés dans les tests comportementaux. De cette manière, le stade reproducteur de la femelle n'a pas constitué un facteur limitant dans l'évaluation des capacités de maintien et de reformation de l'appariement (la phase pré-copulatoire étant naturellement dépendante du cycle de mue de la femelle). En effet, la majorité des femelles testées se trouvaient ainsi dans la phase précoce de pré-copulation et étaient réceptives et disponibles pour un ré-appariement pendant toute la durée de nos tests. En raison d'un biais probable sur les comportements d'appariement d'une oxygénation par bullage ou flux d'eau, les expériences #1 et #2 se sont déroulées en utilisant des boîtes de pétri, permettant ainsi d'obtenir des conditions statiques avec une bonne oxygénation des solutions testées et une hauteur d'eau suffisante pour

permettre le déplacement des individus (≈ 1 cm). Pour les tests en présence de cadmium, les boîtes de pétri en plastique (85 mm de diamètre et 2 cm de haut) ont été préalablement saturées pendant 48 h à l'aide des solutions cadmiées avant leur utilisation lors des tests comportementaux.

Expérience #1. Chaque boîte de pétri a été remplie avec 60 mL de solution test (eau témoin ou eau cadmiée). Un total de 60 pré-copulâts ($N = 30$ pré-copulâts/condition) a été prélevé parmi les individus acclimatés. La démarche expérimentale a consisté à placer délicatement un pré-copulât à l'intérieur de chaque boîte à l'aide d'une cuillère en plastique et d'un pinceau. A la suite de leur introduction dans les boîtes de pétri, le nombre total de pré-copulâts déformés a été relevé toutes les 5 minutes pendant les deux premières heures d'exposition, puis à intervalles de temps réguliers jusqu'à une durée maximale de 10 h d'exposition.

Expérience #2. Chaque boîte de pétri a été remplie avec 60 mL de solution test (eau témoin ou eau cadmiée). Un total de 60 pré-copulâts ($N = 30$ pré-copulâts/condition) a été prélevé parmi les individus acclimatés. Pour chaque pré-copulât, le mâle a été physiquement séparé de la femelle et chaque individu de la paire a été placé individuellement dans une boîte de pétri contenant la solution testée. Après 1 min d'acclimatation, la femelle a été introduite délicatement dans la boîte de pétri contenant le mâle à l'aide d'une cuillère en plastique et d'un pinceau. Dès l'introduction de la femelle, deux paramètres ont été mesurés : (1) le nombre de contacts entre le mâle et la femelle a été compté, et (2) le temps moyen avant ré-appariement a été chronométré. Pour chaque pré-copulât, les réponses ont été acquises en triplicat de façon à obtenir une moyenne $\pm$ écart-type. Au bout du premier appariement, une séparation physique du pré-copulât est opérée à l'aide d'un pinceau et chacun des deux individus a été de nouveau acclimaté séparément pendant 1 min, puis remis en contact, et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de trois valeurs par pré-copulât. L'expérience #2 s'est déroulée sur une durée maximale de 30 min par réplicat et par condition.

3.1.4. Analyses statistiques

L'ensemble des tests statistiques a été réalisé à l'aide du logiciel *Statistica* 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, USA). Concernant l'expérience #1, les données ont été comparées à

l'aide d'un test t pour échantillons appariés, avec un risque d'erreur de type I fixé à 0,1%. Concernant l'expérience #2, comme les données de base ont rempli les conditions de normalité et d'homogénéité de variance, chaque réponse a été analysée à l'aide d'une ANOVA à un facteur, suivie du test post-hoc HSD de Tukey, avec un risque d'erreur de type I fixé à 0,1%.

3.2. Résultats

3.2.1. Expérience #1

Dans le groupe témoin, nous avons observé une déformation progressive des pré-copulâts au cours du temps, avec notamment 7 pré-copulâts séparés instantanément après leur introduction dans les boîtes de pétri et un maximum de 21 pré-copulâts séparés atteint au bout de 8 h 15 min d'exposition (**Figure V-4**). En présence de cadmium, 12 pré-copulâts sur 30 se sont séparés instantanément après leur introduction dans les boîtes de pétri et tous les appariements ont été défaits au bout de 8 h 30 min d'exposition. A chaque temps de mesure, le nombre de pré-copulâts séparés en présence de cadmium a été significativement supérieur à celui observé dans le témoin (test t pour échantillons appariés, $P < 0.01$).

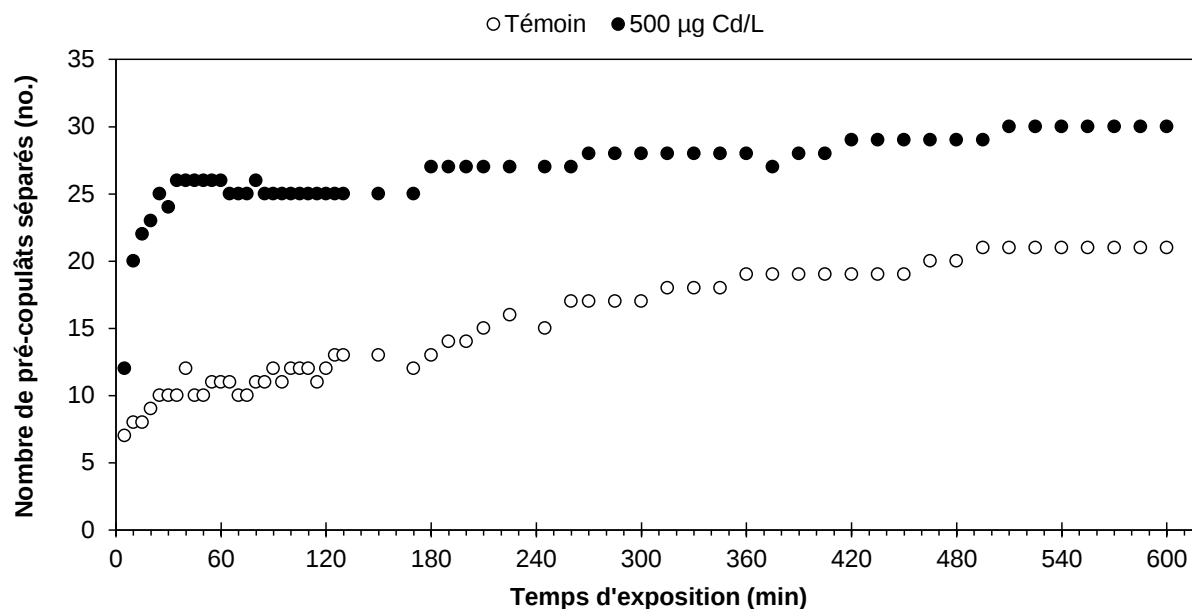


Figure V-4. Effet du cadmium sur la capacité de maintien de l'appariement chez *D. villosus*. Evolution du nombre de pré-copulâts séparés en fonction du temps d'exposition à une solution témoin (eau déchlorée) ou une solution cadmiée (500 µg Cd/L).

3.2.2. Expérience #2

En présence de cadmium, le temps moyen avant ré-appariement à la suite d'une séparation du pré-copulât a significativement augmenté de plus du double par rapport au temps de latence observé en condition témoin (**Figure V-5A**). Une augmentation de plus du double a également été observée au niveau du nombre moyen de contacts entre mâles et femelles avant appariement dans le groupe exposé au cadmium par rapport aux valeurs observées dans le groupe témoin (**Figure V-5B**).

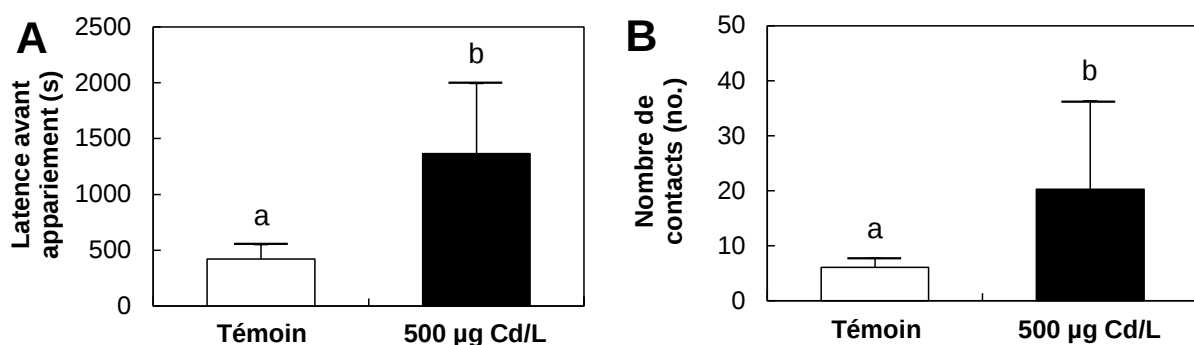


Figure V-5. Effet du cadmium sur la capacité d'appariement chez *D. villosus*. A) Temps moyen avant la reformation d'un pré-copulât à la suite d'une séparation du mâle et de la femelle ; B) Nombre moyen de contacts entre le mâle et la femelle avant appariement. Les données représentent des moyennes de $N = 30 \pm$ Ecart-type. Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (tests post-hoc HSD de Tukey après l'ANOVA, $P < 0.001$).

3.3. Discussion

Dans un premier temps, nos résultats ont montré qu'une exposition à une concentration sublétales de cadmium induisait une diminution significative de la capacité de maintien de l'appariement chez *D. villosus*. Bien qu'une augmentation du nombre de pré-copulâts séparés ait également été observée dans le groupe témoin, cette augmentation s'est avérée à la fois plus rapide et plus marquée dans le groupe exposé au cadmium. A notre connaissance, peu de données sont disponibles dans la littérature concernant l'effet du cadmium sur les comportements d'appariement chez les amphipodes d'eau douce. Une diminution de la capacité de maintien de l'appariement induite par la toxicité du cadmium a uniquement été observée par Poulton & Pascoe (1990) chez *G. pulex*. Toutefois, de nombreux

travaux ont déjà montré une diminution significative du maintien pré-copulatoire chez diverses espèces d'amphipodes suite à une exposition à des stressés variés (Butler *et al.*, 1982; Linden, 1970; McCahon & Poulton, 1991; Meliyan, 1991). Heckmann *et al.* (2005) ont par exemple observé une diminution significative du nombre de pré-copulâts formés chez *G. pulex* (*i.e.* une incapacité de maintien de l'appariement) 5 jours après une exposition à un pulse de 0,35 µg/L de lambda-cyhalothrine, un pesticide de la famille des pyréthroïdes fréquemment utilisé en agriculture. Une séparation immédiate des pré-copulâts a également été observée chez *G. pulex* après seulement 1 h d'exposition à 0,05 µg/L d'esfenvalérate, un pesticide appartenant également à la famille des pyréthroïdes (Cold & Forbes, 2004).

Dans un second temps, nos résultats ont mis en évidence un impact significatif du cadmium sur la capacité de ré-appariement après une séparation physique des pré-copulâts chez *D. villosus*. Dans une précédente étude, Malbouisson *et al.* (1995) ont observé une diminution significative de la capacité à reformer des pré-copulâts préalablement séparés chez *G. pulex*, suite à une exposition de 10 ou 20 min à 1 ou 2 mg/L de lindane. En présence de cadmium, nos résultats ont également montré une augmentation significative du nombre de contacts entre mâle et femelle avant l'appariement. Il est probable que cette augmentation soit l'indicateur d'une diminution de la capacité de détection de la femelle par le mâle ou d'une perturbation de la communication chez l'un des deux sexes.

La perturbation des voies de signalisation chimique par le cadmium constitue une hypothèse plausible concernant l'inhibition globale du comportement pré-copulatoire observée dans notre étude. En effet, des travaux ont déjà montré chez divers organismes aquatiques que certains polluants chimiques (*e.g.* pesticides, surfactants, métaux lourds, etc.) peuvent perturber non seulement le transfert de l'information chimique au sein de l'organisme (*i.e.* perturbation endocrinienne), mais également le transfert de l'information chimique entre les organismes (Hanazato, 1999; Lüring & Scheffer, 2007). Certaines études ont notamment pu mettre en évidence un lien direct entre une perturbation du comportement d'appariement et une exposition à une substance toxique. Lyes (1979) a par exemple observé une inhibition de la réception des signaux chimiques émis par la femelle chez *G. duebeni* suite à une exposition à de faibles concentrations au surfactant Tween 80, induisant une diminution du succès d'appariement. Il est établi que chez les crustacés d'eau douce, la reconnaissance d'un partenaire sexuel repose sur divers mécanismes complexes faisant intervenir, entre autres, des

facteurs morphologiques et hydromécaniques, mais également des systèmes chemosensoriels. La communication chimique joue un rôle majeur dans la reconnaissance et la localisation du partenaire sexuel, dans l'appariement pré-copulatoire et, d'une façon plus globale, dans la reproduction des organismes aquatiques, comme il a par exemple été montré chez des copépodes (Lonsdale *et al.*, 1998) ou chez des amphipodes et des isopodes (Thiel, 2011). Chez les crustacés, les kairomones, les phéromones peptidiques et les aminosucres qui peuvent se substituer aux kairomones sont utilisées en tant que molécules d'information (Rittschof & Cohen, 2004). Même si la nature chimique de ces molécules d'information et l'identité de toutes les molécules impliquées ne sont pas clairement connues, de nombreuses études ont permis d'établir que les signaux chimiques peuvent être de deux types : (1) des molécules solubles, généralement impliquées dans la localisation d'un partenaire sexuel, ou (2) des molécules de contact, généralement impliquées dans l'appariement (Asai *et al.*, 2000; Atema & Steinbach, 2007; Belanger & Moore, 2006; Caskey & Bauer, 2005; Ekerholm & Hallberg, 2005; Gleeson, 1991; Hardege *et al.*, 2002; Kamio *et al.*, 2002, 2008; Stebbing *et al.*, 2003; Ting & Snell, 2003). La mue de la femelle étant régulée de façon hormonale, il est également probable que la reconnaissance par le mâle du statut reproductif de la femelle (*i.e.* proximité de la mue, qui est indispensable à la fécondation) soit modulée par des composés chimiques. Alors que certains toxiques (*e.g.* nonylphénols) sont connus pour affecter les structures permettant d'émettre les signaux chimiques de communication, d'autres contaminants, tels que les métaux, sont connus pour affecter les récepteurs de ces signaux. Certains travaux réalisés chez diverses espèces de poisson ont ainsi permis de montrer que le cadmium endommageait les cellules olfactives de l'épithélium (Baker & Montgomery, 2001; Scott *et al.*, 2003) et par la même occasion l'aptitude des individus à détecter les informations chimiques. Même si des investigations sont nécessaires pour mieux comprendre ces mécanismes chez les crustacés d'eau douce, nous pouvons penser qu'il existe une certaine homologie entre les mécanismes impliqués chez les poissons et ceux mis en jeu chez les crustacés (Derby & Sorensen, 2008).

Bien que les mécanismes responsables d'une incapacité à (1) maintenir l'appariement, (2) détecter la présence d'une femelle réceptive et (3) reformer un pré-copulat soient encore mal connus, les réponses comportementales observées dans notre étude pourraient être la résultante non seulement d'une perturbation des mécanismes de communication chez l'un des deux sexes, mais également d'une diminution des réserves

énergétiques. L'allocation des ressources énergétiques en faveur des mécanismes de défenses antitoxiques au détriment des comportements pré-copulatoires, coûteux en terme d'énergie (Elwood & Dick, 1990; Jormalainen *et al.*, 2001; Plaistow *et al.*, 2003; Robinson & Doyle, 1985; Sparkes *et al.*, 1996), pourrait alors traduire un choix opéré par les individus dans le but d'optimiser leur résistance au stress généré par le cadmium et donc leur survie, plutôt que leur succès reproducteur (*fitness*).

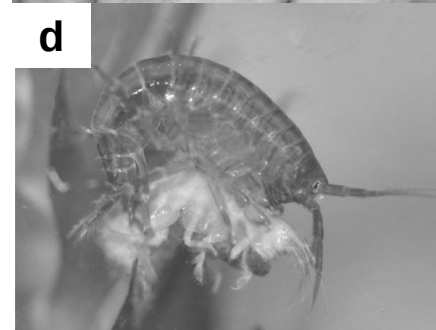
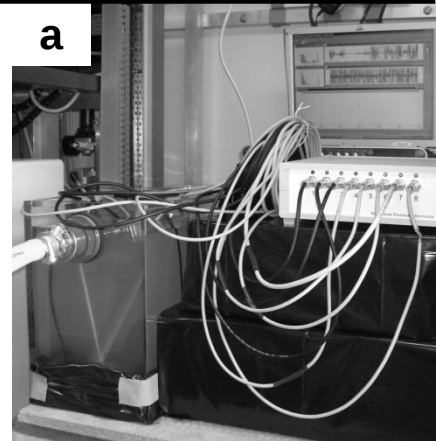
Dans une précédente étude, Plaistow *et al.* (2003) ont montré que le coût énergétique généré lors de l'appariement chez *G. pulex* s'était avéré fortement corrélé de façon positive à la taille de la femelle. Dans cette étude, l'augmentation du coût énergétique observée lors de l'appariement avec une femelle de grande taille était indépendante du coût généré par une réduction de l'alimentation pendant l'appariement, et a induit une diminution des contenus en lipides et en glycogène chez les individus appariés. Il serait alors intéressant de tester le choix que peut opérer le mâle entre une femelle de petite taille et une femelle de grande taille lors d'une reformation de pré-copulât après une séparation physique, à la suite d'une exposition à un stressor chimique tel que le cadmium. En présence du contaminant, deux choix s'offriraient alors au mâle en cas d'appariement : (1) optimiser sa résistance au stress en allouant ses ressources énergétiques aux mécanismes de défenses antitoxiques et donc choisir une femelle de petite taille, au détriment de son succès reproducteur (*i.e.* le nombre d'œufs dépend de la taille du marsupium de la femelle et donc de la longueur du corps) ou (2) optimiser sa *fitness* en choisissant une femelle de grande taille, malgré le coût énergétique associé (*i.e.* énergie nécessaire pour manipuler, soumettre et maintenir la femelle en pré-copulât, celle-ci présentant généralement un comportement de résistance lors de l'appariement comme il a par exemple été montré par Jormalainen & Merilaita, 1995).

Le moment de la copulation est une étape cruciale pour le gammare, puisque les cycles de reproduction et de mue coïncident chez la femelle adulte. La période de réceptivité des femelles est limitée à une fenêtre de temps de quelques heures environ, moment pendant lequel l'exuvie se détache du corps de la femelle (Hynes, 1955; Piscart & Bollache, 2011). C'est à ce moment précis que les femelles ovulent, pondent leurs œufs et en l'absence d'organes de stockage du sperme, doivent être accompagnées par un mâle afin que la fécondation puisse avoir lieu (Le Roux, 1933). C'est cette courte période de réceptivité des femelles pendant la mue parturienne qui a contribué à l'émergence du gardiennage pré-

copulatoire. Une incapacité du gammare à maintenir ou à reformer l'appariement pourrait alors diminuer voire éliminer la possibilité de copulation, ce qui induirait à terme une réduction de la *fitness* des organismes, avec des conséquences démographiques probables à un niveau populationnel.

CHAPITRE VI

Discussion Générale



**a**

Dispositif expérimental du Multispecies Freshwater Biomonitor (MFB) (Photo : A. Gerhardt).

**b**

Traitement des boues émises par une papeterie située à Golbey (Vosges, France) (Photo : L. Perquis).

**c**

Amphipodes appartenant à l'espèce *Dikerogammarus villosus* (Photo : P. Steinmann).

**d**

Amphipodes appartenant à l'espèce *Gammarus pulex* en pré-copulât : le mâle maintenant en amplexus la femelle, placée en dessous, à l'aide de ses gnathopodes (Photo : vienne-nature.asso.fr).

L'objectif général de notre étude consistait à utiliser diverses réponses comportementales afin d'appréhender les effets d'une contamination du milieu (sédiment et eau) chez des crustacés d'eau douce. Cette démarche avait pour but de mieux comprendre les différents mécanismes comportementaux mis en place chez des espèces distinctes exposées à un stress métallique, et également d'appréhender certains facteurs pouvant moduler ces réponses. Les apports de nos résultats sont relatifs à trois items : (1) la variabilité des réponses comportementales entre différentes espèces ou selon que l'on considère le genre des individus testés, (2) l'incidence du cadmium dans les réactions d'anti-prédation et d'appariement et l'hypothèse que la perception du danger ou du partenaire sexuel est amoindrie face au stress induit par le toxique, et (3) la précocité et la cohérence de la réponse comportementale.

1. Variabilité des réponses comportementales

1.1. Variabilité inter-espèces

Notre postulat de départ était que des espèces distinctes sont susceptibles de présenter des spectres de réponse différents (au niveau de l'intensité, de la durée ou du point de déclenchement), même si elles répondent globalement de la même manière à un stress environnemental donné (**Figure VI-1**).

D'un point de vue théorique, les tests d'évitement au substrat visaient à évaluer les effets d'une contamination métallique des sédiments sur les comportements de cinq espèces de crustacés. L'hypothèse sous-jacente était que l'absence de comportements d'évitement significatifs chez les espèces testées pouvait révéler une faible toxicité des sédiments, même si dans l'absolu les concentrations testées étaient relativement élevées. Le niveau d'intimité des organismes avec les sédiments peut être responsable des résultats obtenus, nos expériences ayant été réalisées en condition statique, c'est-à dire sans flux d'eau. Ces conditions simulent une eau stagnante non renouvelée comme peut l'être une eau de retenue. Il est possible par conséquent qu'il y ait eu, dans ces conditions, une toxicité plus grande pour les organismes fouisseurs que pour ceux qui restent à la surface du sédiment et/ou au niveau de la colonne d'eau. Pour les Gammaridae en particulier, l'absence de remise en suspension

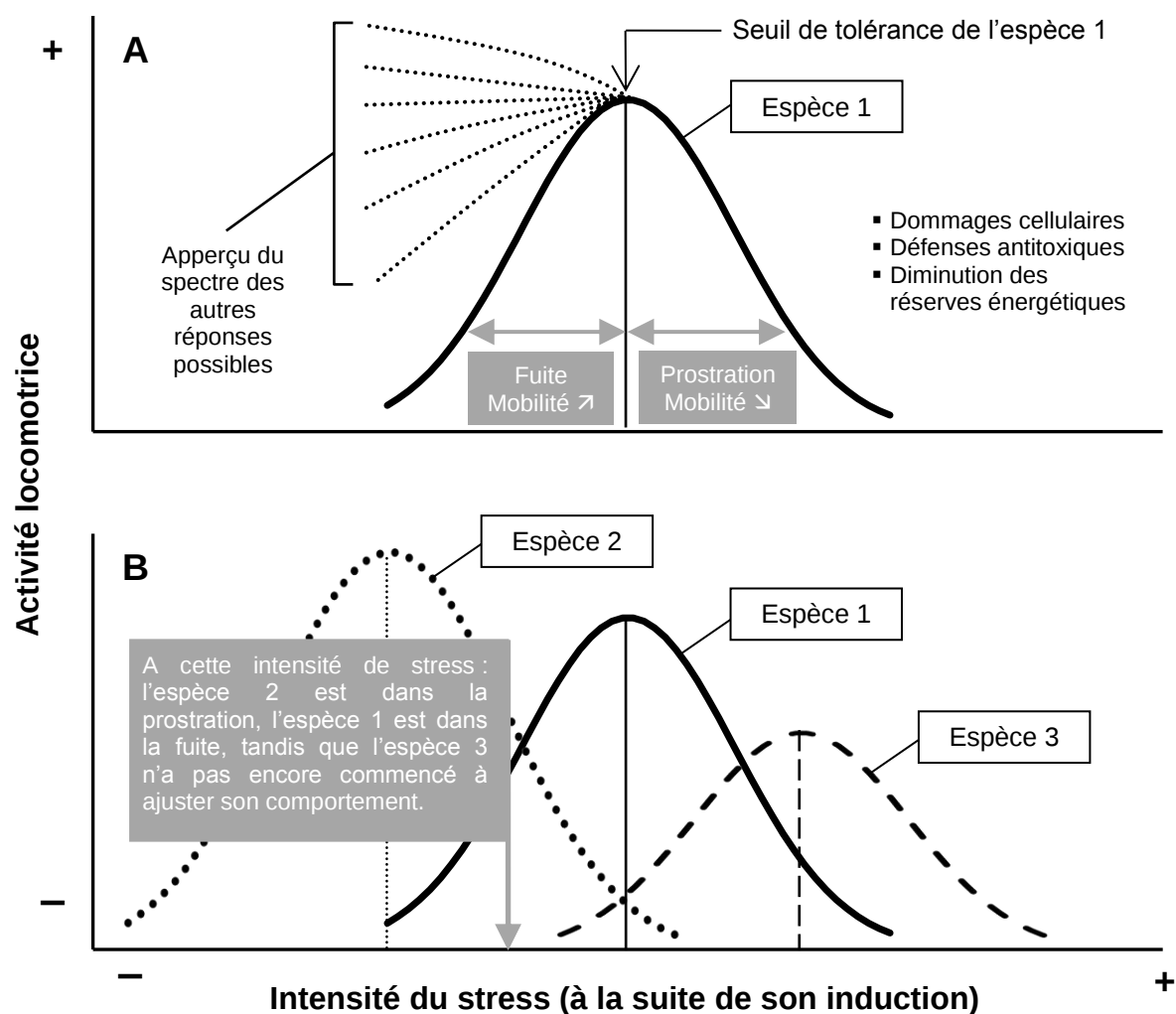


Figure VI-1. Exemple d'un patron de réponse théorique de l'activité locomotrice modifiée à la suite de l'induction d'un stress environnemental chez trois espèces différentes (réponse cumulée à celle observée en condition non-stressante, non représentée ici). A) Quelques réponses possibles de l'espèce 1 ; B) Comparaison des réponses simplifiées des espèces 1, 2 et 3.

des sédiments n'aurait pas entraîné une modification physico-chimique (modification de la partition phase dissoute/particulaire), et un changement de spéciation particulaire. Les espèces qui engendrent une bioturbation du fait de leur comportement naturel ou tout simplement suite à leur déplacement, sont susceptibles de provoquer une modification des équilibres chimiques telle que la colonne d'eau devient plus toxique. Cependant, nous n'avons observé pendant nos expériences ni comportement fouisseur de la part des écrevisses, ni aucune remise en suspension du sédiment suite aux déplacements des organismes testés.

1.1.1. Différences de perceptions de la contamination liées à l'intimité de l'espèce au substrat

Notre hypothèse de travail s'est avérée vérifiée : les deux espèces dont le comportement engendre un contact intime avec le sédiment (l'aselle *A. aquaticus* et l'écrevisse *A. astacus*) sont celles qui ont montré des différences significatives dans les traits mesurés. Les écrevisses ont présenté un comportement d'évitement du substrat contaminé dans les expériences où un choix leur était offert. Elles répondent par conséquent de manière cohérente par rapport à la toxicité du milieu. De manière beaucoup plus paradoxale, les aselles ont montré une fréquentation du sédiment multi-contaminé plus importante. Deux hypothèses d'interprétations peuvent être avancées. La première hypothèse est que le substrat contaminé présentait une différence pour un autre critère que la contamination, et que cette différence-là influençait le choix des aselles. La teneur en matière organique des sédiments que nous avons reçu dans le cadre du programme DIESE n'a pas pu être contrôlée préalablement à leur utilisation dans nos tests comportementaux. Il s'en est suivi que ces sédiments variaient à la fois par leurs teneurs en métaux lourds et par leur teneur en carbone organique apte à piéger les polluants. Nos résultats suggèrent cependant que le choix est d'abord conditionné par l'attrait du sédiment en matière organique plus que par sa toxicité, en particulier pour l'aselle. En effet, il a été montré que l'aselle fréquentait souvent les milieux présentant un taux naturel élevé en matière organique (Murphy & Leaner, 1982), celle-ci représentant une ressource alimentaire de choix pour cet organisme (Graça *et al.*, 1993; Marcus *et al.*, 1978)

Une étude comportementale de choix de sédiments serait à répéter avec du sédiment artificiel dopé, mais cette approche expérimentale n'a pas pu être réalisée dans le cadre de cette étude doctorale sur l'ensemble des espèces envisagées au départ. Si cette approche s'éloigne de conditions reflétant ce qui est observé en milieu naturel, elle permettrait de mieux comprendre les relations entre réponses comportementales et qualité du sédiment.

1.1.2. Variabilité de réponses comportementales entre espèces d'amphipodes

L'absence de réponses d'évitement du sédiment multi-contaminé chez les trois espèces d'amphipodes testées pourrait s'interpréter par un problème de perception de la

toxicité du sédiment pollué ou un problème de sensibilité des espèces utilisées. L'absence de remise en suspension des sédiments pendant nos tests pourrait être à l'origine d'une faible toxicité au niveau de la colonne d'eau fréquentée par ces amphipodes.

Certaines réponses comportementales relatives à la locomotion furent examinées dans le détail chez trois espèces de gammares soumises à un risque élevé de prédation. Les résultats obtenus chez *G. pulex*, *G. roeseli* et *D. villosus* nous ont permis d'identifier des comportements nettement différents selon l'espèce, même en dehors d'une situation de danger. Les réponses observées se sont avérées cohérentes avec le mode d'alimentation des amphipodes testés et leur utilisation respective de l'habitat dans des conditions naturelles. La singularité du comportement de l'amphipode invasif *D. villosus* a présenté un lien cohérent avec son caractère prédateur, d'opportuniste et invasif.

Nous avons également observé une forte variabilité des réponses comportementales entre les trois amphipodes face à une situation de danger. En effet, en présence d'un risque élevé de prédation, les différences observées en situation non stressante ont été amplifiées et ont permis de mettre en évidence des stratégies opposées d'évitement du prédateur.

Des différences comportementales marquées ont également été observées entre les deux amphipodes *G. roeseli* et *D. villosus* en présence d'un risque de prédation et d'une contamination de la colonne d'eau à des concentrations sublétales de cadmium. Des différences inter-espèces au niveau de réponses comportementales d'amphipodes ont déjà été observées dans la littérature, comme par exemple le comportement de ventilation (*i.e.* battements de pléopodes) en présence d'un gradient croissant de températures (Wijnhoven *et al.*, 2003) ou au niveau du comportement de prédation et de consommation de proies (Bollache *et al.*, 2008) ou de feuilles (Piscart *et al.*, 2011).

En dehors des réponses comportementales, des différences entre les amphipodes utilisés dans notre travail doctoral ont déjà été rapportées dans la littérature. Sroda & Cossu-Leguille (2011a) ont par exemple mis en évidence une différence de sensibilité entre *G. roeseli* et *D. villosus* exposés à des concentrations sublétales de cuivre : *D. villosus* s'est avéré moins affecté que *G. roeseli* au niveau des enzymes anti-oxydantes, des réserves énergétiques et des dommages cellulaires. Ces résultats sont en accord avec ceux de Boets *et al.* (2010, 2011a,b) qui ont observé une sensibilité au cuivre 10 fois plus élevée chez *G. roeseli* par rapport à *D. villosus*. Toutefois, lors d'une exposition à des concentrations sublétales de cadmium, *D. villosus* s'est montré plus sensible que *G. roeseli* (Boets *et al.*, 2012). Dans

certain cas, au sein d'une même espèce, les diverses études disponibles peuvent présenter des valeurs de sensibilité différentes, ce qui suggère la présence de paramètres pouvant agir de manière directe ou indirecte sur les réponses mesurées.

1.2. Variabilité inter-sexes

Les réponses des biomarqueurs peuvent être influencées par une multitude de paramètres tels que la température, la présence de parasites, ou encore la taille (et donc l'âge), le sexe ou le stade de reproduction (*i.e.* lien étroit avec le cycle de mue) des individus. La prise en compte de ces facteurs confondants (aussi appelés facteurs de confusion) est une nécessité en écotoxicologie, ceci afin de fournir une interprétation correcte des réponses mesurées et, par extension, de fournir une évaluation et une prédiction des effets d'un stress les plus justes et fiables possible. Dans le cadre de cette étude doctorale, nous nous sommes systématiquement intéressés à l'effet du genre sur les réponses des biomarqueurs mesurés, en réalisant toutes les expériences avec des lots de mâles et de femelles.

D'une manière globale, aucune différence inter-sexes au niveau des réponses comportementales n'a été mise en évidence lors de nos différentes expérimentations. Toutefois, les réserves énergétiques se sont avérées significativement différentes selon le sexe des individus : les contenus en lipides et en glycogène étaient supérieurs chez les femelles par rapport à ceux des mâles de la même espèce, à la fois pour *G. roeseli* et *D. villosus*. Ces résultats sont corroborés par ceux de Gismondi *et al.* (2012a,c), où des réserves énergétiques systématiquement supérieures chez les femelles par rapport aux mâles ont été observées chez l'amphipode *G. roeseli*. Dans ces études, les réponses testées ainsi que les différences inter-sexes étaient également modulées par la présence de parasites ou par la saison, qui constituent des facteurs confondants à part entière.

Selon nos résultats au niveau des réponses d'évitement au substrat et d'anti-prédation, il semble que le genre ne constitue pas un facteur pouvant influencer la réponse comportementale des organismes testés face à un stress biotique (*e.g.* risque de prédation) ou abiotique (*e.g.* contamination au cadmium), ou encore une combinaison des deux. Toutefois, les résultats d'une précédente étude réalisée dans le cadre d'une exposition à un stress salin chez *G. roeseli* nous avaient permis de mettre en évidence des différences significatives entre

mâles et femelles au niveau de la survie, la ventilation et l'osmo-régulation des organismes : les femelles avaient présenté une tolérance à la salinité inférieure aux mâles, une diminution de l'activité ventilatoire moins forte que les mâles et des concentrations en Na^+ et Cl^- respectivement supérieure et inférieure dans l'hémolymphe par rapport aux mâles (Sornom *et al.*, 2010 - Annexe I). Ces premiers résultats avaient influencé les plans d'expérience réalisés par la suite en y incluant l'effet genre systématiquement. Dans nos résultats, l'absence de différences inter-sexes au niveau des réponses comportementales nous conduit à émettre différentes hypothèses : (1) la manière dont chaque sexe est affecté par la toxicité varie selon le stress imposé, le cadmium n'ayant pas le même mode d'action que les sels minéraux précédemment testés ; (2) il se peut que les doses testées soient en-deçà des seuils à partir desquels le comportement est modifié différemment selon le sexe des individus ; (3) il est probable que, pour certaines réponses testées, les différences inter-sexes soient réduites par une forte unicité de réponse entre femelles et mâles au niveau de leur comportement, même en présence de différences à plus petites échelles (*e.g.* effets cellulaires, ressources énergétiques, etc.).

Des différences inter-sexes au niveau des réponses physiologiques ou biologiques suite à une exposition à un stress environnemental ont déjà été observées chez diverses espèces de crustacés d'eau douce, dont le gammare (Benoit *et al.*, 1976; Kinne, 1953a,b; McCahon & Pascoe, 1988a). Sroda & Cossu-Leguille (2011a,b) ont par exemple montré que les activités enzymatiques du stress oxydant (*e.g.* glutathion peroxydases et catalase) étaient plus fortes chez les femelles que chez les mâles, mais que, lors d'expositions de *G. roeseli* et *D. villosus* à différentes concentrations en cuivre, les femelles étaient moins résistantes que les mâles. Dans les études ayant évalué l'effet du genre sur la survie des organismes exposés à un stress, les auteurs ont généralement observé une tolérance supérieure des mâles par rapport aux femelles (McCahon & Pascoe, 1988a; Kinne, 1953a,b; Hoback & Barnhart, 1996). L'une des principales hypothèses pour expliquer la tolérance inférieure des femelles concerne les ressources énergétiques. En effet, Buikema & Benfield (1979) expliquent en partie la différence de sensibilité entre les deux sexes par une augmentation des besoins énergétiques du métabolisme au cours de l'ovogenèse et l'incubation des œufs chez les femelles. Il s'en suit chez les femelles une augmentation de la mobilisation et de la synthèse lipidique, par rapport au processus de spermatogenèse moins exigeant d'un point de vue énergétique. Cette

allocation des ressources pourrait conduire à un meilleur état physiologique chez les mâles alors que les deux sexes sont exposés à un même niveau de stress.

Cependant, d'autres auteurs ont observé une meilleure résistance des femelles par rapport aux mâles en évaluant la survie d'individus exposés à des substances non essentielles telles que le cadmium, le mercure ou le crésol (Benoit *et al.*, 1976; Emery, 1970; Gismondi *et al.*, 2012b; Heit & Fingerman, 1977). McClellan-Green *et al.* (2007) ont émis deux hypothèses pouvant expliquer la meilleure résistance au stress chez les femelles par rapport aux mâles : (1) un taux de mues des femelles supérieur à celui des mâles en condition de stress, le processus de mue étant considéré comme une des voies d'élimination des contaminants chez de nombreux invertébrés, et (2) un transfert des contaminants des organes vitaux et des tissus vers les œufs pouvant induire une meilleure métabolisation ou élimination des éléments toxiques chez les femelles (Di Pinto *et al.*, 1993; Oberdörster *et al.*, 2000).

De plus, la résistance d'un sexe par rapport à l'autre en présence d'un stress environnemental semble être fortement influencée par des facteurs extrinsèques tels que la saison. En effet, Gismondi *et al.* (2012a) ont montré des variations significatives des concentrations en glutathion et de sa synthèse (*i.e.* activité γ -glutamylcystéine ligase), ainsi que des réserves énergétiques chez *G. roeseli* en fonction du genre et de la saison. Tous ces paramètres se sont avérés supérieurs chez les femelles par rapport aux mâles, suggérant potentiellement des défenses antitoxiques plus efficaces et une meilleure gestion, chez les femelles, des coûts liés à ces défenses et à la reproduction.

Dans un contexte de suivi de la qualité d'un milieu, il est préférable de choisir les espèces mais également le sexe et le stade de développement des individus testés. En effet, la sélection des individus les plus sensibles, ainsi que les stades de développement les plus sensibles au sein de ces individus, est un critère indispensable en écotoxicologie afin de mieux prédire la toxicité de substances données et de fournir ainsi une évaluation la plus juste possible du risque lié à ces substances. Dans ce contexte, il est nécessaire de déterminer les facteurs dont les impacts sur les réponses testées sont négligeables, de mieux comprendre la variabilité de ces réponses et de définir les niveaux de référence d'une activité basale (*i.e.* sans effets d'un stress) (Xuereb *et al.*, 2009b). Aujourd'hui encore, la présence et les conséquences de tels facteurs sont souvent négligées ou sous-estimées dans les études en laboratoire

(McClellan-Green *et al.*, 2007), et ce en partie à cause de la lourdeur expérimentale qu'implique la prise en compte de ces paramètres et de la difficulté d'interprétation des résultats.

2. Effets du cadmium sur les réponses testées

2.1. Altérations du comportement

Dans nos premières expériences, l'absence de remise en suspension des sédiments n'aurait pas permis une modification physico-chimique (*i.e.* modification de la partition phase dissoute/particulaire), et un changement de spéciation particulaire. Devant la difficulté de concilier réalisme écologique (*i.e.* flux permettant une perturbation des sédiments contaminés qui assure une remise en suspension de particules et une biodisponibilité des contaminants pour les organismes non fouisseurs) et fiabilité expérimentale (*i.e.* le moins de perturbations possibles lors des vidéos pour en optimiser l'analyse), nous avons fait le choix d'une contamination directe de l'eau, ce qui pourrait correspondre dans le milieu naturel à une période de conditions anoxiques pendant laquelle il y a une re-solubilisation des contaminants dans la colonne d'eau suite à une variation des conditions d'oxydo-réduction.

Les résultats de l'exposition de *D. villosus* à un sédiment dopé au cadmium avec une concentration sublétales nous ont permis de mettre en évidence un évitement du substrat contaminé, alors qu'aucun choix n'avait été opéré par cette espèce et par les deux autres amphipodes lors de leur exposition à un sédiment naturel multi-contaminé. Ces résultats suggèrent une réponse non seulement dose-dépendante et différente selon l'espèce, mais également variable selon le type de stress appliqué (**Figure VI-1**).

Nous nous sommes donc intéressés par la suite à l'influence d'un stress biotique (*i.e.* risque élevé de prédation) et/ou abiotique (*i.e.* contamination au cadmium) sur les réponses comportementales d'amphipodes. En présence d'un risque élevé de prédation, les amphipodes exposés ont généralement présenté un thigmotactisme positif (*i.e.* comportement de recherche de contact avec des congénères ou un support physique tel qu'un refuge). Toutefois, ce thigmotactisme a été diminué en présence d'un stress chimique, ce qui suggère également que la réponse comportementale peut différer selon que le stress soit biotique ou abiotique. Dans

une précédente étude, Médoc *et al.* (2009) ont également mis en évidence une augmentation du thigmotactisme chez l'amphipode *G. roeseli* exposé à un stress biotique constitué par un risque de prédation élevé généré par le poisson *Gasterosteus aculeatus*. En présence du parasite acanthocéphale *Polymorphus minutus* (qui constitue également un stress biotique pour l'individu infecté) chez *G. roeseli*, une augmentation du thigmotactisme a été observée en réponse à un évitement du prédateur non-hôte par une manipulation du parasite, dans le but d'optimiser la survie des amphipodes infectés et donc la transmission du parasite.

L'exposition des deux amphipodes *G. roeseli* et *D. villosus* à des concentrations sublétales de cadmium a engendré des effets toxiques au niveau cellulaire, des impacts sur les réserves énergétiques et des modifications comportementales au niveau de leurs réponses d'anti-prédation. L'exposition de *D. villosus* à une concentration sublétales de cadmium a également révélé des modifications comportementales au niveau des réponses d'appariement sexuel. Des altérations du comportement par le cadmium ont déjà été mises en évidence dans la littérature, toutefois, les réponses testées dans ce travail doctoral apportent des informations complémentaires à celles déjà établies.

L'ensemble de nos résultats suggère une probable interférence du cadmium avec les voies de signalisation chimique impliquées dans la reconnaissance d'un danger ou d'un partenaire sexuel. Cette capacité de perturbation du transfert de l'information chimique par le cadmium a déjà été observée dans de nombreuses études, cependant, les mécanismes exacts impliqués dans cette perturbation sont encore mal connus et resteraient à explorer.

2.2. Conséquence écologique de la réponse comportementale : une approche du changement d'échelle

Les comportements d'anti-prédation ainsi que les comportements pré-copulatoires mesurés dans notre travail doctoral ont été modifiés en présence de cadmium. Une altération du comportement d'anti-prédation chez un amphipode exposé à un stress chimique aurait tendance à le surexposer aux prédateurs, tandis qu'une altération du comportement d'appariement sexuel aurait tendance à affecter sa reproduction. Ces altérations comportementales pourraient ainsi se répercuter sur de telles activités à forte pertinence écologique, et *in fine* conduire à la « mort écologique » de ces organismes. Les amphipodes

pouvant représenter plus de la moitié des invertébrés qui vivent sur le lit fluvial, c'est le réseau trophique tout entier qui peut être affecté par ces changements.

Pour plus de réalisme écologique, il serait intéressant de tester si une altération du comportement d'anti-prédation chez le gammare par une substance toxique telle que le cadmium induit une augmentation significative au niveau de sa prédation et de sa consommation par un poisson prédateur, tout en vérifiant que les prédateurs ne subissent pas aussi des changements comportementaux tels qu'une baisse de leur activité ou de leur nourrissage.

3. Précocité et cohérence des réponses comportementales testées

3.1. Précocité des réponses comportementales

Des changements comportementaux significatifs ainsi qu'une augmentation des dégâts cellulaires (MDA) ont été conjointement observés dès 4 minutes d'exposition à 250 µg Cd/L chez *G. roeseli* et 500 µg Cd/L chez *D. villosus*. De plus, une altération marquée de la capacité de maintien ou de reformation de l'appariement entre mâle et femelle a été observée dans les 30 premières minutes d'exposition à 500 µg Cd/L chez *D. villosus* : ces résultats démontrent la rapidité de réponse des biomarqueurs comportementaux. En effet, les changements comportementaux renseignent non seulement sur la toxicité du toxique employé, mais apportent une information avant que des dommages morphologiques ou structurels importants n'interviennent ou parfois dans le même temps, mais surtout avant qu'une létalité ne soit observée. Les résultats de notre étude vont globalement dans le sens de la définition des biomarqueurs comportementaux en tant que signaux d'alerte précoce (Gerhardt *et al.*, 1994).

Dans une étude récente, Felten *et al.* (2008) ont analysé conjointement diverses réponses comportementales et physiologiques chez l'amphipode *G. pulex* exposé à une contamination au cadmium. Cette étude constitue l'une des rares investigations chez les amphipodes d'eau douce ayant couplé des réponses comportementales à des biomarqueurs plus classiquement utilisés en écotoxicologie. Ces auteurs ont montré que, parmi l'ensemble des biomarqueurs utilisés, l'activité locomotrice des gammares exposés au stress métallique

était le paramètre dont la perturbation s'est avérée la plus prononcée, à concentrations et durées d'exposition équivalentes. Il est fort probable que, en présence de différentes durées d'exposition aux concentrations testées, ce paramètre aurait été modifié de façon précoce et aurait renseigné sur la toxicité du cadmium avant que des modifications ne soient quantifiables au niveau de la ventilation, de l'iono-/osmo-régulation, de la bioaccumulation ou encore de la survie des organismes.

3.2. Approche multicritères : intérêt de la prise en compte de marqueurs comportementaux

Nos résultats montrent que les marqueurs comportementaux préservent l'intégrité des organismes tout en fournissant une information sur la toxicité de leur milieu. Cependant, les réponses comportementales dépendent non seulement de l'espèce utilisée, du type de réponse mesurée, du stress étudié, mais également de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. Devant des mécanismes de réponse souvent complexes, le développement d'approches basées sur l'acquisition en parallèle de plusieurs biomarqueurs différents est une nécessité. En effet, ce type d'approche permettrait non seulement de comprendre les conséquences à l'échelle individuelle d'une exposition à un stress et de lier les réponses, mais également de mieux prédire les effets potentiels du stress sur les niveaux d'organisation supérieurs (Felten *et al.*, 2008; Hellou, 2011; Xuereb *et al.*, 2009a).

Une utilisation d'avenir consisterait à étudier les changements comportementaux chez des organismes exposés en temps réel à un flux d'eau dont on souhaite tester la qualité. Le terme de biocapteur désigne ainsi un analyseur biologique conçu pour fonctionner en continu ou semi-continu et donner une réponse en temps réel sur la qualité des flux au sein desquels il est placé. Il s'agit généralement de systèmes automatisables capables de détecter une réponse sortant de limites standards préétablies (Osbuild *et al.*, 1995). Le modèle biologique (*i.e.* biocatalyseur) étudié émet des réponses qui sont captées par un transducteur qui détecte le signal biologique et le transforme en un signal électrique aussitôt amplifié et traité. Une perspective intéressante est offerte par la mise en place de tels outils, comme par exemple le système Truitel ou le système Multispecies Freshwater Biomonitoring (MFB). Avec le MFB, Gerhardt et collaborateurs proposent par exemple ce type d'approche via la société *LimCo International GmbH*, avec la possibilité d'utiliser le gammare comme modèle

biologique catalyseur. Ces outils permettent également l'acquisition simultanée de plusieurs réponses comportementales et biologiques, et fournissent ainsi une complémentarité intéressante aux tests écotoxicologiques classiques, avec parfois la possibilité de relier les réponses mesurées à des effets biologiques ou écologiques. Enfin, ce type d'approches axées sur une analyse automatisée ou assistée par ordinateur, comme l'outil utilisé dans notre travail par exemple, répond à une nécessité de standardisation de la réponse. En effet, une grande partie des réponses comportementales mesurées dans de nombreux travaux repose sur des observations faites par un opérateur : les réponses mesurées sont de ce fait potentiellement sujettes à une variabilité liée à l'opérateur et des choix décisionnels qui lui sont propres.

Suite au développement de nouveaux outils et de nouvelles méthodologies, l'application des biocapteurs en flux continu dans des études *in situ* constitue une branche émergente dans le suivi de la qualité des milieux aquatiques (Gerhardt *et al.*, 2006). Cependant ce type de tests comportementaux sur des individus issus du milieu naturel doit au préalable, comme pour d'autres biomarqueurs, répondre à la question de la sélection de populations résistantes au stress dans des environnements perturbés. Il est par exemple possible que le jeu de la sélection au sein de variants ait *in fine* aboutie au sein d'écosystèmes pollués à des lignées relativement résistantes et/ou qui sont susceptibles de mettre en place des systèmes compensateurs. Les individus de ces populations-là pourraient présenter des comportements relativement différents de ceux de populations issues de milieux non perturbés.

La question de la variabilité inter-populations de marqueurs écotoxicologiques a peu souvent été étudiée à notre connaissance et mériterait d'être approfondie. La comparaison de diverses réponses mesurées in situ au niveau de populations distinctes permet dans certaines études de définir un intervalle de variation de ces réponses en condition non stressante, et d'établir ainsi un seuil de réponse dont tout dépassement révélerait une exposition et/ou des effets d'une contamination (Coulaud et al., 2011; Lacaze et al., 2011).

La nécessité de multiplier les approches multicritères réside également dans le fait qu'il soit possible que la réponse comportementale soit non-spécifique : des stress chimiques différents peuvent induire des réponses homologues sur une même espèce. De même, une diminution de l'activité locomotrice chez le gammaré peut par exemple être observée en

réponse à une exposition à divers stressseurs abiotiques (*e.g.* cadmium, cuivre, etc.), mais également à une exposition à un stress de type biotique (*e.g.* manipulation parasitaire, risque de prédation, etc.). Ce point est à la fois un inconvénient et un avantage : c'est un marqueur « universel » d'un certain point de vue mais son utilisation ne permet pas un diagnostic précis. Par contre, il devient possible de réaliser des analyses prédictives des effets d'un stressseur sur les organismes. Dans le cadre du biomonitoring, il est indispensable de bien connaître la sensibilité du biomarqueur qui peut être simplement utilisé comme un détecteur de la présence d'un stress ou d'une augmentation du taux des contaminants dans le milieu, sans connaissance des implications biologiques du signal. Il faut surtout que la sensibilité du biomarqueur soit appropriée aux milieux ou aux substances à analyser et en rapport avec le degré de contamination probable. La sensibilité des réponses détermine donc son domaine d'application.

Dans le cas de marqueurs comportementaux, si une sélection d'individus s'opère entre générations dans des conditions toxiques, les caractéristiques des individus survivants ne sont pas forcément transmises à la génération descendante. En effet, la plupart des études trans-générationnelles montrent que les comportements sont relativement peu héréditaires. Chaque individu réagit en fonction de son propre vécu et pas forcément en fonction de sa généalogie.

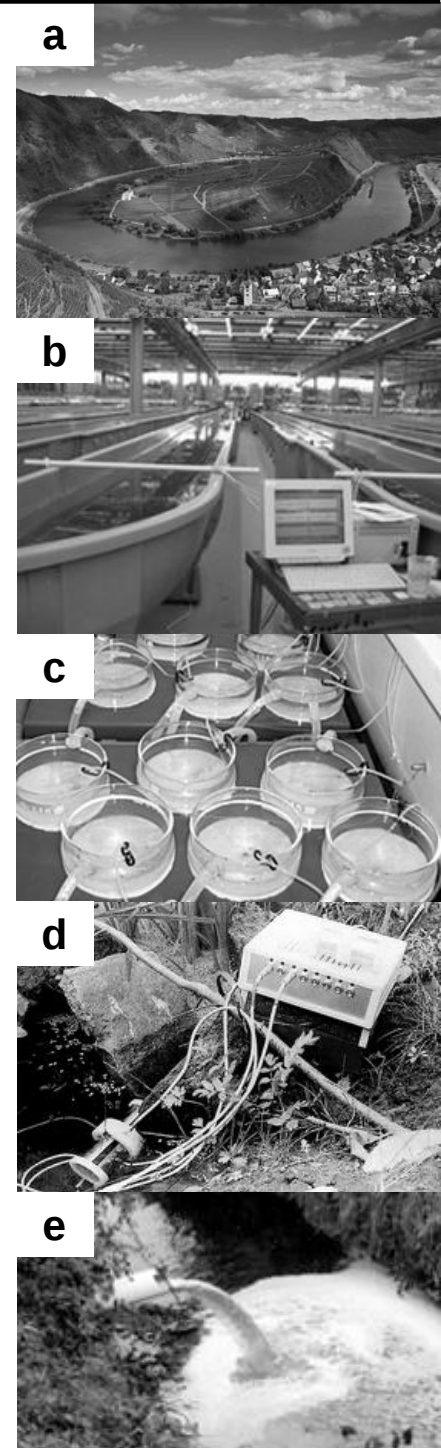
L'intérêt d'études multicritères réside également dans la multidimensionnalité potentielle d'un stress environnemental : l'effet d'un toxique comme le cadmium peut se répercuter sur plusieurs traits comportements liés ou non. Par exemple, si un individu accroît sa vitesse de nage, il augmente de surcroît ses besoins en oxygène, et pour répondre à cette demande, il est probable qu'il augmente la fréquence de battement des pléopodes. Il en résulte que n'importe quelle combinaison de réponses de plusieurs traits considérés de concert ne peut pas être obtenue.

Enfin, les avancées technologiques liées à un perfectionnement croissant du matériel et une diminution des coûts associés permettent aujourd'hui le développement et la mise en place de dispositifs d'acquisition originaux et peu onéreux. Myrick (2009) propose par exemple un système à bas prix (< 1000 \$, hors coût de l'ordinateur) permettant de capturer par *tracking* le déplacement d'organismes à l'aide de cinq caméras digitales filmant en

simultanée. L'analyse des déplacements est ensuite assurée par un logiciel standard de vidéosurveillance (utilisé dans le domaine de la sécurité), d'un programme gratuit d'analyse d'images et d'une feuille de calculs automatisés. De tels systèmes, à l'image de celui utilisé dans ce travail doctoral, offrent une alternative intéressante aux systèmes tels que le MFB et permettent de développer des outils d'analyse adaptés aux réponses particulières qu'un opérateur souhaiterait mesurer. En effet, dans le présent travail par exemple, une acquisition vidéo des réponses comportementales a non seulement permis d'étudier plusieurs caractéristiques du comportement à l'aide d'une mesure unique, mais a également permis de cibler des traits précis, originaux et encore très peu étudiés tels que la vitesse de nage des amphipodes.

CHAPITRE VII

Conclusions Et Perspectives



**a**

Boucle de la rivière Moselle dans sa partie allemande (Photo : B. Schmidt).

**b**

Utilisation du MFB en mésocosmes en laboratoire (Photo : A. Gerhardt).

**c**

Test de survie en microcosmes en laboratoire (Photo : irstea.fr).

**d**

Application du MFB *in situ* et première comparaison concluante avec d'autres outils biologiques et chimiques en flux continu au niveau de trois rivières européennes (Photo : A. Gerhardt).

**e**

Rejets directs d'effluents dans une rivière française (Photo : irstea.fr).

La première partie de ce travail a concerné l'étude des effets d'une contamination des sédiments sur la fréquentation du substrat chez cinq espèces de crustacés. Une première expérimentation a permis de montrer que l'isopode *Asellus aquaticus*, le décapode *Astacus astacus* et les amphipodes *Gammarus pulex*, *Gammarus roeseli* et *Dikerogammarus villosus* présentaient une variabilité comportementale interspécifique en terme d'évitement de substrats contaminés. Cependant, les réponses mesurées semblaient fortement influencées par la nature plus ou moins organique des sédiments testés. Une deuxième expérimentation visait à étudier les effets d'un sédiment dopé au cadmium sur la fréquentation du substrat et l'utilisation de refuges en réponse à un risque de prédation chez l'amphipode *D. villosus*. Nous avons mis en évidence un impact significatif du sédiment dopé sur le comportement d'évitement de *D. villosus*, ainsi qu'une potentielle altération du comportement d'anti-prédation par le cadmium.

La seconde partie était dévolue à l'influence d'un risque élevé de prédation sur les comportements des trois amphipodes *G. pulex*, *G. roeseli* et *D. villosus*, trois espèces phylogénétiquement proches, en l'absence de stress chimique. Elle a permis de montrer et quantifier une forte variabilité au niveau des stratégies d'anti-prédation adoptées par ces amphipodes. En présence d'un risque élevé de prédation constitué par les signaux chimiques du prédateur *Cottus gobio* et des congénères blessés ou consommés par les poissons, les trois amphipodes testés ont globalement augmenté leur utilisation des refuges. Toutefois, au niveau des autres réponses testées, de nettes différences sont apparues : *G. pulex* a été le seul à s'agréger auprès de congénères, *G. pulex* et *G. roeseli* ont tous les deux augmenté leur vitesse de nage alors que *D. villosus*, le plus rapide des trois en condition non stressante, a montré une prostration prononcée, et seuls *G. roeseli* et *D. villosus* ont diminué leur exploration de l'environnement. Ces combinaisons de réponses se sont avérées cohérentes avec les observations *ex situ* et *in situ* d'autres études, mais ont surtout permis de souligner le comportement singulier de l'amphipode invasif *D. villosus* qui tendrait à le sous-exposer à la prédation par rapport aux deux autres espèces testées, ce qui pourrait expliquer, en partie, son succès invasif.

Enfin, la dernière partie de ces travaux de thèse concernait l'évaluation des effets d'une contamination de l'eau au cadmium sur les réponses d'anti-prédation, antitoxiques et

énergétiques des deux amphipodes *G. roeseli* et *D. villosus*, ainsi que sur les réponses d'appariement sexuel de *D. villosus*. Les résultats de ces expérimentations ont permis de mettre en évidence une toxicité aiguë du cadmium : les expositions de courtes durées à des concentrations sublétales de cadmium ont induit des dommages cellulaires (*i.e.* augmentation des niveaux de MDA), une diminution des réserves énergétiques (*i.e.* diminution des contenus en lipides et en glycogène) et une modification de l'activité locomotrice (*i.e.* diminution de l'utilisation de refuges et de l'exploration chez les deux espèces, augmentation de la mobilité chez *D. villosus* et diminution de la mobilité chez *G. roeseli*). A l'image des différences comportementales révélées par la seconde partie de notre travail en l'absence de stress chimique, les deux amphipodes testés ont présenté des différences au niveau de leurs réponses respectives en présence de cadmium.

L'impact du cadmium a également été évalué par la mesure d'altérations de la capacité de maintien pré-copulatoire, de ré-appariement et, potentiellement, de détection du partenaire sexuel chez *D. villosus*. Nos observations suggèrent que le cadmium serait susceptible d'affecter les voies de signalisation ou de communication chimique chez le gammaré, et ainsi, de perturber la perception des signaux de danger et l'appariement sexuel. Même si les aspects mécanistiques sont encore à déterminer, de nombreuses études précédentes confirment la dérégulation par des polluants chimiques tels que le cadmium des voies de signalisation permettant le transfert de l'information au sein de l'organisme et entre les organismes. Les altérations observées dans notre étude au niveau de l'évitement de prédateurs potentiels et de la capacité à se reproduire chez les amphipodes pourraient avoir des impacts à une échelle populationnelle, avec des effets potentiels en cascade sur les communautés aquatiques. Il serait alors intéressant d'examiner chez les gammars exposés au cadmium les conséquences de ces altérations au niveau (1) de la prédation par un poisson prédateur (*e.g.* nombre de gammars consommés), et (2) des caractéristiques de leur descendance (*e.g.* nombres de juvéniles produits), bien que ce genre d'approche soit délicat à mettre en place, notamment du fait de la difficulté à avoir des élevages avec reproduction.

La question de la prise en compte de facteurs confondants pouvant influencer les réponses d'un organisme à un stress est de plus en plus présente dans les études de bioindication. En effet, ces facteurs sont, encore maintenant, trop souvent négligés, voire ignorés, alors qu'ils induisent une variabilité parfois importante au niveau des réponses biologiques. Même si de fortes différences inter-sexes ont été observées au niveau des

réerves énergétiques chez *G. roeseli* et *D. villosus*, l'influence du genre ou même de la taille (*i.e.* l'âge) des individus ne s'est pas révélée significative sur les réponses comportementales utilisées dans ce travail de thèse. Toutefois, ces réponses comportementales étaient basées exclusivement sur la locomotion et il semblerait que l'effet de tels facteurs confondants dépende fortement du type de réponse mesurée, puisque des différences liées au sexe ou à la taille (*i.e.* l'âge) des individus ont été mis en évidence dans de nombreux travaux, aussi bien au niveau de réponses physiologiques ou biologiques (*e.g.* survie, activités enzymatiques, etc.), que de réponses comportementales (*e.g.* ventilation).

Parmi les perspectives que laisse entrevoir ce travail de thèse, un intérêt certain réside dans le besoin de coupler les analyses de réserves énergétiques et d'effets toxiques aux mesures comportementales. Ce type de couplage permet de mieux évaluer le moment à partir duquel le volume d'activité locomotrice présente un coût en terme de besoins énergétiques, ce qui mériterait d'être approfondi. Dans un contexte d'étude multicritères, il serait par exemple pertinent d'évaluer à partir de quel moment une diminution des ressources énergétiques induit des modifications notables au niveau de l'activité ventilatoire (*i.e.* respiration). Pour appréhender ces processus et mieux comprendre le lien entre les réponses physiologiques et comportementales, diverses expérimentations pourraient être mises en place. Par exemple, des tests d'endurance au niveau de l'activité locomotrice de gammarés placés dans un flux d'eau continu, en présence ou non d'une substance toxique et avec différentes durées d'exposition pourraient être couplés à l'analyse des dommages cellulaires (*i.e.* MDA) et des réserves énergétiques, mesurés immédiatement après les tests comportementaux. Des tests complémentaires basés sur des mesures de la consommation d'oxygène pourraient également être envisagés.

L'évaluation des ajustements au niveau des réponses comportementales mises en place par un organisme à la suite d'expositions de longue durée (*i.e.* plusieurs jours) et à de faibles concentrations fait également partie des perspectives. En effet, bien que l'étude des changements comportementaux induits par un stress aiguë (*i.e.* de fortes concentrations sur des durées d'exposition courtes) révèle la précocité des biomarqueurs comportementaux, les investigations concernant les effets d'une toxicité chronique répondent à un plus grand réalisme écologique en étant plus représentatives du type de pressions anthropiques que subissent habituellement les écosystèmes aquatiques. Il est fort probable que les ajustements

effectués par un organisme sur son comportement à court terme différent de ceux pouvant être mis en place à plus long terme. De plus, notre étude n'a été conduite que sur le cadmium. Il serait intéressant de tester les réponses mesurées en présence d'autres stressors.

Alors que l'étude des impacts de substances toxiques seules et en conditions simplifiées (*i.e.* sans la prise en compte de facteurs confondants) nous semble indispensable afin de mieux comprendre les modes d'action et les impacts des xénobiotiques, les effets combinés de mélanges de polluants sont encore largement méconnus, et le champ d'investigation demeure vaste (Marking, 1985; Moulder, 1980; Norwood *et al.*, 2003; Spehar & Fiandt, 1986; Vellinger *et al.*, 2012b). Dans une approche multicritères basée sur l'évaluation de réponses comportementales et physiologiques de *G. pulex* exposé au cadmium et à l'arsenic, sous sa forme inorganique As(V), à trois températures différentes, nous avons contribué à montrer (1) un impact significatif des métaux seuls sur les réponses comportementales des organismes exposés, (2) un effet significatif de la température sur la plupart des impacts, mais également (3) un effet globalement additif des mixtures binaires (Vellinger *et al.*, 2012a - Annexe III). Ainsi, une diminution des activités locomotrice et ventilatoire a été observée parallèlement à une diminution de la concentration hémolympatique en ions Cl^- , avec des réponses plus marquées à la plus forte température testée.

Cependant, il nous semble difficile de pouvoir reproduire, dans des expérimentations en microcosmes ou en mésocosmes, la complexité des mécanismes et des processus mis en jeu en condition naturelle, et de pouvoir fournir une analyse intelligible des réponses d'un organisme à ces contraintes. Le développement de méthodes et outils d'analyse basés sur l'acquisition de réponses variées (*i.e.* comportementales et biologiques/physiologiques) face à divers types de stress offre cependant des perspectives intéressantes. La réponse comportementale dépend de l'espèce considérée, mais son étude permet en particulier de poser les premiers jalons de la compréhension des conséquences d'une perturbation à des échelles écologiques supérieures.

BIBLIOGRAPHIE

a



b



c



d



a (Photo : T. Morozova).

b (Photo : D. Perez).

c (Photo : B. Broomfield).

d (Photo : www.plos.org).

A

- Åbjörnsson, K., Dahl, J., Nyström, P. & Brönmark, C. (2000)** Influence of predator and dietary chemical cues on the behaviour and shredding efficiency of *Gammarus pulex*. *Aquatic Ecology* **34**, 379-387.
- Alonso, A. & Camargo, J.A. (2004)** Toxic effects of unionized ammonia on survival and feeding activity of the freshwater amphipod *Eulimnogammarus toletanus* (Gammaridae, Crustacea). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **72**, 1052-1058.
- Alonso, A., De Lange, H.J. & Peeters, E.T.H.M. (2009)** Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *G. fossarum*. *Ecotoxicology* **19**, 133-140.
- Andersson, G. (1985)** Decomposition of alder leaves in acid waters. *Ecological Bulletins* **37**, 293-299.
- Andersson, K.G., Brönmark, C., Herrmann, J., Malmqvist, B., Otto, C. & Sjöström, P. (1986)** Presence of sculpins (*Cottus gobio*) reduces drift and activity of *Gammarus pulex* (Amphipoda). *Hydrobiologia* **133**, 209-215.
- Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, R.D., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schneider, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E. & Villeneuve, D.L. (2010)** Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**, 730-741.
- Appelberg, M. (1984)** Early development of the crayfish *Astacus astacus* L. in acid water. Report Institute of the Freshwater Research, Drottningholm **61**, 48-59.
- Asai, N., Fusetani, N., Matsunaga, S. & Sasaki, J. (2000)** Sex pheromones of the hair crab *Erimacrus isenbeckii*. Part 1: isolation and structures of novel ceramides. *Tetrahedron* **56**, 9895-9899.
- Association Française de Normalisation AFNOR NF ISO 6341 (1996)** Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Essai de toxicité aiguë.
- Atchison, G.J., Henry, M.G. & Sandheinrich, M.B. (1987)** Effects of metals on fish behaviour: a review. *Environmental Biology of Fishes* **18**, 11-35.
- Atema, J. & Steinbach, M.A. (2007)** Chemical communication in the social behavior of the lobster, *Homarus americanus*, and other decapod Crustacea. In: E. Duffy and M. Thiel (Eds.) Ecology and evolution of social behavior: crustaceans as model systems. Oxford University press, Oxford, UK, 115-144.

B

- Babula, A. (1979)** Structure of the respiratory organs of the freshwater isopod *Asellus aquaticus* (L., Crustacea). *Bulletin. Société des Amis des Sciences et des Lettres de Poznan* **19**, 75-82.
- Baker, C.F. & Montgomery, J.C. (2001)** Sensory deficits induced by cadmium in banded kokopu, *Galaxias fasciatus*, juveniles. *Environmental Biology of Fishes* **62**, 455-464.
- Baumgärtner, D., Koch, U. & Rothhaupt, K.O. (2003)** Alteration of kairomone-induced antipredator response of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli* by sediment type. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 1391-1401.
- Beitinger, T.L. (1990)** Behavioral reactions for the assessment of stress in fishes. *Journal of Great Lakes Research* **16**, 495-528.
- Beketov, M.A. & Liess, M. (2012)** Ecotoxicology and macroecology - Time for integration. *Environmental Pollution* **162**, 247-254.
- Belanger, R.M. & Moore, P.A. (2006)** The use of the major chelae by reproductive male crayfish (*Orconectus rusticus*) for discrimination of female odours. *Behaviour* **143**, 713-731.
- Benoit, D.A., Leonard, E.N., Christensen, G.M. & Fiandt, J.T. (1976)** Toxic effects of cadmium on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Transactions of the American Fisheries Society* **10**, 550-560.
- Berezina, N.A. (2001)** Influence of ambient pH on freshwater invertebrates under experimental conditions. *Russian Journal of Ecology* **32**, 343-351.
- Bertin, A. & Cézilly, F. (2005)** Density-dependent influence of male characters on mate-locating efficiency and pairing success in the waterlouse *Asellus aquaticus*: an experimental study. *Journal of Zoology (London)* **265**, 333-338.
- 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.
- Blockwell, S.J., Maund, S.J. & Pascoe, D. (1998a)** The acute toxicity of lindane to *Hyaella azteca* and the development of a sublethal bioassay based on precopulatory guarding behavior. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **35**, 432-440.
- Blockwell, S.J., Taylor, E.J., Jones, I. & Pascoe, D. (1998b)** The influence of fresh water pollutants and interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the feeding activity of *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **34**, 41-47.
- Blomberg, S.P., Garland, T., Ives, J.R. & Ives A.R. (2003)** Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* **57**, 717-745.

- Bloor, M.C., Banks, C.J. & Krivtsov, V. (2005)** Acute and sublethal toxicity tests to monitor the impact of leachate on an aquatic environment. *Environment International* **31**, 269-273.
- Boets, P., Lock, K. & Goethals, P.L.M. (2010)** Combining data-driven methods and lab studies to analyse the ecology of *Dikerogammarus villosus*. *Ecological Informatics* **5**, 133-139.
- Boets, P., Lock, K. & Goethals, P.L.M. (2011a)** Alterations in the gammarid (Amphipoda) fauna in brackish polder waters of Flanders (Belgium). *Journal of Crustacean Biology* **31**, 270-277.
- Boets, P., Lock, K. & Goethals, P.L.M. (2011b)** Using long-term monitoring to investigate the changes in species composition in the harbour of Ghent (Belgium). *Hydrobiologia* **663**, 155-166.
- 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., Devin, S., Wattier, R., Chovet, M., Beisel, J.N., Moreteau, J.C. & Rigaud, T. (2004)** Rapid range extension of the Ponto-Caspian amphipod *Dikerogammarus villosus* in France: potential consequences. *Archiv für Hydrobiologia* **160**, 57-66.
- Bollache, L., Dick, J.T.A., Farnsworth, K.D. & Montgomery, W.I. (2008)** Comparison of the functional responses of invasive and native amphipods. *Biology Letters* **4**, 166-169.
- Bollache, L., Kaldonski, N., Troussard, J.P., Lagrue, C. & Rigaud, T. (2006)** Spines and behaviour as defences against fish predators in an invasive freshwater amphipod. *Animal Behaviour* **72**, 627-633.
- Bonnet, C., Babut, M., Férard, J.F., Martel, L. & Garric, J. (2000)** Assessing the potential toxicity of resuspended sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 1290-1296.
- Borcherding, J. & Magnhagen, C. (2007)** Food abundance affects both morphology and behaviour of juvenile perch. *Ecology of Freshwater Fish* **17**, 207-218.
- Bourgeois, J. & Leger, G. (1998)** Biological pollution tests: Truitosem, Biosem. *Techniques Sciences Methodes* **1**, 45-48.
- Brown, A.F. & Pascoe, D. (1989)** Parasitism and host sensitivity to cadmium: an acanthocephalan infection of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Journal of Applied Ecology* **26**, 473-487.
- Brusven, M.A. & Rose, S.T. (1981)** Influence of substrate composition and suspended sediment on insect predation by the torrent sculpin, *Cottus rhotus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **38**, 1444-1448.
- Buikema, A.L. & Benfield, E.F. (1979)** Use of macroinvertebrate fauna and water quality of saline river system in south-western Australia. *Hydrobiologia* **248**, 143-160.

Bundschuh, M., Hahn, T., Gessner, M.O. & Schulz, R. (2009) Antibiotics as a chemical stressor affecting an aquatic decomposer-detritivore system. *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**, 197-203.

Burga Pérez, K. (2012) Développement et validation de microbiotests en phase solide pour l'évaluation écotoxicologique de sédiments. Université de Lorraine, Metz, 251pp.

Butler, R.G., Trivelpiece, W. & Miller, D.S. (1982) The effects of oil, dispersant, and emulsions on the survival and behavior of an estuarine teleost and an intertidal amphipod. *Environmental Research* **27**, 266-276.

C

Cairns, M.A., Nebeker, A.V., Gakstater, J.H. & Griffis, W.L. (1984) Toxicity of copper-spiked sediments to freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* **3**, 435-445.

Cargill, A.S., Cummins, K.W., Hanson, B.J. & Lowry, R.R. (1985) The role of lipids as feeding stimulants for shredding aquatic insects. *Freshwater Biology* **15**, 455-464.

Caskey, J.L. & Bauer, R.T. (2005) Behavioural tests for a possible contact pheromone in the caridean shrimp *Palaemonetes pugio*. *Journal of Crustacean Biology* **25**, 571-576.

Chapman, P.M. (1989) Current approaches to developing sediment quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry* **8**, 589-599.

Clarke, A., Skadsheim, A. & Holmes, L.J. (1985) Lipid biochemistry and reproductive biology in two species of Gammaridae (Crustacea: Amphipoda). *Marine Biology* **88**, 247-263.

Clotfelter, E.D., Bell, A.M. & Levering, K.R. (2004) The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. *Animal Behaviour* **68**, 665-676.

Cockrell, B.J. (1984) Effects of water depth on choice of spatially separated prey by *Notonecta glauca* L. *Oecologia* **62**, 256-261.

Colas, F. (2012) Outils de diagnose structurelle et fonctionnelle pour la bioévaluation de la qualité des sédiments associés à la présence de barrages. Approche intégrée de la population au processus écosystémique. Université de Lorraine, Metz, 262pp.

Cold, A. & Forbes, V.E. (2004) Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquatic Toxicology* **67**, 287-299.

Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S. & Chaumot, A. (2011) *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research* **45**, 6417-6429.

Cukerzis, J.M. (1984) La biologie de l'écrevisse (*Astacus astacus* L.). Institut National de la Recherche Agronomique, 316pp.

Cukerzis, J.M. (1988) *Astacus astacus* in Europe. In: D.M. Holdich and R.S. (Eds.) Lowery freshwater crayfish: biology, management and exploitation. Croom Helm, London, 309-340.

D

Davis, J.C. (1978) Disruption of precopulatory behavior in the amphipod *Anisogammarus pugettensis* upon exposure to bleached kraft pulpmill effluent. *Water Research* **12**, 273-275.

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

De Lange, H.J., Peeters, E.T.H.M. & Lürling, M. (2009) Changes in ventilation and locomotion of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) in response to low concentrations of pharmaceuticals. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **15**, 111-120.

De Lange, H.J., Sperber, V. & Peeters, E.T.H.M. (2006b) Avoidance of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments by the freshwater invertebrates *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 452-457.

Depledge, M.H. (1994) The rationale basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: M.C. Fossi and C. Leonzio (Eds.) Non destructive biomarkers in vertebrates. Lewis Publishers, 271-296.

Derby, C.D. & Sorensen, P.W. (2008) Neural processing, perception, and behavioral responses of natural chemical stimuli by fish and crustaceans. *Journal of Chemical Ecology* **34**, 898-914.

Devin, S., Beisel, J.N., Bachman, V. & Moreteau, J.C. (2001) *Dikerogammarus villosus* (Amphipoda: Gammaridae): another invasive species newly established in the Moselle river and French hydrosystems. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* **37**, 21-27.

Di Pinto, L.M., Coull, B.C. & Chandler, G.T. (1993) Lethal and sublethal effects of the sediment associated PCB Aroclor 1254 on a meiobenthic copepod. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**, 1909-1918.

Dick, J.T.A., Alexander, M.E. & MacNeil, C. (2012) Natural born killers: an invasive amphipod is predatory throughout its life-history. *Biological Invasions Online*, doi: 10.1007/s10530-012-0287-9.

- Dick, J.T.A. (1995)** The cannibalistic behaviour of two *Gammarus* species (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Zoology* **236**, 697-706.
- Dick, J.T.A., Platvoet, D. & Kelly, D.W. (2002)** Predatory impact of the freshwater invader *Dikerogammarus villosus* (Crustacea: Amphipoda). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **59**, 1078-1084.
- Djukić-Ćosić, D., Ćurčić-Jovanović, M., Plamenac-Bulat, Z., Ninković, M., Maličević, Z. & Matović, V. (2008)** Relation between lipid peroxidation and iron concentration in mouse liver after acute and subacute cadmium intoxication. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **22**, 66-72.
- Dole-Olivier, M.J., Marmonier, P. & Beffy, J.L. (1997)** Response of invertebrates to lotic disturbance: is the hyporheic zone a patchy refugium? *Freshwater Biology* **37**, 257-276.
- Duckworth, R.A. (2009)** The role of behavior in evolution: a search for mechanism. *Evolutionary Ecology* **23**, 513-531.
- Dutra, B.K., Fernandes, F., Lauffer, A. & Oliveira, G. (2009)** Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **149**, 640-646.

E

- Ekerholm, M. & Hallberg, E. (2005)** Primer and short-range releaser pheromone properties of pre-moult female urine from the shore crab *Carcinus maenas*. *Journal of Chemical Ecology* **31**, 1845-1864.
- Elwood, R. & Dick, J.T. (1990)** The amorous *Gammarus*: the relationship between precopula duration and size-assortative mating in *G. pulex*. *Animal Behaviour*, **39** 828-833.
- Emery, R.M. (1970)** The comparative acute toxicity of cresol to two benthic crustaceans. *Water Research* **4**, 485-491.
- Estebe, A., Thevenot, D.R., Boudries, H. & Mouchel, J.M. (1997)** Urban runoff impacts on particulate metal and hydrocarbon concentrations in river Seine: suspended solid and sediment transport. *Water Science and Technology* **36**, 185-193.

F

- 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.

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.

G

Gaston, K.J. & Blackburn, T.M. (2000) Pattern and Process in Macroecology. Blackwell Science, London.

Gayraud, S., Philippe, M. & Maridet, L. (2000) The response of benthic macroinvertebrates to artificial disturbances: drift or vertical movements in the gravel bed of two sub-alpine streams? *Archiv für Hydrobiologie*, 431-446.

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

Gentile, J.H., Johns, D.M., Cardin, J.A. & Heltshe, J.F. (1984) Marine ecotoxicological testing with crustaceans. In: G. Persoone, E. Jaspers and C. Claus (Eds.) Ecotoxicological testing for the marine environment. State University of Ghent and Institute of Marine Scientific Research, Bredene, Belgium, 479-502.

Gerhardt, A. (1995) Monitoring behavioural responses to metals in *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea) with impedance conversion. *Environmental Science and Pollution Research* **2**, 15-23.

Gerhardt, A. (1999) Recent trends in online biomonitoring for water quality control. In: A. Gerhardt (Eds.) Biomonitoring of polluted water. Reviews on actual topics, TTP, Zürich, Switzerland, 15-23.

Gerhardt, A., Carlsson, A., Ressemann, C. & Stich, K.P. (1998) New online biomonitoring system for *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea): In Situ test below a copper effluent in south Sweden. *Environmental Science and Technology* **32**, 150-156.

Gerhardt, A., Ingram, M.K., Kang, I.J. & Ulitzur, S. (2006) In situ on-line toxicity biomonitoring in water: recent developments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 2263-2271.

Gerhardt, A., Svensson, E., Clostermann, M. & Fridlund, B. (1994) Monitoring of behavioral patterns of aquatic organisms with an impedance conversion technique. *Environment International* **20**, 209-219.

Gismondi, E. (2012) Etude des systèmes de défenses antitoxiques chez l'amphipode *Gammarus roeseli* : effets du parasitisme et d'une exposition au cadmium. Université de Lorraine, Metz, 281pp.

- Gismondi, E., Beisel, J.N. & Cossu-Leguille, C. (2012a)** Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. *Environmental Research* **118**, 47-52.
- Gismondi, E., Cossu-Leguille, C. & Beisel, J.N. (2012b)** Acanthocephalan parasites: help or burden in gammarid amphipods exposed to cadmium? *Ecotoxicology* **21**, 1188-1193.
- Gismondi, E., Cossu-Leguille, C. & Beisel, J.N. (2012c)** Does the ancothocephalan parasite *Polymorphus minutus* modify the energy reserves and antitoxic defences of its intermediate host *Gammarus roeseli*? *Parasitology* **139**, 1054-1061.
- Gismondi, E., Rigaud, T., Beisel, J.N. & Cossu-Leguille, C. (2012d)** Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a gammarid. *Environmental Pollution* **160**, 17-23.
- Gleeson, R.A. (1991)** Intrinsic factors mediating pheromone communication in the blue crab, *Callinectes sapidus*. In: R.T. Bauer and J.W. Martin (Eds.) Crustacean sexual biology. Columbia University Press, New York, NY, 17-32.
- Graça, M.A.S., Maltby, L. & Calow, P. (1993)** Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus* I: feeding strategies. *Oecologia* **93**, 139-144.
- Gross-Sorokin, M.Y., Grist, E.P.M., Cooke, M. & Crane, M. (2003)** Uptake and depuration of 4-nonylphenol by the benthic invertebrate *Gammarus pulex*: how important is feeding rate? *Environmental Science & Technology* **37**, 2236-2241.

H

- Hanazato, T. (1999)** Anthropogenic chemicals (insecticides) disturb natural organic chemical communication in the plankton community. *Environmental Pollution* **105**, 137-142.
- Hardege, J.D., Jennings, A., Hayden, D., Muller, C.T., Pascoe, D., Bentley, M.G. & Clare, A.S. (2002)** Morpholine, bile acids, and skin mucous as possible chemical cues in salmonid homing: electrophysiological reevaluation. In: J.D. McCleave, G.P. Arnold, J.J. Dodson and W. Neill (Eds.) Mechanisms of migration in fishes. Plenum, New York, NY, 363-378.
- Harris, R.R. & Musko, I.B. (1999)** Oxygen consumption, hypoxia, and tube-dwelling in the invasive amphipod *Corophium curvispinum*. *Journal of Crustacean Biology* **19**, 224-234.
- Heckmann, L.H., Friberg, N. & Ravn, H.W. (2005)** Relationship between biochemical biomarkers and pre-copulatory behaviour and mortality in *Gammarus pulex* following pulse-exposure to lambda-cyhalothrin. *Pest Management Science* **61**, 627-635.
- Heit, M. & Fingerman, M. (1977)** The influence of size, sex and temperature on the toxicity of mercure to two species of crayfishes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **18**, 572-580.

- Hellawell, J.M. (1986)** Biological indicators of freshwater pollution and environmental management. *Elsevier Applied Science Publishers, London*, 1-546.
- Hellou, J. (2011)** Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research International* **18**, 1-11.
- Hellou, J., Cheeseman, K., Desnoyers, E., Johnston, D., Jouvenelle, M.L., Leonard, J., Robertson, S. & Walker, P. (2008)** A non-lethal chemically based approach to investigate the quality of harbor sediments. *Science of the Total Environment* **389**, 178-187.
- Hervant, F., Mathieu, J. & Culver, D.C. (1999)** Comparative responses to severe hypoxia and subsequent recovery in closely related amphipod populations (*Gammarus minus*) from cave and surface habitats. *Hydrobiologia* **392**, 197-204.
- Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D. & Fréminet, A. (1995)** Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and the epigean *Gammarus fossarum* (Crustacea : Amphipoda). *Physiological Zoology* **68**, 223-244.
- Hessen, D.O., Kristiansen, G. & Skurdal, J. (1993)** Nutrient release from crayfish, and its potential impact on primary production in lakes. *Freshwater Crayfish* **9**, 311-317.
- Hill, N.A., King, C.K., Perrett, L.A. & Johnston, E.L. (2009)** Contaminated suspended sediments toxic to an Antarctic filter feeder: aqueous- and particulate-phase effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**, 409-417.
- Hoback, W.W. & Barnhart, M.C. (1996)** Lethal limits and sublethal effects of hypoxia on the amphipod *Gammarus pseudolimnaeus*. *Journal of the North American Benthological Society* **15**, 117-126.
- Huey, R.B., Hertz, P.E. & Sinervo, B. (2003)** Behavioral drive versus behavioral inertia in evolution: a null model approach. *American Naturalist* **161**, 357-366.
- Hynes, H.B.N. (1955)** The reproductive cycle of some British freshwater Gammaridae. *Journal of Animal Ecology* **24**, 352-387.

I

- 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.

J

- Jamet, J.L. (1995)** Reproduction, condition and food of adult arctic charr (*Savelinus alpinus*, L.) in Lake Pavin (Massif Central, France). *Hydrobiologia* **300/301**, 279-288.
- Jazdzewski, K. (1980)** Range extensions of some gammaridean species in European inland waters caused by human activity. *Crustaceana* **6**, 84-107.
- Jormalainen, V. & Merilaita, S. (1995)** Female resistance and duration of mateguarding in three aquatic peracarids (Crustacea). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **36**, 43-48.
- Jormalainen, V., Merilaita, S. & Riihimäki, J. (2001)** Costs of intersexual conflict in the isopod *Idotea baltica*. *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 763-772.
- Jussila, J., Henttonen, P. & Huner, J.V. (1995)** Calcium, magnesium and manganese content of noble crayfish *Astacus astacus* (L.) branchial carapace and its relationship to water and sediment mineral contents of two pond and one lake in Central Finland. *Freshwater Crayfish* **10**, 230-238.

K

- Kaldonski, N., Lagrue, C., Motreuil, S., Rigaud, T. & Bollache, L. (2008)** Habitat segregation mediates predation by the benthic fish *Cottus gobio* on the exotic amphipod species *Gammarus roeseli*. *Naturwissenschaften* **95**, 839-844.
- Kaldonski, N., Perrot-Minnot, M.J. & Cézilly, F. (2007)** Differential influence of two acanthocephalan parasites on the antipredator behaviour of their common intermediate host. *Animal Behaviour* **74**, 1311-1317.
- Kamio, M., Matsunaga, S. & Fusetani, N. (2002)** Copulation pheromone in the crab *Telmessus cheiragonus* (Brachyura: Decapoda). *Marine Ecology Progress Series* **234**, 183-190.
- Kamio, M., Reidenbach, M.A. & Derby, C.D. (2008)** To paddle or not: context dependent courtship display by male blue crabs, *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Biology* **211**, 1243-1248.
- Kefford, B.J., Hickey, G.L., Gasith, A., Ben-David, E., Dunlop, J.E., Palmer, C.G., Allan, K., Choy, S.C. & Piscart, C. (2012)** Global scale variation in the salinity sensitivity of riverine macroinvertebrates: eastern Australia, France, Israel and South Africa. *PLOS ONE* **7**, e35224.
- 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.
- Kinne, O. (1953a)** Zur biologie und physiologie von *Gammarus duebeni* Lillj. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* **157**, 427-491.

- Kinne, O. (1953b)** Biologie und physiologie von *Gammarus duebeni* Lillj. II. Über die häutungsfrequenz, ihre abhangigkeit von temperatur und saizgehalt sowie über ihr verhalten bei isoliert gehaltenen und amputierten versuchstieren. *Zoologische Jahrbuecher Abteilung fuer Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere* **64**, 183-206.
- Kinzler, W., Kley, A., Mayer, G., Waloszek, D. & Maier, G. (2009)** Mutual predation between and cannibalism within several freshwater gammarids: *Dikerogammarus villosus* versus one native and three invasives. *Aquatic Ecology* **43**, 457-464.
- Klimasauskas, E. (2006)** Mineral of the month: cadmium. Energy and Resources. *American Geological Institute Publication*.
- Kravitz, M.J., Lamberson, J.O., Ferraro, S.P., Swartz, R.C., Boese, B.L. & Specht, D.T. (1999)** Avoidance response of the estuarine amphipod *Eohaustorius estuarius* to polycyclic aromatic hydrocarboncontaminated, field-collected sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**, 1232–1235.
- Kunz, P.Y., Kienle, C. & Gerhardt, A. (2010)** *Gammarus* spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: toward integrated multilevel tests. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **205**, 1-76.



- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A. & Geffard, O. (2011)** DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution* **159**, 1682-1691.
- Lafont, M., Grapentine, L. Rochfort, Q., Marsalek, J., Tixier, G. & Breil, P. (2007)** Bioassessment of wet-weather pollution impacts on fine sediments in urban waters by benthic indices and the sediment quality triad. *Water Science and Technology* **56**, 13-20.
- Lagadic, L., Caquet, T. & Amiard, J. (1997)** Introduction : biomarqueurs en écotoxicologie, principes et définitions. Dans : L. Lagadic, T. Caquet et J.C. Amiard (Eds.) *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*. Masson, Paris, 1-10.
- Lauridsen, R.B. & Friberg, N. (2005)** Stream macroinvertebrate drift response to pulsed exposure of the synthetic pyrethroid lambda-cyhalothrin. *Environmental Toxicology* **20**, 513-521.
- Lawrence, A.J. & Poulter, C. (1998)** Development of a sub-lethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*. *Water Research* **32**, 569-578.
- Lawrence, A.J. & Poulter, C. (2001)** Impact of copper, pentachlorophenol and benzo[a]pyrene on the swimming efficiency and embryogenesis of the amphipod *Chaetogammarus marinus*. *Marine Ecology Progress Series* **223**, 213-223.

- Le Roux, M.L. (1933)** Recherches sur la sexualité des gammariens. Croissance, reproduction, déterminisme des caractères sexuels secondaires. *Bulletin Biologique de France et Belgique* **16**, 1-138.
- LeBlanc, G.A. (2007)** Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology* **16**, 61-81.
- Linden, O. (1970)** Effects of oil on the amphipod *Gammarus oceanicus*. *Environmental Pollution* **10**, 239-250.
- Linden, O. (1976)** Effects of oil on the reproduction of the amphipod *Gammarus oceanicus*. *Ambio* **5**, 36-37.
- Little, E.E. & Finger, S.E. (1990)** Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* **9**, 13-19.
- Lonsdale, D.J., Frey, M. & Snell, T.W. (1998)** The role of chemical signals in copepod reproduction. *Journal of Marine Systems* **15**, 1-12.
- Lürling, M. & Scheffer, M. (2007)** Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trends Ecol Evol* **22**, 374-379.
- Lyes, M.C. (1979)** The reproductive behaviour of *Gammarus duebeni* (Lilljeborg), and the inhibitory effect of a surface active agent. *Marine Behaviour and Physiology* **6**, 47-55.

M

- MacNeil, C., Dick, J.T.A. & Elwood, R.W. (1997)** The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews* **72**, 349-364.
- MacNeil, C., Dick, J.T.A., Bigsby, E., Elwood, R.W., Montgomery, W.I., Gibbins, C.N. & Kelly, D.W. (2002)** The validity of the *Gammarus: Asellus* ratio as an index of organic pollution: abiotic and biotic influences. *Water Research* **36**, 75-84.
- MacNeil, 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.
- Malbouisson, J.F.C., Young, T.W.K. & Bark, A.W. (1995)** Use of feeding rate and re-pairing of precopulatory *Gammarus pulex* to assess toxicity of gamma-hexachlorocyclohexane (lindane). *Chemosphere* **30**, 1573-1583.
- Maltby, L. & Crane, M. (1994)** Responses of *Gammarus pulex* (Amphipoda, Crustacea) to metalliferous effluents: identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution* **84**, 45-52.

- Manca, D., Ricard, A.C., Trottier, B. & Chevalier, G. (1991)** Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride, *Toxicology* **67**, 303-323.
- Marcus, J.H., Sutcliffe, D.W. & Willoughby, L.G. (1978)** Feeding and growth of *Asellus aquaticus* (Isopoda) on food items from the littoral of Windermere, including green leaves of *Elodea Canadensis*. *Freshwater Biology* **8**, 505-519.
- Marking, L.L. (1985)** Toxicity of chemical mixtures. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications. Hemisphere Publishing Corporation, Washington DC, 164-176.
- McCahon, C.P. & Pascoe, D. (1988a)** Increased sensitivity to cadmium of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) during the reproductive period. *Aquatic Toxicology* **13**, 183-194.
- McCahon, C.P. & Pascoe, D. (1988b)** Culture techniques for three freshwater macroinvertebrate species and their use in toxicity tests. *Chemosphere* **17**, 2471-2480.
- McCahon, C.P. & Poulton, M.J. (1991)** Lethal and sub-lethal effects of acid, aluminium and lime on *Gammarus pulex* during repeated simulated episodes in a Welsh stream. *Freshwater Biology* **25**, 169-178.
- McClellan-Green, P., Romano, J. & Oberdörster, E. (2007)** Does gender really matter in contaminant exposure? A case study using invertebrate models. *Environmental Research* **104**, 183-191.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G. & Wood, C.M. (2000)** Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 2. Tissue specific metal accumulation. *Aquatic Toxicology* **50**, 245-256.
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R.M. & Yu, H. (2000)** Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 2085-2092.
- Médoc, V., Rigaud, T., Bollache, L. & Beisel, J.N. (2009)** A manipulative parasite increasing an antipredator response decreases its vulnerability to a nonhost predator. *Animal Behaviour* **77**, 1235-1241.
- Meliyan, R.I. (1991)** Effects of pesticides on reproductive function of the freshwater amphipod *Gammarus kischineffensis*. *Hydrobiological Journal* **27**, 33-36.
- Meyer, W., Kretschmer, M., Hoffmann, A. & Harisch, G. (1991)** Biochemical and histochemical observations on effects of low-level heavy metal load (lead, cadmium) in different organ systems of the freshwater crayfish, *Astacus astacus* L (Crustacea: Decapoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **21**, 137-156.
- Millennium Ecosystem Assessment (2005)** Ecosystems and human wellbeing: wetlands and water synthesis. World Resources, Washington, DC.
- Mills, C.L., Shukla, D.H. & Compton, G.J. (2006)** Development of a new low cost high sensitivity system for behavioural ecotoxicity testing. *Aquatic Toxicology* **77**, 197-201.

- Minshall, G.W. (1984)** Aquatic insect-substratum relationships. In: V.H. Resh and D.M. Rosenberg (Eds.) *The ecology of aquatic insects*. Praeger Publishers, New York (NY), 358-400.
- Moore, J.W. (1975)** The role of algae in the diet of *Asellus aquaticus* L. and *Gammarus pulex* L. *Journal of Animal Ecology* **44**, 719-730.
- Moulder, S.M. (1980)** Combined effect of the chlorides of mercury and copper in sea water on the euryhaline amphipod *Gammarus duebeni*. *Marine Biology* **59**, 193-200.
- Mulliss, R., Ellis, J.B., Revitt, D.M. & Shutes, R.B.E. (1994)** An evaluation of the toxic influences on *Asellus aquaticus* (L.) in an urban stream environment. *Water Science and Technology* **29**, 199-207.
- Murphy, P.M. & Learner, M.A. (1982)** The life history and production of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) in the River Ely, South Wales. *Freshwater Biology* **12**, 435-444.
- Myrick, C.A. (2009)** A low-cost system for capturing and analyzing the motion of aquatic organisms. *Journal of the North American Benthological Society* **28**, 101-109.

N

- Norwood, W.P., Borgmann, U., Dixon, D.G. & Wallace, A. (2003)** Effects of metal mixtures on aquatic biota: a review of observations and methods. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* **9**, 795-811.
- Nunez-Nogueira, G., Rainbow, P.S. & Smith, B.D. (2005)** Assimilation efficiency of zinc and cadmium in the decapod crustacean *Penaeus indicus*. *Journal of Experimental Biology* **332**, 75-83.

O

- Oberdörster, E., Brouwer, M., Hoexum-Brouwer, T., Manning, S. & McLachlan, J.A. (2000)** Long-term pyrene exposure of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, affects molting and reproduction of exposed males and offspring of exposed females. *Environmental Health Perspectives* **108**, 640-646.
- Osbuild, D., Babut, M. & Vasseur, P. (1995)** Biosensors for environmental monitoring and water control. *Journal of Water Science* **8**, 505-538.
- Overnell, J. & Trehwella, E. (1979)** Evidence for the natural occurrence of (cadmium, copper)-metallothionein in the crab *Cancer pagurus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **64**, 69-76.

P

- Palmer, M.A., Covich, A.P., Lake, S., Biro, P., Brooks, J.J., Cole, J., Dahm, C., Gibert, J., Goedkoop, W., Martens, K., Verhoeven, J. & Van de Bund, W.J. (2000)** Linkages between aquatic sediment biota and life above sediments as potential drivers of biodiversity and ecological processes. *Bioscience* **50**, 1062-1075.
- Pandey, R.B., Adams, G.L. & Warren, L.W. (2011)** Survival and precopulatory guarding behavior of *Hyalella azteca* (Amphipoda) exposed to nitrate in the presence of atrazine. *Environmental Toxicology* **30**, 1170-1177.
- Pascoe, D., Kedwards, T.J., Maund, S.J., Muthi, E. & Taylor, E.J. (1994)** Laboratory and field evaluation of a behavioural bioassay - the *Gammarus pulex* (L.) precopula separation (GaPPS) test. *Water Research* **28**, 369-372.
- Perrot-Minnot, M.J., Kaldonski, N. & Cézilly, F. (2007)** Increased susceptibility to predation and altered anti-predator behaviour in an acanthocephalan-infected amphipod. *International Journal for Parasitology* **37**, 645-651.
- Pestana, J.L.T., Nogueira, A.R.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**, 1566-1562.
- Petersen, K., Kristensen, E. & Bjerregaard, P. (1998)** Influence of bioturbating animals on flux of cadmium into estuarine sediment. *Marine Environmental Research* **45**, 403-415.
- Petersen, W., Hong, J., Willamowski, C. & Wallmann, K. (1996)** Release of trace contaminants during reoxidation of anoxic sediment slurries in oxic water. *Arch. Hydrobiol. Spec. Iss. Adv. Limnol.* **47**, 295-305.
- Peterson, G.S., Ankley, G.T. & Leonard, E.N. (1996)** Effect of bioturbation on metal-sulfide oxidation in surficial freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**, 2147-2155.
- Phillips, D.J.H. & Rainbow, P.S. (1994)** Biomonitoring of trace aquatic contaminants. Chapman & Hall, London.
- Piol, M.N., Lopez, A.G., Mino, L.A., Dos Santos Afonso, M. & Guerrero, N.R.V. (2006)** The impact of particule-bound cadmium on bioavailability and bioaccumulation: a pragmatic approach. *Environmental Science and Technology* **40**, 6341-6347.
- Piscart, C. & Bollache, L. (2011)** Crustacés amphipodes de surface (Gammare d'eau douce). Association Française de Limnologie, Thonon les Bains, 113pp.
- 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.

Plaistow, S.J., Bollache, L. & Cézilly, F. (2003) Energetically costly precopulatory mate guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences. *Animal Behaviour* **65**, 683-691.

Pöckl, M. (1992) Effect of temperature, age and body size on moulting and growth in the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. *Freshwater Biology* **27**, 211-225.

Poulton, M. & Pascoe, D. (1990) Disruption of precopula in *Gammarus pulex* (L.): development of a behavioural bioassay for evaluating pollutant and parasite induced stress. *Chemosphere* **20**, 403-415.

R

Rask, M. & Hiisivuori, C. (1985) The predation on *Asellus aquaticus* (L.) by perch, *Perca fluviatilis* (L.), in a small forest lake. *Hydrobiologia* **121**, 27-33.

Ridley, M. & Thompson, D.J. (1979) Size and mating in *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Zeitschrift für Tierpsychologie* **51**, 380-397.

Rinderhagen, M., Ritterhof, J. & Zauke, G.P. (2000) Crustaceans as bioindicators. In: A. Gerhardt (Eds.) Biomonitoring of polluted water - Reviews on actual topics. Environmental Research Forum. Volume 9. Trans Tech Publications - Scitech Publications, 161-194.

Rittschof, D. & Cohen, J.H. (2004) Crustacean peptide and peptide-like pheromones and kairomones. *Peptides* **25**, 1503-1516.

Roast, S.D., Widdows, J. & Jones, M.B. (2001) Impairment of mysid (*Neomysis integer*) swimming ability: an environmentally realistic assessment of the impact of cadmium exposure. *Aquatic Toxicology* **52**, 217-227.

Robinson, B.W. & Doyle, R.W. (1985) Trade-off between male reproduction (amplexus) and growth in the amphipod *Gammarus lawrencianus*. *Biological Bulletin* **168**, 482-488.

Robinson, P.D. (2009) Behavioural toxicity of organic chemical contaminants in fish: application to ecological risk assessments (ERAs). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **66**, 1179-1188.

Roméo, 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.

S

- Sanchez, W. & Porcher, J. (2009)** Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* **28**, 150-158.
- Schaller, J., Brackhage, C., Mkandawire, M. & Dudel, E.G. (2011)** Metal/metalloid accumulation/remobilization during aquatic litter decomposition in freshwater: a review. *Science of the Total Environment* **409**, 4891-4898.
- Schill, R.O., Görlitz, H. & Köhler, H.R. (2003)** Laboratory simulation of a mining accident: acute toxicity, hsc/hsp70 response, and recovery from stress in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) exposed to a pulse of cadmium. *BioMetals* **16**, 391-401.
- Schlenk, D. (1999)** Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin* **39**, 48-53.
- Schmitt-Jansen, M., Veit, U., Dudel, G. & Altenburger, R. (2008)** An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: approaches and challenges. *Basic and Applied Ecology* **9**, 337-345.
- Schmitz, E.H. (1992)** Amphipoda. In: F.W. Harrison and A.G. Humes (Eds.) Microscopic anatomy of invertebrates. Volume 9: Crustacea. Wiley Liss, New York (NY), 443-529.
- Scott, G.R. & Sloman, K.A. (2004)** The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* **68**, 369-392.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., Rouleau, C. & Wood, C.M. (2003)** Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* **206**, 1779-1790.
- Shinn, C. (2010)** Impact of toxicants on stream fish biological traits. Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse. 147pp.
- Silvestre, F., Trausch, G. & Devos, P. (2005)** Hyper-osmoregulation capacity of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) exposed to cadmium; acclimation during chronic exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* **140**, 29-37.
- Simon, O., Ribeyre, F. & Boudou, A. (2000)** Comparative experimental study of cadmium and methylmercury trophic transfers between the Asiatic clam *Crobcula fluminea* and the crayfish *Astacus astacus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **38**, 317-326.
- Soegianto, A., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.P. & 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., Médoc, V., Sorda, 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.

- 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**, e42435.
- 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. (1986)** Acute and chronic effects of water quality criteria-based metal mixtures on three aquatic species. *Environmental Toxicology and Chemistry* **5**, 917-931.
- Sroda, S. & Cossu-Leguille, C. (2011a)** Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor? *Ecotoxicology* **20**, 264-273.
- Sroda, S. & Cossu-Leguille, C. (2011b)** Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere* **83**, 538-544.
- Starry, O., Wanzenböck, J. & Danielopol, D.L. (1998)** Tendency of the Amphipod *Gammarus roeseli* Gervais to Colonize Coarse Sediment Habitats under Fish Predation Pressure. *International Review of Hydrobiology* **83**, 371-380.
- Stebbing, P.D., Bentley, M.G. & Watson, G.J. (2003)** Mating behaviour and evidence for a female released courtship pheromone in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 465-475.
- Stronkhorst, J., Brils, J., Batty, J., Coquery, M., Gardner, M., Mannio, J., O'Donnell, C., Steenwijk, J. & Frintrop, P. (2004)** Discussion document on sediment monitoring guidance for the EU Water Framework Directive. Version 2. EU Water Framework Directive expert group on Analysis and Monitoring of Priority Substances.
- Stuhlbacher, A. & Maltby, L. (1992)** Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **22**, 319-324.
- Styrishave, B. & Depledge, M.H. (1996)** Evolution of mercury induced changes in circadian heart-rate rhythms in freshwater crabs *Potamon potamon* and crayfish *Astacus astacus* as an early predictor of mortality. *Comparative Biochemistry and Physiology* **115**, 349-366.
- Styrishave, B., Rasmussen, A.D., & Depledge, M.H. (1995)** The influence of bulk and trace metals on the circadian rhythmicity of heart rates in freshwater crayfish *Astacus astacus*. *Marine Pollution Bulletin* **31**, 87-92.
- Sullivan, B.K., Buskey, E., Miller, D.C. & Ritacco, P.J. (1983)** Effects of copper and cadmium on growth, swimming and predator avoidance in *Eurytemora affinis* (Copepoda). *Marine Biology* **77**, 299-306.
- Sundelin, B. (1983)** Effects of cadmium on *Pontoporeia affinis* (Crustacea: Amphipoda) in laboratory soft-bottom microcosms. *Marine Biology* **74**, 203-212.
- Sutcliffe, D.W. (1992)** Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): basic processes. *Freshwater Forum* **2**, 102-128.

T

- Taylor, D. (1983)** The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **7**, 33-42.
- Taylor, E.J., Jones, D.P.W., Maund, S.J. & Pascoe, D. (1993)** A new method for measuring the feeding activity of *Gammarus pulex* (L.). *Chemosphere* **26**, 1375-1381.
- Thiel, M. (2011)** Chemical communication in peracarid crustaceans. In: T. Breithaupt and M. Thiel (Eds.) Chemical communication in crustaceans. Springer, New-York, NY, 199-218.
- Thurén, A. & Woin, P. (1991)** Effects of phthalate esters on the locomotor activity of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **46**, 159-166.
- Timofeyev, M.A., Shatilina, Z.M., Bedulina, D.S., Protopopova, M.V., Pavlichenko, V.V., Grabelynch, 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.
- Ting, J.H. & Snell, T.W. (2003)** Purification and sequencing of a mate-recognition protein from the copepod *Tigriopus japonicus*. *Marine Biology* **143**, 1-8.
- 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.

U

- Usio, N. & Townsend, C. (2004)** Roles of crayfish: consequences of predation and bioturbation for stream invertebrates. *Ecology* **85**, 807-822.

V

- Van Hattum, B., Korthals, G., Van Straalen, N.M., Govers, H.A.J. & Joosse, E.N.G. (1993)** Accumulation patterns of trace metals in freshwater isopods in sediment

- bioassay - influence of substrate characteristics, temperature and pH. *Water Research* **27**, 669-684.
- Vandel, A. (1943)** Essai sur l'évolution et la classification des *Oniscoidea* (Isopodes terrestre). *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique* **30**, 1-136.
- Vellinger, C., Felten, V., Sornom, P., Rousselle, P., Beisel, J.N. & Usseglio-Polatera, P. (2012a)** Behavioural and physiological responses of *Gammarus pulex* exposed to cadmium and arsenate at three temperatures: Individual and combined effects. *PLOS ONE* **7**, e39153.
- 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.
- Vellinger, C., Parant, M., Rousselle, P., Immel, F., Wagner, P. & Usseglio-Polatera, P. (2012c)** Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*). *Environmental Pollution* **160**, 66-73.
- Vörösmarty, C.J., McIntyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., et al. (2010)** Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* **467**, 555-561.

W

- 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.
- Wallace, W.G., Hoexum-Brouwer, T.M., Brouwer, M. & Lopez, G.R. (2000)** Alterations in prey capture and induction of metallothioneins in grass shrimp fed cadmium-contaminated prey. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 962-971.
- Waller, W.T. & Cairns, J.C. (1972)** The use of fish movement patterns to monitor zinc in water. *Water Research* **6**, 257-269.
- Watts, M.M., Pascoe, D. & Carroll, K. (2001)** Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens. *Water Research* **35**, 2347-2352.
- Wcislo, W.T. (1989)** Behavioral environments and evolutionary change. *Annual Review of Ecology and Systematics* **20**, 137-169.
- Wetzel, R.G. (1975)** Limnology. WB Saunders Co, Philadelphia, PA, 743pp.
- 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.

- Wildish, D.J. (1972)** Polychlorinated biphenyls (PCB) in sea water and their effect on reproduction of *Gammarus oceanicus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **7**, 182-187.
- Williams, K.A., Green, W.J. & Pascoe, D. (1985)** Studies on the acute toxicity of pollutants to freshwater macroinvertebrates. 1. Cadmium. *Archiv für Hydrobiologie* **102**, 461-471.
- Wimberger, P.H. & de Queiroz, A. (1996)** Comparing behavioral and morphological characters as indicators of phylogeny. In: E.P. Martins (Eds.) *Phylogenies and the comparative method in animal behavior*. Oxford University Press, New York (NY), 206-233.
- 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.
- Wright, D.A. (1980)** Cadmium and calcium interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Freshwater Biology* **10**, 123-133.

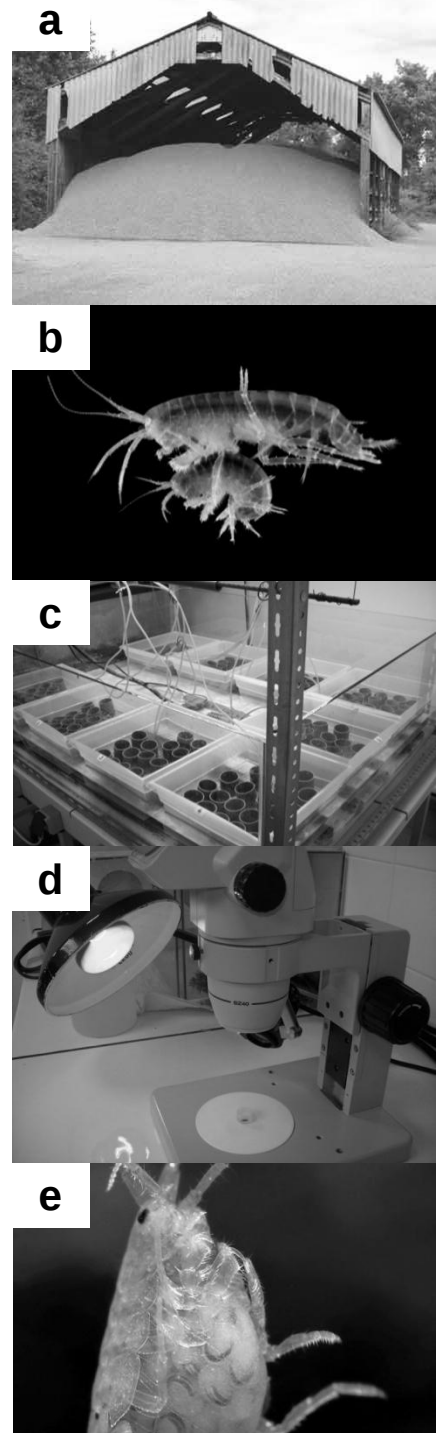
X

- Xu, Q. (1995)** The effects of exposure to zinc and cadmium separately and jointly of the free amino acid pool of *Gammarus pulex*. *Toxicological and Environmental Chemistry* **50**, 183-196.
- Xuereb, B. (2009)** Développement de marqueurs de neurotoxicité et de perturbations endocrines chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. Metz : UFR Sciences Fondamentales et Appliquées.
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J. & Geffard, O. (2009a)** Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology* **94**, 114-122.
- Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J. & Geffard, O. (2009b)** Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquatic Toxicology* **93**, 225-233.

Z

- Zauke, G.-P., Clason, B., Savinov, V.M. & Savinova, T. (2003)** Heavy metals of inshore Benthic invertebrates from the Barents Sea. *Science of the Total Environment* **306**, 99-110.

ANNEXES



a

Dépôt de sel utilisé dans le déneigement des routes (Photo : assoceverte.fr).

b

Déplacement d'un pré-copulat chez *Gammarus pulex* (Photo : J.F. Cart).

c

Tests de survie de *Gammarus roeseli* exposé à différents niveaux de salinité (Photo : P. Sornom).

d

Mesure de la ventilation des gammares par comptage de la fréquence de battement des pléopodes (Photo : P. Sornom).

e

Juveniles contenus dans le marsupium d'un gammare femelle avant leur libération (Photo : P. Maguire).

Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature

Research article, Environmental Pollution (2010) 158, 1288-1295

Pascal Sornom^{a,*}, Vincent Felten^a, Vincent Médoc^b, Sophie Sroda^a, Philippe Rousselle^a, Jean-Nicolas Beisel^a

^a Université de Metz, Laboratoire Interactions Ecotoxicologie Biodiversité Ecosystèmes (LIEBE), CNRS UMR 7146, Avenue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

^b Université de Bourgogne, Laboratoire de Biogéosciences, équipe Ecologie Evolutive, CNRS UMR 5561, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

* Author for correspondence: P. Sornom, Laboratoire des Interactions, Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), CNRS UMR 7146, Université de Lorraine, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France (e-mail: pascal.sornom@univ-metz.fr)

Article history:

Received 29 September 2009

Received in revised form 18 January 2010

Accepted 22 January 2010

Abstract

The importance of potentially interacting factors in organisms responses to a stress are often ignored or underestimated in ecotoxicology. In laboratory experiments we investigated how gender, temperature and age influence the behaviour and the physiology of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli* under salinity stress. Our results revealed a significant higher sensitivity of females in survival, ventilation and ionoregulation whereas no inter-age differences were reported. Water temperature also exerted a significant effect in survival and ventilation of *G. roeseli*. Some of those factors appeared to interact significantly. This study provides evidence that gender can affect organisms responses to a stressor and consequently has to be considered while assessing a stress impact. We discussed the potential relationships between biological and behavioural responses.

Keywords:

Behaviour; Gender effect; *Gammarus roeseli*; Physiology; Salinity stress

Short title:

Influence of gender, age and temperature in a gammarid responses to a stress.

1. Introduction

In aquatic ecosystems, organisms are constantly exposed to different levels of physical and chemical stressors. To estimate and predict its effects, the need of relevant tools has considerably increased in the past few years simultaneously to contamination sources and types. In this general context of quality biomonitoring, selecting the most sensitive species/gender/life stage is a necessity since it allows a more suitable risk assessment of stress. Crustaceans have been widely used as bioindicators and biomonitors in various aquatic systems (Rinderhagen *et al.*, 2000). Within this group, differences of sensitivity exist between females and males (Benoit *et al.*, 1976; Kinne, 1953a, 1953b; McCahon and Pascoe, 1988a), and between juveniles and adults (Alonso *et al.*, 2009; Cowley, 1985; McCahon and Pascoe, 1988b; Naylor *et al.*, 1995; Sanders, 1969). Some authors have considered these two intrinsic factors simultaneously on organisms exposed to stressors (Emery, 1970; Heit and Fingerman, 1977; Hoback and Barnhart, 1996). However, the occurrence and consequences of such confounding factors in individuals responses to a stress are still largely neglected (McClellan-Green *et al.*, 2007).

Multi-response studies are also increasingly needed, not only to understand exposures consequences and to link responses (as a function of time and intensity), but also to better 'predict' potential effects on higher scale levels. Behavioural changes, which are considered as 'early warning responses' to contaminants and environmental stresses (Gerhardt, 1995), have been widely used as tools for ecotoxicity testing and water quality monitoring (De Lange *et al.*, 2009; Felten *et al.*, 2008a; Maltby *et al.*, 2002; Peeters *et al.*, 2009a, 2009b; Poulton and Pascoe, 1990; Wijnhoven *et al.*, 2003) and some techniques have been developed to simultaneously measure different types of behaviours (*e.g.*, the Multispecies Freshwater Biomonitor: Gerhardt *et al.*, 1994). The use of behavioural tests is of interest for ecotoxicology because, in addition to being sensitive, fast, simple to perform, cheap and non-invasive, they also allow the link between toxic effects obtained at biochemical/cellular levels and impacts observed on populations and communities (Mills *et al.*, 2006; Rinderhagen *et al.*, 2000; Wallace and Estephan, 2004).

Locomotion, which is generally reduced under stress conditions (De Lange *et al.*, 2006; Felten *et al.*, 2008b; Lawrence and Poulter, 2001; Piscart *et al.*, 2007), is required in foraging strategy, to obtain mates, to escape predation and to migrate. Ventilation reflects, among other things, the organism capacity to supply oxygen to respiratory organs, which

allows its use as a measure of respiration rates and/or osmoregulation adjustment (Lawrence and Poulter, 1998; Mills *et al.*, 2006). The hemolymph osmotic capacity is also a reliable indicator of a stress in crustaceans since it represents an integrated measure of the individual physiological aptitude to compensate the osmotic gradient which can appear between the external and internal media (Calosi *et al.*, 2005; Lignot *et al.*, 2000). Na^+ and Cl^- , which are known to make up 90% or more of the osmotic pressure of hemolymph in most crustaceans (Mantel and Farmer, 1983), can be impacted by a stress, leading to losses of these ions in the hemolymph (Brooks and Mills, 2003; Felten and Guérold, 2004; Johnson and Jones, 1990). Any stress that interferes with such highly ecologically relevant activities is likely to reduce the fitness of organisms and could involve 'ecological death' (Scott and Sloman, 2004).

Salinisation (*i.e.*, natural or anthropic rise of salt concentration) is a serious environmental problem which is expected to increase with time (Williams, 1987, 1999). Increasing salinity in freshwaters is caused by certain chemical plant discharges (Piscart *et al.*, 2005; Pringle *et al.*, 1981; Silva *et al.*, 2000), by sea water intrusion inherent of climate and human activities or by the intensive use of road salt to remove snow and ice (Blasius and Merritt, 2002). Although the drastic impact of a rising salinity on freshwater macroinvertebrates has been reported on different organisation scales (Bruijs *et al.*, 2001; Gandolfi *et al.*, 2001; Kefford *et al.*, 2003; Marshall and Bailey, 2004; Metzeling, 1993; Patrick and Bradley, 2000), there is still a need for individual studies to produce and validate bottom-up models that allow extrapolation of population level impacts from organisms responses.

The main objective of the present study was to assess the importance of two intrinsic factors (gender and age) and an extrinsic one (temperature) on the responses of *G. roeseli* to salinity stress. To achieve this goal, we included behavioural (ventilation and locomotion) and physiological (ionoregulation) endpoints in traditional testing (survival) in three independent laboratory experiments. Since those endpoints are suspected of being connected, we hypothesize that adverse environmental stress may impair survival and physiology as well as other functions linked to behaviour, but in a different way according to organisms gender and/or age. Overall, under stress conditions the allocation of energy should be in favour of maintenance functions (such as iono-/osmo-regulation, see Felten *et al.*, 2008a) rather than of non-vital ones (such as locomotion).

2. Material and methods

2.1. Test species

The freshwater amphipod *G. roeseli* was selected because this species is (1) holobiotic, (2) widespread, (3) often occurring at high densities and easy to collect, (4) easy to identify down to the species level, (5) characterized by a sexual dimorphism, (6) sensitive to a large range of stresses, (7) currently used in ecotoxicological tests, (8) considered as an important reserve of food for macroinvertebrates, fish, bird and amphibian species (MacNeil *et al.*, 2000), and (9) playing a major role in the leaf litter breakdown process as an omnivorous shredder and consequently in the entire aquatic food web (Forrow and Maltby, 2000).

Specimens of *G. roeseli* were collected, between January and May 2008, using a hand net from an unpolluted station, La Nied River (Remilly, northeastern France, 49°00'N and 6°23'E). The organisms were quickly transported (< 1 h) in plastic vessels to the laboratory, where they were immediately used. Animals were not fed before and during experiments.

2.2. Test solutions

For all experiments, the field sampling site water (salinity of 0.6 g L⁻¹) was taken as a control and test solutions were prepared by dissolving Red Sea salt (Red Sea Pharm, Verneuil sur Avre, France) in distilled water according to the method described in Piscart *et al.* (2007). Salinity was expressed as concentration of dissolved solids, converted from the measurement of electrical conductivity via an arithmetic relationship (for details, see Piscart *et al.*, 2007).

2.3. Experiment #1: tolerance of *G. roeseli* exposed to salinity stress

Salinity 72-h LC₅₀ of *G. roeseli* were determined through lethal toxicity tests following the protocol proposed by Kefford *et al.* (2003). It was also a prerequisite for defining the design and the tested concentrations of experiments #2 and #3. The experimental device was composed of eight plastic aquaria, each of them containing 4 L of aerated test solution and 18 plastic cylindrical baskets (Ø 5 cm, height 7 cm) open to the air. Three size

classes were tested for both females and males (small, medium and large). For each size class per gender, three baskets were used to obtain triplicates, each basket containing five individuals. Size was not initially measured to minimize the manipulation of individuals: the length of each gammarid (from the tip of the rostrum to the base of the telson) was accurately measured a posteriori using a binocular magnifying glass (Leica MZ 125) fitted with an eyepiece micrometer (Zeiss, 10×) in order to investigate inter-age differences.

Six salinity treatments were selected according to Piscart *et al.* (2007) who previously defined the 72-h LC₅₀ of *G. roeseli* at 12.6 g NaCl.L⁻¹: thus, the tested salinity levels were 6, 9, 12, 14, 16 and 18 g.L⁻¹. Since the thermal optimum of *G. roeseli* is within 11.9–15.1°C (Pöckl, 1993; Pöckl and Humpesh, 1990), the three tested water temperatures were 10°, 14° and 18°C.

Semi-static exposures to saline conditions were performed to limit chemical variation with waters were renewed every 24 h. A total of 2 160 gammarids ($n = 45/\text{condition}$) were exposed during 72 h under a photoperiod of 14/10 h light/dark. Survivors were counted after the first hour, and then at 24 hourly intervals until 72 h of exposure. Dead animals and moults were removed when water was renewed. During the experiment, conductivity, pH, dissolved oxygen and the percentage of oxygen saturation were daily checked (WTW model Cond 330i, Weilheim, Germany). Evaporation was checked daily and the salinity levels were adjusted only when necessary.

2.4. Experiment #2: behavioural responses of *G. roeseli* exposed to salinity stress

For both behavioural markers, three test solutions were prepared to obtain salinities of 6, 12 and 18 g.L⁻¹. To investigate inter-age differences, gammarids were measured at the end of each test as described in sub-section 2.3.

2.4.1. Ventilation

The ventilatory activity of *G. roeseli* was assessed through the measurement of the pleopod (ventilatory appendages of malacostracean crustaceans) beat frequency by adapting the protocol used by Wijnhoven *et al.* (2003). After a 30 min acclimatization to the solution tested, gammarids were placed individually in plastic reservoirs (Ø 3.5 cm, height 1.5 cm) open to the air and filled with water of the required salinity. For each individual, pleopod beat

mean frequency (PBMF) was assessed with three replicates of one minute. PBMF was counted under red light only when animal was at rest using a binocular and a manual cell counter. The measurements were performed rapidly at the same period of the day (fixed hours: 17–19 h) to avoid the effects of a possible circadian rhythm of respiration (Rosas *et al.*, 1992). Ventilation was assessed at three different water temperatures (10°, 14° and 18°C) with a total of 120 gammarids ($n = 5/\text{condition}$).

2.4.2. Locomotion

The locomotor activity of *G. roeseli* was assessed following the method used by Piscart *et al.* (2007). After a 30 min acclimatization period to the solution tested, amphipods were placed alone in plastic reservoirs (Ø 10 cm, height 1.5 cm) open to the air and filled with water of the required salinity. Reservoirs were then placed in a hermetic box linked to a digital video camera. Individual behaviour was filmed under red light at 15 frames per second for 3 min. The movies were analysed with a software developed in our laboratory to obtain the position of the gammarid in each frame. Hence a 3 min video allowed us to analyse the gammarid displacement via an array of 2 700 x/y coordinates. These coordinates were used to compute six behavioural indices: the time immobile (TI) and the time mobile (TM) in seconds, the highest speed (HS), 95% of the speed (95S) and the mean speed (MS) in millimeters per second, and the total distance covered by a gammarid (TD) in millimeters. Locomotion was assessed at two different water temperatures (14° and 18°C) with a total of 96 gammarids ($n = 6/\text{condition}$).

2.5. Experiment #3: ionoregulation of *G. roeseli* exposed to salinity stress

A test solution was prepared to obtain a salinity of 8 g.L⁻¹ (*i.e.*, the lowest 72-h LC₅₀ observed in experiment #1). A total of 40 gammarids ($n = 10/\text{condition}$) were exposed using the same experimental device and exposure procedure as in experiment #1. According to the results obtained in experiments #1 and #2, the third experiment was only performed at 18°C on organisms presenting a homogenous length range (9 ± 1 mm). After the 72 h exposure, gammarids in similar intermoult C stage were selected. Moulting stages were determined by microscopical observation of the tip of posterior pereopods according to Blanchet-Tournier (1980). Living organisms were gently dried between two sheets of filter paper. Samples of

hemolymph (0.8–1.2 μL) taken from the telson of each individual using a microsyringe were transferred to a gauged 5 μL microcapillary tube and were centrifuged for 10 min at $6\,596 \times g$. After centrifugation the liquid phase was diluted in 2 mL of Nanopur water. Prior to analysis, samples for Na^+ and Cl^- were fixed by acidification with HNO_3 Normapur (0.5%). In hemolymph, $[\text{Na}^+]$ was evaluated using atomic absorption spectrophotometry (Perkin Elmer Analyst 100) whereas $[\text{Cl}^-]$ was measured by ionic chromatography (Dionex 4500i equipped with a Ion Pac AS4A column). For more details concerning hemolymph sampling and analysis see Felten and Gu  rold (2001, 2004, 2006).

2.6. Statistical analyses

All data are reported as means $\pm$ s.d. LC_{50} values were calculated, time per time, by logistic curve-fitting procedure according to the method described by Isnard *et al.* (2001) and Vindimian *et al.* (1999). A Microsoft Excel^{  } spreadsheet (Redmond, WA, USA) enabled automated macro-calculation of LC_{50} and resampling procedure for the bootstrap estimations of confidence intervals. Furthermore we determined differences between LC_{50} values for each gender, age and temperature by comparing the slope of each curve at 50% of mortality using Student *t*-tests. Eight three way analyses of variance (ANOVA) were performed to detect statistically significant effects of (1) gender, (2) salinity and (3) water temperature on survival, ventilation and locomotion, and to highlight the potential interactions between those factors. Moreover we determined differences between controls and the different salinity levels in ventilation and locomotion for each gender, size class and water temperature by *t*-tests. A standardised principal components analysis (PCA) was also performed on locomotion data to highlight gender, water temperature and inter-age differences using ADE-4.0 (Thioulouse *et al.*, 1997). The six locomotor indices were used as active variables on the $\text{F1} \times \text{F2}$ factorial plane whereas salinity and gammarids length were used as supplementary ones. Mann-Whitney *U*-tests were used to compare female and male hemolymph $[\text{Na}^+]$ and $[\text{Cl}^-]$. Correlations between behavioural indices and individual lengths (for each gender and temperature) were performed to verify if significant relationships exist (not presented).

3. Results

3.1. Experiment #1: tolerance of *G. roeseli* exposed to salinity stress

The mortality of organisms following a 72 h exposure to control water remained low and below 10% for the three tested water temperatures (Fig. 1). A rise of salinity increased significantly *G. roeseli* mortality which reached 50% at 9.28 g NaCl.L⁻¹ for females and 12.24 g NaCl.L⁻¹ for males (average between the tested temperatures). The impact of salinity in survival was confirmed by the ANOVA ($p < 0.0001$). At each temperature females salinity tolerance was significantly lower than males ($n = 45$; Student's *t*-tests; $p < 0.001$). The ANOVA emphasized not only a significant effect of gender in survival but also an impact of water temperature and significant interactions between the factors: salinity $\times$ gender, salinity $\times$ temperature and salinity $\times$ gender $\times$ temperature ($p < 0.0001$ for each). In particular, the mortality of females in terms of LC₅₀ increased with temperature ($p < 0.0001$), although no difference was observed for males. The length ranges were 7.83–13.01, 6.99–13.85 and 7.23–16.26 mm for females and 9.16–15.66, 9.64–16.14 and 8.67–16.63 mm for males, at 10°, 14° and 18°C, respectively. No effect of gammarids length was observed in survival since the 72-h LC₅₀ values for each chosen length class per gender did not differ significantly ($p > 0.05$) (not presented).

3.2. Experiment #2: behavioural responses of *G. roeseli* exposed to salinity stress

3.2.1. Ventilation

The ventilation of gammarids decreased significantly for each gender when the salinity reached between 6 and 12 g.L⁻¹ for all tested temperatures (Fig. 2). The ANOVA confirmed the significant effect of salinity in PBMF values ($p < 0.0001$). From this 6–12 g.L⁻¹ salinity range, significant differences in PBMF were found between females and males ($p < 0.05$ for 12 g.L⁻¹ and $p < 0.001$ for 18 g.L⁻¹ at 10°C; $p < 0.01$ for 12 g.L⁻¹ and $p < 0.001$ for 18 g.L⁻¹ at 14°C; $p < 0.05$ for 6 g.L⁻¹, $p < 0.001$ for 12 g.L⁻¹ and $p < 0.001$ for 12 g.L⁻¹ at 18°C), females showing a lower decrease in ventilation rate to salinity than males. The significant effect of gender in ventilation was confirmed by the ANOVA ($p < 0.0001$). Differences between female and male PBMF values increased with the rise of salinity. A significant effect of water temperature in ventilation and an interaction between salinity and gender were also underlined by the ANOVA ($p < 0.0001$ for each). The gammarids length ranges were 9.23–12.17, 9.04–11.08 and 9.88–11.69 mm for females and 11.20–12.77, 11.32–13.97 and 12.05–15.30 mm for males, at 10°, 14° and 18°C, respectively. No inter-age differences were

reported in ventilation: correlations between PBMF values and measured lengths were not significant ($p > 0.05$) (not presented).

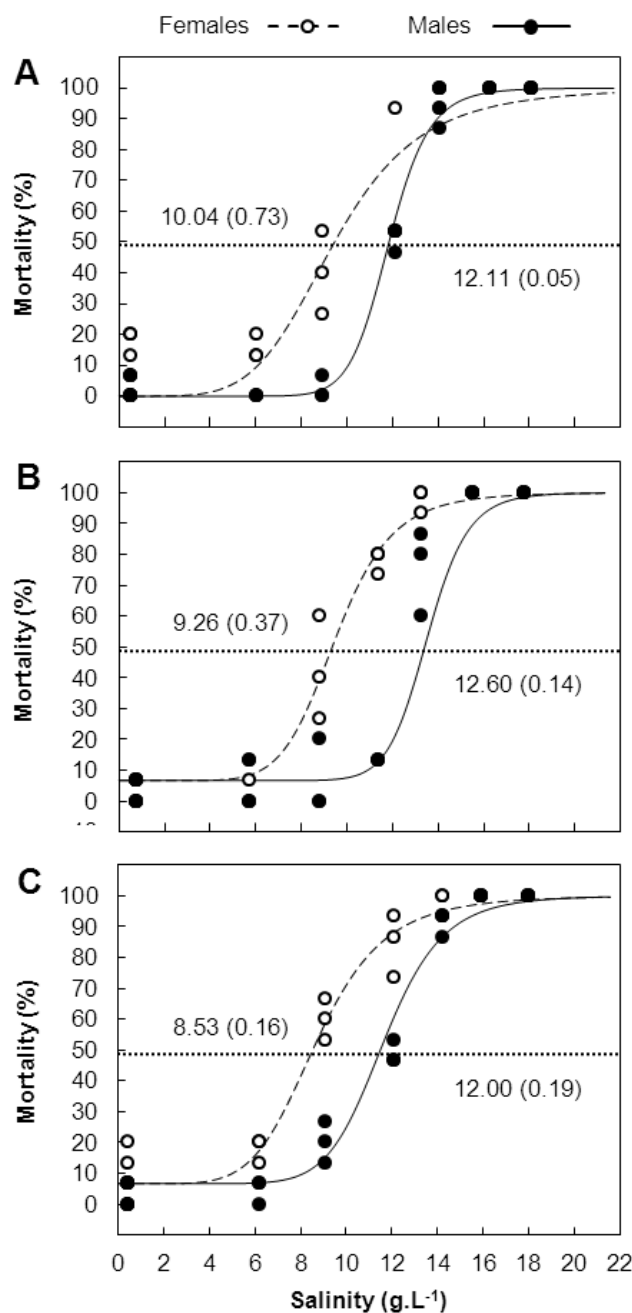


Fig. 1. Toxicity of salinity on *Gammarus roeseli* at three different water temperatures: (A) 10°C, (B) 14°C and (C) 18°C. The 72-h LC50 values (in g L⁻¹) are means (±s.d.) and are, respectively, indicated for females and males above and below the line for 50% of mortality

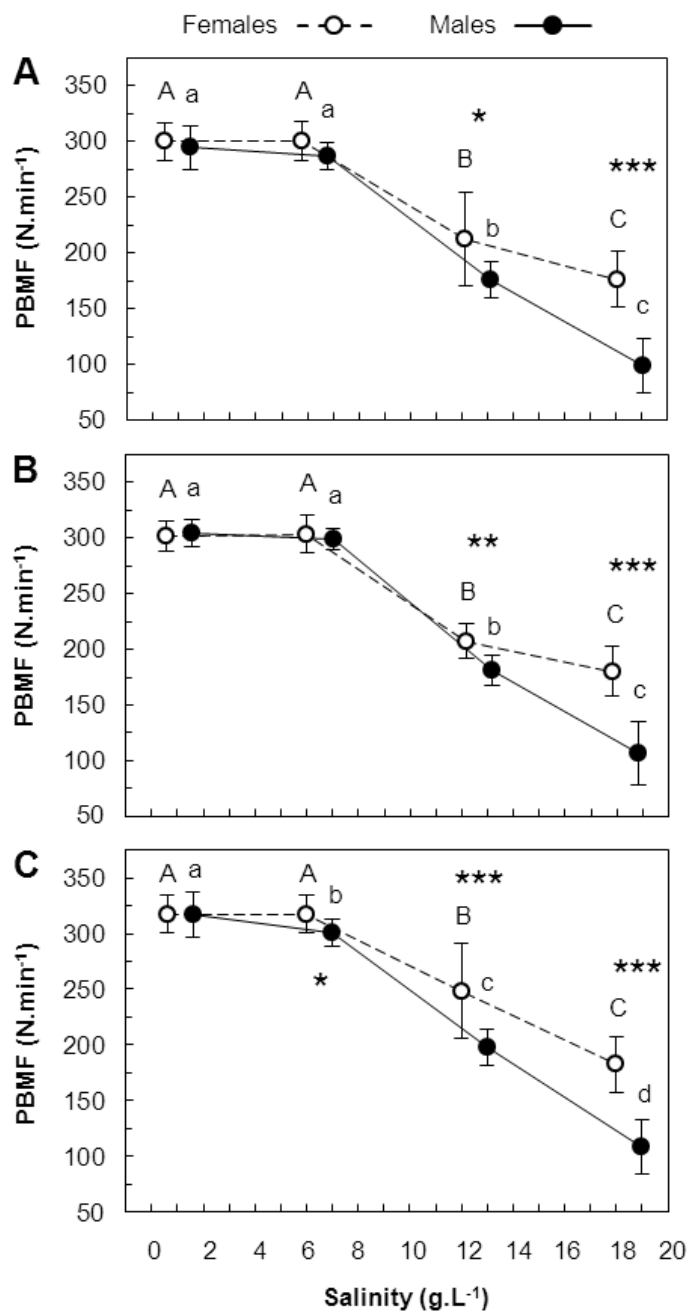


Fig. 2. Pleopod beat mean frequency ($\pm$ s.d.), abridged PBMF, of *Gammarus roeseli* exposed for 30 min to different salinity treatments, at three different water temperatures: (A) 10°, (B) 14° and (C) 18°C. Groups sharing the same letter do not differ significantly ($n = 5$; Student's t -tests; $p < 0.05$). Asterisks indicate significant inter-sex differences ($n = 5$; Student's t -tests; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). To make the figure more readable, points for males were shifted to the right with an addition of 1 g L⁻¹ on salinity values (abscissa).

3.2.2. Locomotion

In the PCA, two factorial axes were selected according to the decrease in eigenvalues (83.48 and 15.12%, respectively of total inertia – Fig. 3A). The first component described the effect of salinity in *G. roeseli* locomotion. MS, HS, 95S, TD and TM varied in the same way (significant correlation with the F1 axis), at obtuse angles to the salinity gradient (Fig. 3B). Gammarids locomotion significantly decreased with increasing salinity: an exposure to a salinity above the 6–12 g.L⁻¹ range led to (1) a decrease of TM, HS, 95S (Fig. 4), MS and TD, (2) an increase of TI. The ANOVA confirmed the significant impact of salinity in all of the six locomotor indices ($p < 0.0001$ for each). No inter-sex differences in locomotion were found: the locations of gravity centres for each gender were very close on F1 × F2 (Fig. 3C). The ANOVA corroborated the absence of significant gender effect in locomotion ($p > 0.05$). In the same way, no water temperature effect was observed on F1 × F2 since the locations of gravity centres for each temperature were layered (Fig. 3D), what has been confirmed by ANOVAs ($p > 0.05$). The ANOVA also indicated a significant interaction (1) between gender × temperature in TI or TM ($p = 0.0259$) and (2) between gender × salinity × temperature in TI or TM ($p = 0.0047$) and TD ($p = 0.0356$). The gammarids length ranges were 9.04–12.41 and 9.04–12.05 mm for females and 12.05–14.82 and 12.41–14.46 mm for males, at 14° and 18°C, respectively. No significant inter-age differences were observed in locomotion: individual length was not correlated to any axis in the PCA (Fig. 3A) and we did not find any correlations between locomotor indices and individual lengths ($p > 0.05$) (not presented).

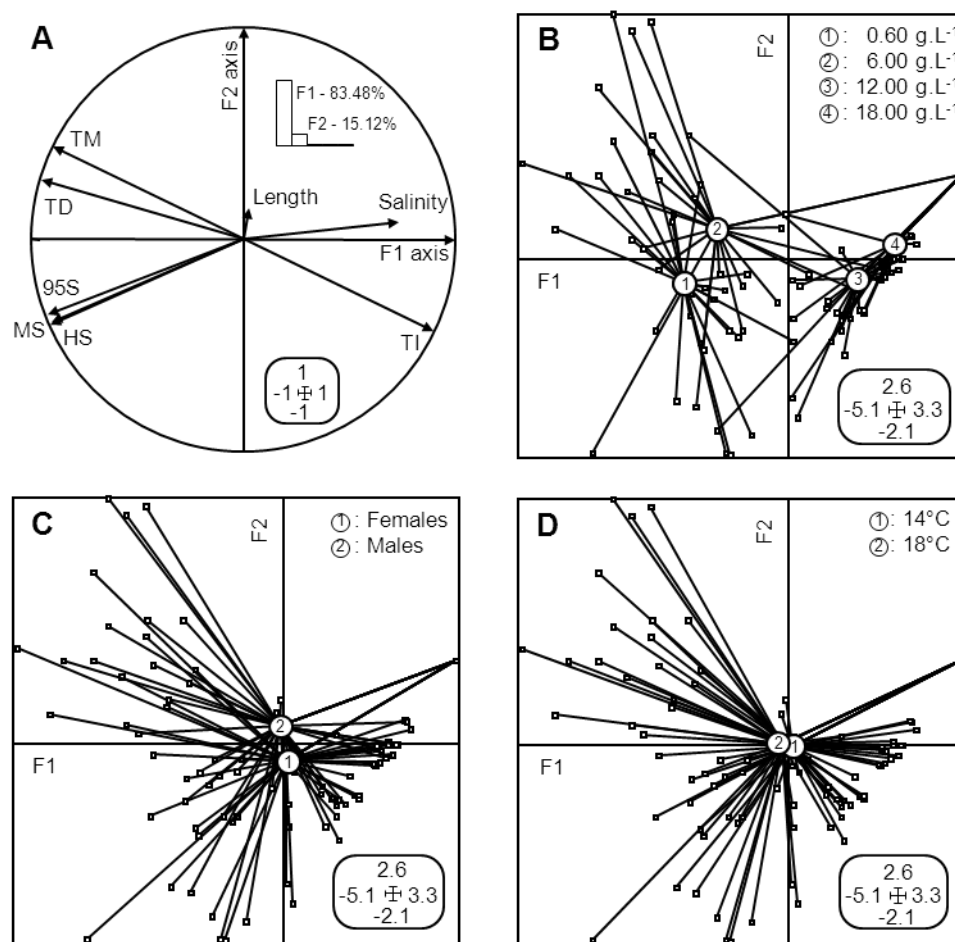


Fig. 3. Results of the principal components analysis on *Gammarus roeseli* locomotion (TI: time immobile, TM: time mobile, HS: highest speed, 95S: 95% of the speed, MS: mean speed and TD: total distance). (A) Correlation circle. (B) Distribution of salinity levels on the F1 × F2 factorial plane of the correspondence analysis. Salinity levels (white circles) are positioned at the weighted average of individual locomotor activity indices (white squares) and are represented by numbers (1 = 0.60 g L⁻¹; 2 = 6.00 g L⁻¹; 3 = 12.00 g L⁻¹; 4 = 18.00 g L⁻¹); solid lines link the locomotor indices to the corresponding salinity. (C) Distribution of both genders on the F1 × F2 factorial plane of the correspondence analysis. Each gender (white circles) is positioned at the weighted average of individual locomotor activity indices (white squares) and is represented by numbers (1 = females; 2 = males). Solid lines link the locomotor indices to the corresponding gender. (D) Distribution of water temperatures on the F1 × F2 factorial plane of the correspondence analysis. Each temperature (white circles) is positioned at the weighted average of individual locomotor activity indices (white squares) and is represented by numbers (1 = 14°C; 2 = 18°C). Solid lines link the locomotor indices to the corresponding water temperature.

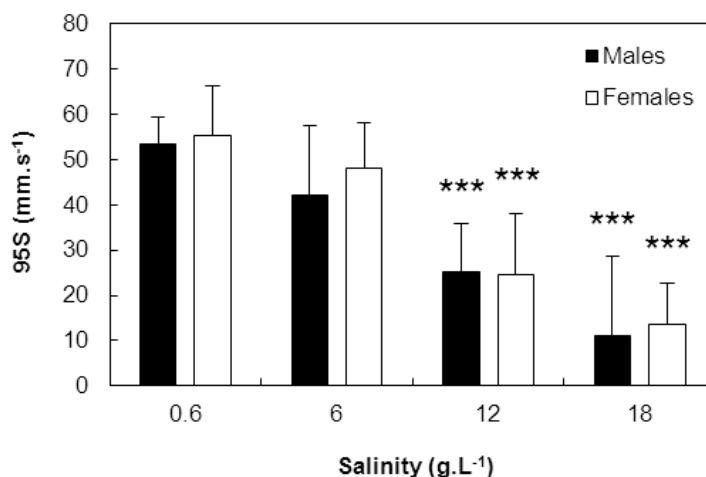


Fig. 4. Illustration of *Gammarus roeseli* decreased locomotion above a 6–12 g L⁻¹ salinity range considering the 95% value of the maximum speed (95S) measured at 14°C. Data are means $\pm$ s.d. Significant differences to control (field water, 0.6 g L⁻¹) are indicated by asterisks ($n = 6$; Student's t -tests; *** $p < 0.001$).

3.3. Experiment #3: ionoregulation of *G. roeseli* exposed to salinity stress

The baseline level of hemolymph [Na⁺] and [Cl⁻] in control organisms were close to 100 mmol.L⁻¹ and was similar in both genders (Fig. 5). A 72 h exposure to a salinity of 8 g.L⁻¹ at 18°C induced a significant increase in the hemolymph of (1) [Na⁺] in both females and males ($n = 10$; Mann-Whitney U -tests; $p < 0.05$), (2) [Cl⁻] only in males ($p < 0.05$) and (3) [Na⁺ + Cl⁻] in both genders ($p < 0.05$). Significant inter-sex differences were found in hemolymph ionic concentrations under stressing condition ($p < 0.05$). Under saline stress, females showed significant higher natremia and lower chloremia than males ($p < 0.05$): at 8 g.L⁻¹, hemolymphatic [Na⁺] were 248.71 ± 78.57 and 135.58 ± 12.96 mmol.L⁻¹, and [Cl⁻] were 101.96 ± 36.95 and 152.37 ± 10.72 mmol.L⁻¹, for females and males, respectively (means $\pm$ s.d.).

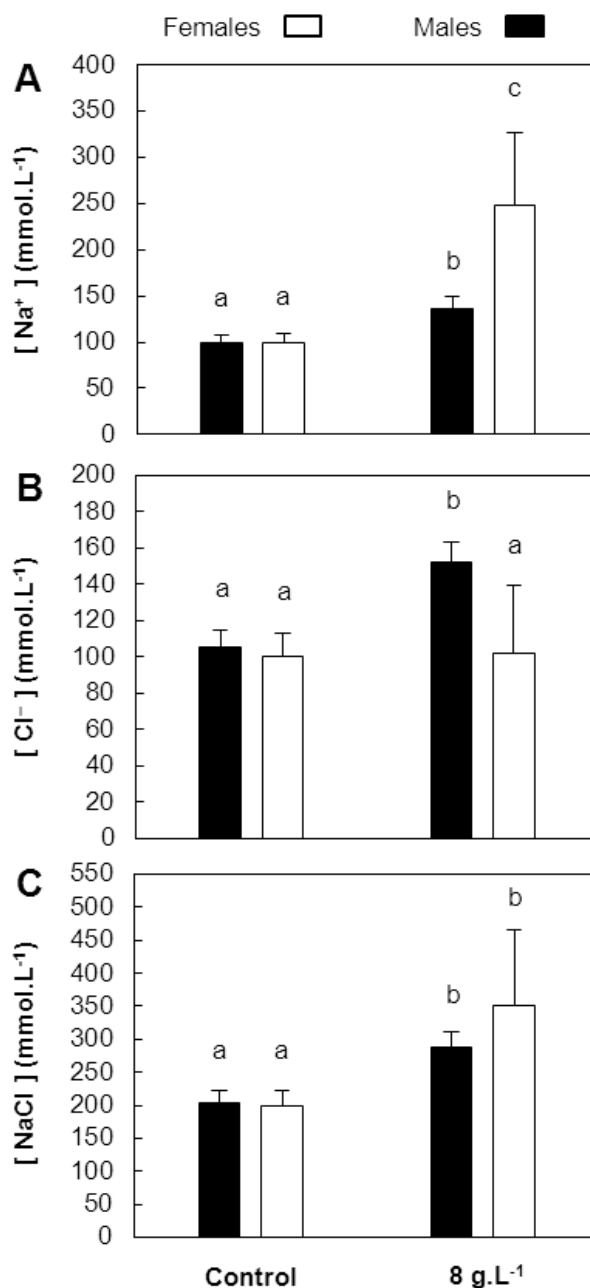


Fig. 5. Mean values (±s.d.) of (A) Na^+ , (B) Cl^- and (C) $\text{Na}^+ + \text{Cl}^-$ concentrations in the hemolymph of *Gammarus roeseli* following a 72 h exposure to two different salinity treatments at 18°C. Groups sharing the same letter do not differ significantly (n = 10; Mann-Whitney U-tests; p < 0.05).

4. Discussion

4.1. Inter-sex differences

In the present study, females exposed to high salinity showed (1) the lowest tolerance, (2) the lowest decrease of ventilation and (3) the highest and lowest hemolymphatic $[\text{Na}^+]$ and $[\text{Cl}^-]$, respectively. Most of the studies devoted to inter-sex differences in gammarids have highlighted a higher sensitivity of females in front of a stress (McCahon and Pascoe, 1988a; Kinne, 1953a, 1953b; Hoback and Barnhart, 1996). This can be caused by differences in (1) the induction or the efficiency of compensation mechanisms (such as osmoregulation) explaining differences in hemolymph $[\text{Na}^+]$ and $[\text{Cl}^-]$ in exposed organisms, (2) the cellular tolerance limits from which these processes are induced, or/and (3) the energetic resources needed/available to supply such mechanisms. According to Buikema and Benfield (1979), the difference of sensitivity between both genders could partly be explained by an increase of metabolism energetic demands during oogenesis and eggs incubation, and the following increase of lipidic synthesis and mobilization, in comparison to spermatogenesis processes which are less demanding in term of energy. This resource allocation could lead to a better physiological state for males while both are exposed to a stress. However, some authors have reported a better resistance of females in comparison to males (Benoit *et al.*, 1976; Emery, 1970; Heit and Fingerman, 1977). In these cases the tested substances were always a non-essential molecule (*e.g.*, cadmium, mercury, cresol). Two hypotheses have been advanced by McClellan-Green *et al.* (2007) to explain this better resistance: (1) a higher moulting rate than males under stress conditions, the process of shedding of the exoskeleton supposing to be one of the removal pathways of contaminants from many invertebrate systems, and (2) the ovodeposition process (*i.e.*, the transfer of contaminants into their eggs and out of their critical organs and tissues) may confer to females a better metabolism or elimination of environmental contaminants (Di Pinto *et al.*, 1993; Oberdörster *et al.*, 2000). Further studies are needed to investigate these processes concerning a salinity stress.

If females exposed to high salinity and more generally to chemicals and environmental stresses are more sensitive than males, the population structure may be strongly impaired. Indeed, in a stressed *G. roeseli* population the sex ratio, which is usually in favour of females in field condition, may change in favour of males. Such modification may

weaken population dynamics since females play a key role in the breeding process and the establishment of the future line of descent.

4.2. Inter-age differences

In the present study, no clear effect of individual length (*i.e.*, age) was observed in *G. roeseli* responses to a salinity stress. In studies with a larger age range, several authors have demonstrated a higher sensitivity of juvenile gammarids in comparison to adults (Alonso *et al.*, 2009; Cowley, 1985; Emery, 1970; McCahon and Pascoe, 1988b; Naylor *et al.*, 1995; Sanders, 1969). The relative sensitivity of younger life-stages to various stressors, including salinity, has also been observed in many other invertebrate species (Conklin and Rao, 1978; Green *et al.*, 1986; Williams *et al.*, 1986; Hall and Burns, 2002; Kefford *et al.*, 2004, 2007) and fishes (Chapman, 1978; Hart *et al.*, 1991). This higher sensitivity could be explained by a higher surface/volume ratio in comparison to older (*i.e.*, more voluminous) life-stages, conferring to juveniles not only a greater potential for moving water and ions through exchange surfaces, but also a higher metabolic rate per weight unit (Schmidt-Nielsen, 1984). All these characteristics may facilitate pollutant uptake (Buikema and Benfield, 1979; Kefford *et al.*, 2004). Kefford *et al.* (2007) have highlighted at least three physiological reasons to explain the higher sensitivity of juveniles: (1) they could regulate their hemolymph at a lower osmolality than older life-stages, (2) the maximum salinity beyond which they can not regulate their hemolymph osmolality could be lower than older life-stages (*i.e.*, juveniles become osmoconformers at a lower salinity), and (3) the maximum hemolymph osmolality that they can tolerate is lower than adults. It is also important to underline that younger individuals have more frequent moultings (*i.e.*, shorter inter-moult duration). Moulting is a critical step for many aquatic species since organisms are more sensitive: the risk of mortality increases with the number of moults in a given time. The absence of inter-age differences in our study could partly be explained by (1) the sampling of mature organisms, preventing a real comparison between juveniles and adults, (2) an over-narrow length (age) spectrum, and (3) too short exposure periods.

4.3. Observed effects of water temperature

We detected a significant effect of water temperature in mortality and ventilation of *G. roeseli* and an interaction between temperature and salinity. Earlier studies have shown that temperature and salinity are two extrinsic factors which can jointly evolve: temperature can change the salinity tolerance spectrum of a species, and vice versa (Allan *et al.*, 2006; Kinne and Rotthauwe, 1952; Shyamasundari, 1973). Wijnhoven *et al.* (2003) found in many gammarid species that a rise of water temperature significantly induced hyperventilation until a threshold, followed by a decrease of PBMF above this limit. Hyperventilation was first directly linked to a rise of water temperature, which seems to confirm our results, since the highest values of PBMF were obtained at the highest tested temperature (18°C) for both genders. All these results suggest that water temperature is an important factor while assessing the effects of a salinity stress, and can be considered as a full-fledged stressor in some cases. A larger range of temperatures is needed to conclude efficiently on its effects on the measured biological and behavioural responses in *G. roeseli* exposed to a salinity stress.

4.4. Potential relationships between biological and behavioural responses

The capacity of gammarids to survive in some environments strongly depends on the regulation of internal ionic concentrations (Brooks and Mills, 2006). If osmoregulation is disturbed and hemolymph osmolality increases above a critical point when the salinity rises, individual death occurs (Hart *et al.*, 1991). In the present study, the influx of ions (Na^+ in particular) in *G. roeseli* hemolymph resulting from hyperosmoregulatory function of the species could emphasize possible disturbances in regulatory processes which can explain organisms mortality when exposed to high salinity. Conversely, possible cellular damages could impinge on osmoregulation by increasing ions and water permeability, and could, as shown in short-term exposures of crustaceans to heavy metals, explain the hypoventilation (*i.e.*, a possible decrease of oxygen consumption). Another hypothesis to explain hypoventilation in saline treatment is an adaptation of the organism to reduce water flow in gills and thus decrease the ions uptake by this way.

Among the possible causes in *G. roeseli* osmoregulation disruption, the most plausible is that iono-/osmo-regulation function of this freshwater gammarid is not able to face high salinity since Na^+/K^+ -ATPases are directed to uptake ions and not the opposite.

Impairment of exchange areas could also be a cumulative hypothesis. In osmoregulation processes, permeable areas are essential for gaseous exchange. Crustacean gills, one of the major exchange areas, have been shown to play a dual role in respiration and active ions uptake (Péqueux, 1995). Some workers have demonstrated, through morphological studies in many crustacean species, a link between a deterioration of gill epithelium by copper and an osmoregulation disturbance (Lawson *et al.*, 1995; Nonnotte *et al.*, 1993; Soegianto *et al.*, 1999). Milne and Ellis (1973) found that acclimatization to low salinities induces changes in the ultrastructure of the gill cells of the marine euryhaline amphipod *Gammarus oceanicus*. Another cause could be an impairment of extero-receptors, which probably monitors the concentration of the medium and mediates its effect via a humoral system by controlling the rate of ion uptake and urine concentration (Lockwood, 1964). Further experiments on water permeability, ions flux, ions concentrations in urine, morphological integrity and modification of exchange areas are needed to validate these hypotheses.

The observed inter-sex differences in hemolymph ionic concentrations (in particular with $[\text{Na}^+]$) and ventilation can explain differences in salinity tolerance of both genders (survival). Since hypoventilation seems to be a protective reaction to saline stress, females which have higher PBMF could be more exposed to saline stress. In addition, although the physiological disturbance (hemolymphatic $[\text{Na}^+]$ and $[\text{Cl}^-]$) due to high salinity was different according to gender, females were less able to regulate ionic influx (when considering hemolymphatic $[\text{Na}^+ + \text{Cl}^-]$). Even if an influx of ions was reported, the analysis of physiological responses shows that compensatory mechanisms take place to maintain homeostasis: if not, hemolymphatic $[\text{Na}^+]$ and $[\text{Cl}^-]$ would be higher. ATPase activities in gills are considered to be the main ionic exchange activity in aquatic crustaceans (Péqueux, 1995). Since compensatory mechanisms are generally energy-consuming, organisms can have three non-exclusive choices: (1) the increase of energy entry (*e.g.*, nutrition), (2) the draw on its energetic reserves and/or (3) the limitation of energy loss in non-vital functions. Decreases in locomotor and ventilatory activities were conjointly reported. Thus, although a direct effect of salinity can not be excluded, decreases observed in locomotion and ventilation might be induced by a redirection of energy in favour of osmoregulation compensation mechanisms, which is directly linked to energetic pathways. As shown by Felten *et al.* (2008a) and Lawrence and Poulter (1998), a metal exposure could involve a reduction or redirection of available energy from ventilation and locomotion to detoxification mechanisms (metallothioneins, stress proteins, mixed functional enzyme systems) or compensation

mechanisms (Na^+/K^+ -ATPase activity inactivation/induction). Consequently, such saline stress may profoundly influence the population as a whole.

5. Conclusions

Survival, ventilation, locomotion, and hemolymph $[\text{Na}^+]$ and $[\text{Cl}^-]$ were all impacted by salinity stress. The results clearly demonstrated an effect of gender and, in a less extent, of water temperature in individual responses to a stress. Our work underlined that the use of multi-responses represents a simple, fast and relatively powerful tool to estimate the functional integrity of many physiological processes at an individual scale. Although such approach provides some clues concerning the possible links between markers, further studies are needed to fully understand the effects of salinity in amphipods (*i.e.*, mechanisms involved at cellular and molecular levels, assessment of inter-sex and -age differences in other gammarid species).

Acknowledgements

The authors are grateful to the two anonymous referees for helpful comments and linguistic corrections that helped to improve the manuscript.

References

- Allan, E.L., Froneman, P.W., Hodgson, A.N., 2006. Effects of temperature and salinity on the standard metabolic rate (SMR) of the caridean shrimp *Palaemon peringueyi*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 337, 103–108.
- Alonso, A., De Lange, H.J., Peeters, E.T.H.M., 2009. Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *G. fosarum*. *Ecotoxicology*. Published Online.
- Benoit, D.A., Leonard, E.N., Christensen, G.M., Fiandt, J.T., 1976. Toxic effects of cadmium on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Transactions of the American Fisheries Society* 10, 550–560.

- Blanchet-Tournier, M.F., 1980. Mue et vitellogénèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas): contrôles endocrines et interactions. Thesis, Paris 6 university, 198 p.
- Blasius, B.J., Merritt, R.W., 2002. Field and laboratory investigations on the effects of road salt (NaCl) on stream macroinvertebrate communities. *Environmental Pollution* 120, 219–231.
- 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: Molecular and Integrative Physiology* 135, 527–537.
- Brooks, S.J., Mills, C.L., 2006. Gill Na⁺,K⁺-ATPase in a series of hyper-regulating gammarid amphipods. Enzyme characterisation and the effects of salinity acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology* 144, 24–32.
- Bruijs, M.C.M., Kelleher, B., Van der Velde, G., Bij de Vaate, A., 2001. Oxygen consumption, temperature and salinity tolerance of the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*: indicators of further dispersal via ballast water transport. *Archiv für Hydrobiologie* 152, 633–646.
- Buikema, A.L., Benfield, E.F., 1979. Use of macroinvertebrate fauna and water quality of saline river system in south-western Australia. *Hydrobiologia* 248, 143–160.
- Calosi, P., Ugolini, A., Morritt, D., 2005. Physiological responses to hyposmotic stress in the supralittoral amphipod *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology* 142, 267–275.
- Chapman, G.A., 1978. Toxicities of cadmium, copper and zinc to four juveniles stages of Chinook salmon and Steelheads. *Transactions of the American Fisheries Society* 107, 841–847.
- Conklin, P.J., Rao, K.R., 1978. Toxicity of sodium pentachlorophenate to the grass shrimp *Palaemonetes pugio* in relation to the molt cycle, in: Rao; K.R. (Eds.), *Pentachlorophenol: chemistry, pharmacology and environmental toxicology*. Plenum press, New York.
- Cowley, C., 1985. The influence of road run-off on the benthic macroinvertebrates of an unpolluted chalk stream. Unpublished PhD thesis, Polytechnic of Central London.

- De Lange, H.J., Noordoven, W., Murk, A.J., Lürling, M., Peeters, E.T.H.M., 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 78, 209–216.
- De Lange, H.J., Peeters, E.T.H.M., Lürling, M., 2009. Changes in ventilation and locomotion of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) in response to low concentrations of pharmaceuticals. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15(1), 111–120.
- Di Pinto, L.M., Coull, B.C., Chandler, G.T., 1993. Lethal and sublethal effects of the sediment associated PCB Aroclor 1254 on a meiobenthic copepod. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 1909–1918.
- Emery, R.M., 1970. The comparative acute toxicity of cresol to two benthic crustaceans. *Water Research* 4, 485–491.
- Felten, V., Guérol, F., 2001. Hyperventilation and loss of hemolymph Na^+ and Cl^- in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* exposed to acid stress: a preliminary study. *Disease of Aquatic Organisms* 45, 77–80.
- Felten, V., Guérol, F., 2004. Haemolymph $[\text{Na}^+]$ and $[\text{Cl}^-]$ loss in *Gammarus fossarum* exposed *in situ* to a wide range of acidic streams. *Disease of Aquatic Organisms* 61, 113–121.
- Felten, V., Guérol, F., 2006. Short-term physiological responses to a severe acid stress in three macroinvertebrate species: a comparative study. *Chemosphere* 63, 1427–1435.
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O., 2008a. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 86, 413–425.
- Felten, V., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Aujoulat, F., Garric, J., Geffard, O., 2008b. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* exposed to acid stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology* 147, 189–197.
- Farrow, 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.
- Gandolfi, A., Akon Todeshi, E.B., Van Doninck, L., Rossi, V., Menozzi, P., 2001. Salinity tolerance of *Darwinula stevensoni* (Crustacea, Ostracoda). *Italian Journal of Zoology* 68, 61–67.

- Gerhardt, A., 1995. Monitoring behavioural responses to metals in *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea) with impedance conversion, *Environmental Science and Pollution Reserach* 2, 15–23.
- Gerhardt, A., Svensson, E., Clostermann, M., Fridlund, B., 1994. Monitoring of behavioral patterns of aquatic organisms with an impedance conversion technique. *Environment International* 20(2), 209–219.
- Green, D.W.J., Williams, K.A., Pascoe, D., 1986. The acute and chronic toxicity of cadmium to different life history stages of freshwater crustacean *Asellus aquaticus* L. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 15, 465–471.
- Hall, C.J., Burns, C.W., 2002. Mortality and growth responses of *Daphnia carinata* to increases in temperature and salinity. *Freshwater Biology* 47, 451–458.
- Hart, B.T., Bailey, P., Edwards, R., Hortle, K., James, K., McCahon, A., Meredith, C., Swadling, K., 1991. A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota. *Hydrobiologia* 210, 105–144.
- Heit, M., Fingerman, M., 1977. The influence of size, sex and temperature on the toxicity of mercure to two species of crayfishes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 18, 572–580.
- Hoback, W.W., Barnhart, M.C., 1996. Lethal limits and sublethal effects of hypoxia on the amphipod *Gammarus pseudolimnaeus*. *Journal of the North American Benthological Society* 15(1), 117–126.
- 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.
- 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(3), 187–192.
- Kefford, B.J., Dalton, A., Palmer, C.G., Nuggeoda, D., 2004. The salinity tolerance of eggs and hatchlings of selected aquatic macroinvertebrates in south-east Australia and South Africa. *Hydrobiologia* 517, 179–192.
- Kefford, B.J., Nuggeoda, D., Zalizniak, L., Fields, E.J., Hassell, K.L., 2007. The salinity tolerance of freshwater macroinvertebrate eggs and hatchlings in comparison to their older life-stages: a diversity of responses. *Aquatic Ecology* 41, 335–348.

- Kefford, B.J., Papas, P.J., Nugenoda, D., 2003. Relative salinity tolerance of macroinvertebrates from the Barwon River, Victoria, Australia. *Marine and Freshwater Research* 54, 755–765.
- Kinne, O., 1953a. Zur biologie und physiologie von *Gammarus duebeni* Lillj. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* 157, 427–491.
- Kinne, O., 1953b. Biologie und physiologie von *Gammarus duebeni* Lillj. II. Über die häutungsfrequenz, ihre abhangigkeit von temperatur und saizgehalt sowie über ihr verhalten bei isoliert gehaltenen und amputierten versuchstieren. *Zoologische Jahrbuecher Abteilung fuer Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere* 64, 183–206.
- Kinne, O., Rotthauwe, W., 1952. Biologische beobachtungen und untersuchungen über die blutkonzentration an *Heteropanope tridentatus* Maitland (Decapoda). *Kieler Meeresforschung* 8, 212–217.
- Lawrence, A.J., Poulter, C., 1998. Development of a sub-lethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*. *Water Research* 32, 569–578.
- Lawrence, A.J., Poulter, C., 2001. Impact of copper, pentachlorophenol and benzo(a)pyrene on the swimming efficiency and embryogenesis of the amphipod *Chaetogammarus marinus*. *Marine Ecology Progress Series* 223, 213–223.
- Lawson, S.L., Jones, M.B., Moate, R.M., 1995. Effect of copper on the ultrastructure of the gill epithelium of *Carcinus Maenas* (Decapoda: Brachyura). *Marine Pollution Bulletin* 31, 63–72.
- 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.
- Lockwood, A.P.M., 1964. Activation of the sodium uptake system at high blood concentrations in the amphipod *Gammarus duebeni*. *Journal of Experimental Biology* 41, 447–458.
- MacNeil, 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.
- Maltby, L., Clayton, S.A., Wood, R.M., McLoughlin, N., 2002. Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as a bioindicator of water quality: robustness,

- responsiveness, and relevance. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 361–368.
- Mantel, L.H., Farmer, L.L., 1983. Osmotic and ionic regulation, in: Mantel, L.H. (Eds.), *The Biology of Crustacea*, Vol. 5. Academic Press, New York, pp. 53–161.
- Marshall, N.A., Bailey, P.C.E., 2004. Impact of secondary salinisation on freshwater ecosystems: effects of contrasting, experimental, short-term releases of saline wastewater on macroinvertebrates in a lowland stream. *Marine and Freshwater Research* 55, 509–523.
- McCahon, C.P., Pascoe, D., 1988a. Increased sensitivity to cadmium of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) during the reproductive period. *Aquatic Toxicology* 13, 183–194.
- McCahon, C.P., Pascoe, D., 1988b. Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluation tests: culture and selection of a sensitive life stage. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 15, 245–252.
- McClellan-Green, P., Romano, J., Oberdörster, E., 2007. Does gender really matter in contaminant exposure? A case study using invertebrate models. *Environmental Research* 104, 183–191.
- Metzeling, L., 1993. Benthic macroinvertebrate community structure in streams of different salinities. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 44, 335–351.
- Mills, C.L., Shukla, D.H., Compton, G.J., 2006. Development of a new low cost high sensitivity system for behavioural ecotoxicity testing. *Aquatic Toxicology* 77, 197–201.
- Milne, D.J., Ellis, R.A., 1973. The effect of salinity acclimation on the ultrastructure of the gills of *Gammarus oceanicus* (Segerstrale, 1947) (Crustacea: Amphipoda). *Zeitschrift fuer Zellforschung* 139, 311–318.
- Naylor, C., Pindar, L., Calow, P., 1995. Inter- and intraspecific variation in sensitivity to toxins: the effects of acidity and zinc on the freshwater crustaceans *Asellus aquaticus* (L.) and *Gammarus pulex* (L.). *Water Research* 24, 757–762.
- Nonnotte, L., Boitel, F., Truchot, J.P., 1993. Waterborne copper causes gill damage and haemolymph hypoxia in the shore crab *Carcinus maenas*. *Canadian Journal of Zoology* 71, 1569–1576.
- Oberdörster, E., Brouwer, M., Hoexum-Brouwer, T., Manning, S., McLachlan, J.A., 2000. Long-term pyrene exposure of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, affects molting and

- reproduction of exposed males and offspring of exposed females. *Environmental Health Perspectives* 108, 640–646.
- Patrick, M.L., Bradley, T.J., 2000. The physiology of salinity tolerance in larvae of two species of *Culex* mosquitoes: the role of compatible solutes. *Journal of Experimental Biology* 203, 821–830.
- Péqueux, A., 1995. Osmotic regulation. *Journal of Crustacean Biology* 15, 1–60.
- Peeters, E.T.H.M., De Lange, H.J., Lüring, M., 2009a. Variation in the behavior of the amphipod *Gammarus pulex*. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15(1), 41–52.
- Peeters, E.T.H.M., Gerhardt, A., Amiard-Triquet, C., 2009b. Behavioral ecotoxicology: mechanisms, effects, applications, and biomonitoring. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15(1), 7–10.
- Piscart, C., Webb, B.W., Beisel, J.N., 2007. An acanthocephalan parasite increases the salinity tolerance of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli* (Crustacea: Gammaridae). *Naturwissenschaften* 94, 741–747.
- Pöckl, M., 1993. Reproductive potential and lifetime potential fecundity of the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* in Austrian streams and rivers. *Freshwater Biology* 30, 73–91.
- Pöckl, M., Humpesch, U.H., 1990. Intra- and inter-specific variations in egg survival and brood development time for the Austrian populations of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda). *Freshwater Biology* 23, 441–455.
- Poulton, M., Pascoe, D., 1990. Disruption of precopula in *Gammarus pulex* (L.): development of a behavioural bioassay for evaluating pollutant and parasite induced stress. *Chemosphere* 20, 403–415.
- Pringle, C.M., White, D.S., Rice, C.P., Tuchman, N.L., 1981. The biological effects of chloride and sulfate with a special emphasis on the Laurentian Great Lakes. Great Lakes Research Division Publication No. 20. Great Lakes Fishery Commission, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan.
- Rinderhagen, M., Ritterhof, J., Zauke, G.P., 2000. Crustaceans as bioindicators, in: Gerhardt, A. (Eds.), *Biomonitoring of polluted water – Reviews on actual topics*. Trans Tech Publications – Scitech Publications, *Environmental Research Forum* 9, 161–194.
- 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, Part A: Molecular and Integrative Physiology* 101, 323–328.
- Sanders, H.O., 1969. Toxicity of pesticides to the crustacean *Gammarus lacustris*. U.S. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, Technical Paper n°25, 14p.
- Schmidt-Nielsen, K., 1984. *Scaling: why is animal size so important?* Cambridge, Cambridge University Press 241p.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369–392.
- Shyamasundari, K., 1973. Studies on the tube-building amphipod *Corophium triaenonyx* stebbing from Visakhapatnam harbor: effect of salinity and temperature. *Marine Biological Laboratory* 144, 503–510.
- Silva, E.I.L., Shimizu, A., Matsunami, H., 2000. Salt pollution in a Japanese stream and its effects on water chemistry and epilithic algal chlorophyll-a. *Hydrobiologia* 437, 139–148.
- Soegianto, A., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.P., Charmantier, G., 1999. Impact of copper on the structure of the gills and epidodites of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Journal of Crustacean Biology* 19, 209–223.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S., Olivier, J.M., 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* 7, 75–83.
- 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 judgments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2386–2391.
- 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.
- 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.
- Williams, W.D., 1987. Salinization of rivers and stream: an important environmental hazard. *Ambio* 16, 181–185.
- Williams, W.D., 1999. Salinisation: a major threat to water resource in the arid and semi-arid regions. *Lakes and Reservoirs: Research and Management* 4, 85–91.

Williams, K.A., Green, D.W.J., Pascoe, D., Gower, D.E., 1986. The acute toxicity of cadmium to different larval stages of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) and its ecological significance for pollution regulation. *Oecologia* 70, 362–366.

Annexe II. Analyses physico-chimiques de l'eau superficielle et des sédiments de la Nied française à Rémyilly, et des sédiments de la Moselle à Metz (Saulcy). *MS : Matière Sèche.

		Nied française (Rémyilly)	Moselle (Metz, Saulcy)
Sédiments			
Matières sèches totales (%)	MST	65,9	75,9
Métaux (mg/kg MS*)	Aluminium (Al)	19109	27600
	Arsenic (As)	20,6	11,9
	Cadmium (Cd)	0,2	< 0,2
	Chrome total (Cr)	41,6	22,9
	Cobalt (Co)	10,4	4,6
	Cuivre (Cu)	11,1	15
	Fer total (Fe)	26336	13900
	Manganèse (Mn)	1721,5	331
	Mercuré (Hg)	< 0,02	0,04
	Nickel (Ni)	19,5	10,8
	Plomb (Pb)	16,9	58,6
	Zinc (Zn)	51,8	77,4
HAPs (µg/kg MS)	Anthracène (Anth)	53	1206
	Benzo(a)anthracène (BaA)	382	3506
	Benzo(a)pyrène (BaP)	444	3388
	Benzo(k)fluoranthène (BkF)	245	1949
	Benzo(ghi)perylène (BgP)	371	1965
	Chrysène (Chry)	440	2668
	Fluoranthène (Fluo)	762	7489
	Indénol(1,2,3-cd)pyrène (Ind)	363	1301
	Phénanthrène (Phén)	226	3092
PCBs (µg/kg MS)	PCB28	< 5	< 5
	PCB52	< 5	Présence
	PCB101	< 5	5
	PCB118	< 5	Présence
	PCB138	< 5	7
	PCB153	< 5	13
	PCB180	< 5	7
Eau superficielle			
Métaux (µg/L)	Aluminium (Al)	164	-
	Arsenic (As)	5,9	-
	Cadmium (Cd)	< 0,2	-
	Chrome total (Cr)	0,2	-
	Cobalt (Co)	0,2	-
	Cuivre (Cu)	3,2	-
	Fer total (Fe)	170	-
	Manganèse (Mn)	55	-
	Mercuré (Hg)	< 0,1	-
	Nickel (Ni)	1	-
	Plomb (Pb)	0,3	-
	Zinc (Zn)	3	-
HAPs (µg/L)	Benzo(a)pyrène (BaP)	0,002	-
	Benzo(ghi)perylène (BgP)	0,005	-
PCBs (µg/L)	PCB28	< 0,005	-
	PCB52	< 0,005	-
	PCB101	< 0,005	-
	PCB118	< 0,005	-
	PCB138	< 0,005	-
	PCB153	< 0,005	-
	PCB180	< 0,005	-

Behavioural and physiological responses of *Gammarus pulex* exposed to cadmium and arsenate at three temperatures: individual and combined effects

Research article, PLOS ONE (2012) 7(6): e39153

Céline Vellinger *, Vincent Felten, Pascal Sornom, Philippe Rousselle, Jean-Nicolas Beisel, Philippe Usseglio-Polatera

Laboratoire des Interactions, Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes, CNRS UMR 7146, Université de Lorraine, Metz, France

* Author for correspondence: C. Vellinger, Laboratoire des Interactions, Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), CNRS UMR 7146, Université de Lorraine, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France (e-mail: celine.vellinger@umail.univ-metz.fr)

Citation: Vellinger C, Felten V, Sornom P, Beisel J-N, *et al.* (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. doi: 10.1371/journal.pone.0039153

Editor: Stephane Blanc, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, France

Received March 29, 2012; **Accepted** May 16, 2012; **Published** June 22, 2012

Copyright: © 2012 Vellinger *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: This work has been supported by the French Ministry of Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

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 96 h 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 (ionoregulation 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.

Short title:

Temperature and metals effects in *Gammarus pulex*

RESUME : Les réponses mises en place par les organismes lorsqu'ils sont exposés à des perturbations environnementales variées sont couramment utilisées comme biomarqueurs pour l'évaluation de la qualité des milieux. Cependant, ces réponses sont modulées par de nombreux facteurs et elles apportent des informations différentes selon leur précocité, leur pertinence, leur spécificité ou leur complexité. Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier une batterie de réponses comportementales chez diverses espèces de crustacés d'eau douce d'intérêt écotoxicologique. Pour cela, nous nous sommes intéressés aux effets d'un stress biotique (*i.e.* risque de prédation) et/ou d'un stress abiotique (*i.e.* contamination métallique) sur des comportements à haute pertinence écologique, avec la prise en compte de certains facteurs confondants (*i.e.* le sexe et la taille des individus). Lors d'investigations en laboratoire, nous avons étudié les effets : (i) d'une contamination des sédiments sur l'évitement au substrat du décapode *Astacus astacus*, de l'isopode *Asellus aquaticus* et des amphipodes *Gammarus pulex*, *Gammarus roeseli* et *Dikerogammarus villosus*, (ii) d'un risque de prédation sur les stratégies d'anti-prédation de *G. pulex*, *G. roeseli* et *D. villosus*, (iii) d'un risque de prédation et d'une contamination de l'eau au cadmium sur les stratégies d'anti-prédation, les dommages cellulaires et les réserves énergétiques de *G. roeseli* et *D. villosus*, et (iv) d'une contamination de l'eau au cadmium sur l'appariement sexuel de *D. villosus*. Nous avons mis en évidence des variabilités inter-espèces fortes, peu de différences inter-sexes et d'une manière générale un impact significatif du cadmium sur les réponses testées. Globalement, cette étude met en avant le caractère précoce et cohérent des réponses comportementales et souligne leur importance dans l'évaluation des effets d'un stress environnemental et dans l'évaluation de la qualité des milieux.

MOTS CLEFS : Crustacés, Biomarqueurs, Comportements, *Astacus astacus*, *Asellus aquaticus*, *Gammarus pulex*, *Gammarus roeseli*, *Dikerogammarus villosus*, Evitement, Anti-prédation, Appariement sexuel, Contamination métallique, Cadmium, Facteur confondant

ABSTRACT : Organisms responses to various environmental disturbances are commonly used as biomarkers in the assessment of environmental quality. However, these responses are modulated by many factors and provide different information depending on their precocity, their relevance, specificity and complexity. In this context, we chose to study a set of behavioural responses in various species of freshwater crustaceans of ecotoxicological interest. To achieve this goal, we investigated the effects of biotic (*i.e.* predation risk) and/or abiotic stress (*i.e.* metal contamination) on behaviours of high ecological relevance, including some confounding factors (*i.e.* gender and individual length). In laboratory experiments, we studied the effects of: (i) a sediment contamination on the substrate avoidance in the decapod *Astacus astacus*, the isopod *Asellus aquaticus* and the amphipods *Gammarus pulex*, *Gammarus roeseli* and *Dikerogammarus villosus*, (ii) a high predation risk on antipredator strategies in *G. pulex*, *G. roeseli* and *D. villosus*, (iii) a high predation risk and a contamination of water by cadmium on antipredator strategies, cell damages and energy reserves in *G. roeseli* and *D. villosus*, and (iv) a contamination of water by cadmium on the precopulatory behaviour in *D. villosus*. We have highlighted a strong interspecies variability and small differences depending on gender. The impact of cadmium was significant on the tested responses. Overall, this study emphasizes the importance of behaviours, which can be considered as early warning signals and as relevant tools with high ecological relevance, in the assessment of stress effects and environmental quality.

KEYWORDS : Crustaceans, Biomarkers, Behaviours, *Astacus astacus*, *Asellus aquaticus*, *Gammarus pulex*, *Gammarus roeseli*, *Dikerogammarus villosus*, Avoidance, Antipredation, Mating, Metal contamination, Cadmium, Confounding factors