UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

Université Paul Verlaine de Metz – UFR SciFA
Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystème
LIEBE – CNRS UMR 7146

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie
Ressource Procédés Produits Environnement,
RP2E, ED N° 410

THESE

Université de Lorraine
UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

présentée par **Éric GISMONDI**

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Spécialité : **ÉCOTOXICOLOGIE ET BIODIVERSITE**

Étude des systèmes de défenses antitoxiques chez l'amphipode *Gammarus roeseli*: effets du parasitisme et d'une exposition au cadmium

Soutenue le **17 avril 2012** devant la commission d'examen suivante :

Directeur de thèse	**Carole COSSU-LEGUILLE**	Maître de Conférences - HDR, Université de Metz
Co-Directeur de thèse	**Jean-Nicolas BEISEL**	Maître de Conférences - HDR, Université de Metz
Rapporteurs	**Marie-Jeanne PERROT-MINNOT**	Maître de Conférences - HDR, Université de Bourgogne
	Alain GEFFARD	Professeur, Université de Reims
Examinateurs	**Maria BEBIANNO**	Professeur, Université d'Algarve - Portugal
	Jean-Pierre THOMÉ	Professeur, Université de Liège - Belgique
	Thierry RIGAUD	Directeur de Recherche, Université de Bourgogne

L'expérience est une lanterne accrochée dans le dos qui
n'éclaire que le chemin parcouru.
(Confucius 551- 479 av J.C.)

Remerciements

Et voilà… Trois années (et quelques mois) se sont écoulées… Ma thèse touche à sa fin, et il est grand temps pour moi de remercier l'ensemble des personnes qui m'ont aidé, épaulé, soutenu de près ou de loin durant ce « périple »… C'est avec beaucoup d'émotions que je leur dédie ces quelques lignes…

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-François Férard, ancien directeur du laboratoire LIEBE de m'avoir accueilli au sein de son établissement de recherche. Par la même, je remercie également Pascale Bauda et Laure Giambérini qui ont depuis repris le flambeau en tant que directrice et directrice-adjointe de cette unité de recherche. Je tiens également à remercier ici le Professeur Paule Vasseur, qui m'a permis de faire mes premiers pas dans la recherche en m'acceptant dans le parcours M2 Recherche.

Toute ma reconnaissance, ma gratitude, et mes remerciements les plus sincères s'adressent à Carole Cossu-Leguille, directrice de thèse et Jean-Nicolas Beisel, co-directeur de thèse. Merci de m'avoir accordé toute votre confiance durant ces années.

Carole, merci pour ta disponibilité, tes conseils, ton soutien, ta gentillesse et j'en passe, qui m'ont été d'une très grande aide durant ma thèse. Merci d'avoir toujours su trouver les mots justes, surtout dans les moments d'angoisses. Un de mes grands moments restera notre « manip canards ». Désolé de t'avoir laissé le mauvais rôle avec eux; mais grâce à toi, nous pouvons dire que les canards sont intelligents et ont une mémoire visuelle (un Nature ?!). J'en profite, par la même occasion, pour remercier ses beaux-parents, M et Mme Leguille, d'avoir gentillement accepté de s'occuper de nos canards dans nos expériences les plus « folles ».

Jean-Nicolas, merci à toi pour ton écoute, tes conseils, nos discussions, tes idées parfois farfelues qui m'ont souvent fait peur, mais surtout rire. Une chose est sûre, c'est qu'entre la pluie à chaque sortie, les pneus crevés, les pièges à gammares perdus, les attaques de cygne, les rouleaux de papiers toilettes flottants (et je dois certainement en oublier), il est préférable que nous stoppions les sorties terrains ensemble.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Mme Marie-Jeanne Perrot-Minnot, Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne et M. Alain Geffard, Professeur à l'Université de Reims qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Je tiens à remercier Thierry Rigaud, Directeur de Recherche au laboratoire Biogéosciences de Dijon, d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant qu'examinateur, de m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche pour l'apprentissage de la détection des microsporidies avec l'aide de Christine Dubreuil, mais surtout pour sa disponibilité, ses précieux conseils, ses réflexions scientifiques, que ce soit lors de nos réunions ou par e-mails. J'adresse également mes remerciements à Mme Maria Bébianno, Professeur à l'Université d'Algarve du Portugal et M. Jean-Pierre Thomé, Professeur à l'Université de Liège de Belgique, d'avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examinateurs et d'avoir fait le voyage pour ma soutenance de thèse.

Merci à l'ensemble du personnel du laboratoire sans qui ce travail de thèse n'aurait pu aboutir: notre secrétaire, Maryline, pour toutes les démarches administratives diverses et variées, et son aide dans de multiples tâches que je ne m'amuserai pas à énumérer car nombreuses; Claudine et Anne-Marie pour leur gentillesse et leur rigueur. Je remercie Marie-Aline, le second membre des « Cookie Dingler » (le 1er étant Carole) pour ses nombreux coups de main lors de sorties terrains, sa bonne humeur, et ses conseils d'ex-doctorante.

Merci également à Chantal d'avoir toujours su trouver le mot (ou la grimace) pour faire rire, que ce soit entre deux couloirs, ou à travers les vitres de la R1 (le privilège de travailler dans la seule salle vitrée ?!!). Merci à Marie-Andrée pour nos discussions diverses et variées. Mes remerciements s'adressent aussi à Rosy, toujours prête à rendre service et surtout, toujours souriante… même à 7h du matin !! Et en parlant de bonne humeur, je ne pouvais omettre de remercier Philippe Wagner, qu'on entend et voit souvent avec le sourire, et qui n'oubliait jamais de s'arrêter à notre bureau pour nous saluer et nous souhaiter une bonne journée. Et comme au LIEBE, un Philippe en cache toujours un autre, merci à Philippe Rousselle pour avoir réussi avec brio le défi que je lui avais lancé, à savoir doser le cadmium dans UN gammare, mais aussi chez le parasite qu'il a si gentillement requalifié de « petite bêbête cachée dans la bêbête ». Merci à Françoise et Bénédicte pour leur bonne humeur et humour !! Merci aussi à Mireille, dont le fameux « info-doc » a rythmé nos départs en week-end.

Je tiens également à remercier l'ensemble des Chercheurs et Enseignants-Chercheurs que j'ai pu côtoyer au sein du LIEBE. Je pense notamment à Vincent Felten, gammarophile averti, dont j'ai pu faire plus amples connaissances entre 2 dissections et 3-4 pipetages en R1; Sandrine Pain-Devin, souriante en toutes circonstances (merci d'avoir sauvé mon petit doigt !!); Simon Devin, d'une grande aide lors de mes premiers pas concrets en biostatistiques; Michael Danger, « expert relève » en HPLC (mais si…tu sais comment ça tourne maintenant); Florence Maunoury-Danger, pour sa bonne humeur très communicative; Pascal Poupin, pour ses conseils en biologie moléculaire… Un grand merci à tous !!

Au cours d'une thèse, le savoir se transmet d'encadrants à doctorants, mais également de doctorants à doctorants. Je voudrais ici remercier ceux qui sont communément appelés les « anciens ». Merci à Vincent M. et Sophie pour m'avoir initié aux gammares et sorties terrains; à Renaud D. pour les nombreuses soirées détentes à écouter ses histoires toutes plus burlesques les unes que les autres; à Marc B. et Yann L. pour leur aide et bonne humeur. Un merci spécial à Anne-Sophie, toujours en train de rire de tout (…et manger.. de tout), nos combats de chaises et les longs « débats » me manquent. Merci également à Laetitia, nouvelle diplômée, pour tes conseils, nos échanges en parasitologie et autres. Certains diront de nouveau qu'il est dommage que nous n'ayons pas pu collaborer… Je répondrais simplement que nous avons fini une thèse, mais que notre carrière ne fait que débuter… en tout cas je le souhaite (… peut-être à bientôt ?!).

Il y a ensuite les doctorants en fin de thèse qui traversent les mêmes joies, craintes et questionnements. Merci à Apolline, Fanny, Karen, Cédric, Olivier, Nelly J. et Céline, pour leur soutien et les échanges qui remontent le moral. Je remercie particulièrement Pascal S. pour m'avoir fait confiance et permis de participer à certaines de ses expérimentations. Bonne chance à tous pour la suite !!... J'en profite également pour donner tout mon soutien et souhaiter bonne chance aux « nouveaux » arrivants. Je pense notamment à Stéphane, alias « Noupi » ou « Monsieur Cinéma », ta connaissance dans de nombreux domaines est impressionnante. Je pense aussi à Julio, Adrien, et Maël, dont la rigueur, le sérieux et la motivation font plaisir à voir. Bonne chance également à Faustine pour son DESU.

Et puis il y a les doctorants et anciens-doctorants (du LIEBE ou d'ailleurs) qui ont une place particulière… et que je préfère appeler « ami(e)s ». Cécile, merci pour ta joie de vivre et ton soutien depuis maintenant 8 ans !! Mimie, merci pour tes phrases du jour qui savent tant détendre l'atmosphère. Audrey, merci pour nos nombreuses discussions en tous genres, et ton grain de folie qui va très certainement beaucoup me manquer. Un grand merci à Aurélie pour tout le soutien que tu m'as apporté pendant tes années au laboratoire et depuis Reims, mais aussi pour tous les moments partagés depuis 5 ans (… surtout les déménagements !!). Merci également à Hugues pour ton soutien, nos discussions, tes petites visites matinales en R1, et toutes ces soirées qui vont énormément me manquer et qui ont fait, je pense, qu'une belle amitié est née. A vous tous un grand MERCI !!

Je tiens à remercier mes ami(e)s extérieurs au monde scientifique, qui ont permis à mon esprit de s'évader des sentiers du laboratoire. Merci à Béné et Micka, Letitia, Pierrick, Jeremy et Vincent pour les soirées de franches rigolades, qu'il va falloir d'ailleurs renouveler plus souvent. Merci également à Nanou, Céline, Zofi, Rélie, Christou et Nico, Sylvie et Fabien de m'avoir si bien intégrer à leur bande et de m'avoir soutenu pendant ma thèse.

Un merci tout particulier à toi Aurore… Wouah... t'as vu le chemin qu'on a parcouru ?! Qui l'eût cru ? On a enfin la réponse aux questions que l'on se posait il y a de ça maintenant 10 ans: toi diplômée du M.A.I., moi diplôme d'un doctorat. Merci pour tout le soutien que tu m'apportes, pour ton écoute, pour ta compréhension lorsque je n'étais plus autant disponible… Merci pour tout… and Rock 'n' Roll !!! Un grand merci aussi à Nath… A quand de nouvelles nuits d'été à refaire le monde avec chaises longues, vin blanc et fondant au chocolat ?

Mes derniers remerciements et non des moindres vont à ma famille. Merci à vous Papa et Maman. Vous dites souvent que, comme vous n'avez pas pu faire d'études, il était difficile pour vous de nous aider dans les nôtres. La preuve contraire en est aujourd'hui, maintenant que nous avons tous les trois terminé nos études: la réussite ne réside pas dans l'aide apportée à un exo de math ou autres, mais découle également du soutien que l'on a. Votre soutien est incommensurable et un merci ne suffirait pas à vous remercier. D'ailleurs aucun mot ne suffirait… alors je dirais tout simplement: MERCI !!

Merci à ma sœur, Nathalie, mon frère Franck, mes beaux-frères Didier et Laurent, mes bouts de choux Nolan et Elwenn pour leur soutien, leur amour, leur écoute, leur présence, leur… tout… MERCI !!

Je remercie également mes grands-parents qui m'ont toujours soutenu, ici ou d'où ils sont maintenant.

Merci également à Virginie, Grég, Mattéo et Célia.

Je terminerai par te remercier toi, Julian (bien que les mots soient encore plus durs à trouver). Merci pour la confiance que tu m'accordes, pour ton soutien de tous les jours. Merci d'avoir supporté mes changements d'humeur, de réconforter mes angoisses, de partager mes joies... Merci de m'avoir donné la force pendant ma thèse. Merci d'être là…

Table des matières

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 9

1. LES BIOMARQUEURS 11
1.1. Qu'est-ce qu'un biomarqueur ? 11
1.2. Biomarqueurs d'exposition et biomarqueurs d'effet 11
1.3. Intérêt des biomarqueurs 14
1.4. Biomarqueurs et facteurs confondants 15

2. STRESS OXYDANT, DEFENSES ANTITOXIQUES ET DOMMAGE MEMBRANAIRE 18
2.1. Les principales espèces réactives de l'oxygène 18
2.1.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) 18
2.1.2. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 19
2.1.3. Le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) 19

2.2. Les systèmes de défenses antioxydants 20
2.2.1. Les antioxydants enzymatiques 20
- Les superoxydes dismutases 21
- La catalase 21
- Les glutathion peroxydases 21
- La glutathion réductase 21

2.2.2. Les antioxydants non-enzymatiques 22

2.3. Le glutathion: synthèse, rôle et maintien 22
2.3.1. Biosynthèse du glutathion 22
2.3.2. Rôle antioxydant 23
2.3.3. Recyclage et maintien de la concentration en glutathion réduit 24

2.4. Les métallothionéines 26
2.5. Les caroténoïdes 27
2.6. Dommage membranaire: la lipoperoxydation 30

3. RESERVES ENERGETIQUES 32
3.1. Les lipides 32
3.2. Le glycogène 33
3.3. Les protéines 33

4. MODELE D'ETUDE: LE GAMMARE 34
4.1. Traits physiologiques et biologiques relatifs aux amphipodes 34
4.1.1. Morphologie 34
4.1.2. Traits biologiques 35
- Mode de respiration 35
- Mode de reproduction 36
- Croissance 36

4.2. Intérêt et utilisation du gammare en écotoxicologie 37

4.3. *Gammarus roeseli* 39
4.3.1. Origine 39
4.3.2. Identification 40
4.3.3. G. roeseli comme modèle d'étude 42

5. LE PARASITISME 43
5.1. Les acanthocéphales 43
5.1.1. Morphologie et nutrition 43
5.1.2. Reproduction 44
5.1.3. Influence des parasites acanthocéphales sur le gammare 45
5.1.4. Acanthocéphales et contaminations environnementales 48
5.1.5. Polymorphus minutus 49
- Cycle de vie 51
- Effets de la présence de *P. minutus* chez *G. roeseli* 51

5.2. Les microsporidies 53
5.2.1. Structure cellulaire et cycle de développement 53
- Le méronte 53
- La spore 54

5.2.2. La germination: processus d'infection 55
5.2.3. Mode de transmission 55
- La transmission horizontale 56
- La transmission verticale 56
- Effets des microsporidies à transmission verticale chez *Gammarus* sp. 57

5.2.4. Le genre Dictyocoela sp. 60

6. LE CADMIUM 61
6.1. Généralités 61
6.2. Toxicité du cadmium 62

CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES 67

1. SITES D'ETUDE 69
1.1. Caractéristiques et intérêt de la Nied française 69
1.2. Qualité écologique 70

2. MATERIEL BIOLOGIQUE 70
2.1. Technique de prélèvement 70
2.2. Tri des organismes 71

3. METHODES DE PREPARATION ET D'ANALYSES DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES 72
3.1. Préparation des homogénats 72

3.2. Mesure des réserves énergétiques chez *G. roeseli* 73
3.2.1. Dosages des lipides totaux et du glycogène 73
- Lipides totaux 73
- Glycogène 73

3.2.2. Dosage des protéines 74

3.3. Mesure des capacités de défenses antitoxiques de *G. roeseli* 74
3.3.1. Dosage des concentrations en glutathion réduit (GSH) 76
3.3.2. Dosage de l'activité γ-glutamylcystéine ligase (GCL) 76
3.3.3. Dosage des concentrations en métallothionéines (MT) 77
3.3.4. Dosages des caroténoïdes 78

3.4. Dosage de la concentration en malondialdéhyde (MDA) 78

3.5. Dosages des concentrations en lipides totaux, caroténoïdes et MDA chez *P. minutus* 79

4. ETUDE DE VARIATIONS MENSUELLES DES MARQUEURS ENERGETIQUES ET DE CAPACITES DE DEFENSE CHEZ *G. ROESELI* 79

5. INFLUENCE DU PARASITISME ET DE L'INTERACTION PARASITE/CONTAMINANT SUR LES BIOMARQUEURS DE *G. ROESELI* 80
5.1. Influence de l'acanthocéphale *P. minutus* sur son hôte intermédiaire *G. roeseli* 80
5.1.1. Effets de P. minutus sur G. roeseli en conditions physiologiques 81
5.1.2. Influence de P. minutus sur la réponse de G. roeseli après exposition au cadmium 81
- Détermination de la CL_{50} 82
- Bioaccumulation du cadmium 82
- Effet de l'interaction *P. minutus*/cadmium sur *G. roeseli* 84

5.2. Influence des microsporidies à transmission verticale sur *G. roeseli* 84
5.2.1. Mise en évidence de la présence de microsporidies 84
- Dissection des gonades 84
- Extraction d'ADN 86
- PCR-RFLP 86

5.2.2. Prévalence saisonnière 90
5.2.3. Influence des microsporidies à transmission verticale en conditions physiologiques 91
5.2.4. Influence des microsporidies à transmission verticale lors d'une exposition au cadmium 91

5.3. Influence de la co-infection *P. minutus*/microsporidies à transmission verticale chez *G. roeseli* lors d'un stress au cadmium 92

6. ANALYSES STATISTIQUES 95

CHAPITRE III: RESULTATS DES TRAVAUX 97

PARTIE I: ETUDE DE L'INFLUENCE DU SEXE ET DE LA SAISON SUR DES BIOMARQUEURS DE *G. ROESELI* 101

Publication 1: Influence of gender and season on reduced glutathione and energy reserves of *Gammarus roeseli* 101

PARTIE II: ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE LA PRESENCE DE PARASITE SUR DES BIOMARQUEURS DE *G. ROESELI* ~ L'ACANTHOCEPHALE *POLYMORPHUS MINUTUS* 121

Publication 2: Does the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* modify the energy reserves and antitoxic defences of its intermediate host *Gammarus roeseli*? 121

Publication 3: Acanthocephalan parasites: help or burden in Gammarid amphipods exposed to cadmium? 141

Publication 4: *Polymorphus minutus* affects antitoxic responses of *Gammarus roeseli* exposed to cadmium 155

PARTIE II (suite): ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA PRESENCE DE PARASITE SUR DES BIOMARQUEURS DE *G. ROESELI* ~ LES MICROSPORIDIES A TRANSMISSION VERTICALE 175

Publication 5: Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a Gammarid 175

PARTIE III: ÉTUDE DE L'INFLUENCE D'UNE CO-INFECTION PARASITIAIRE SUR DES BIOMARQUEURS DE *G. ROESELI* 199

Publication 6: Effect of parasitic multiple-infection on the tolerance of pollutant contamination, in freshwater amphipod 199

CHAPITRE IV: DISCUSSION GENERALE 223

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 237

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 243

ANNEXES 275

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ARNm : Acide RiboNucléique messager
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
BCF : Facteur de bioconcentration
CAT : Catalase
CL_{50} : concentration léthale 50
CTAB: Cétyl triméthylammonium bromide
DCE : Directive Cadre Européenne
DO : Densité optique
DTT : Dithiothréitol
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
GC (ou γ-GC) : γ-glutamylcystéine
GCL (ou γ-GCL) : γ-glutamylcystéine ligase
GRd : Glutathion Réductase
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
GST : Glutathion-S-Transférases
GS-X : Glutathion-S-conjugué
4-HNE : 4-hydroxynonénal
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance
HSP: Protéine de choc thermique
IBD : Indice Biologique Diatomées
IBGN : Indice Biologique Global Normalisé
IBR : *Integrated Biomarker Response*
IndSeGPx : Glutathion Peroxydase Sélénium-Indépendante
mBBr : Monobromobimane
MDA : Malondialdéhyde
MT : Métallothionéines
MTLP : Protéine métallothionéine-like
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OPA : *ortho*-phthalaldéhyde
PCB : Polychlorobiphényles
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*
ROS : Espèces réactives de l'Oxygène
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SeGPx : Glutathion Peroxydase Sélénium-dépendante
SOD : Superoxyde Dismutase

Liste des figures et tableaux

INTRODUCTION

Figure A: Effets de contaminations environnementales et de parasites sur différents paramètres biologiques d'un organisme hôte (d'après Sures, 2008). **(p. 5)**

CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Figures

Figure I-1: Relation entre pertinence écologique et temps de réponses de différents biomarqueurs (d'après Adams, 1990; Van der Oost et al., 2003) **(p. 15)**

Figure I-2: Schéma de formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la chaîne respiratoire (adapté de Chabot et al., 1998 et Nordberg et Arnér, 2001) **(p. 18)**

Figure I-3: Schéma des systèmes enzymatique et non-enzymatique de détoxication des ROS **(p.20)**

Figure I-4: Structure moléculaire du glutathion réduit (GSH) **(p. 23)**

Figure I-5: Structure moléculaire du glutathion oxydé (GSSG) **(p. 23)**

Figure I-6: Réaction enzymatique de synthèse du glutathion réduit **(p. 23)**

Figure I-7: Réaction enzymatique catalysée par la γ-glutamylcystéine ligase **(p. 25)**

Figure I-8: Séquence d'acides aminés de métallothionéine de foie de lapin (Stillman, 1995) **(p. 26)**

Figure I-9: Exemple de structure de 4 caroténoïdes: (1) β-carotène, (2) zéaxanthine, (3) canthaxanthine, (4) astaxanthine **(p. 27)**

Figure I-10: Biosynthèse de l'astaxanthine à partir de β-carotène chez *G. pulex* et *G. roeseli* (Gaillard et al., 2004) **(p. 29)**

Figure I-11: Mécanisme de peroxydation des lipides (d'après de Zwart et al., 1999 et Noci-Charissou, 2002) **(p. 31)**

Figure I-12: Structure chimique du malondialdéhyde **(p. 31)**

Figure I-13: Morphologie d'un gammare. Exemple de *Gammarus roeseli* femelle **(p. 34)**

Figure I-14: Schéma d'une branchie de gammare (adapté de Milne et Ellis, 1973) **(p. 35)**

Figure I-15: Colonisation des cours d'eau d'Europe de l'Est par *Gammarus roeseli* originaire des Balkans (d'après Jażdżewski et Roux, 1988) **(p. 40)**

Figure I-16: Carène dorsale de *G. roeseli* composée de 3 spicules **(p. 41)**

Figure I-17: Dimorphisme sexuel entre *G. roeseli* femelle (A) et mâle (B) **(p. 41)**

Figure I-18: Présence de papilles génitales (flèches blanches) au niveau du segment VII (VII) chez *G. roeseli* mâle **(p. 41)**

Figure I-19: Morphologie d'un acanthocéphale adulte. Exemple de l'acanthocéphale *Polymorphus minutus* femelle adulte **(p. 44)**

Figure I-20: Cycle de vie de *Polymorphus minutus* **(p. 52)**

Figure I-21: Les différents stades de développement d'une microsporidies (d'après Beznoussenko et al., 2007) **(p. 54)**

Figure I-22 : Extrusion du filament polaire durant la germination d'une spore de microsporidie (d'après Keeling et Fast, 2002) **(p. 55)**

Figure I-23: Exemple d'invasion des ovocytes de *Gammarus duebeni*, hôte de *Nosema granulosis*, microsporidie ayant une transmission verticale (d'après Dunn et al., 2001) **(p. 57)**

Tableaux

Tableaux I-1: Exemple de biomarqueurs utilisés dans des études de terrain et de laboratoire, indicateurs d'expositions ou d'effets de divers polluants, ainsi que leurs réponses (d'après Vasseur et Cossu-Leguille, 2003; Allan et al., 2006) **(p. 12)**

Tableau I-2: Études ayant rapporté divers influences d'un parasite acanthocéphale sur son hôte intermédiaire amphipode **(p. 46-47)**

Tableau I-3: Études ayant rapporté une bioaccumulation de métal par des parasites acanthocéphales en comparaison à leurs hôtes définitifs **(p. 50)**

Tableau I-4: Études de l'interaction entre des parasites microsporidies à transmission verticale et leur hôte *Gammarus* sp. **(p. 58-59)**

Tableau I-5: Espèces du genre *Dictyocoela* sp. identifiées chez différents amphipodes (d'après Wilkinson et al., 2011) **(p. 61)**

Tableau I-6: Études ayant rapporté des effets du cadmium sur des amphipodes **(p.64-65)**

CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES

Figures

Figure II-1: Carte de la Nied localisant les sites de prélèvements (carré rouge), les stations de suivi de la qualité de l'eau (losange violet) et le laboratoire LIEBE (rond vert) **(p. 69)**

Figure II-2: Matériels utilisés pour l'échantillonnage de *G. roeseli*: tamis de 500 µm de vide maille (gauche) et pièges artificiels (droite) **(p. 70)**

Figure II-3: Répartition de l'homogénat total en vue du dosage des différents biomarqueurs **(p. 72)**

Figure II-4: Schéma de fonctionnement d'un système de HPLC **(p. 75)**

Figure II-5: Réaction enzymatique de synthèse de la L-glutamylcystéine par la γ-glutamylcystéine ligase à partir de ses 3 substrats : L-cystéine, L-glutamyl et ATP **(p. 76)**

Figure II-6: Dispositif expérimental utilisé pour la détermination de la CL_{50} de *G. roeseli* non parasités et parasités par *P. minutus* après 96h d'exposition au cadmium. N: nombre d'individus exposés **(p. 83)**

Figure II-7: Étapes de dissection des gonades de *G. roeseli* femelles. **(p. 85)**

Figure II-8: Étapes d'extraction d'ADN des tissus gonadiques **(p. 87)**

Figure II-9: Schéma explicatif de la technique de RFLP. **(p. 89)**

Figure II-10: Dispositif expérimental utilisé pour l'étude de l'impact de microsporidies à transmission vertical sur les biomarqueurs de *G. roeseli*. N: nombre d'organismes exposés **(p. 92)**

Figure II-11: Dispositif expérimental utilisé pour l'évaluation de l'effet de la co-infection *P. minutus*/microsporidies sur les biomarqueurs de *G. roeseli.* N: nombre d'organismes exposés **(p. 94)**

Tableaux

Tableau II-1: Conditions expérimentales des analyses par HPLC **(p. 75)**

Tableau II-2: Détermination de l'espèce de microsporidies en fonction de l'enzyme de restriction utilisée et du profil de restriction obtenu **(p. 89)**

CHAPITRE III: RESULTATS DES TRAVAUX

PUBLICATION 1

Tableaux

Table 1: Physico-chemical parameters of the Nied River at Laquenexy measured at each sampling date. Means and standard deviations are presented at the end of the table. **(p. 109)**

Table 2: Multivariate (Pillai's trace) and univariate analyses of variance investigating variation of energy reserves (protein, lipid, glycogen), defences capacities (GSH, GCL) and biomarker of toxicity (MDA) of *Gammarus roeseli*, as function of gender and sampling month. **(p. 110)**

Table 3: Monthly variations of energy reserves (lipid, glycogen) of *G. roeseli* males and females. Majuscule and minuscule letters indicate significant differences in males and females, respectively. Asterisk highlighted differences between males and females for each month. Minimum and maximum of each parameter for each gender were indicated in bold type. **(p. 113)**

Figures

Figure 1: Seasonal variations of GSH concentrations in *G. roeseli* males and females, and the temperature. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, *p*-values < 0.05). **(p. 111)**

Figure 2: Seasonal variations of GCL activities in *G. roeseli* males and females, and the temperature. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, *p*-values < 0.05). **(p. 112)**

Figure 3: Seasonal variations of MDA levels in *G. roeseli* males and females, and the temperature. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, *p*-values < 0.05). **(p. 112)**

PUBLICATION 2

Tableaux

Table 1: Multivariate analyses of variance (Pillai's trace) investigating variation of energy reserves (protein, lipid, glycogen) and defences capacities (GSH, GCL) of *Gammarus roeseli*, as function of infection by acanthocephalan parasites, month sampling and individual gender. **(p. 129)**

Table 2: Univariate analyses of variance (ANOVA) investigating variations in energy reserves (protein, lipid, and glycogen), defence capacity (GSH, GCL) and biomarkers for toxicity (MDA) of *Gammarus roeseli*, according to the sampling month, gender and infection by *P. minutus*. **(p. 130)**

Table 3: MDA levels (ng MDA/mg lipids) depending on sampling period, *Gammarus roeseli* gender and infection status. *P*-values highlighted significant differences depending on the infection status and asterisk underlined seasonal variation. nd: not determined. **(p. 133)**

Figures

Figure 1: Protein concentration (mg/mL) (A), total lipid (mg/mL) (B) and glycogen contents (µg/mg tissue) (C) depending on sampling period, *Gammarus roeseli* gender and infection status. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, *p*-values <0.05). White bars are uninfected *G. roeseli* and black bars are infected *G. roeseli*. **(p. 132)**

Figure 2: GSH concentration (nmol GSH/mg protein) (A) and GCL activity (nmol GC/min/mg protein) (B) depending on sampling month, *Gammarus roeseli* gender and infection status. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, *p*-values <0.05). White bars are uninfected *G. roeseli* and black bars are infected *G. roeseli*. **(p. 132)**

PUBLICATION 3

Tableaux

Table 1: LC_{50} values (± 95% confidence interval) of *Gammarus roeseli* according to gender and the presence/absence of *Polymorphus minutus*, after 96hrs of cadmium exposure (n = 30 for each condition). **(p. 147)**

Figures

Figure 1: Concentrations of cadmium measured in *G. roeseli* exposed at 6 and 18 µg $Cd.L^{-1}$ according to the gender and the infected status. Five individuals were analyzed for each condition. Different letters above the bars indicate significantly different values (*p*-values < 0.05). **(p. 148)**

Figure 2: Concentrations of cadmium determined in *P. minutus* from *G. roeseli* males and females exposed at 6 and 18 µg $Cd.L^{-1}$. Five pools of 5 cystacanths were analyzed for each condition. Different letters above the bars indicate significantly different values (*p*-values < 0.05). **(p. 148)**

Figure 3: Relationship between cadmium concentrations in *P. minutus* body tissues and *G. roeseli* females (○) and males (●) body tissues after 96 hrs of exposure. Asterisks indicate *p*-value < 0.015. **(p. 149)**

Figure 4: Bioconcentration factors (BCFs) of *G. roeseli* according to the gender, the infection status and the cadmium exposure. Five individuals were analyzed for each condition. Different letters above the bars indicate significantly different values (*p*-values < 0.05). **(p. 149)**

PUBLICATION 4

Figures

Figure 1: Influence of the presence of *Polymorphus minutus* on malondialdehyde levels of *G. roeseli* females exposed at 2 and 8 µg Cd/L for 96hrs. Errors bars represent mean ± SE. Different letters above the bars indicate significantly different values (Tukey's HSD test, *p*-values < 0.05). **(p. 166)**

Figure 2: Influence of the presence of *Polymorphus minutus* on GSH concentrations (A), GCL activity (B), MT concentrations (C) and carotenoid levels of *G. roeseli* females exposed at 2 and 8 µg Cd/L for 96hrs. Errors bars represent mean ± SE. Different letters above the bars indicate significantly different values (Tukey's HSD test, *p*-values < 0.05). **(p. 167)**

Figure 3: Influence of the presence of *Polymorphus minutus* on the total lipid (A) and glycogen (B) contents of *Gammarus roeseli* females exposed at 2 and 8 µg Cd/L for 96hrs. Errors bars represent mean ± SE. Different letters above the bars indicate significantly different values (Tukey's HSD test, *p*-values < 0.05). **(p. 168)**

Figure 4: Lipid contents (A), carotenoid (B) and MDA (C) levels in *P. minutus* dissected from *G. roeseli* exposed at 2 and 8 µg Cd/L for 96hrs. Errors bars represent mean ± SE. Different letters above the bars indicate significantly different values (Tukey's HSD test, *p*-values < 0.05). **(p. 169)**

Tableaux

Table 1: Multivariate analyses of variance (Pillai's trace) investigating variations in energy reserves (lipid, glycogen) and defence capacity (GSH, GCL, MT, Carotenoid, MDA) of *Gammarus roeseli*, as a function of infection by acanthocephalan parasites and cadmium exposure. **(p. 165)**

Table 2: Univariate analyses of variance (ANOVA) investigating variations in energy reserves (lipid, and glycogen), in defence capacity (GSH, GCL, MT, carotenoid) and the variation of a toxicity biomarker (MDA), in *Gammarus roeseli*, according to infection by *P. minutus* and cadmium exposure. The significant differences are indicated in bold. **(p. 165)**

Table 3: Univariate analyses of variance (ANOVA) investigating variations in lipid contents, carotenoid concentrations and MDA levels in *P. minutus* according to cadmium exposure. **(p. 168)**

PUBLICATION 5

Tableaux

Table 1: Table of microsporidia prevalence according to the season and to *G. roeseli* gender **(p. 185)**

Table 2: Multivariate (Pillai's trace) and univariate analyses of variance investigating variations in biomarkers for toxicity (MDA), defence capacity (GSH, GCL) and energy reserves (protein, lipid, glycogen) of *Gammarus roeseli*, according to the infection by microsporidian parasites, and cadmium contamination. **(p. 186)**

Table 3: Univariate analysis of variance investigating variations in MT concentration in *Gammarus roeseli*, according to the infection by microsporidian parasites, and cadmium contamination. **(p. 188)**

Figures

Figure 1: Influence of the presence of microsporidia parasite on the malondialdehyde level (ng MDA/mg lipids) of *G. roeseli* females exposed to $CdCl_2$ during 96h. U: uninfected, *Dr*: *Dictyocoela roeselum*-infected females, *Dm*: *Dictyocoela muelleri*-infected females, C_1: 2 µg $Cd.L^{-1}$, C_2: 8 µg $Cd.L^{-1}$. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, *p*-values <0.05). **(p. 187)**

Figure 2: Influence of the presence of microsporidia parasite on reduced glutathione concentration (nmol GSH/mg proteins) (a), γ-glutamylcysteine ligase activity (nmol GC/min/mg proteins) (b) and metallothionein concentration (nmol MT/mg proteins) (c) of *Gammarus roeseli* females exposed to $CdCl_2$ during 96h. U: uninfected, *Dr*: *Dictyocoela roeselum*-infected females, *Dm*: *Dictyocoela muelleri*-infected females, C_1: 2 µg $Cd.L^{-1}$, C_2: 8 µg $Cd.L^{-1}$. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, *p*-values < 0.05). **(p. 188)**

Figure 3: Influence of the presence of microsporidia parasite on the protein concentration (mg/mL) (a), total lipid (mg/mL) (b) and glycogen (µg/mg tissue) (c) contents of *Gammarus roeseli* females exposed to $CdCl_2$ during 96h. U: uninfected, *Dr*: *Dictyocoela roeselum*-infected females, *Dm*: *Dictyocoela muelleri*-infected females, C_1: 2 µg $Cd.L^{-1}$, C_2: 8 µg $Cd.L^{-1}$. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, *p*-values < 0.05) **(p. 189)**

PUBLICATION 6

Tableaux

Table 1. MANOVA and ANOVAs for the effects of parasite and cadmium on biomarkers **(p. 206)**

Table 2. ANOVA for the effects of host infection status and cadmium on the *P. minutus* malondialdehyde level **(p. 209)**

Figures

Figure 1. Influence of the presence of *P. minutus* and/or *D. roeselum* on energy and defences biomarkers of *Gammarus roeseli* females exposed at 2 and 8 µg Cd/L for 96hrs. Pm: *P. minutus*-infected females, Dr: *D. roeselum*-infected females, Pm/Dr: co-infected females. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, p-values < 0.05). Lipids content: mg/mL; glycogen content: µg/mg tissue; GSH concentration: nmol GSH/mg protein; GCL activity: nmol GC/min/mg protein; MT: nmol MT/mg protein; carotenoïds: ng carotenoid/mg lipids; MDA: ng MDA/mg lipids. **(p. 207)**

Figure 2. *Integrated Biomarker Responses* measured in *G. roeseli* exposed at 2 and 8 µg Cd/L for 96hrs. Pm: *P. minutus*-infected females, Dr: *D. roeselum*-infected females, Pm/Dr: co-infected females. IBR includes the defence capacities (GSH, GCL, MT, carotenoids) and the MDA responses. **(p. 208)**

Figure 3. Malondialdehyde levels (ng MDA/mg lipids) measured in the acanthocephalan parasite *P. minutus* dissected from *P. minutus*-infected *G. roeseli* females (Pm) and *G. roeseli* females infected by *P. minutus* and *D. roeselum* (Pm/Dr) exposed at 2 and 8 µg Cd/L. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, *p*-values < 0.05) **(p. 209)**

CHAPITRE IV: DISCUSSION GENERALE

Tableaux

Tableau IV-1: Récapitulatif des réponses des biomarqueurs énergétiques, de défenses ou de toxicité après une exposition 96h à deux concentrations de cadmium chez *G. roeseli* femelles non-parasitées, ou parasitées par l'un des trois parasites: *Polymorphus minutus*, *Dictyocoela roeselum* ou *D. muelleri*. **(p.231)**

Figures

Figure IV-1: «*Integrated Biomarker Response*» (IBR) calculé pour chaque condition parasitaire et d'exposition au cadmium. **(p. 233)**

Liste des publications et communications

➲ Publications internationales présentées dans le manuscrit

Gismondi Eric, Beisel Jean-Nicolas, Cossu-Leguille Carole. Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. (S*oumis à Ecotoxicology*)

Gismondi Eric, Cossu-Leguille Carole, Beisel Jean-Nicolas. Does the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* modify the energy reserves and antitoxic defences of its intermediate host *Gammarus roeseli*? *Parasitology*, 12, 1-8.

Gismondi Eric, Cossu-Leguille Carole, Beisel Jean-Nicolas. Acanthocephalan parasites: help or burden in Gammarid amphipods exposed to cadmium? *Ecotoxicology*. 21, 1188-1193.

Gismondi Eric, Beisel Jean-Nicolas, Cossu-Leguille Carole. *Polymorphus minutus* affects antitoxic responses of *Gammarus roeseli* exposed to cadmium. (*Soumis à PLoS One*)

Gismondi Eric, Rigaud Thierry, Beisel Jean-Nicolas, Cossu-Leguille Carole (2012). Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a Gammarid. *Environmental Pollution*, 160, 17-23.

Gismondi Eric, Rigaud Thierry, Beisel Jean-Nicolas, Cossu-Leguille Carole. Effect of parasitic multiple-infection on the tolerance of pollutant contamination, in freshwater amphipod. (*Soumis à PLoS Biology*)

➲ Collaborations – publications internationales

Sornom Pascal, **Gismondi Eric**, Vellinger Céline, Devin Simon, Férard Jean-François, Beisel Jean-Nicolas. Effects of sublethal cadmium exposure on behavioural and antitoxic responses of the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus* exposed to a high perceived risk of predation. (*Soumis à PLoS One*)

Sornom Pascal, **Gismondi Eric**, Beisel Jean-Nicolas. Behavioural and antitoxic responses of *Gammarus roeseli* exposed to multi-stresses. (*En preparation*)

➲ Communications orales

Gismondi Eric, Beisel Jean-Nicolas, Rigaud Thierry, Cossu-Leguille Carole (2011). Microsporidia parasites in Gammarid: a confounding factor in the evaluation of cadmium toxicity. 21st Annual meeting of SETAC Europe. Ecosystem protection in a sustainable world: a Challenge for science and regulation. Milan, Italie, 15-19/05/2011.

Gismondi Eric, Beisel Jean-Nicolas, Cossu-Leguille Carole (2010). Interaction *Polymorphus minutus* - *Gammarus roeseli*: quels effets sur les réserves énergétiques et les capacités de défense de l'hôte ? Journées scientifiques ZAM 2010: séminaire annuel de la Zone Atelier Moselle. Vittel, France, 10-11/05/2010.

Gismondi Eric, Beisel Jean-Nicolas, Cossu-Leguille Carole (2010). Impact du parasite acanthocéphale *Polymorphus minutus* sur les réserves énergétiques et les capacités de défense de *Gammarus roeseli*. Colloque de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée. INRA de Versailles-Grignon, France, 31/03-01/04/2010.

Gismondi Eric, Beisel Jean-Nicolas, Cossu-Leguille Carole (2009). Effect of the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* on its intermediate host, *Gammarus roeseli*. ISTA14. 14th International symposium on toxicity assessment. Metz, France, 30/08-04/09/2009.

Gismondi Eric, Sroda Sophie, Beisel Jean-Nicolas, Cossu-Leguille Carole (2009). L'espèce, la saison et la présence de parasites influencent-elles les capacités de défenses antitoxiques des Gammares ? 9ème Journées Internationales de Limnologie. Luxembourg, Luxembourg, 06-09/04/2009.

- **Collaborations – communication orale**

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.* Palerme, Italie, 27-29/09/2011.

- **Communications affichées**

Gismondi Eric, Beisel Jean-Nicolas, Cossu-Leguille Carole (2010). Energy reserves and antitoxic defence depletion induced by the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus*, in its intermediate host, *Gammarus roeseli*. 20th Annual meeting of SETAC Europe. Science and technology for environmental protection. Séville, Espagne, 23-27/05/2010.

Gismondi Eric, Sroda Sophie, Cossu-Leguille Carole (2009). Etude du glutathion chez deux espèces de gammaridés: *Gammarus roeseli* et *Dikerogammarus villosus*. Séminaire de l'Ecole doctorale RP2E. Nancy, UHP, France, 15/01/2009.

Gismondi Eric, Sroda Sophie, Cossu-Leguille Carole (2008). Variations saisonnières du glutathion chez *Gammarus roeseli* et *Dikerogammarus villosus*, CILO. 7ème Congrès international de limnologie-océanographie. Rouen, France, 14-16/10/2008.

INTRODUCTION

Les activités humaines, qu'elles soient industrielles, agricoles ou domestiques, ont depuis plusieurs décennies anthropisé tous les milieux environnementaux, et notamment les milieux aquatiques, qui se trouvent être les réceptacles de nombreuses substances polluantes. La prise de conscience des conséquences de ces xénobiotiques sur les écosystèmes a conduit les autorités à évaluer la qualité de ces milieux afin de réglementer la gestion des substances susceptibles d'y être introduites. C'est dans ce contexte qu'est apparue en Europe, la Directive Cadre de l'Eau (DCE – 2000/60/CE) qui vise à atteindre un « bon état » écologique et chimique des eaux de surfaces d'ici 2015.

Actuellement, l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques s'effectue à l'aide d'indicateurs biologiques basés sur la présence et l'abondance d'organismes animaux et végétaux (Rosenberg et Resh, 1993). Cependant, bien que ces bioindicateurs soient très importants dans l'évaluation globale de l'écosystème, ils n'apportent que très peu de réponses sur la nature de la perturbation qui peut être de 3 types: physique (*e.g.* changement de l'habitat), biologique (*e.g.* compétition) ou encore chimique (*e.g.* mélange de polluants métallique ou organique). De manière générale, les organismes ne sont pas soumis à un seul de ces trois stress, mais plutôt à une combinaison de plusieurs stress appelées « stress multiples ».

L'écotoxicologie est la discipline qui permet d'appréhender les effets d'agents polluants artificiels ou naturels sur les organismes vivants. Elle utilise notamment la mesure de réponses biologiques des organismes, appelées biomarqueurs, qui se trouvent être des outils complémentaires à l'évaluation écologique de la qualité des milieux (Peakall, 1994). Parmi les biomarqueurs les plus utilisés en écotoxicologie, on trouve des nombreux composés antitoxiques qui répondent à divers contaminations environnementales (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003; Allan *et al.*, 2006), comme par exemple des molécules antitoxiques (*e.g.* métallothionéines, glutathion,…), mais aussi des enzymes antioxydantes (e.g. catalase, glutathation peroxydases, catalase, superoxyde dismutase,…).

Si de par leurs réponses, ces outils permettent d'appréhender l'impact de milieux anthropisés sur les organismes, l'un des problèmes majeurs de leur utilisation réside dans le fait que leurs réponses ne sont pas uniquement induites par la présence de polluants. Indépendamment de toutes perturbations, les biomarqueurs peuvent varier en fonction de facteurs propres à l'individu sur lequel ils sont mesurés, appelés facteurs biotiques (*e.g.* âge, sexe, stade de reproduction…) (Sroda et Cossu-Leguille, 2011; Xuereb, 2009) ou en fonction

de facteurs environnementaux naturels, appelés facteurs abiotiques (*e.g.* température, oxygénation,…) (Serafim *et al.*, 2002; Geffard *et al.*, 2005; 2007).

Depuis quelques années, un intérêt croissant est porté sur le parasitisme comme facteur confondant pouvant induire des modifications de l'hôte. De nombreuses études ont déjà démontré l'influence de parasites sur le comportement et l'aptitude phénotypique (*fitness*) de son hôte. Ces modifications sont souvent des sous-produits de l'infection qui peuvent avoir une dimension adaptative pour le parasite dans la mesure où elles favorisent le bon déroulement de son cycle. Par exemple, le trématode *Diplostomum spathaceum*, qui se trouve logé dans l'œil de son hôte intermédiaire, la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, réduit la vision de l'hôte d'une manière telle qu'il s'expose plus, que les individus non-infectés, à une ingestion par l'hôte définitif, un oiseau d'eau (Seppälä *et al.*, 2004; 2005). De même, l'acanthocéphale *Polymorphus minutus* peut modifier le géotactisme de l'amphipode *Gammarus roeseli*, hôte intermédiaire, ce qui l'amène à rejoindre la surface de l'eau où il devient très vulnérable à l'hôte final du parasite, un oiseau d'eau (Médoc *et al.*, 2006; 2009; Médoc et Beisel, 2009; 2011). Ces macroparasites ne sont toutefois pas les seuls à influencer un caractère de leur hôte, puisqu'il a été démontré que des microparasites impactaient le sex-ratio de leur hôte en augmentant la production de femelles, ce qui a pour conséquence de favoriser leur transmission verticale de la mère aux juvéniles (Terry *et al.*, 1997; 1998; Bouchon *et al.*, 1998; Rigaud *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 2001; 2002; 2003).

Cependant, si un parasite peut altérer le comportement et l'aptitude phénotypique de son hôte, il peut également altérer les réponses biologiques de celui-ci lors d'une exposition à une contamination environnementale, et ainsi devenir un facteur confondant souvent négligé dans les études écotoxicologiques (Sures, 2006; 2007; Marcogliese et Pietrock, 2011). La **figure A** permet de visualiser les effets que peut avoir un polluant ou un parasite sur un organisme hôte.

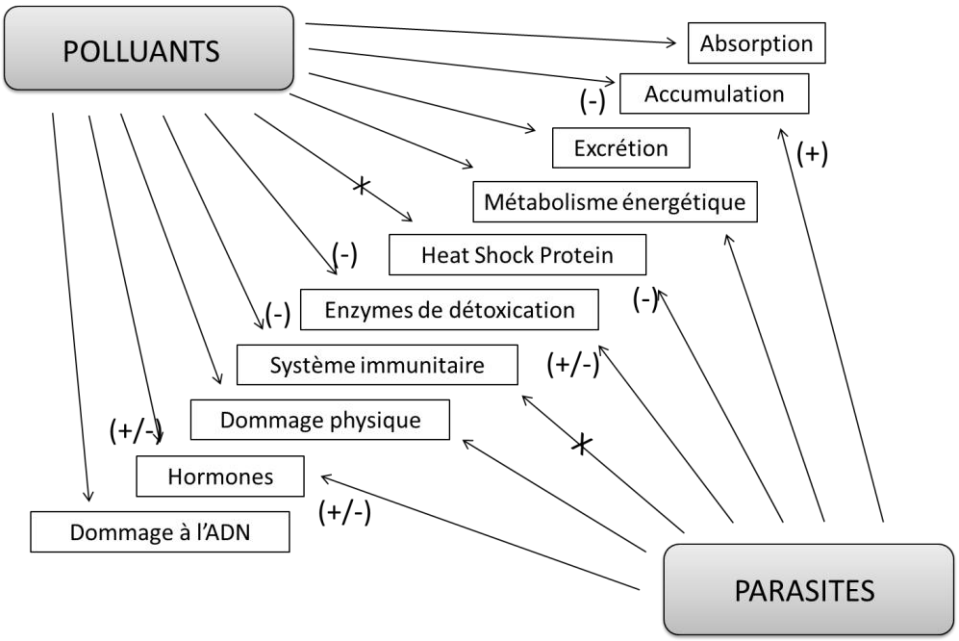


Figure A. Effets de contaminations environnementales et de parasites sur différents paramètres biologiques d'un organisme hôte *(d'après Sures, 2008). (+): augmentation/activation, (-): diminution/inhibition, (x): suppression*

Le métabolisme énergétique est un des nombreux paramètres biologiques pouvant être influencés par un parasite. En effet, il est bien connu maintenant que le parasite puise l'énergie nécessaire à son métabolisme dans les réserves énergétiques de son hôte. Il peut également influencer l'accumulation de contaminants dans les tissus de son hôte, par exemple en la diminuant, comme démontré chez le chabot *Leuciscus cephalus* infecté par l'acanthocéphale *Pomphorhynchus laevis* (Sures et Siddall, 1999) ou encore chez la palourde *Pisidium amnicum* infectée par le trématode *Bunodera luciopercae* (Heinonen, 2000). La présence de parasite impacte également les systèmes de défenses antitoxiques en augmentant ou diminuant leurs concentrations, mais aussi en inhibant ou activant leur synthèse. Par exemple, la concentration en métallothionéines chez les coques *Cerastoderma edule* infectées par le parasite digénien *Labratrema minimus* était diminuée (Baudrimont *et al.*, 2006; 2007), de même que la synthèse des protéines de choc thermique (Hsp70) chez *Gammarus roeseli* infectés par *Polymorphus minutus* (Sures et Radszuweit, 2007). L'altération des défenses antitoxiques due à la présence de parasite pourrait donc avoir de graves conséquences sur la survie des individus. En effet, de nombreuses études ont démontré de plus fortes mortalités de bivalves ou de crustacés parasités et exposés à divers stress environnementaux (McCahon *et al.*, 1988; Wegeberg et Jensen, 1999; Heinonen, 2000; Mouritsen *et al.*, 2005; Coors *et al.*, 2008; Marcogliese et Pietrock, 2011), ce qui pourrait avoir des effets néfastes sur la population et donc sur l'écosystème et son fonctionnement.

Les différents effets que peut avoir un parasite sur son hôte font appel au principe de « phénotype étendu » (*extended phenotype*) défini par Dawkins (1982). Ce principe dit que le phénotype d'un individu peut être le résultat de l'expression de plusieurs génomes en interaction, et non pas uniquement de l'expression du génome de l'individu. Il expliquerait donc que le génome d'un parasite puisse s'exprimer au-delà de son propre phénotype et affecter le phénotype de son hôte, en modifiant par exemple l'apparence et le comportement de façon à ce qui ceci favorise l'achèvement de son cycle de reproduction. Ce principe est notamment vrai pour les interactions durables, où le nombre d'hôte est réduit et où l'association entre les organismes se maintient dans le temps (Combes, 2001).

D'après ces études, il apparait clairement que la présence de parasites influence les réponses des biomarqueurs développés chez des organismes sentinelles utilisés dans l'évaluation de la qualité des milieux. C'est dans ce contexte que s'insère ce travail doctoral. Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de la présence de parasites sur les réponses de biomarqueurs de défenses antitoxiques, mais aussi de biomarqueurs énergétiques chez un crustacé amphipode d'eau douce *Gammarus roeseli*. Pour cela, nous avons choisi d'étudier le glutathion réduit et l'activité de la γ-glutamylcystéine ligase, enzyme limitant la synthèse du glutathion. En effet, bien que ce tripeptide joue un rôle central dans le système antioxydant (*i.e.* piègeur de radicaux libres et substrat d'enzymes antioxydantes), il n'a jamais été étudié chez le gammare. En parallèle, la concentration en métallothionéines et en caroténoïdes, également impliqués dans les systèmes de détoxication de l'organisme, ont été évaluées. Les réserves énergétiques de l'organisme hôte ont été définies par la mesure des teneurs en protéines, lipides totaux et glycogène. Enfin, la concentration en malondialdéhyde a été utilisée comme biomarqueur d'effets toxiques.

Ce travail de thèse a débuté par l'étude des variations annuelles de la concentration en glutathion réduit, sa synthèse et des réserves énergétiques de *G. roeseli*, afin de caractériser l'influence de la saison et du sexe de l'organisme. Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'influence du parasite acanthocéphale, *Polymorphus minutus* et de parasites microsporidies à transmission verticale sur les différents biomarqueurs, en absence de contamination chimique et lors d'une contamination métallique au cadmium. Enfin, l'effet d'une multi-infection parasitaire sur les défenses antitoxiques et les réserves énergétiques de *G. roeseli* soumis ou non à un stress cadmié a été étudié.

Ce document de thèse se structure en quatre chapitres. Le chapitre I est une synthèse bibliographique permettant de définir les notions de biomarqueurs, de stress oxydant, ainsi que d'apporter des informations relatives aux différents biomarqueurs et modèles biologiques utilisés. Le chapitre II présente les matériels et méthodes employés au cours de ce travail doctoral, notamment en termes d'expérimentations en laboratoire et de protocoles d'analyses. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre III, lui-même subdivisé en 3 parties avec: (i) l'étude de l'influence de la saison et du sexe de l'organisme sur les différents biomarqueurs (publication 1), (ii) l'influence d'une mono-infection sur la réponses des biomarqueurs en absence de stress ou lors d'une exposition au cadmium (publications 2, 3, 4 et 5), et (iii) l'influence d'une co-infection lors d'un stress chimique au cadmium (publication 6). Enfin, une discussion générale des principaux résultats obtenus est présentée dans le chapitre IV, suivi d'une conclusion ouvrant sur des perspectives à ces travaux.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les biomarqueurs

1.1. Qu'est-ce qu'un biomarqueur ?

La notion de biomarqueur est apparue dans les années 80 surtout dans le domaine médical, puis s'est peu à peu développée dans les années 90 dans le domaine environnemental (Depledge et Fossi, 1994; Peakall, 1994). Les biomarqueurs ont pour but de fournir un outil complémentaire, à l'échelle individuelle, des indices biotiques tels que l'Indice Biologique Global Normalisé (IBGN) ou l'Indice Biologique Diatomées (IBD) utilisés à l'échelle de la population, pour évaluer la qualité des écosystèmes. Les biomarqueurs sont des variables biologiques permettant à la fois de caractériser l'état physiologique des individus dans un environnement donné et de détecter de façon précoce tout dérèglement pouvant avoir des répercussions à plus long terme sur les écosystèmes (populations et communautés).

Avant toute utilisation de biomarqueurs, il est important d'en énoncer clairement la définition. La première fut établie par le National Research Concil (NRC) en 1987 qui qualifiait un biomarqueur d'« *indicateur signalant des modifications dans des systèmes ou échantillons biologiques faisant suite à une exposition à un composé chimique* ». Bien que cette définition fût principalement destinée à la santé humaine, elle a été un point de départ pour Adams (1990) qui déclina ce concept au plan environnemental, en précisant les notions d'« organismes », de « populations » et de « communautés ». Au fil des années, la définition d'un biomarqueur s'est enrichie et précisée pour aboutir à la définition proposée par Lagadic *et al.* (1997) et que nous avons adoptée dans ce travail doctoral. Selon ces auteurs, un biomarqueur est un « *changement observable* $^{et}/_{ou}$ *mesurable au niveau moléculaire, physiologique ou comportemental qui révèle une exposition présente ou passé d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant*». Cette définition permet de mettre en évidence tous les niveaux biologiques pouvant être utilisés comme biomarqueurs ainsi que l'importance du facteur « temps » dans l'utilisation et l'interprétation des réponses d'un biomarqueur.

1.2. Biomarqueurs d'exposition et biomarqueurs d'effet

Deux principales catégories de biomarqueurs, couramment utilisées en écotoxicologie, furent établies en fonction de la réponse apportée (Schlenk, 1999). Il s'agit des biomarqueurs d'exposition et des biomarqueurs d'effet (**Tableau I-1**).

Tableau I-1. Exemple de biomarqueurs utilisés dans des études de terrain et de laboratoire, indicateurs d'expositions ou d'effets de divers polluants, ainsi que leurs réponses *(d'après Vasseur et Cossu-Leguille, 2003; Allan et al., 2006)*

	Biomarqueurs	Polluants	Effets
Biomarqueurs d'exposition	Cytochrome P450	Pesticides, HAPs, Dioxines	Induction
	Glutathion-S-Transférase	Substances électrophiles	Induction
	Activité acétylcholinestérase	Insecticides organophosphoré et carbamates	Inhibition
	Synthèse métallothionéines	Métaux et autres xénobiotiques	Induction
	Protéines de stress	Métaux et autres xénobiotiques	Induction
	Protéines MultiXénobiotiques Résistance (MXR)	HAPs, PCBs, métabolites, …	Induction / Inhibition
	Systèmes antioxydants (ex: glutathion, enzymes antioxydantes,…)	Xénobiotiques organiques divers, métaux,…	Inhibition / Augmentation / Diminution
Biomarqueurs d'effet	Activité acétylcholinestérase	Insecticides organophosphorés et carbamates	Diminution Inhibition
	Peroxydation lipidique	Xénobiotiques organiques divers, métaux,…	Induction
	Intégrité lysosomale	Xénobiotiques organiques divers, métaux,…	Diminution
	Vitellogénine	Perturbateurs endocriniens	Induction (mâles)

Un *biomarqueur d'exposition* met en évidence l'exposition d'un organisme à au moins une substance polluante, sans pour autant démontrer les effets induits par celle-ci. Cette catégorie de biomarqueurs regroupe de nombreuses molécules dont le rôle majeur est d'assurer la protection des cellules de l'organisme.

Parmi ces biomarqueurs d'exposition, il est possible de trouver des protéines de choc thermique (heat shock protein, HSP). Ce sont des protéines chaperonnes permettant la bonne reconfiguration de protéines endommagées lors d'un stress. Leur expression peut être induite lors d'une perturbation thermique mais également par un grand nombre d'agents oxydants, métaux lourds ou autres composés toxiques (Eckwert *et al.*, 1997; Piano *et al.*, 2004; Bierkens *et al.*, 1998). Les monooxygénases liées au cytochrome P450, enzymes de détoxication de phase I, sont également des biomarqueurs d'exposition du fait de leur induction principalement lors d'exposition à des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) ou à des pesticides (Stegeman et Kloepper-Sams, 1987; Livingstone *et al.*, 1995). Leur rôle est de catalyser l'oxydation des xénobiotiques afin de les fonctionnaliser pour les

rendre moins toxiques et faciliter leur élimination. Les métallothionéines sont considérées comme des biomarqueurs d'exposition puisque leur synthèse et leur concentration sont induites lors d'exposition à des métaux lourds (Geffard *et al.*, 2002a, 2002b; 2005; Bigot *et al.*, 2011). En effet, ces protéines sont responsables de la fixation des métaux. Parmi les biomarqueurs d'exposition, il est également possible de retrouver des mécanismes de résistance à de multixénobiotiques (MXR), qui sont des pompes membranaires ATP-dépendantes permettant l'expulsion des éléments toxiques hors de la cellule. Leurs expressions et leurs activités peuvent être induites par des métaux de type cadmium, cuivre, mercure ou zinc (Achard *et al.*, 2004), ainsi que par des pesticides comme le chlorthal ou l'Aroclor 1254 (Eufemia et Epel, 1998). Les systèmes antioxydants des organismes permettent de mettre en évidence une exposition à divers polluants métalliques et organiques. Ces systèmes font intervenir des enzymes antioxydantes telles que la catalase, les glutathion-S-transférases ou encore les glutathion-peroxydases responsable de l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS), délétères pour l'organisme. Parmi les systèmes antioxydants, on trouve également des molécules telles que le glutathion, les caroténoïdes ou encore les vitamines A et E. Ces systèmes antioxydants sont développés dans le paragraphe 2.2.

Un *biomarqueur d'effet* met en évidence un ou des effet(s) toxique(s) subit(s) par un organisme suite à une exposition à au moins une substance polluante. Les biomarqueurs d'effets peuvent être par exemple des produits de dégradation, des enzymes ou encore des modifications structurales. Un des produits de dégradation considéré comme biomarqueur d'effets est le malondialdéhyde, produit final formé au cours de la dégradation des membranes cellulaires appelée peroxydation des lipides (Cossu *et al.*, 1997; Charissou *et al.*, 2004; Del Rio *et al.*, 2005). Une augmentation de la concentration en malondialdéhyde est synonyme de dommages cellulaires subits par les organismes exposés à divers polluants comme par exemple des métaux tels que le cuivre (Sroda et Cossu-Leguille, 2011a; Correia *et al.*, 2002) ou le cadmium (Khan *et al.*, 2010), ou à des composés organiques tels que des pesticides (Hernández-Moreno *et al.*, 2010). L'activité de l'acétylcholinestérase, enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine au niveau des synapses du système nerveux et stoppe la transmission du message nerveux, est utilisée comme biomarqueur d'effet, puisque son inhibition est spécifique à une exposition à des composés organophosphorés ou carbamates, utilisés comme pesticides (Xuereb *et al.*, 2007; 2009). Les biomarqueurs d'effets ne sont pas uniquement des molécules $^{et}/_{ou}$ des activités enzymatiques comme décrit précédemment, mais peuvent être des modifications structurales. Au niveau de la cellule, les lysosomes, vésicules chargées d'enzymes hydrolytiques permettant la dégradation de macromolécules, sont utilisés

comme biomarqueurs d'effets. L'augmentation de leur volume, de leur taille $^{et}/_{ou}$ de leur nombres est synonyme d'expositions à divers contaminants chimique comme des HAPs ou des métaux lourds (Giambérini et Cajaraville, 2005; Marigómez *et al.*, 2005).

1.3. Intérêt des biomarqueurs

Un biomarqueur n'a d'intérêt que s'il peut être précoce et prédictif de changement à l'échelle de la population (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Van der Oost *et al.* (2003) ont mis en relation la pertinence écologique d'un biomarqueur en fonction de son temps de réponse (**Figure I-1**). Leur étude met alors en évidence les difficultés quant au choix des biomarqueurs pertinents à utiliser lors d'évaluations de l'impact de contaminations environnementales. Les biomarqueurs répondant lors de courtes expositions se révèlent avoir peu de pertinence écologique, c'est-à-dire être peu prédictif d'un effet au niveau populationnel, même s'ils présentent l'avantage de fournir des informations précoces. Il existe toutefois des paramètres biochimiques permettant de faire un lien entre la réponse d'un biomarqueur mesurée à l'échelle individuelle et l'effet potentiel de cette contamination sur la population. Il s'agit de paramètres biochimiques liés à la reproduction. Lagadic (2002) a défini que les hormones liées au potentiel reproducteur d'un individu ainsi que les composantes énergétiques peuvent mettre en évidence un impact au niveau populationnel. Néanmoins, le nombre de marqueurs moléculaires permettant de faire un lien entre individu et population reste à ce jour très limité. Il est donc recommandé d'utiliser une batterie de biomarqueurs, c'est-à-dire un ensemble de biomarqueurs de différents niveaux d'organisation biologiques (moléculaire, cellulaire, physiologique,…) afin d'appréhender au mieux l'impact d'une contamination environnementale et d'interpréter et conclure le plus précisément possible quant aux effets d'une exposition à un ou des xénobiotique(s). L'approche multi-marqueurs, faisant intervenir des biomarqueurs d'exposition et d'effets, s'est ainsi beaucoup développée dans les études écotoxicologiques (de Lafontaine *et al.*, 2000; McLoughlin *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2004; Galloway *et al.*, 2006; Felten *et al.*, 2008; Frenzilli *et al.*, 2008; Falfushynska *et al.*, 2010).

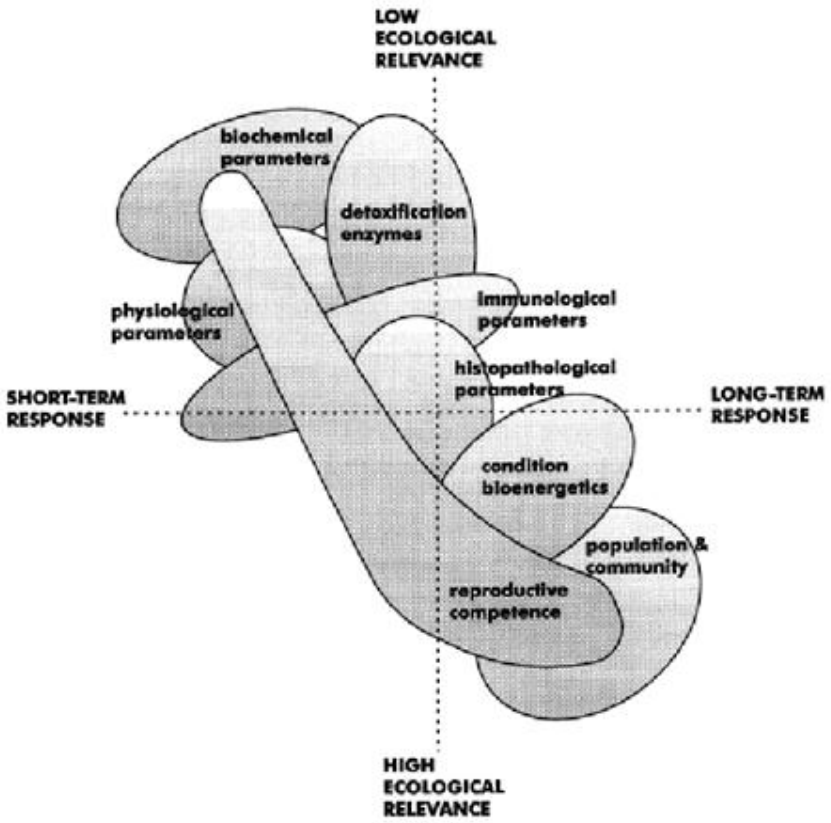


***Figure I-1**. **Relation entre pertinence écologique et temps de réponses de différents biomarqueurs** (d'après Adams, 1990; Van der Oost et al., 2003)*

1.4. Biomarqueurs et facteurs confondants

Bien que les réponses des biomarqueurs soient induites après exposition à divers xénobiotiques, elles peuvent également dépendre d'autres facteurs appelés « facteurs confondants » ou « facteurs de confusion ».

Parmi les facteurs confondants, les plus connus pour induire une modification de la réponse des biomarqueurs, il y a des facteurs abiotiques tels que la température, ou la salinité. Ainsi, Serafim *et al.* (2002) ont démontré que l'induction de la synthèse des métallothionéines (MT) chez le bivalve *Mytilus galloprovincialis* exposé au cadmium était température-dépendante. En effet, lorsque les individus étaient exposés à 100 µg $Cd.L^{-1}$ à 25°C, la concentration de MT induite était 5 fois plus élevée que celle des individus placés à 5°C. De même, Tankoua *et al.* (2011) ont mis en évidence chez le bivalve marin *Scrobicularia plana*, une différence de réponses antitoxiques selon la salinité. Lors d'une augmentation de la salinité, il a été observé une augmentation de l'activité de la glutathion-S-transférase, mais une diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase ainsi que de la concentration des protéines métallothionéines-like (MTLP). Ces études soulignent donc l'importance de prendre en compte les facteurs environnementaux, tels que la physico-chimie

du milieu, lors d'études écotoxicologiques, afin de permettre une interprétation plus juste des réponses des biomarqueurs, et ainsi d'incriminer leurs variations à la présence d'une contamination.

Par ailleurs, les réponses des biomarqueurs ne sont pas uniquement soumises à des facteurs abiotiques, mais peuvent également être influencées par des facteurs biotiques, souvent propres à l'individu. Bebianno *et al.*, (2003) ont démontré chez le gastéropode *Patella aspera* que des individus de grandes tailles (longueur de la coquille), donc âgés, avait une plus forte concentration en MT que les individus de petites tailles et donc plus jeunes. De même, Xuereb *et al.*, (2009) ont mesuré une plus forte activité de l'acétylcholinestérase chez les amphipodes *Gammarus fossarum* de petites tailles, en comparaison à celle des individus de grandes tailles. Le sexe de l'individu influence également les réponses des biomarqueurs comme il a été démontré chez *Gammarus roeseli* (Sroda et Cossu-Leguille, 2011a; 2011b). Ces auteurs ont démontré que les femelles avaient de plus fortes activités d'enzymes antioxydantes (e.g. glutathion peroxydases ou la catalase) que les mâles; mais que lors d'une exposition au cuivre, les femelles étaient moins résistantes que les mâles. D'autres facteurs biotiques en lien avec le cycle de reproduction de l'individu peuvent modifier les réponses des biomarqueurs. On y retrouve par exemple le stade de reproduction (*i.e.* lien étroit avec le cycle de mue) qui influence notamment l'induction du gène de la vitellogénine chez *Gammarus fossarum* (Xuereb *et al.*, 2009; 2011). En effet, ces auteurs ont démontré que les femelles avaient une augmentation significative d'ARNm de la vitellogénine à la fin de la phase d'inter-mue et au début de la phase de pré-mue.

Au sein de la multitude de facteurs de confusion, la saison est de loin le plus étudié. Le cas particulier de la saison réside dans le fait qu'il s'agit à la fois d'un facteur confondant biotique ou abiotique, puisqu'elle fait intervenir des facteurs physiologiques (maturation, cycle de reproduction,…) et environnementaux (variations de température, d'oxygénation, ressource alimentaire,…). Des variations saisonnières ont pu être établies pour de nombreuses défenses antioxydantes, notamment chez des invertébrés, où la température ainsi que le cycle de reproduction influencent l'activité basale des individus jouant ainsi sur leur sensibilité et donc sur les réponses des biomarqueurs. Il a été démontré, par exemple chez le bivalve *Mytilus edulis* que la concentration de glutathion était la plus faible en automne et en hiver et la plus forte en été (Power et Sheehan, 1996). A l'inverse, la concentration en métallothionéines du bivalve *Corbicula fluminea* était minimale au printemps et maximale en été (Baudrimont *et al.*, 1997) alors qu'elle était minimale au printemps et maximale en hiver chez l'amphipode *Gammarus pulex* (Geffard *et al.*, 2007). Des variations saisonnières ont

également été mises en évidence pour les réserves énergétiques. Dutra *et al.* (2007) ont notamment mis en évidence que la teneur en lipides de l'amphipode *Hyallela pleoacuta* était minimale en été et maximale en automne. La même observation a été faite pour la teneur en lipides de l'amphipode *Gammarus roeseli* (Sroda et Cossu-Leguille, 2011b).

Depuis quelques années, le parasitisme est apparu comme un facteur confondant pouvant induire des modifications dans les réponses de biomarqueurs de son hôte, d'autant que ce dernier est souvent une espèce sentinelle (poissons, bivalves, crustacés,…) (Sures 2006; 2007; 2008). Cependant, très peu d'études à ce jour se sont intéressées à l'influence de parasites, bien qu'il soit clairement établi maintenant, qu'un parasite utilise le stock énergétique de son hôte, conduisant ainsi à un remaniement des différentes allocations énergétiques de ce dernier. Toutefois, durant la dernière décennie, il a été démontré que la présence de parasites pouvait modifier les systèmes de défense de son hôte. Par exemple, une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (catalase, glutathion réductase, glutathion-S-transférase) a été décrite chez la carpe *Cyprinus carpio* infectée par le cestode *Ptychobothrium* sp. (Dautremepuits *et al.*, 2002; 2003). La présence de parasites n'affecte pas uniquement le métabolisme de défense de son hôte, mais peut également induire un changement dans sa structure physiologique. En effet, Minguez *et al.* (2009) ont démontré une diminution de la taille des lysosomes, ainsi qu'une augmentation de leur nombre chez le bivalve *Dreissena polymorpha* infecté par diverses parasites tels que des organismes Rickettsiale-like (bactérie intracellulaire), un cilié (*Ophryoglena* sp.) ou encore un trématode (*Echinoparyphium* sp.). Ces études mettent donc en avant une nouvelle difficulté quant à l'utilisation de biomarqueurs comme outils de diagnostic de perturbations anthropiques. En effet, bien qu'il soit relativement facile de contrôler la température, le pH ou encore le sexe de l'individu lors d'une exposition en laboratoire, la présence de parasites restent délicate à établir, notamment dans le cas de parasites non-visibles à l'œil nu, nécessitant l'utilisation d'outils biomoléculaires ou histologiques pour les mettre en évidence.

Même si les biomarqueurs sont très largement étudiés dans les études d'évaluation de la qualité des eaux, la connaissance de l'influence de facteurs confondants, et notamment de nouveaux facteurs tel que le parasitisme, devient indispensable pour une interprétation correcte des réponses des biomarqueurs; et ceci avant même de juger de la pertinence écologique d'un biomarqueur ou d'une batterie de biomarqueurs.

2. Stress oxydant, défenses antitoxiques et dommage membranaire

Toute vie aérobie nécessite l'utilisation d'oxygène moléculaire (O_2). Cependant, il a été estimé que la métabolisation d'environ 1 à 3% de l'oxygène consommé aboutit à la formation d'espèces radicalaires, également appelées « espèces réactives de l'oxygène » (ROS) (Livingstone, 2003). Ces ROS peuvent alors conduire à l'apparition d'un stress oxydatif lorsque celles-ci ne sont plus prises en charge par les systèmes de défenses de l'organisme. La production de ces ROS est également induite par de multiples polluants rejetés notamment par les activités anthropiques (pesticides, métaux, HAPs,…) (Livingstone, 2001).

2.1. Les principales espèces réactives de l'oxygène

Les ROS sont des espèces chimiques réactives qui présentent un électron libre sur leur couche externe, ce qui leur confère la particularité de pouvoir réagir très rapidement avec de nombreuses molécules voisines et ainsi induire un stress oxydatif (Sies, 1986).

Ces ROS sont majoritairement produites de façon endogène au niveau des membranes des mitochondries, au cours du transfert des électrons de la chaine respiratoire (Staniek et Nohl, 2000) (**Figure I-2**).

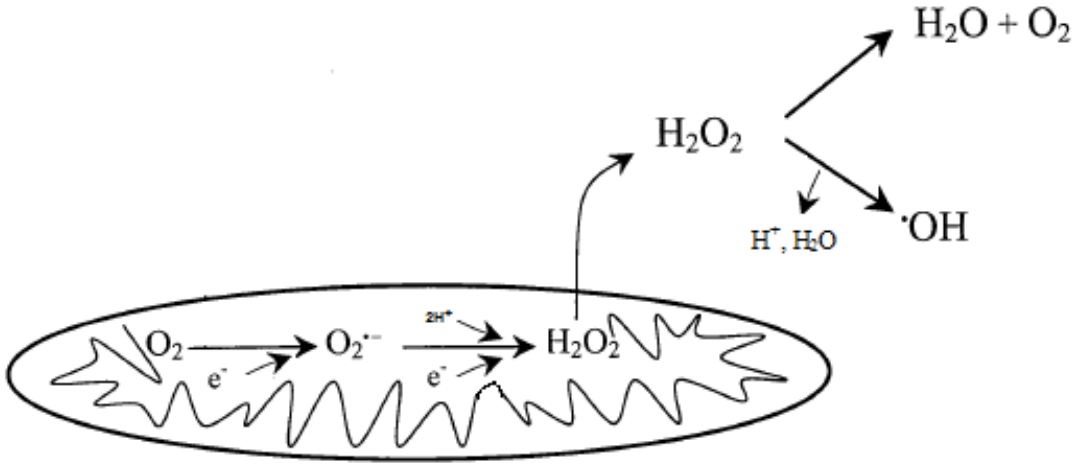


Figure I-2. Schéma de formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la chaîne respiratoire *(adapté de Chabot et al., 1998 et Nordberg et Arnér, 2001). O_2 : oxygène moléculaire, $O_2^{\bullet-}$: anion superoxyde protoné, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, $^{\bullet}OH$: peroxyde organique.*

2.1.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

La plus connue des espèces réactives de l'oxygène est l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$. Il est formé essentiellement au niveau des membranes mitochondriales (Staniek et Nohl, 2000)

après capture d'un électron par le molécule d'O_2 (Halliwell et Gutteridge, 1984). L'anion superoxyde n'est pas la forme activée de l'oxygène la plus réactive mais elle peut toutefois être impliquée dans certains dommages cellulaires. En effet, du fait de son incapacité à traverser les membranes lipidiques, l'anion superoxyde reste principalement dans la mitochondrie et conduit alors à la destruction des lipides membranaires ou lipoperoxydation (voir paragraphe 2.6.). L'anion superoxyde peut également se dismuter en peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante catalysée par les superoxydes dismutases (Fridovich, 1975).

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2\ H_2O \longrightarrow H_2O_2 + O_2 + 2\ OH^-$$

2.1.2. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) provient donc de la dismutation de l'anion superoxyde. Ce composé franchit facilement la barrière membranaire des cellules par diffusion (Nordberg et Arnér, 2001). Selon la réaction de Fenton, le peroxyde d'hydrogène se décompose en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}) pour former un ion hydroxyde (OH^-) et un radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$):

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}$$

Cette réaction s'arrête rapidement par épuisement de l'ion ferreux; cependant, lors de la présence d'ion superoxyde, elle peut perdurer du fait que ce dernier génère du fer ferreux selon la réaction d'Haber-Weiss:

$$O_2^{\bullet -} + Fe^{3+} \longrightarrow O_2 + Fe^{2+}$$

2.1.3. Le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$)

Le radical hydroxyle est formé par la fission homolytique de la liaison oxygène-oxygène du peroxyde d'hydrogène lors, par exemple *in vitro*, de la réaction de Fenton faisant intervenir des métaux de transition sous forme réduite, mais également lors de réactions thermiques. *In vivo*, la formation de ce radical est réalisée selon la réaction d'Haber-Weiss dont le bilan est le suivant:

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$$

Le radical hydroxyle est certainement la plus réactive des ROS. Il est le plus oxydant mais également le plus instable car sa demi-vie à 37°C n'est que de 10^{-9} secondes (Sies, 1991). Ce composé réagit avec différentes molécules biologiques comme les phospholipides

membranaires initiant ainsi la lipoperoxydation, ou encore avec les bases de l'ADN créant ainsi des erreurs de transcription et donc de synthèses protéiques (Halliwell et Gutteridge, 1984).

2.2. Les systèmes de défenses antioxydants

Afin de limiter les effets cellulaires délétères pour l'organisme, il est important de contrôler la production et la dissémination des espèces réactives de l'oxygène. Pour cela, les organismes ont développé des systèmes de détoxication leur permettant de se défendre contre la surproduction de ROS (**Figure I-3**).

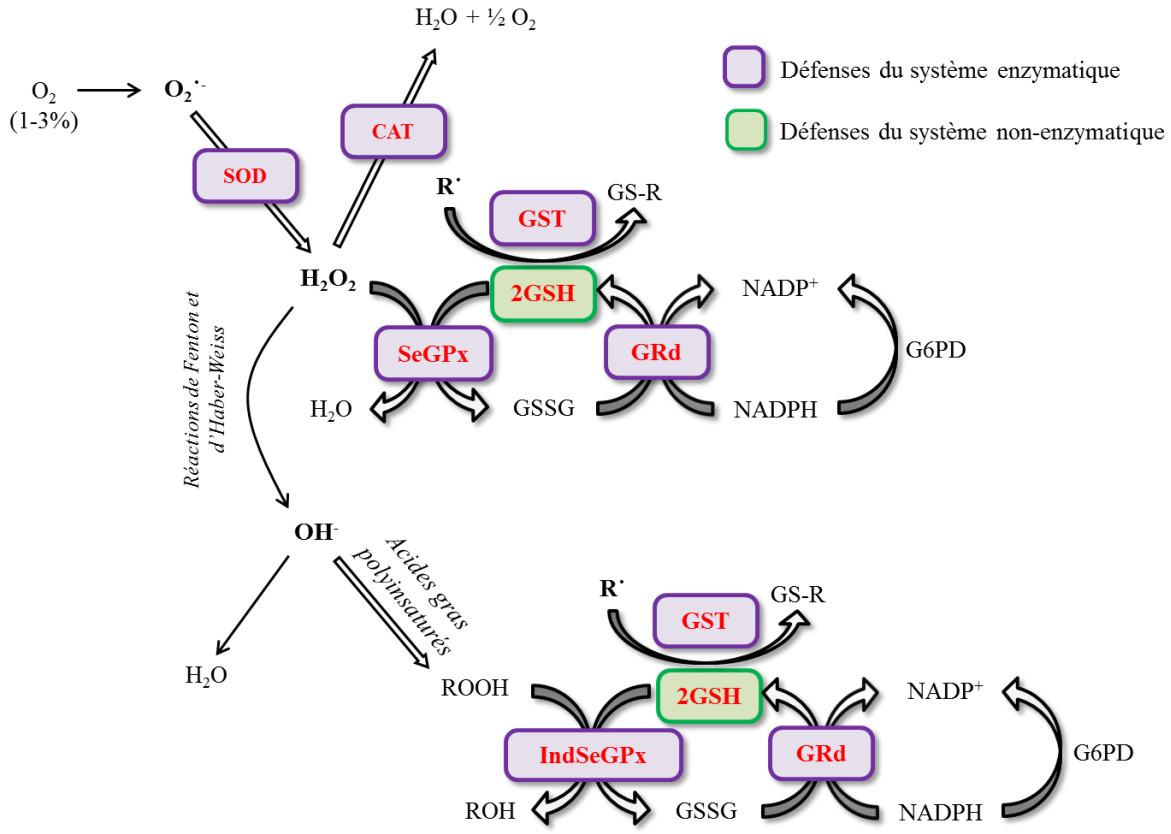


Figure I-3. Schéma des systèmes enzymatique et non-enzymatique de détoxication des ROS*. SOD: superoxyde dismutase ; CAT: catalase ; SeGPx: glutathion peroxydase-sélénium dépendant ; IndSeGPx: glutathion peroxydase-sélénium indépendant ; GST: glutathion S-transférase ; GRd: glutathion réductase ; GSH: glutathion réduit.*

2.2.1. Les antioxydants enzymatiques

Ce système fait intervenir de nombreuses enzymes de détoxication telles que la catalase (CAT, EC 1.11.1.6), les superoxydes dismutases (SOD, EC 1.15.1.1), les glutathion peroxydases sélénium-dépendante (SeGPx, EC 1.11.1.9), et sélénium-indépendante (IndSeGPx, EC 1.11.1).

- *Les superoxydes dismutases*

Les superoxydes dismutases (SOD) ont un rôle important dans la prise en charge de l'anion superoxyde (McCord et Fridovich, 1969). Ces enzymes ne traversent pas les membranes et agissent donc dans le compartiment même où les $O_2^{\bullet-}$ sont formés (Staniek et Nohl, 2000). Elles constituent une première ligne de défense efficace pour empêcher l'accumulation cellulaire de l'anion superoxyde. Elles catalysent la dismutation du $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

- *La catalase*

La catalase, qui est principalement localisée dans les peroxysomes, permet l'élimination du peroxyde d'hydrogène formé par exemple lors de la dismutation de l'anion superoxyde (voir ci-dessus) en catalysant sa réduction en eau et oxygène

$$H_2O_2 \longrightarrow H_2O + ½\ O_2$$

Elle permet alors de soustraire H_2O_2 de la réaction d'Haber-Weiss et ainsi d'éviter la formation de radical hydroxyle (Halliwell et Gutteridge, 1989).

- *Les glutathion peroxydases*

Les glutathion peroxydases (GPx) peuvent également prendre en charge le peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme existe sous deux formes, la glutathion peroxydase sélénium-dépendante (SeGPx) et la glutathion peroxydase sélénium-indépendante (IndSeGPx). La SeGPx peut prendre en charge la détoxication de peroxydes organiques et du peroxyde d'hydrogène, alors que l'IndSeGPx neutralise uniquement les peroxydes organiques (Burk *et al.*, 1978).

- *La glutathion réductase*

La glutathion réductase (GRd), présente chez tout organisme animal ou végétal, est composée de deux sous-unités identiques. Elle permet le recyclage de la forme oxydée du glutathion (GSSG) lors de la réaction suivante NADPH-dépendante :

$$GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow 2\ GSH + NADP^+$$

2.2.2. Les antioxydants non-enzymatiques

Les antioxydants non-enzymatiques sont complémentaires des antioxydants enzymatiques dans la prise en charge des ROS. Il existe diverses molécules liposolubles et hydrosolubles antioxydantes.

Les éléments liposolubles, permettant une détoxication de l'organisme, font intervenir par exemple les tocophénols, incluant la vitamine E, piégeur de radicaux lipidiques, mais aussi les caroténoïdes dont fait partie la vitamine A, également piégeurs de ROS du fait de leurs doubles liaisons (Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996).

Parmi les éléments hydrosolubles, on trouve la vitamine C, antioxydant présent dans tous les organes, mais surtout le glutathion, antioxydant et substrat indispensable de nombreuses réactions enzymatiques antioxydantes (GPx, GST,…).

2.3. Le glutathion: synthèse, rôle et maintien

Le glutathion, également appelé L-γ-glutamyl-L-cystéinylglycine, est un thiol non protéique de faible poids moléculaire, le plus abondant dans les organismes vivants (Meister et Anderson, 1983). Ce tripeptide est composé de 3 acides aminés: acide glutamique, cystéine et glycine (**Figure I-4**) et est présent sous deux formes dans l'organisme: la forme réduite (GSH) et la forme oxydée (GSSG) (**Figures I-5**). Dans la cellule, il est majoritairement présent sous forme réduite (90%) qui est sa forme active (Meister, 1988).

2.3.1. Biosynthèse du glutathion

Le glutathion est synthétisé à partir de L-glutamate, L-cystéine et glycine après deux réactions enzymatiques consécutives (Meister, 1994; 1995). La première réaction est catalysée par la γ-glutamylcystéine ligase (γ-GCL) utilisant la L-glutamyl et la L-cystéine comme substrat pour former le L-glutamylcystéine (**Réaction 1 – Figure I-6**). Ce composé formé est ensuite majoritairement pris en charge (> 95%) par la glutathion synthétase afin de former le glutathion réduit (**Réaction 2 – Figure I-6**). Les 5% restant étant pris en charge par la γ-glutamylcyclotransférase pour former le 5-oxo-L-proline (Smith *et al.*, 1980).

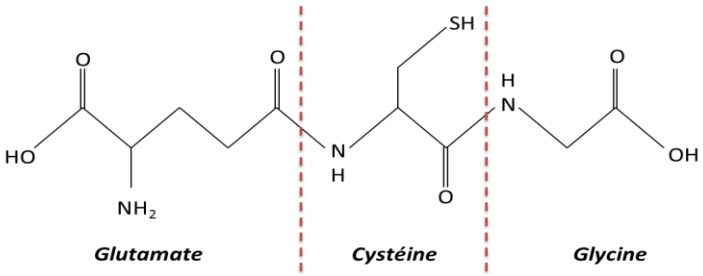


Figure I-4. Structure moléculaire du glutathion réduit (GSH)

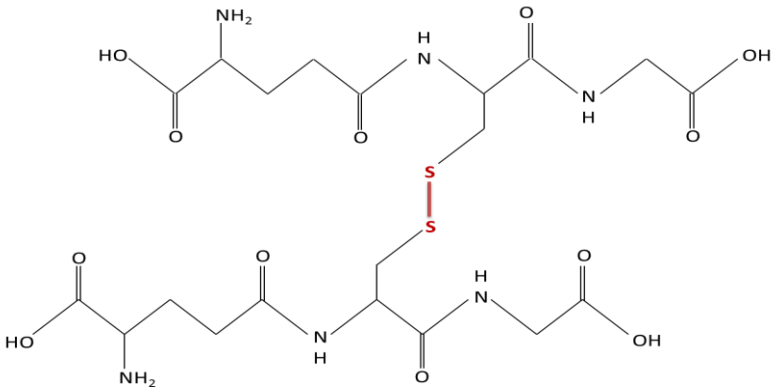


Figure I-5. Structure moléculaire du glutathion oxydé (GSSG)

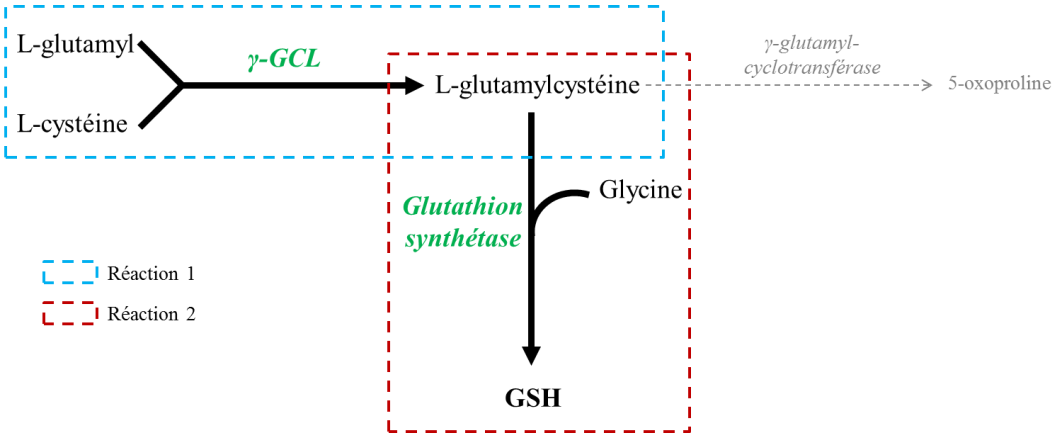


Figure I-6. Réaction enzymatique de synthèse du glutathion réduit

2.3.2. Rôle antioxydant

Le glutathion intervient dans de nombreuses réactions au niveau cellulaire. C'est probablement l'antioxydant cellulaire le plus important. Fahey et Sundquist (1991) ont démontré une forte corrélation de lien évolutif entre le glutathion et le métabolisme des eucaryotes aérobies, indiquant ainsi que le glutathion a évolué comme une molécule qui protège les cellules contre la toxicité de l'oxygène. Le glutathion permet dans un premier

temps, l'inactivation des espèces radicalaires en réagissant rapidement et de façon non enzymatique avec le radical hydroxyl ou encore les peroxynitrites (produit cytotoxique formé lors de la réaction de l'oxyde nitrique avec l'oxygène) grâce à son groupement thiol (-SH) (Kalyanaraman *et al.*, 1996; Luperchio *et al.*, 1996). Cette détoxication se fait par simple transfert d'électrons, rendant ainsi les ROS moins toxiques pour l'organisme (DeLeve et Kaplowitz, 1991).

$$GSH + R^{\bullet} \longrightarrow GS^{\bullet} + RH$$

Le glutathion participe également au système de défense en tant que substrat de nombreuses enzymes antioxydantes telles que les glutathion-S-transférases (GST) ou les glutathion peroxydases (GPx).

La réaction catalysée par les GST permet la conjugaison d'une molécule de glutathion à des composés électrophiles ou des métaux, afin de former respectivement des espèces conjuguées et des complexes métalliques communément appelés des composés glutathion-S-conjugués (GS-X).

$$X + GSH \xrightarrow{\boldsymbol{GST}} H^{+} + GS\text{-}X$$

De même, la réaction catalysée par les glutathion peroxydases permet de neutraliser les hydroperoxydes organiques et le peroxyde d'hydrogène par conjugaison au glutathion réduit (Mills, 1957).

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{\boldsymbol{GPx}} ROH + H_2O + GSSG$$

Ces réactions aboutissent généralement à des composés moins toxiques, qui seront par la suite éliminés de l'organisme par excrétion (Ketterer *et al.*, 1983).

2.3.3. Recyclage et maintien de la concentration en glutathion réduit

Après avoir été conjugué à un composé toxique ou utilisé par des enzymes antioxydantes, le glutathion réduit (GSH) se retrouve sous forme oxydée (GSSG). Le maintien du ratio GSH/GSSG, ainsi que des activités antioxydantes glutathion-dépendantes peut se faire par recyclage de la forme oxydée. Cette réaction est catalysée par la glutathion réductase (GRd, EC 1.6.4.2), enzyme NADPH-dépendante, selon la réaction suivante:

$$GSSG + NADPH + H^{+} \xrightarrow{\boldsymbol{GRd}} 2\,GSH + NADP^{+}$$

Le maintien de la concentration en GSH dans la cellule peut également se faire par synthèse du tripeptide grâce à la γ-glutamylcystéine ligase (GCL, EC 6.3.2.2.). Cette enzyme est considérée comme facteur limitant dans la synthèse *de novo* du glutathion.

Chez les mammifères, la GCL est une enzyme hétérodimérique composée d'une sous-unité catalytique (GCLc) de 73 kDa et d'une sous-unité de régulation (GCLm) de 27,7 kDa (Fouré-Seelig *et al.*, 1984). Une structure similaire a également été retrouvée chez des vertébrés comme le poisson-zèbre *Danio rerio* (Ventura-Lima *et al.*, 2009), et des invertébrés tels que le diptère *Drosophila melanogaster* (Fraser *et al.*, 2002), le nématode *Orchocerca volvulus* (Lüersen *et al.*, 2000) ou encore le bivalve *Unio tumidus* (Coffinet *et al.*, 2008). La première sous-unité permet d'amorcer la synthèse du GSH selon la réaction représentée sur la **figure I-7**. Dans un premier temps, l'acide glutamique réagit avec l'ATP afin de former le L-γ-glutamylphosphate (Réaction 1) qui va se lier à la L-cystéine afin de former le produit finale de la réaction, le γ-glutamylcystéine (γ-GC) (Réaction 2) (Griffith et Mulcahy, 1999). Le glutathion réduit est ensuite formé lors de la réaction entre le γ-GC et la glycine, catalysée par la glutathion synthétase (EC 6.3.2.3).

(1) L-Glu + ATP ⟶ L-γ-glutamylphosphate + ADP

(2) L-γ-glutamylphosphate + L-Cys ⟶ γ-GC + Pi

Bilan: L-Glu + L-Cys + ATP ⟶ γ-GC + ADP + Pi

Figure I-7. Réaction enzymatique catalysée par la γ-glutamylcystéine ligase. *L-Glu: L-glutamate, ATP: Adénosine TriPhosphate, ADP: Adénosine DiPhosphate, L-Cys: L-cystéine, γ-GC: γ-glutamylcystéine, Pi: phosphate inorganique.*

La γ-glutamylcystéine ligase, comme toute enzyme, présente un système de régulation. Le glutathion lui-même est capable de réguler sa synthèse en exerçant une inhibition feedback de l'activité de la GCL. Par exemple, il a été démontré qu'une concentration de 5 mM de GSH inhibait 50% de l'activité GCL (Richman et Meister, 1975). Inversement, une diminution de la concentration en glutathion par conjugaison avec un composé toxique entraine une augmentation de l'activité de la GCL (Iles et Liu, 2005).

Cependant, la régulation de la synthèse du glutathion ne dépend pas uniquement de son effet inhibiteur sur l'activité de la GCL, mais aussi de la concentration de cette enzyme dans la cellule, ainsi que de la disponibilité des substrats de la réaction et en particulier de la L-cystéine (Griffith, 1999).

2.4. Les métallothionéines

Les métallothionéines (MT) sont des protéines non-enzymatiques, localisées dans le cytoplasme des cellules, de faible poids moléculaire (~ 6-7 kDa) et présentes chez tous les vertébrés et invertébrés (Roesijadi, 1981). Elles sont généralement responsables de la fixation des métaux du fait de leur forte composition en cystéine (Coyle *et al.*, 2002). Cette particularité leur confère un fort potentiel régulateur intracellulaire de métaux essentiels comme le cuivre et le zinc qui se fixent alors aux cystéines. Cette fixation évite que le métal circule librement dans l'organisme et induise la formation de ROS, notamment par la réaction de Fenton (voir paragraphe 2.1.).

La fixation des métaux par les MTs s'effectue grâce à leurs deux sous-unités: α et β. La sous-unité α contient 11 cystéines et peut fixer 4 ions métalliques, tandis que la sous-unité β en possède 9 et peut fixer 3 ions métalliques (**Figure I-8**). L'atome de soufre des cystéines se lie à l'ion métallique, et provoque un repliement des deux sous-unités autour de celui-ci. Cette séquestration des métaux est réversible car de nombreux processus cellulaires nécessitent l'utilisation de ces métaux. Par exemple le zinc, qui a une très forte affinité pour les MTs ($K_{Zn} = 3{,}2.10^{13}\ M^{-1}$), peut être transféré des MTs à un récepteur permettant d'activer des réactions enzymatiques tels que l'anhydrase carbonique, enzyme qui transforme le CO_2 en acide carbonique (H_2CO_3) (Jacob *et al.*, 1998).

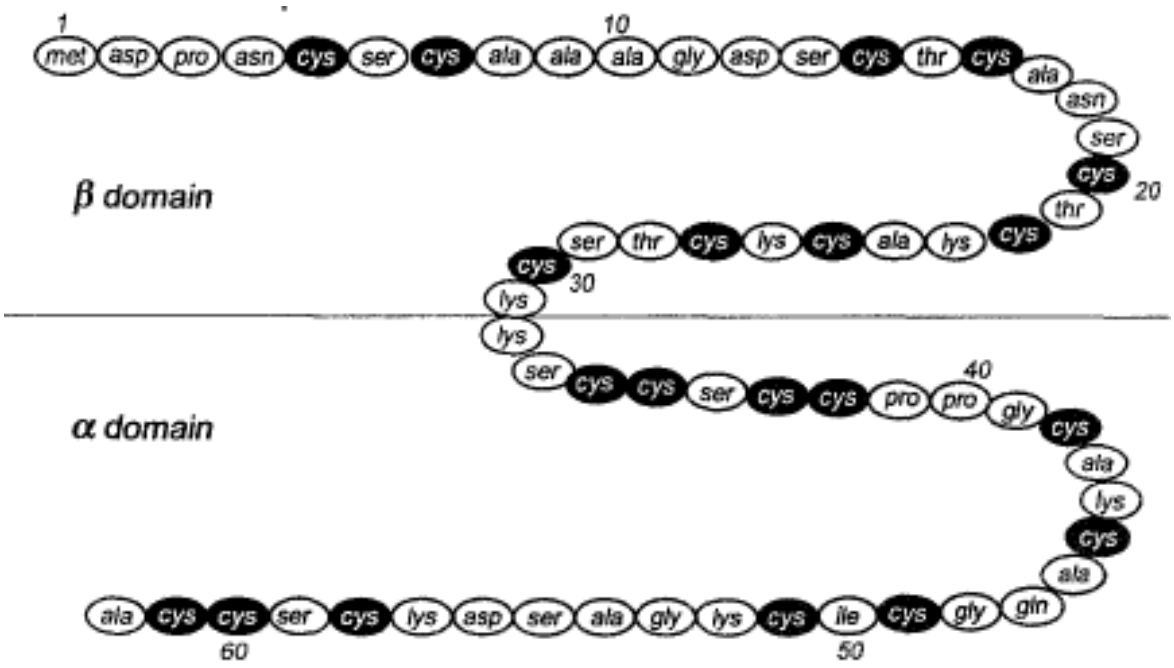


***Figure I-8. Séquence d'acides aminés de métallothionéine de foie* de lapin** *(Stillman, 1995)*

En plus de se lier à des métaux essentiels comme le cuivre et le zinc, les MTs peuvent séquestrer d'autres métaux mais aussi des espèces radicalaires (Andrews, 2000). Ceci leur confère alors un rôle important dans la détoxication des organismes exposés. En effet, les MTs ont également une grande affinité pour des métaux lourds qui peuvent donc facilement prendre la place du zinc. Le gradient d'affinité des MTs pour les métaux est le suivant: Hg^{2+} >> Cu^{+}, Ag^{+}, Bi^{3+} >> Cd^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} (Vasák, 1991). De nombreuses études ont démontré un lien entre l'induction des métallothionéines et une contamination du milieu par des métaux tels que le cadmium (Fraysse *et al.*, 2006; Bigot *et al.*, 2011), le mercure (Roesijadi *et al.*, 1982; Baudrimont *et al.*, 2006), l'argent (Hogstrand *et al.*, 1996) ou encore le fer (Viarengo *et al.*, 1999). Leur induction a pour but de séquestrer les métaux libres et d'éviter des effets toxiques. Leur utilisation en tant que biomarqueur permet de mettre en évidence une contamination métallique du milieu auquel l'organisme a été exposé.

2.5. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des molécules d'environ 40 carbones, dérivées d'isoprènes. Le caroténoïde le plus connu est le β-carotène; cependant, selon l'état d'oxydation de ce dernier, il existe diverses caroténoïdes tels que la zéaxanthine ou encore l'astaxanthine (**Figure I-9**). Ces composés sont responsables de la teinte de nombreuses plantes, fruits et fleurs; mais également de la couleur de certains oiseaux, insectes ou crustacés. Les caroténoïdes ne sont pas synthétisés par tous les organismes. Seuls les algues, les végétaux, les champignons et les bactéries en sont capables; les autres organismes devant obligatoirement les absorber par l'alimentation (Nègre-Sadargues *et al.*, 2000). Du fait de leur caractère lipophile, ce sont des molécules qui tendent à être accumulées dans les compartiments riches en lipides comme les membranes cellulaires ou les lipoprotéines.

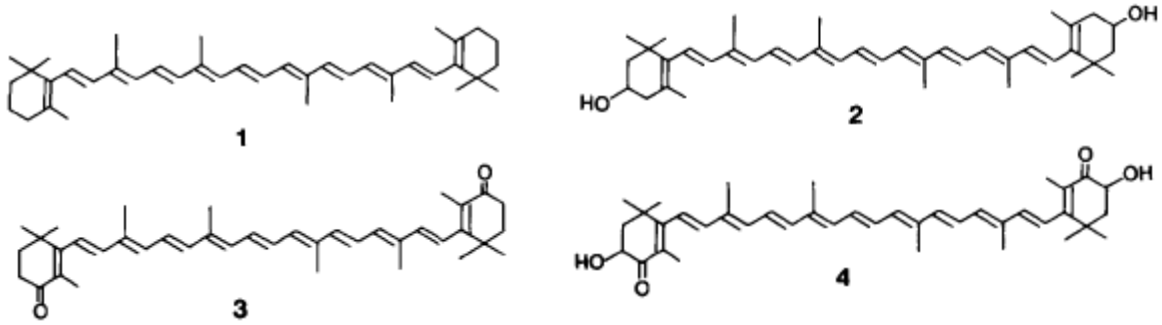


Figure I-9. Exemple de structure de 4 caroténoïdes. *(1) β-carotène, (2) zéaxanthine, (3) canthaxanthine, (4) astaxanthine*

Dans les organismes, les caroténoïdes possèdent différentes fonctions. Ils peuvent notamment intervenir dans la reproduction (Gilchrist et Lee, 1972) et dans le développement des œufs (Petit *et al.*, 1997) en étant des précurseurs du vitellus, réserve énergétique nécessaire au développement des juvéniles (Wallace *et al.*, 1967; Chang *et al.*, 1993). Ils sont également précurseurs de rétinoïdes ayant un rôle important dans la différenciation cellulaire lors du développement embryonnaire (Liñán-Cabello *et al.*, 2002; Stahl *et al.*, 2002). Les caroténoïdes sont présents dans les membranes des organismes et jouent un rôle dans leurs stabilisations (Gruszecki, 2004). Par exemple, la zéaxanthine, du fait de ces deux groupes polaires terminaux, permet d'augmenter la rigidité des membranes (Lazrak *et al.*, 1987). Il a également été démontré que les caroténoïdes membranaires influençaient l'épaisseur et la fluidité des membranes (Subczynski *et al.*, 1992). Néanmoins, un des rôles majeurs de ces composés lipophiles réside dans leur propriété antioxydante (Palozza et Krinsky, 1992).

Les caroténoïdes présentent une nouvelle barrière de défenses pour l'organisme en inhibant les radicaux libres (Krinsky et Deneke, 1982; Krinsky, 1989). En effet, l'un des rôles connus des caroténoïdes est la photo-protection qu'ils apportent contre les UV (Montenegro *et al.*, 2002; Hansson et Hylander, 2009). Il a d'ailleurs été démontré que les amphipodes vivants en eau profonde avaient moins de caroténoïdes que ceux vivants près de la surface (Green et Koslova, 1992). Lorsqu'ils sont présents dans les membranes, leur structure leur confère différentes propriétés antioxydantes. Le β-carotène et le lycopène réagissent avec les radicaux libres présents dans la partie hydrophobe des membranes, tandis que le zéaxanthine, de par son groupement final qui pénètre dans la partie polaire des membranes, réagit avec les radicaux libres générés dans la partie aqueuse (Britton, 1995). Leur implication dans l'activité phénoloxydase du système immunitaire des crustacés a également été démontrée par Cornet *et al.* (2007). Ces auteurs ont visualisé chez *Gammarus pulex* qu'une forte concentration en caroténoïdes permettait à l'individu d'avoir une forte activité phénoloxydase, génératrice de produits cytotoxiques.

Chez les crustacés amphipodes, le caroténoïde le plus abondant est l'astaxanthine (Dembitsky et Rezanka, 1996; Gaillard *et al.*, 2004). Ce caroténoïde est connu pour avoir également un fort pouvoir antioxydant estimé à respectivement, 10 et 100 fois celui de la vitamine A et de la vitamine E (Miki, 1991). L'astaxanthine, comme la majorité des caroténoïdes, est un produit issu de l'oxydation du β-carotène (**Figure I-10**).

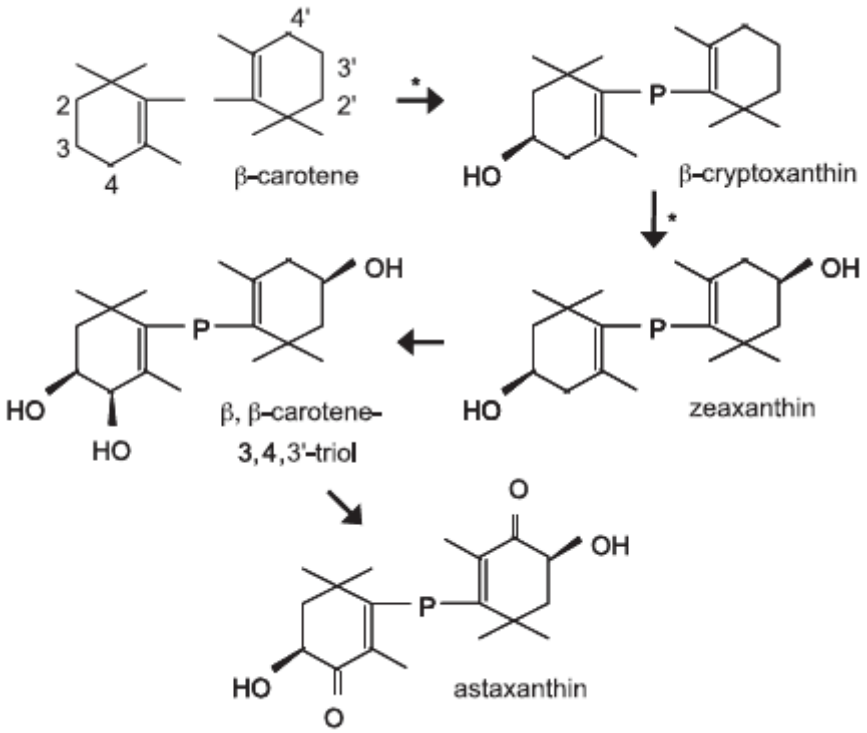


Figure I-10. Biosynthèse de l'astaxanthine à partir de β-carotène chez G. pulex et G. roeseli *(Gaillard et al., 2004)*

Les réactions antioxydantes des caroténoïdes sont liées à leur structure moléculaire, issue du β-carotène. Ils peuvent réagir avec l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ afin de le neutraliser selon la réaction suivante où « *car* » représente le caroténoïde (Conn *et al.*, 1992):

$$O_2^{\bullet -} + car + 2H^+ \longleftrightarrow car^{\bullet +} + H_2O_2$$

De même, il peut réagir avec un radical peroxyle ($RO_2^{\bullet}$) pour donner un radical carotenyl ($car^{\bullet}$) qui, en absence d'oxygène pourra réagir avec un autre radical peroxyde selon la réaction 1 et ainsi stopper la toxicité liée à ce composé ou, en présence d'oxygène, propager la chaîne réactionnelle par la formation d'un radical β-carotène peroxyle selon la réaction 2 (Rousseau *et al.*, 1992)

Réaction 1: $car^{\bullet} + RO_2^{\bullet} \longrightarrow car\text{-}RO_2$

Réaction 2: $car^{\bullet} + O_2 \longleftrightarrow car\text{-}OO^{\bullet}$

Enfin, les caroténoïdes en piégeant les radicaux peroxyles vont stopper la peroxydation lipidique et ainsi maintenir l'intégrité des membranes cellulaires (Jorgensen et Skibsted, 1993).

2.6. Dommage membranaire: la lipoperoxydation

Lorsque les systèmes de défenses antioxydantes ne suffisent plus pour prendre en charge l'intégralité des espèces réactives de l'oxygène, ces dernières vont créer des dommages cellulaires et notamment des destructions membranaires, appelées peroxydation des lipides ou lipoperoxydation. Ces dommages amènent dans la plupart des cas à une diminution de fluidité membranaire, de même qu'à une inactivation des récepteurs membranaires.

La peroxydation lipidique est un phénomène qui se produit en 3 étapes (**Figure I-11**): initiation, propagation et terminaison.

L'étape d'initiation correspond à l'attaque d'un atome d'hydrogène d'un acide gras par un ROS, aboutissant à la formation d'un radical lipidique qui subit alors un réarrangement moléculaire afin d'être plus stable.

La seconde étape est une propagation du phénomène de lipoperoxydation, par une réaction entre le radical lipidique et l'oxygène, formant un radical peroxyl lipidique très réactif avec les lipides membranaires adjacents. En effet, ce radical va à son tour arracher un atome d'hydrogène à un lipide voisin, provoquant une réaction en chaine conduisant à la production de radicaux lipidiques et d'hydrolipoperoxydes.

La phase terminale de la lipoperoxidation consiste en la formation de composés stables à partir de deux radicaux lipidiques (Halliwell *et al.*, 1992). Cette phase reste cependant tardive du fait que la probabilité de rencontre entre deux radicaux lipidiques est plus faible que la probabilité de rencontre entre un radical lipidique et un ROS.

La lipoperoxydation conduit à la formation de différents hydroperoxydes lipidiques qui sont à l'origine d'aldéhydes, d'acides gras et de traces d'hydrocarbures (Wade et Van Rij, 1985). Parmi les aldéhydes, on retrouve le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal (4-HNE). Le malondialdéhyde (MDA) est un β-dialdéhyde tricarboné (**Figure I-12** - Esterbauer *et al.*, 1991) issu de la peroxydation des acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons. C'est le composé le plus étudié pour définir l'effet toxique d'un xénobiotique sur l'organisme, c'est pourquoi il est qualifié de biomarqueur d'effets toxiques (Del Rio *et al.*, 2005; Lykkesfeldt, 2007). Cependant, le MDA, étant un aldéhyde, est très réactif vis-à-vis des macromolécules telles que les protéines, l'ARN ou l'ADN (Valenzuela, 1991). Il peut former des adduits à l'ADN pouvant induire un effet mutagène pour l'organisme (Marnett, 1999a; 1999b), ou se complexer avec des acides aminés ou encore le glutathion (Pilz *et al.*, 2000).

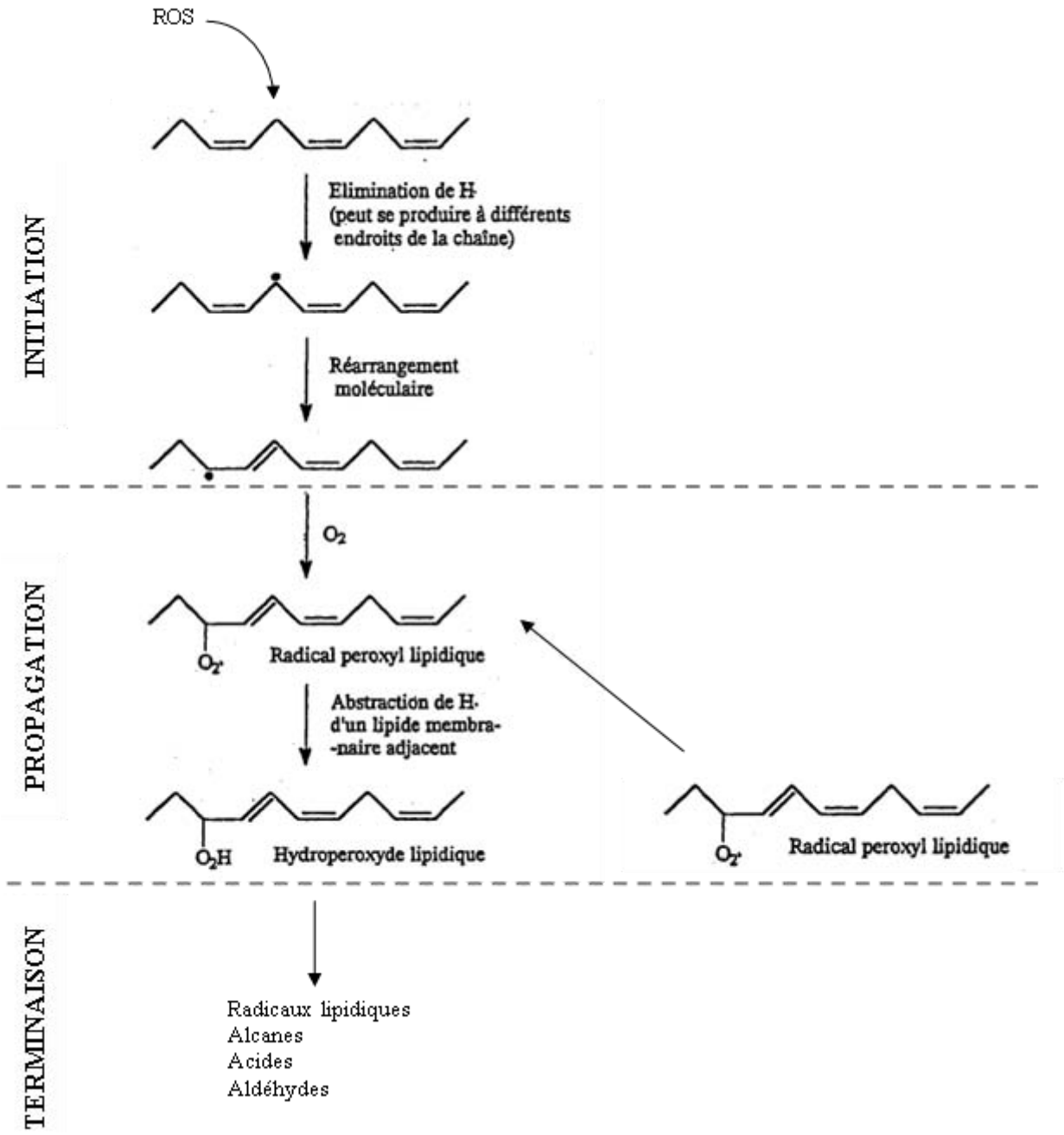


Figure I-11. Mécanisme de peroxydation des lipides *(d'après de Zwart et al., 1999 et Noci-Charissou, 2002)*

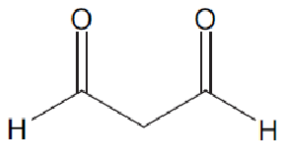


Figure I-12. Structure chimique du malondialdéhyde

3. Réserves énergétiques

La synthèse, la mobilisation et l'utilisation de défenses antitoxiques ont un coût énergétique pour l'organisme (Calow, 1991); c'est pourquoi, il est important de prendre en compte les réserves énergétiques dans les études écotoxicologiques. De plus, la balance énergétique d'un individu, c'est-à-dire la différence entre l'énergie d'entrée (alimentation) et l'énergie de sortie (métabolisme basal, défenses,…) est en lien étroit avec son allocation énergétique pour la croissance et la reproduction (Stoeckmann et Garton, 2001). Ces paramètres utilisés comme biomarqueurs en écotoxicologie peuvent donc mettre en évidence les prémisses d'un impact environnemental sur les populations (Smolders *et al.*, 2004; Voets *et al.*, 2006), mais aussi souligner l'énergie disponible à l'organisme pour lutter contre un stress (activation enzymes antioxydantes, synthèses d'antioxydants,…). Les réserves énergétiques sont constituées par les lipides, le glycogène et les protéines.

3.1. Les lipides

Les lipides constituent une des plus importantes substances métaboliques des organismes. Ils sont généralement stockés dans les tissus adipeux, mais lorsque l'organisme en est dépourvu, comme chez les crustacés, les lipides sont stockés dans les tissus musculaires et l'hépatopancréas (O'Connor et Gilbert, 1968). Ils servent de réserves de nutriments dans les périodes à forte demande énergétique comme les périodes de carences alimentaires ou ressources alimentaires limitées (Lemcke et Lampert, 1975) ou de reproduction (Cargill *et al.*, 1985; Rosa et Nunes, 2002). L'utilisation des lipides comme source d'énergie induit donc un phénomène de lipolyse permettant aux organismes de les dégrader afin de produire l'énergie nécessaire à leur métabolisme de base (réaction enzymatique, synthèse moléculaire,…). Il a été défini que la dégradation d'un milligramme de lipide produisait 39500 mJ (De Coen et Janssen, 1997).

Des études ont mis en évidence une différence inter-sexe dans la concentration de lipides. En effet, Dutra *et al.* (2007) ont montré que les femelles des amphipodes *Hyallela pleoacuta* et *Hyallela castroi* avaient de plus fortes teneurs en lipides que les mâles, quelle que soit la saison. De même, Sroda et Cossu-Leguille (2011b) ont mis en évidence de plus forts taux de lipides chez les femelles *Gammarus roeseli* que chez les mâles quelle que soit la saison. Les niveaux de réserves énergétiques plus élevés chez les femelles que chez les mâles sont probablement dus à leur investissement dans la reproduction. En effet, les lipides, en

période de reproduction, sont alloués à la synthèse d'hormones sexuelles, ainsi qu'au processus de vitellogenèse (Rosa et Nunes, 2002; Oliveira *et al.*, 2007).

3.2. Le glycogène

Le glycogène est une molécule constituée de nombreuses unités de glucose et principalement stocké dans les tissus musculaires ou l'hépatopancréas (Parvathy, 1971; Johnston et Davies, 1972). Il est une source d'énergie immédiatement disponible pour les activités courantes, comme la locomotion (Sparkes *et al.*, 1996), mais est également utilisé dans les processus d'osmorégulation, de croissance, ou encore pendant la période de reproduction et de carences alimentaires (Chang *et al.*, 1983; Kucharski et Da Silva 1991a; 1991b; Oliveira *et al.*, 2004; Rosa et Nunes, 2003). Lors de sa dégradation, le glycogène permet d'obtenir une quantité d'énergie équivalente à 17500 mJ/mg de glycogène (De Coen et Janssen, 1997). Le glycogène apporte donc à l'organisme deux fois moins d'énergie que les lipides. Le taux de glycogène d'un individu est susceptible d'être affecté lors de coûts physiologiques à court terme, contrairement aux lipides qui ne seraient affectés que lors de besoins énergétiques à long terme (Plaistow *et al.*, 2001).

La mesure de ces deux sources d'énergie permet donc d'appréhender l'énergie disponible pour l'organisme lors de ses besoins physiologiques (défense, croissance, osmorégulation,…), mais également pour sa reproduction. Il représenterait donc, comme les lipides, un biomarqueur prédictif d'effet sur la population.

3.3. Les protéines

Toutes les protéines représentent également une source de production d'énergie. Chez les crustacés, le muscle est la plus grande source de protéines. Les protéines sont des constituants structuraux, fonctionnels et énergétiques.

Certaines études ont rapporté une variation du contenu en protéines durant le développement ovarien de crustacés, pouvant être due à la biosynthèse de protéines diverses comme des hormones, des enzymes ou des lipoprotéines impliquées dans la maturation des gonades (Rosa et Nunes, 2003; Yehezkel *et al.*, 2000). Il a d'ailleurs été démontré chez l'amphipode *G. roeseli* que les femelles avaient une concentration en protéine supérieure à celle des mâles (Sroda et Cossu-Leguille, 2011b). Les protéines sont généralement mobilisées lors d'un stress sévère (Durou *et al.*, 2008), nécessitant probablement une grande quantité d'énergie pour les systèmes de défenses. La dégradation d'un milligramme de protéine

produit 24000 mJ (De Coen et Janssen, 1997), ce qui représente une quantité d'énergie inférieure à celle des lipides, mais supérieure à celle du glycogène.

4. Modèle d'étude: le gammare

4.1. Traits physiologiques et biologiques relatifs aux amphipodes

4.1.1. Morphologie

Le gammare est un invertébré aquatique faisant partie de la classe des crustacés amphipodes. Il est caractérisé par une symétrie bilatérale et un aplatissement latéral, ne dépassant pas une taille de 20 mm et ayant une durée de vie de moins de 1 an à un peu plus de 2 ans selon l'espèce et la température du milieu. Son corps est divisé en 4 parties : le prosome, le mésosome, le métasome et l'urosome (**Figure I-13**).

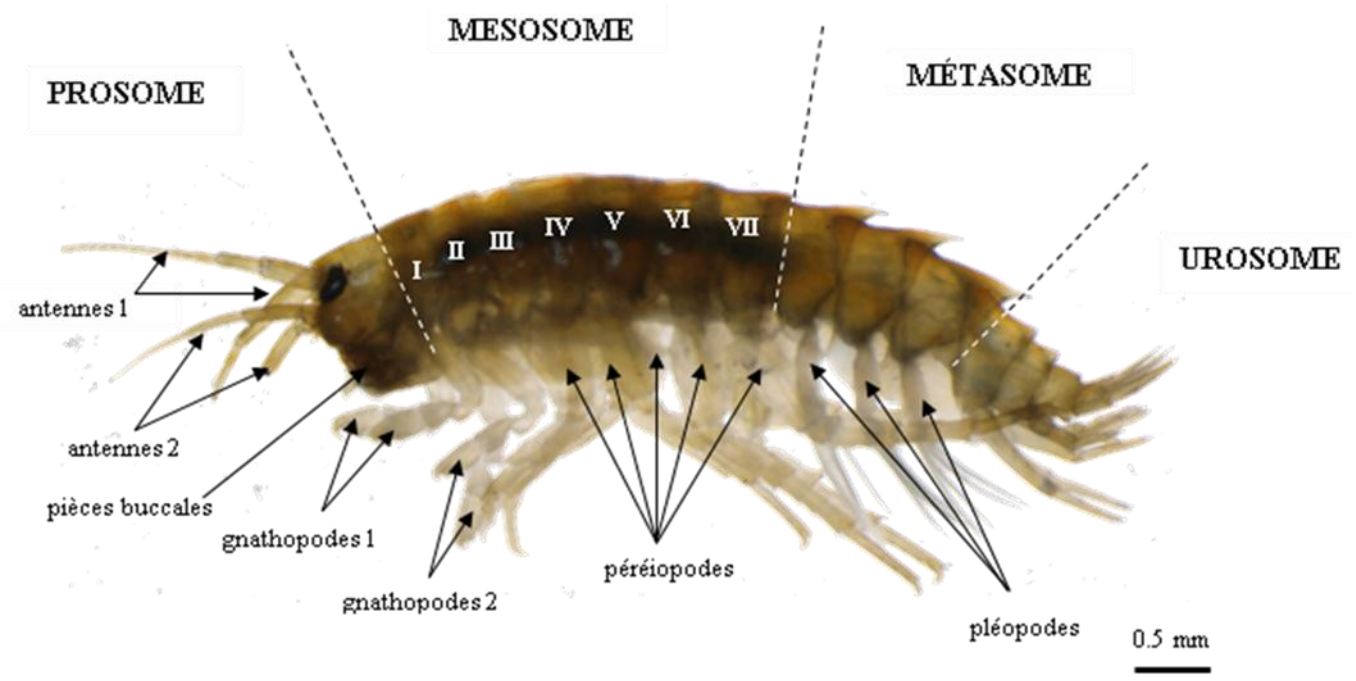


Figure I-13. Morphologie d'un gammare. *Exemple de Gammarus roeseli femelle* (photo: E. Gismondi)

Le prosome (ou région céphalique) contient deux paires d'antennes ainsi que les yeux et les pièces buccales.

Le mésosome est composé de 7 segments. Les segments I et II portent les gnathopodes permettant au gammare de s'accrocher notamment à des substrats végétaux mais servant également à agripper la femelle lors de la reproduction, formant ainsi un « pré-copulât ». Les segments III à VII possèdent des péréiopodes utilisés pour sa locomotion.

Au niveau du métasome se trouvent les pléopodes, éléments indispensables à l'oxygénation de l'organisme; c'est pourquoi ces appendices sont continuellement en mouvement. Ils permettent également la ventilation du marsupium, poche ventrale accueillant les œufs fécondés qui se développeront en juvéniles. Les mouvements continus des pléopodes permettent donc l'oxygénation des œufs, mais également d'obtenir un flux continu d'eau au niveau des branchies.

Enfin l'urosome, tout comme les péréiopodes du mésosome sont nécessaires à la locomotion de l'individu.

4.1.2. Traits biologiques

- *Mode de respiration*

Les gammares sont des organismes à respiration branchiale. Les branchies sont situées au niveau ventral (**Figure I-14**) et sont au nombre de 10, soit 5 paires. Elles permettent un échange gazeux entre les milieux intérieur et extérieur; mais sont surtout le principal site d'échanges ioniques chez les crustacés aquatiques (Péqueux, 1995). Cet échange s'effectue notamment grâce à la fonction régulatrice de la pompe Na^+/K^+-ATPase (Spicer et McMahon, 1994; Brooks et Lloyd Mills, 2006).

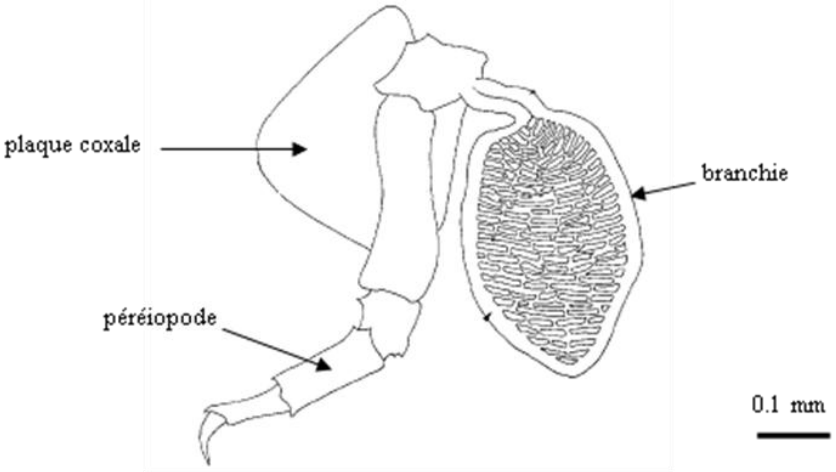


Figure I-14. Schéma d'une branchie de gammare *(adapté de Milne et Ellis, 1973)*

- *Mode de reproduction*

La reproduction des gammares est exclusivement sexuée et ovovivipare. Les mâles s'accrochent aux femelles, côté dorsal, grâce à leurs gnathopodes afin de permettre la formation d'un pré-copulât. Cette phase, appelée « phase de gardiennage », est couramment retrouvée chez les espèces dont la période de réceptivité des femelles est limitée dans le temps. La phase de pré-copulât perdure jusqu'à la mue des femelles qui représente le seul moment où les mâles peuvent les féconder. Pour que la fécondation des œufs ait lieu, les mâles doivent retourner la femelle et se placer de façon à ce que son dernier segment du mésosome, où aboutissent les canaux déférents, soit accolé au 5ème segment du mésosome de la femelle, où se situe l'issue des oviductes. Après fécondation des œufs, ces derniers sont libérés dans le marsupium des femelles où ils vont se développer jusqu'à la formation de juvéniles qui seront libérés dans le milieu extérieur lors de la mue suivante de la mère (Bollache, 2001).

Les gammares ont la capacité de se reproduire tout au long de l'année, avec généralement un pic de reproduction au printemps et en été, puis une diminution en automne (Pöckl, 1992). Au cours de leur vie, les femelles ayant atteint leur maturité sexuelle peuvent produire de 6 à 10 portées de juvéniles (Sutcliffe, 1993). La maturité sexuelle d'un gammare est dépendante de l'espèce ainsi que de la température du milieu comme il a été démontré par Pöckl *et al.* (1992). En effet, lorsque la température de l'eau était de 20°C, l'espèce *Gammarus roeseli* atteignait sa maturité sexuelle en 85 jours après 9 à 10 mues, alors que l'espèce *Gammarus fossarum* l'atteignait 11 jours plus tard. Lorsque la température de l'eau était de 8°C, *G. roeseli* et *G. fossarum* atteignaient leur maturité sexuelle plus tardivement, c'est-à-dire après 403 et 355 jours, respectivement.

- *Croissance*

Comme tous les arthropodes, les gammares possèdent un exosquelette (cuticule) ne leur permettant pas d'avoir une croissance continue. Cette dernière est donc discontinue et assurée par des phénomènes de mues successives. Le cycle de mue d'un gammare se décompose en 6 stades différents et dure en moyenne 30 jours à 12 °C (Sutcliffe, 1992). Dans un premier temps, deux stades « pré-mue », durant respectivement 1 et 3 jours, permettent un épaississement de la cuticule. Ensuite, les deux stades « inter-mue » se caractérisent par un décollement de l'ancienne cuticule et durent environ 9 jours chacun. Ce décollement est associé à un doublement de la perméabilité du gammare à l'eau (Lockwood et Inman, 1973). Enfin, les deux stades « post-mue » ont une durée respective de 3 et 5 jours, et se

caractérisent par les phénomènes d'exuviation (rejet de l'ancienne cuticule) et d'apparition de la nouvelle cuticule (Xuereb, 2009).

4.2. Intérêt et utilisation du gammare en écotoxicologie

Les gammares sont des invertébrés aquatiques faisant partie de la classe des crustacés amphipodes. Leur présence dans la plupart des milieux dulçaquicoles, marins ou terrestres (Barnard et Barnard, 1983), en font d'excellents modèles pour les études écotoxicologiques. Ce sont des organismes présent tout au long de l'année (cycle de vie holobiotique) et à de fortes densités qui peuvent atteindre plusieurs milliers d'individus par m² (Felten, 2003). Ils permettent ainsi de réaliser des suivis temporels d'impacts environnementaux sans être limité par la quantité d'organismes nécessaires lors d'études en laboratoire, ni trop perturber les dynamiques des populations lors des échantillonnages.

Les gammares ont un rôle majeur au niveau de l'écosystème, faisant d'eux de bons modèles pour les études relatives au changement d'échelle. En effet, en étant principalement détritivores (Dangles et Guérold, 2001; Kelly *et al.*, 2002), les gammares ont un rôle essentiel dans la chaîne trophique puisqu'ils participent à la production de la matière organique issue de la décomposition des feuilles (Forrow et Maltby, 2000). De plus, ils représentent une ressource alimentaire pour de nombreux organismes tels que les poissons, les oiseaux ou encore les amphibiens (Macneil *et al.*, 1999; 2000).

Les gammares sont souvent utilisés comme bioindicateurs de perturbations de par leur présence/absence, leur densité mais également leur dynamique de population (croissance, reproduction,…) (Rinderhagen *et al.*, 2000). En écotoxicologie, ils sont largement utilisés dans les études d'impacts de stress toxiques notamment dans la détermination de concentrations léthales 50 (CL_{50} – concentration de toxique menant à la mort de 50% des individus exposés) de polluants organiques (Adam *et al.*, 2010; Alonso *et al.*, 2009; Lukančič, 2010a; 2010b; Pantani *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1991) ou métalliques (Alonso *et al.*, 2009; Güven *et al.*, 1999; McLoughlin *et al.*, 2000; Pantani *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1991; Vellinger *et al.*, 2012; Wright et Frain, 1981). Les CL_{50} sont ensuite utilisées comme point de départ des études menées en laboratoire, faisant appel à l'utilisation de biomarqueurs afin d'appréhender l'effet d'un toxique ou d'un mélange de toxiques sur le métabolisme de l'organisme. Pour cela, divers biomarqueurs peuvent être étudiés à différentes échelles d'organisation biologique. On y retrouve des biomarqueurs:

- *moléculaires*: avec l'application de biomarqueurs de neurotoxiques comme l'activité de l'acétylcholinestérase (Kuhn et Streit 1994; McLoughlin *et al.*, 2000; Xuereb *et al.*, 2007; 2009), de biomarqueurs de reprotoxiques comme la vitellogénine (Gagné *et al.*, 2005; Geffard O. *et al.*, 2010; Xuereb *et al.*, 2011), de biomarqueurs de génotoxicité (Lacaze *et al.*, 2009; 2010a; 2010b) ou encore de biomarqueurs de défenses antitoxiques divers telles que les métallothionéines (Correia *et al.*, 2002; 2004), les Hsps (Schirling *et al.*, 2005) ou les enzymes antioxydantes (Sroda et Cossu-Leguille, 2011b),

- *physiologiques*: avec l'étude de paramètres telles que la respiration (Lukančič *et al.*, 2010b), l'ionorégulation (Brooks et Mills, 2003; Felten *et al.*, 2008) ou encore l'allocation énergétique (Naylor *et al.*, 1989; Maltby *et al.*, 1990; Maltby, 1992; 1994),

- *de l'individu*: avec l'étude de la croissance (Blockwell *et al.*, 1996; Roman *et al.*, 2007), de la locomotion ou ventilation (Lawrence et Poulter, 1998; De Lange *et al.*, 2006; 2009; Sornom *et al.*, 2010), mais également du comportement alimentaire (McLoughlin *et al.*, 2000; Maltby *et al.*, 2002),

- *de la population*: avec l'étude du sex-ratio ou encore de l'occurrence de l'intersexualité (Ford *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2008).

Tous ces paramètres permettent de mettre en évidence l'effet de contaminants sur l'organisme, pouvant avoir des effets à plus ou moins long terme sur la population et l'écosystème. Cependant, l'inconvénient de la plupart de ces études réside dans le fait qu'elles aient été menées en laboratoire, avec un seul élément toxique. Or, il est maintenant bien établi que dans l'environnement, les organismes sont soumis à une multitude de contraintes telles que la pollution multiple, les variations de pH et/ou de température... C'est pourquoi, des études en mésocosme ont permis de se rapprocher de conditions d'exposition et environnementales réalistes lors de l'étude des réponses des biomarqueurs, puisqu'elles permettent de reproduire un écosystème à une échelle réduite. Les études en mésocosme ayant pour modèle le gammare se sont principalement intéressées à l'effet de contaminants sur la croissance (Taylor *et al.*, 1994; Nanko-Drees *et al.*, 1999; Pascoe *et al.*, 2000). Toutefois, ces études, bien qu'elles soient plus réalistes que les études menées en aquarium au laboratoire, ne permettent pas de prendre en compte l'intégralité des paramètres abiotiques d'un environnement contaminé. Néanmoins, les gammares présentent l'avantage de pouvoir être transplantés sur des sites contaminés par des techniques d'encagements, offrant ainsi l'opportunité d'étudier l'intégralité des facteurs environnementaux susceptibles d'influencer

les réponses des biomarqueurs (voir paragraphe 1.4.), de même que les effets de mélange de polluants, sur les différents biomarqueurs à différents niveau d'organisation (Crane *et al.*, 1995; Maltby *et al.*, 2002; Dedourge-Geffard *et al.*, 2009; Coulaud *et al.*, 2011).

4.3. *Gammarus roeseli*

Il existe différentes espèces de gammares et l'espèce modèle utilisée au cours de ces travaux est *Gammarus roeseli*, un crustacé amphipode dont la systématique est présentée ci-dessous.

Embranchement	Arthropode
Sous-embranchement	Crustacé
Classe	Malacostracé
Ordre	Amphipode
Famille	*Gammaridae*
Genre	*Gammarus*
Espèce	*roeseli* (Gervais, 1835)

4.3.1. Origine

G. roeseli, originaire des Balkans (Karaman et Pinkster, 1977), a longtemps été qualifiée d'espèce exotique ou invasive, du fait de sa colonisation récente des eaux de surface de l'Ouest de l'Europe. En effet, Jażdżewski et Roux (1988) ont présenté le système danubien comme étant le réseau de grandes et moyennes rivières ayant favorisé la colonisation des eaux françaises par *G. roeseli* (**Figure I-15**). Il a également été suggéré que *G. roeseli* a colonisé les eaux du Rhin à partir du Danube à la suite d'intervention de l'Homme lors de transport de végétations aquatiques ou lors de la construction d'un canal reliant les deux fleuves en 1845. Cependant, la première observation de l'espèce *G. roeseli* dans les eaux françaises remonte à 1835 aux abords de la région parisienne (Jażdżewski, 1980). Cette espèce est maintenant qualifiée d'espèce naturalisée.

Gammarus roeseli est un amphipode préférant les cours d'eau à faible courant, de bonne qualité d'oxygénation et présentant une végétation aquatique abondante (Henry et Danielopol, 1999).



Figure I-15. Colonisation des cours d'eau d'Europe de l'Est par Gammarus roeseli originaire des Balkans *(d'après Jażdżewski et Roux, 1988)*

4.3.2. Identification

L'espèce *G. roeseli* est facilement reconnaissable des autres espèces de gammares grâce à sa carène dorsale porteuse de 3 spicules (**Figure I-16**). Ces spicules seraient une adaptation morphologique du gammare afin de se défendre contre d'éventuels prédateurs. En effet, Bollache *et al.* (2006) ont démontré par des expériences comportementales que la présence de spicules chez *G. roeseli* diminuait son taux de prédation par la truite *Salmo trutta*. Ce caractère a donc pu être favorable à *G. roeseli* pour la colonisation de milieux présentant déjà un amphipode natif (*e.g. Gammarus pulex*).

La reproduction étant sexuée, une population de *G. roeseli* est composée d'individus mâles et femelles. Il existe un dimorphisme de taille tel que, à âge adulte, les mâles mesurent environ 12 mm lorsque les femelles en mesurent environ 8. Si ce critère ne permet pas de réaliser une séparation précise des mâles et des femelles, un second dimorphisme sexuel au niveau des gnathopodes permet d'affiner la séparation des deux sexes, puisque les mâles possèdent des gnathopodes plus développées que les femelles (**Figure I-17**). Cette différence permet aux mâles de s'accrocher du côté dorsal de la femelle durant la période de gardiennage pré-copulatoire. Enfin, il est possible de distinguer les mâles des femelles par l'observation sous loupe binoculaire des papilles génitales au niveau ventrale du 7ème segment des mâles (**Figure I-18**).

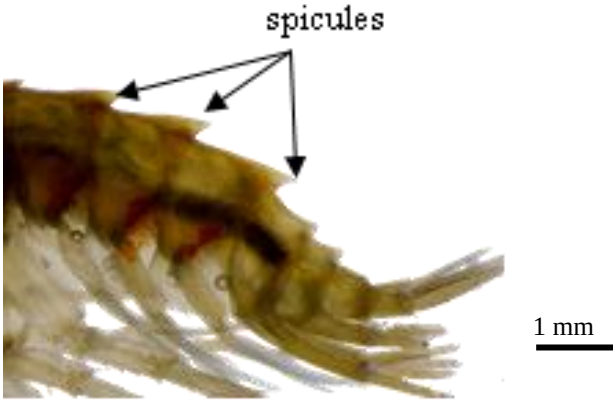


Figure I-16. Carène dorsale de G. roeseli composée de 3 spicules (photo: E. Gismondi)

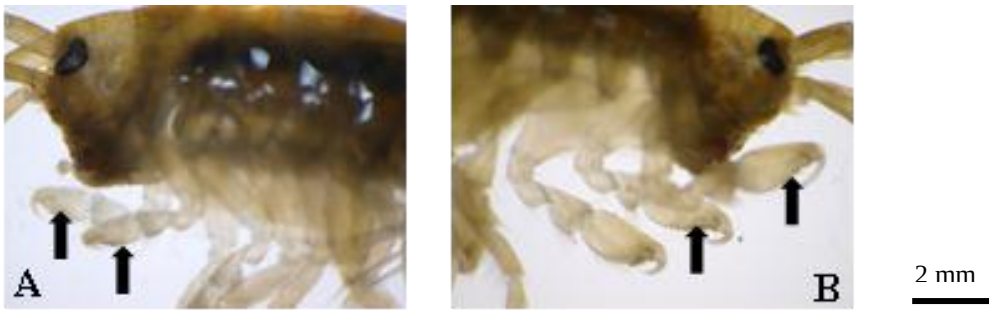


Figure I-17. Dimorphisme sexuel entre G. roeseli femelle (A) et mâle (B)
Les flèches noires indiquent les gnathopodes (photo: E. Gismondi)

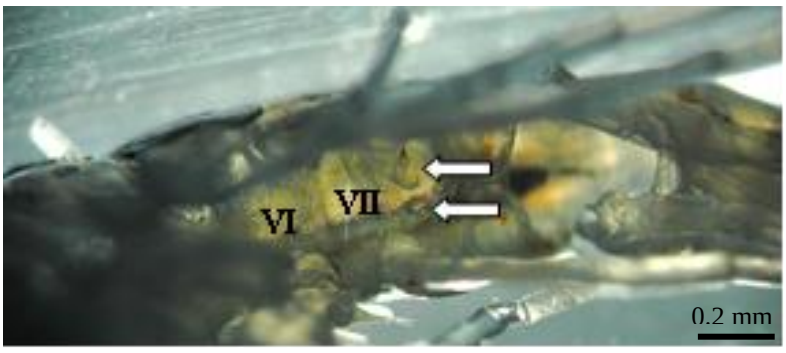


Figure I-18. Présence de papilles génitales (flèches blanches) au niveau du segment VII (VII) chez G. roeseli mâle (photo: E. Gismondi)

4.3.3. *G. roeseli* comme modèle d'étude

Cet amphipode a fait l'objet d'une étude de ses traits d'histoire de vie, c'est-à-dire l'étude de la croissance, du mode d'alimentation, ou encore du processus de mue, en comparaison avec l'espèce *G. fossarum* (Pöckl, 1995; Pöckl *et al.*, 2003). Du fait de son ancien caractère invasif, le comportement anti-prédateur de *G. roeseli* a également fait l'objet d'investigations afin de comprendre si celui-ci était influencé par la présence de prédateurs dans le milieu (Starry *et al.*, 1998), ou par la présence de signal de prédateurs (signal chimique) (Baumgärtner *et al.*, 2003). Ces processus ont plusieurs fois été mis en cause pour expliquer le potentiel invasif de cet amphipode. Par la suite, le caractère anti-prédateur de sa morphologie a été étudié, et il a été démontré que les spicules présents sur sa carène dorsale lui permettaient d'être moins consommé par un prédateur (Bollache *et al.*, 2006).

D'un point de vue écotoxicologique, très peu d'études traitant de l'impact de toxiques environnementaux ont utilisé *Gammarus roeseli* comme modèle biologique. Cependant, *G. roeseli* possède une large aire de répartition en Europe, offrant ainsi la possibilité d'utiliser un même outil sur différentes populations afin de standardiser l'évaluation de la qualité des milieux. *G. roeseli* offre également la possibilité de travailler sur des populations échantillonnables toute l'année, ainsi que sur les différents stades de développement (juvéniles, adultes). Il présente également un avantage pour les études *in situ*, puisque qu'il est facile de les transplanter sur le terrain à l'aide de systèmes d'encagements.

Néanmoins, *G. roeseli* a déjà été choisi comme modèle biologique afin d'étudier l'influence de facteurs abiotiques sur les activités des enzymes antioxydantes telles que la catalase, la superoxyde dismutase ou encore les glutathion peroxydases (Sroda et Cossu-Leguille, 2011b). Les mêmes auteurs ont également utilisé *G. roeseli* comme espèce naturalisée dans l'étude de l'impact d'une contamination au cuivre sur les systèmes de défenses enzymatiques, en comparaison à une espèce invasive, *Dikérogammarus villosus* (Sroda et Cossu-Leguille, 2011a); ceci afin d'étudier l'implication des systèmes de défense dans le caractère invasif de l'organisme. *G. roeseli* a également été le modèle biologique utilisé pour étudier l'effet de la salinité sur l'activité ventilatoire (battement de pléopodes) et la locomotion selon le sexe de l'individu et la température du milieu (Sornom *et al.*, 2010).

Si les études écotoxicologiques utilisant *G. roeseli* sont encore peu nombreuses, cette espèce a fait l'objet d'investigations poussées sur des interactions hôte-parasite. En effet, *G. roeseli* est un amphipode hôte de divers parasites et notamment de deux parasites étudiés au cours de ces travaux: l'acanthocéphale *Polymorphus minutus* et des microsporidies.

5. Le parasitisme

Le parasitisme est sans doute l'interaction la plus répandue dans le monde vivant, et il a été estimé que la moitié des espèces végétales ou animales connues sont des parasites (Bush, 2001). De manière générale, le parasitisme peut être défini comme une relation non symbiotique entre un organisme parasite et un organisme hôte. L'organisme parasite tire alors profit de son hôte par exemple en se nourrissant, s'abritant ou même se reproduisant par l'intermédiaire de ce dernier. Les méso et endoparasites puisent leurs nutriments ainsi que leur énergie directement de leur hôte.

Le gammare ne fait pas exception à la règle et se trouve être l'hôte de nombreux organismes parasites tel que des trématodes (Thomas *et al.*, 2000; Levri et Fisher, 2000; Helluy et Thomas, 2003; 2010), ou encore des cestodes (Stark, 1965; Franceschi *et al.*, 2007). Cependant le gammare est également infecté par deux autres taxons de parasites auxquels nous nous sommes intéressés dans ces travaux de thèse qui sont: un acanthocéphale, *Polymorphus minutus* et des microsporidies.

5.1. Les acanthocéphales

Les parasites acanthocéphales sont un phylum à part entière qui partage quelques similarités avec les plathelminthes. Par exemple, les acanthocéphales ressemblent aux cestodes de par leur absence de tractus digestif ou encore aux nématodes du fait de leur nombre invariable de stade larvaire et de leur sexe séparé. Ce phylum contient plus de 1000 espèces qui sont toutes parasitaires (de Meeûs et Renaud, 2002; Kennedy, 2006).

5.1.1. Morphologie et nutrition

Les acanthocéphales sont des organismes vermiformes à symétrie bilatérale, non segmentés et composés de deux parties: le proboscis et le métasome (**Figure I-19**). L'étymologie de leur nom fait référence à leur « tête pourvue d'épines » appelée le proboscis. C'est un organe rétractile permettant au parasite adulte de s'insérer dans la paroi intestinale de son hôte final grâce aux crochets qui le recouvrent. Une fois la paroi intestinale traversée, le proboscis forme un bulbe afin d'éviter un décrochement du parasite, dû aux mouvements du tractus digestif de l'hôte.

Les acanthocéphales, dépourvus de tube digestif, récupèrent de leur hôte l'intégralité des nutriments dont ils ont besoin. Les crochets du proboscis ayant créé des lésions au niveau intestinal de l'hôte, les nutriments vont s'échapper et pouvoir être absorbés par les téguments

du parasite (Starling, 1985). Cette diffusion à travers la surface du parasite est possible grâce à sa paroi en syncytium, paroi cytoplasmique uniforme comprenant plusieurs noyaux (Albrecht *et al.*, 1997).

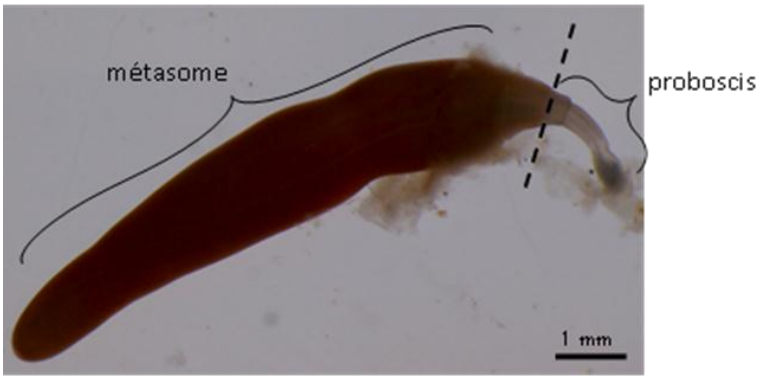


Figure I-19. Morphologie d'un acanthocéphale adulte. *Exemple de l'acanthocéphale Polymorphus minutus femelle adulte* (photo: E. Gismondi)

5.1.2. Reproduction

Les acanthocéphales étant des espèces gonochoriques, leur reproduction est exclusivement sexuée (Kennedy, 1993). Les deux sexes sont donc séparés et un dimorphisme sexuel permet de les différencier. De manière générale, les femelles sont plus grandes que les mâles. Cette différenciation de taille n'est visible qu'à partir de la 3ème semaine d'infection. A ce moment, les femelles mesurent le double de la taille des mâles (Crompton et Whitfield, 1968).

La petite taille des mâles leur permet de changer d'emplacement dans le tractus digestif de l'hôte augmentant ainsi leurs chances de féconder des femelles. Les mâles peuvent féconder plusieurs femelles; de même que les femelles peuvent être fécondées par plusieurs mâles. Au cours de chaque fécondation, les mâles sécrètent un cément en même temps que les spermatozoïdes, scellant ainsi le gonopore des femelles. Ce phénomène permet d'éviter une fécondation multiple et donc une compétition spermatique (Poulin et Morand, 2000). Un mâle peut également évincer un autre mâle de la compétition copulatoire en lui scellant la région génitale à l'aide de cément (Abele et Gilchrist, 1977).

Une fois la fécondation réalisée, les ovaires se décomposent en capsules ovariennes dans lesquels les œufs se développent jusqu'à maturité. En parallèle, la cavité utérine subit une modification pour devenir en quelque sorte un dispositif de tri permettant aux œufs matures d'être libérés dans le milieu extérieur et aux immatures d'être retenus (Whitfield, 1970). Les œufs matures libérés sont ensuite ingérés par un hôte intermédiaire qui est, la

plupart du temps, un invertébré. Les œufs se développeront dans leur hôte intermédiaire en trois stades larvaires successifs: acanthor, acanthella et cystacanthe (stade larvaire infectieux), avant d'être ingérés par un hôte final et de devenir à leur tour adultes. Le cycle de vie de l'acanthocéphale est décrit dans le chapitre 5.1.5., avec l'exemple précis de *Polymorphus minutus,* acanthocéphale étudié dans ces travaux.

5.1.3. Influence des parasites acanthocéphales sur le gammare

Les acanthocéphales, modèles des parasites manipulateurs, sont maintenant bien connu pour exercer une influence sur leur hôte intermédiaire, notamment en modifiant leur comportement. Bethel et Holmes (1973) ont les premiers démontré au cours d'expériences en laboratoire que l'acanthocéphale *Polymorphus marili*s, dont l'hôte final est un oiseau, entrainait des modifications du comportement de son hôte intermédiaire *Gammarus lacustris,* et notamment une inversion du géotactisme. Cette étude a par la suite soulevé l'hypothèse d'une modification comportementale du gammare par le parasite afin d'augmenter ses chances de transmission à son hôte définitif permettant ainsi de continuer son cycle de vie. Cette hypothèse a été vérifiée par Bethel et Holmes (1977) qui ont mis en évidence une augmentation de la prédation de *Gammarus lacustris* infecté par *Polymorphus paradoxus*, par son hôte définitif, le canard colvert.

L'acanthocéphale *P. minutus* ne fait pas exception à la règle et a été décrit comme manipulateur de son hôte intermédiaire puisqu'il entraîne une modification du géotactisme (Bauer *et al.*, 2005; Médoc *et al.*, 2006) et une altération du comportement anti-prédateur (Médoc et Beisel, 2009) de *G. roeseli*, mais aussi une castration totale des femelle de *G. pulex* (Bollache *et al.*, 2002).

Le **tableau I-2** regroupe plusieurs travaux, réalisés au cours de ces dernières décennies, ayant étudiés l'influence d'un parasite acanthocéphale sur leur hôte intermédiaire, le gammare. On peut remarquer que l'effet principal étudié dans cette association parasitaire est le phénomène d'altération du comportement du gammare afin de permettre à l'acanthocéphale d'être transmis à son hôte final, qui peut être soit un poisson pour l'espèce *Pomphorhynchus laevis,* soit un oiseau d'eau pour *P. minutus*.

Tableau I-2. Études ayant rapporté divers influences d'un parasite acanthocéphale sur son hôte intermédiaire amphipode

Hôtes	Parasites	Paramètres étudiés	Observations	Références
G. pulex	*P. laevis* *P. minutus*	Développement de l'hôte	↑ asymétrie	Alibert et al., 2002
G. pulex	*P. laevis*	Phototactisme Prédation	↑ phototactisme ↑ alimentation	Bakker et al., 1997
G. pulex	*P. laevis*	Comportement en contact visuel ou olfactif avec un prédateur	Individus infectés préfèrent l'eau avec odeur du prédateur En présence visuel d'un prédateur, aucune différence de comportement selon le statut d'infection	Baldauf et al., 2007
G. roeseli ***G. pulex***	*P. minutus*	Géotactisme	↓ géotactisme	Bauer et al., 2005
G. lacustris	*P. marilis*	Phototactisme	↑ phototactisme	Bethel et Holmes, 1973
G. lacustris	*P. paradoxus*	Altération du comportement	Apparition d'une modification du comportement 15 à 20 jours après la formation du cystacanthe	Bethel et Holmes, 1974
G. pulex	*P. laevis* *P. minutus*	Accouplement des mâles	↓ appariement	Bollache et al., 2001
G. pulex	*P. laevis* *P. minutus*	Fécondité Succès appariement Structure oocytes	*P. laevis* : diminution fécondité des femelles diminution appariement des mâles pas d'altération des oocytes *P. minutus:* castration des femelles mâles moins appariés altération des oocytes	Bollache et al., 2002
G. pulex	*P. minutus* *P. laevis* *P. tereticollis*	Activité prophénoloxydase	↓ activité prophénoloxydase	Cornet et al., 2009
E. tibaldii	*E. truttae* *P. minutus* *Dentritruncus truttae*	Potentiel de reproduction	Seules les femelles infectées par *P. minutus* ne présentent pas d'œufs dans leur marsupium	Dezfuli et al., 2008
G. pulex	*P. laevis (acanthella)*	Vulnérabilité à la prédation	Individus parasités par acanthella passe plus de temps dans les refuges. Individus parasités moins prédatés par la truite	Dianne et al., 2011
G. pulex	*Echinorhynchus truttae*	Alimentation	↑ alimentation	Dick et al., 2010
G. pulex	*E. truttae*	Composition de l'alimentation	↓ nombre de proies tuées Tendance à tuer uniquement de petites proies	Fielding et al., 2003
G. pulex ***G. roeseli***	*P. minutus*	Concentrations en caroténoïdes	Pas de différence significative quel que soit l'hôte	Gaillard et al., 2004
G. pulex	*P. laevis* *P. minutus*	Rôle de la couleur du parasite dans la transmission à l'hôte définitif	La couleur du parasite n'influence pas sa transmission à l'hôte définitif	Kaldonski et al., 2008
G. pulex ***G. roeseli***	*P. laevis*	Transmission à l'hôte définitif	↑ transmission de *G. pulex* uniquement	Lagrue et al., 2007
***G. tigrinus* (invasif)** ***G. duebeni celticus* (natif)**	*P. minutus*	Phototactisme et activité de l'individu	*G. tigrinus* ne présentait aucun parasite ↑ phototactisme et activité de *G. duebeni celticus*	MacNeil et al., 2003
G. pulex	*P. laevis*	Phototactisme	↑ phototactisme	McCahon et al., 1991
G. roeseli	*P. minutus*	Comportement en présence de prédateur	*D. villosus*: séparation des individus selon le statut parasitaire *A. desmarestii* : pas de ségrégation des individus	Médoc et al., 2006
G. roeseli	*P. minutus*	Alimentation Lipides neutres	↑ alimentation à base d'isopodes morts pas d'effet sur les lipides neutres	Médoc et al., 2011
G. roeseli	*P. minutus*	Vitesse et distance de fuite sous pression de prédation	↑ vitesse de nage, ↑ distance parcourue	Médoc et al. 2008
G. roeseli	*P. minutus*	Evitement hôte non-prédateur	↓ amplitude de l'habitat de *G. roeseli*	Médoc et Beisel, 2009a
G. pulex	*P. laevis* *P. minutus*	Prévalence Association interspécifique	Faible prévalence de *G. pulex* infectés par les 2 parasites Mâles parasités > femelles parasités	Outreman et al., 2002
G. pulex	*P. laevis*	Contenu en lipides et glycogène	[lipides]: femelles ovigères infectées < non-infectées [lipides]: femelles non-ovigères = mâles [glycogène]: infectés > non-infectés	Plaistow et al., 2001

Tableau I-2(suite). Études ayant rapporté divers influences d'un parasite acanthocéphale sur son hôte intermédiaire amphipode

Hôtes	Parasites	Paramètres étudiés	Observations	Références
G. pulex	*P. tereticollis*	Vulnérabilité Comportement anti-prédateur	↑ vulnérabilité Altération du comportement anti-prédateur	Perrot-Minnot et al., 2007
G. pulex	*P. laevis* *P. tereticollis* *P. minutus*	Composition en caroténoïdes Protection contre UVB	Différence de composition en caroténoïdes suivant le parasite Relation entre caroténoïdes et protection contre UVB	Perrot-Minnot et al., 2011
G. roeseli	*P. minutus*	Résistance à la salinité	CL_{50}	Piscart et al., 2007
Hyallela patagonica	*Acanthocephalus lucii* *Corynosoma* sp.	Teneur en caroténoïdes Reproduction	[Caroténoïdes]: infectés < non-infectés ↓ appariement et fécondité des femelles	Rauque et Semenas, 2009
G. pulex	*P. laevis*	Consommation d'oxygène en fonction de la température	A 20°C: ↓ consommation d'O_2 A 10°C : aucune différence	Rumpus et Kennedy, 1974
G. lacustris	*P. minutus*	Prévalence	Pic d'individus parasités en Avril et Août	Spencer, 1974
G. pulex	*P. minutus* *P. laevis* *P. tereticollis*	Altération phototactisme et géotactisme par sérotonine	Injection de sérotonine chez individus non-infectés mime la manipulation du parasite Manipulation du parasite liée à l'activité sérotoninergique du gammare	Tain et al., 2006
G. pulex	*P. minutus*	Comportement lors d'une perturbation olfactive (signal de poisson non-hôte)	Signal induit agrégation des infectés ou sains ↓ activité uniquement chez les sains	Thünken et al., 2010
G. lacustris	*P. marilis*	Taux de développement en fonction de la température et de la concentration d'oxygène dissous	Taux linéaire quand température entre 10 et 25 °C Quand infectés transférés de 23°C à 10°C pendant 28 jours : développement acanthocéphale diminue Quand infectés transférés de 23°C à 10°C pendant 40 jours : développement acanthocéphale augmente Diminution de 80% d'oxygène dissous : pas d'effet sur le développement de *P. minutus*	Tokeson et Holmes, 1982

Cette altération du comportement de l'hôte est souvent traduit par une augmentation du phototactisme et une diminution du géotactisme (Bethel et Holmes, 1973; 1974; MacNeil *et al.*, 2003; McCahon *et al.*, 1991; Tain *et al.*, 2006). Il a également été mis en évidence une altération du comportement anti-prédateur en diminuant par exemple son activité lors de la présence d'une odeur de poisson (Médoc *et al.*, 2006; Médoc et Beisel, 2009; Thünken *et al.*, 2010). De même, certains auteurs ont souligné une modification de l'alimentation des gammares parasités qui prédateraient alors davantage de petites proies et s'alimenteraient d'isopodes morts (Dick *et al.*, 2010; Fielding *et al.*, 2003; Médoc *et al.*, 2011). Cependant, rares sont les travaux ayant étudiés l'influence d'un acanthocéphale sur les défenses antitoxiques de son hôte intermédiaire, à l'exception du système immunitaire qui se trouve être diminué chez les individus infectés (Cornet *et al.*, 2009) et des caroténoïdes, présent à la fois chez le gammare et l'acanthocéphale (Perrot-Minnot *et al.*, 2011; Rauque et Semenas, 2009).

5.1.4. Acanthocéphales et contaminations environnementales

Très peu d'études, à ce jour, se sont intéressées à l'influence d'un parasite acanthocéphale sur son hôte lors de contaminations environnementales, alors que la survie du parasite dépend entièrement de la survie de son hôte. McCahon *et al.* (1988) ont suggéré que la présence du cystacanthe de *Pomphorhynchus laevis* n'avait pas d'influence sur les capacités de défense de *G. pulex* puisqu'aucune différence significative n'a été observée entre la CL_{50} des individus parasités et celle des individus sains lors d'une exposition au cadmium. Cependant, Brown et Pascoe (1989) ont montré un temps de réponse différent entre des individus infectés et des individus sains exposés à du cadmium. En effet, lors d'une exposition à 2,1 µg Cd/L, le temps léthal 50 (LT_{50} – temps après lequel 50% des individus sont morts) des individus *G. pulex* infectés par *P. laevis* était de 17,5 jours alors qu'il était de 42 jours pour les individus sains. Cependant, lors d'une exposition à 6 µg Cd/L, aucune différence significative n'avait été observée. Enfin, il a été démontré par Piscart *et al.* (2007) que *G. roeseli* infectés par *P. minutus* avait une meilleure résistance lors d'un stress salin que les individus non-infectés. La CL_{50} de *G. roeseli* parasités et non-parasités exposés à un stress salin pendant 72h étaient respectivement de 21,5 g/L et 12,6 g/L.

A notre connaissance, il n'existe que très peu d'études traitant de l'influence d'un acanthocéphale sur les défenses antitoxiques d'un gammare exposé à un contaminant. Ainsi, il a été démontré par Sures et Radszuweit (2007) que le cystacanthe de *P. minutus* empêchait la synthèse de protéines de choc thermique 70 (Hsp70) chez *Gammarus roeseli*, lors d'une perturbation thermique ou d'une exposition au palladium. Par ailleurs, en absence de

contaminant, Cornet *et al.* (2009) ont montré que l'activité prophénoloxydase de *G. pulex* (activité reflétant le système immunitaire des crustacés) était diminuée lors de la présence de l'un de ces trois parasites acanthocéphales: *Polymorphus minutus*, *Pomphorhynchus laevis* ou *P. tereticollis*.

A l'inverse du stade cystacanthe, les acanthocéphales adultes ont souvent été étudiés dans un contexte de contamination environnementale, et ont été démontrés comme des bioindicateurs sensibles de pollutions métalliques (**Tableau I-3**). Il a été mis en évidence que les acanthocéphales adultes étaient capables d'accumuler de grandes quantités de métaux lourds tels que le plomb et le cadmium (Sures *et al.*, 1997a), mais aussi l'argent, le cuivre, le zinc ou le nickel (Sures, 2002; Thielen *et al.*, 2004). Il a également été souligné dans ces études que les acanthocéphales adultes peuvent accumuler des concentrations de métaux supérieures à celles accumulées par leurs hôtes respectifs (**Tableau I-3**); et que leurs capacités d'accumulation des métaux seraient très largement supérieures à celles de *Dreissena polymorpha*, considérée comme le bioindicateur le plus sensible de pollution métallique (Sures *et al.*, 1997b).

5.1.5. *Polymorphus minutus*

Gammarus roeseli, étudié dans ces travaux, est l'hôte intermédiaire de parasites acanthocéphales et notamment de *Polymorphus minutus*, seul macro-parasite retrouvé sur nos sites d'études où il présente une prévalence allant de 0,08 en Mai à 0,13 en Août (Médoc et Beisel, 2009). La systématique de ce parasite est présentée ci–dessous:

Embranchement	Acanthocéphale
Classe	Palaeacanthocéphale
Ordre	Polymorphide
Famille	*Polymorphidae*
Genre	*Polymorphus*
Espèce	*minutus* (Goeze, 1782)

Comme tout acanthocéphale, *P. minutus* a un cycle de vie complexe, c'est-à-dire qu'il nécessite l'utilisation de deux hôtes pour le réaliser (**Figure I-20**). Son hôte intermédiaire est un crustacé amphipode, dans notre cas *G. roeseli*, et son hôte définitif, un oiseau d'eau de type canard colvert (*Anas platyrhynchos*). La transmission du parasite de l'hôte intermédiaire vers l'hôte final se fait par voie trophique.

Tableau I-3. Études ayant rapporté une bioaccumulation de métal par des parasites acanthocéphales en comparaison à leurs hôtes définitifs

Hôtes	Parasites	Métaux	Observations	Ratio [Parasite]/[Hôte]	Références
Barbus barbus	*P. laevis*	Cd, Zn, Pb	[*P. laevis*] > [*B. barbus*]	2860	Schludermann et al., 2003
Leuciscus cephalus	*P. laevis*	Pb, Cd	[*P. laevis*] > [*L. cephalus*]	Cd : 2700 Pb : 500	Sures et al., 1997a
Barbus barbus	*P. laevis*	Pt, Pd, Rh	[*P. laevis*] > [*B. barbus*]	Pt, Rh : 4000 Pd : 5000	Sures et al., 2005
Leuciscus cephalus	*P. laevis*	Pb	[*P. laevis*] > [*L. cephalus*]	1000	Sures et Siddall, 1999
Leuciscus cephalus	*P. laevis*	Cd	[*P. laevis*] > [*L. cephalus*]$_{muscle}$	400	Sures et Taraschewski, 1995
			[*P. laevis*] > [*L. cephalus*]$_{intestin}$	67	
Perca fluviatilis	*A. lucii*		[*A. lucii*] > [*P. fluviatilis*]$_{foie}$	3	
			[*A. lucii*] > [*P. fluviatilis*]$_{muscle}$	18	
			[*A. lucii*] > [*P. fluviatilis*]$_{muscle}$	133	
Asellus aquaticus	*A. lucci* (cystacanthe)	Cd	[*A. aquaticus*] > [*A. lucii*]	16	Sures et Taraschewski, 1995
	A. lucci (cystacanthe)		[*A. lucii*]$_{adulte}$ > [*A. lucii*]$_{cystacanthe}$	180	
Leuciscus cephalus	*P. laevis*	Pb	[*P. laevis*] > [*L. cephalus*]$_{intestin}$	284	Sures et al., 1994a
			[*P. laevis*] > [*L. cephalus*]$_{foie}$	771	
			[*P. laevis*] > [*L. cephalus*]$_{muscle}$	2700	
Perca fluviatilis	*A. lucii*	Pb	[*A. lucii*] > [*P. fluviatilis*]$_{muscle}$	367	Sures et al., 1994b
			[*A. lucii*] > [*P. fluviatilis*]$_{foie}$	122	
			[*A. lucii*] > [*P. fluviatilis*]$_{intestin}$	58	
Perca fluviatilis	*A. lucii*	Ba, Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Sr, Zn, Al, Ag, Cd, Cr, Ni, Pb, TI	[*A. lucii*] > [*P. fluviatilis*]$_{muscle}$	2 – 240	Sures, 2002
			[*A. lucii*] > [*P. fluviatilis*]$_{foie}$	1 – 32	
			[*A. lucii*] > [*P. fluviatilis*]$_{intestin}$	1,5 - 48	
Barbus barbus	*P. laevis*	As, Al, Ag, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Mg, Mn, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, TI, V, Zn	Ag, As, Ba, Bi, Cu, Ga, Mn, Pb, Sr, TI, Zn: [*P. laevis*] > [*B. barbus*]	-	Thielen et al., 2004
Anguilla anguilla	*Anguillicolla crassus* (nématode) *Paratenuisentis ambiguus* (acantho)	Pb	[*P. ambiguus*] > [*A. crassus*]	20 - 2000	Zimmermann et al., 1999
Anguilla anguilla	*Paratenuisentis ambiguus* (acantho)	Pt, Pd, Rh	[*P. ambiguus*] > [*A. crassus*]	20 – 2000	Zimmermann et al., 2005
			Pt : [*P. ambiguus*] > [*A. anguilla*]	40	
			Pd : [*P. ambiguus*] > [*A. anguilla*]	4	

- *Cycle de vie*

Le cycle de développement de *P. minutus* comprend deux hôtes (**Figure I-20**). Dans un premier temps, une femelle adulte *P. minutus* va libérer ses œufs dans la cavité intestinale de l'oiseau qui va lui-même les libérer dans le milieu via ses fèces. Le nombre d'œufs libérés peut être considérable puisqu'une femelle *P. minutus* peut produire au cours de sa vie adulte environ 13000 œufs (Crompton et Whitfield, 1968). Le stade œuf est le seul stade « libre » des acanthocéphales, et a été défini comme très résistant dans le milieu extérieur, puisqu'il peut encore être infectieux après 6 mois à 15°C, mais aussi après 2,5 mois à -22°C (Hynes et Nicholas, 1963).

Les œufs libérés vont ensuite se retrouver accrochés à une ressource alimentaire de *G. roeseli*, de type feuilles en décomposition. Une fois dans le tractus digestif de l'amphipode, l'œuf va éclore pour libérer le stade acanthor, et *G. roeseli* est alors dit infecté. L'acanthor transverse ensuite la paroi intestinale pour se loger dans l'hémocoele où il va se développer pour atteindre le stade acanthella (Dezfuli et Giari, 1999). L'acanthella va ensuite continuer son développement afin de devenir un cystacanthe qui est le stade infectieux pour l'hôte définitif. Le développement de *P. minutus* dans le gammare reste relativement long puisqu'à 16°C, le stade acanthor met 60 jours à se développer en cystacanthe (Butterworth, 1969).

G. roeseli ainsi parasité par *P. minutus* va être mangé et digéré par un oiseau d'eau, libérant ainsi le cystacanthe qui va dévaginer son proboscis afin de s'accrocher à la paroi intestinale de son hôte final. Une fois accroché, le parasite termine son développement, avant de se reproduire et recommence son cycle de vie.

- *Effets de la présence de P. minutus chez G. roeseli*

De même que la plupart des acanthocéphales (voir **Tableau I-2**), *P. minutus* influence le comportement de *G. roeseli*. Il a été démontré qu'il inverse le géotactisme de *G. roeseli*, résultant à une surexposition des gammares infectés à son hôte définitif, un oiseau d'eau (Bauer *et al.*, 2005; Médoc *et al.*, 2006). De plus, *P. minutus* module également le comportement anti-prédateur de son hôte intermédiaire, la résultante étant un évitement des hôtes non-définitifs (Médoc et Beisel 2009a, 2011; Médoc *et al.*, 2009b). Enfin, *P. minutus* a également été démontré comme modifiant le comportement alimentaire de *G. roeseli*, puisque les individus infectés consommaient plus d'isopodes morts que vivants et moins de feuilles, en comparaison à des individus non-infectés (Médoc *et al.*, 2011).

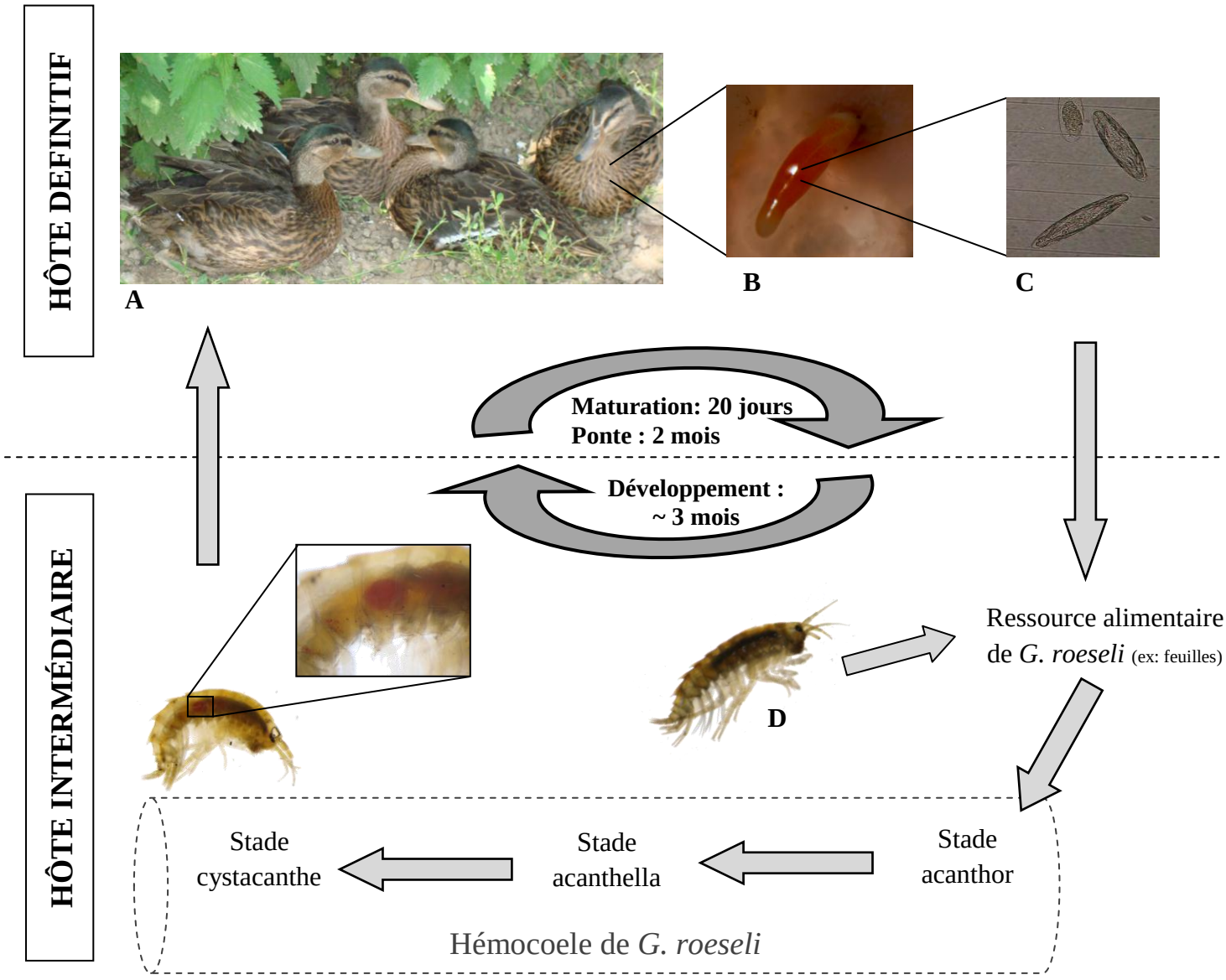


Figure I-20. Cycle de vie de Polymorphus minutus. *A: hôte final de type canard colvert, B: P. minutus femelle stade adulte accrochée à la paroi intestinale du canard (x25), C: œufs de P. minutus (x100), D: G. roeseli non infecté (x12,5), E: cystacanthe de P. minutus observé à travers la cuticule de G. roeseli (x32).* (photo: E. Gismondi)

P. minutus n'induit pas uniquement des changements au niveau du comportement de *G. roeseli* puisqu'il a été démontré qu'il provoquait une absence de réponses des Hsp70 chez des individus infectés lors d'une perturbation thermique ou d'une exposition au palladium (Sures et Radszuweit, 2007), pouvant conduire à une sensibilité plus élevée des individus parasités. Ces auteurs ont également démontré que le cystacanthe de *P. minutus* possédait son propre système de défense puisqu'il y a une augmentation de Hsp70 chez les parasites exposés.

5.2. Les microsporidies

Les microsporidies sont des microorganismes parasites eucaryotes unicellulaires. Ces endoparasites produisent des spores qui constituent à la fois un stade de résistance et de dissémination. La première espèce de microsporidie, *Nosema bombycis*, fut décrite en 1857 par Naegeli (Naegeli, 1857). Cette microsporidie parasite était alors la cause de la pébrine, maladie du ver à soie (*Bombyx mori*) provoquant des tâches sombres sur le corps de l'hôte. Les microsporidies sont donc des microorganismes pathogènes de l'ordre du micromètre et d'une très grande diversité puisqu'elles regroupent plus de 1200 espèces en 150 genres, différenciées aussi bien par leur morphologie, que par leur cycle de développement (Sprague *et al.*, 1992; Dunn et Smith, 2001). Les microsporidies ont également un large spectre d'hôtes, c'est pourquoi elles ont été mises en évidence dans pratiquement tous les groupes du règne animal (protozoaires, helminthes, arthropodes, oiseaux, poissons et mammifères).

5.2.1. Structure cellulaire et cycle de développement

Les microsporidies sont des parasites intracellulaires présents dans le cytoplasme des cellules hôtes. Elles sont incapables de se diviser et d'avoir une croissance à l'extérieur d'une cellule hôte. Il existe deux principaux stades morphologiques des microsporidies: le stade méronte et le stade spore (**Figure I-21**).

- *Le méronte*

Le méronte est le 1er stade de développement d'une microsporidie après avoir infecté une nouvelle cellule hôte (**Figure I-21C**). Le méronte est une cellule de forme allongée qui possède une structure très simple puisqu'il est composé d'un noyau isolé ou par paire, d'une enveloppe restant intacte tout au long de la division cellulaire et d'un cytoplasme dépourvu de mitochondries, de peroxysomes ou encore de granules de stockage. Une fois dans la

cellule hôte, le méronte va évoluer en sporonte caractérisé par un agrégat de matière en périphérie de la cellule (**Figure I-21D**). Ce dernier va continuer son développement pour atteindre le stade sporoblaste (**Figure I-21E**), durant lequel les organites sont synthétisés pour créer une spore mature infectieuse.

- *La spore*

La spore est la cellule infectieuse d'une microsporidie (**Figure I-21A**). A l'inverse du méronte, la spore possède une forte structure, ce qui fait d'elle le seul stade de développement d'une microsporidie parfaitement reconnaissable. La spore est une cellule résistante grâce à sa double paroi composée d'une endospore (paroi interne) et d'une exospore (paroi externe). Elle possède un ou deux noyaux centraux autour duquel s'agence le réticulum endoplasmique, qui est lui-même entouré du filament polaire. Ce dernier permet l'injection du sporoplasme dans une nouvelle cellule hôte afin de l'infecter au cours de la germination (**Figure I-21B**) (Dissanaike et Canning, 1957). Sous la forme de spore, certaines microsporidies peuvent résister dans l'environnement à des températures allant de 10°C à 30°C tout en conservant leur potentiel infectieux (Li *et al.*, 2003).

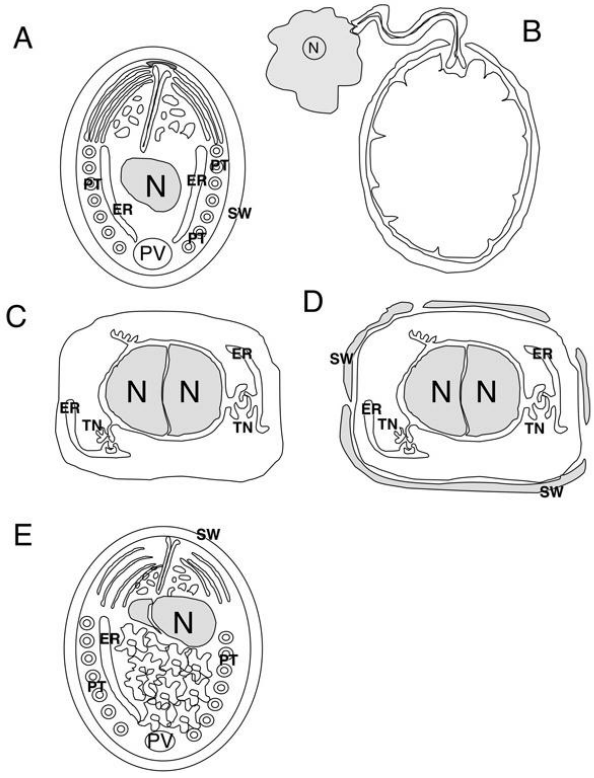


Figure I-21. Les différents stades de développement d'une microsporidies*. (A) la spore, (B) germination d'une spore, (C) le méronte, (D) méronte devenant sporonte, (E) le sporoblaste. ER: réticulum endoplasmique, TN: réseau tubulaire, N: noyau, PT: tube polaire (filament polaire), PV: vacuole postérieure, SW: paroi de la spore. (d'après Beznoussenko et al., 2007)*

5.2.2. La germination: processus d'infection

La germination d'une spore est le processus permettant l'infection d'une nouvelle cellule hôte (**Figure I-22**). Elle débute lors de conditions favorables, dont les facteurs déclencheurs sont encore très peu connus. Il peut s'agir de nombreux stimuli physiques ou chimiques tels qu'une variation du pH, une déshydratation, l'exposition aux ultraviolets ou encore la présence de certains cations ou anions (Undeen et Epsky, 1990). La germination fait intervenir une cascade d'événements rapides puisqu'elle s'effectue de manière générale en moins de 2 secondes. Le tube polaire peut atteindre une vitesse de 100 µm/s et le sporoplasme peut le traverser entièrement en seulement 15 à 500 ms pour se retrouver dans la nouvelle cellule (Frixione *et al.*, 1992).

Au cours de la germination, le filament polaire de la spore transperce l'apex de celle-ci (**Figure I-22B**) grâce à l'accroissement de la taille de la vacuole postérieure induisant une augmentation de la pression osmotique intrasporale (Frixione *et al.*, 1992). Ce phénomène permet également de propulser le sporoplasme au travers du filament polaire pour l'injecter dans la nouvelle cellule hôte (**Figure I-22D-E-F**).

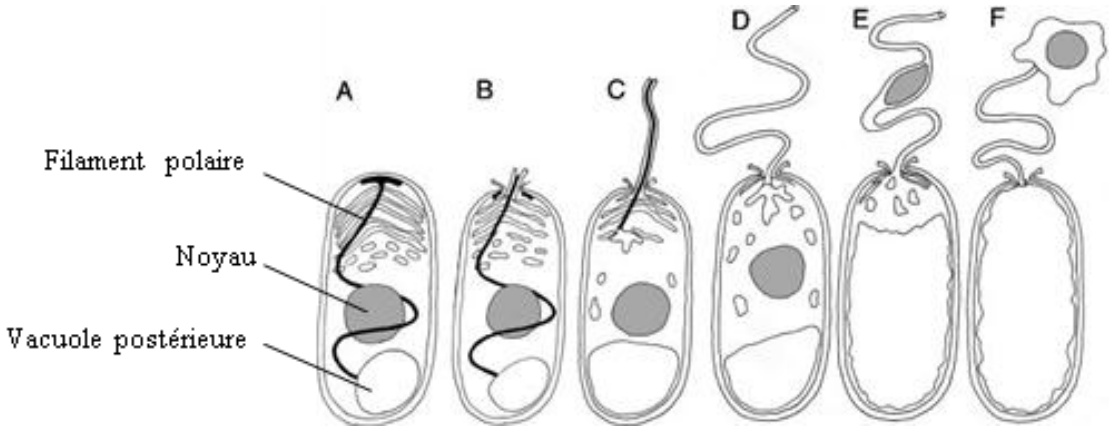


Figure I-22. Extrusion du filament polaire durant la germination d'une spore de microsporidie. *(A) spore en dormance. (B) début d'extrusion du filament polaire. (C) gonflement de la vacuole postérieure et extrusion du filament polaire. (D-E-F) sporoplasme forcé à traverser le filament polaire (d'après Keeling et Fast, 2002).*

5.2.3. Mode de transmission

Les microsporidies possèdent deux modes de transmission. Elles peuvent se transmettre soit par voie horizontale (d'un hôte A à un hôte B), soit par voie verticale (de la mère aux juvéniles). Certaines microsporidies peuvent utiliser ces deux voies de transmission au cours de leur cycle de vie (Dunn et Smith, 2001).

- *La transmission horizontale*

La transmission horizontale peut avoir lieu entre des organismes hôtes d'une seule ou de différentes espèces. L'hôte peut être infecté par voie alimentaire, vénérienne ou directement par l'invasion de l'épithélium. La transmission horizontale est la plus commune chez les microsporidies. Les spores sont ingérées par l'hôte, et après germination vont infecter l'ensemble des cellules intestinales pour ensuite se propager dans les autres tissus (Dunn et Smith, 2001). C'est le cas notamment de *Nosema apis*, microsporidie à transmission horizontale qui infecte l'abeille. L'abeille ingère des spores de *Nosema apis* qui vont coloniser les cellules épithéliales de l'intestin, donnant de nouvelles spores en moins de 48 heures. Cette production massive de spores va entrainer une destruction des cellules, permettant ainsi leur libération dans l'environnement via les fèces de l'hôte (de Graaf *et al.*, 1994). Ce mode de transmission induit en général la mort de l'hôte, reflétant ainsi une forte virulence du parasite.

- *La transmission verticale*

Contrairement au mode de transmission horizontale, la transmission verticale se fait de génération en génération. L'intérêt du parasite étant alors de minimiser les contraintes exercées sur son hôte, sa virulence se trouve réduite voire asymptomatique (Smith et Dunn, 1991; Ebert et Herre, 1996). Cette transmission ayant lieu durant la vitellogenèse de l'hôte (Terry *et al.*, 1997), les microsporidies sont localisées dans les tissus gonadiques de l'hôte. Les mérontes se développent, dans un premier temps, dans les cellules folliculaires jusqu'à la formation de spores qui vont ensuite germer et infecter les ovocytes matures pour être transmis à la descendance (**Figure I-23**). Le cycle de vie du parasite est alors synchronisé directement avec le cycle de reproduction de son hôte. Le mécanisme de transmission pendant le développement de l'hôte juvénile est cependant très peu connu et peut être différent selon l'espèce considérée. En effet, Weedall *et al.* (2006) ont démontré chez *G. duebeni* que l'espèce *Dictyocoela duebenum* infectait les cellules précurseurs de l'ectoderme, puis se transférait dans les cellules germinales, alors que l'espèce *Nosema granulosis* pouvait en plus d'infecter les cellules précurseurs de l'ectoderme, infecter directement les cellules germinales.

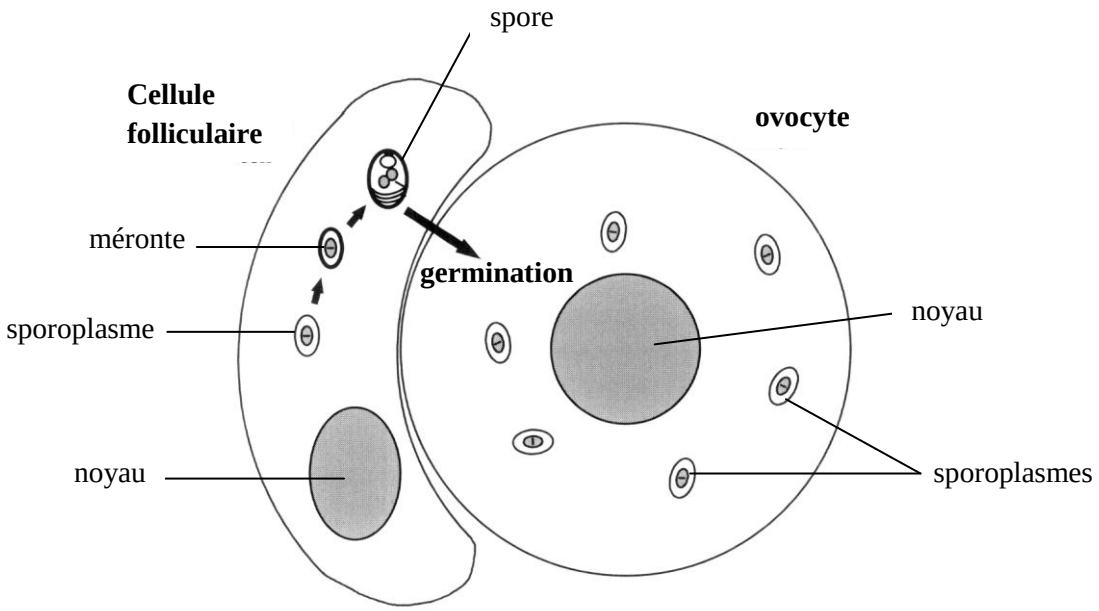


Figure I-23. Exemple d'invasion des ovocytes de Gammarus duebeni, hôte de Nosema granulosis, microsporidie ayant une transmission verticale *(d'après Dunn et al., 2001).*

La transmission verticale est principalement uniparentale. Les microsporidies étant transmises aux œufs via le cytoplasme, seules les femelles permettent cette transmission. En effet, les zygotes héritent rarement du cytoplasme des gamètes mâles, ce qui n'est pas favorable aux microsporidies. De plus, les gamètes mâles étant de très petites tailles, la prolifération des microsporidies n'est pas optimale (Dunn et Smith, 2001).

Du fait d'une transmission uniquement induite par les femelles, les microsporidies à transmission verticale ont dû s'adapter, et une stratégie permettant d'augmenter leur facteur de transmission s'est répandue. Un phénomène de féminisation des organismes juvéniles a été observé chez les femelles parasitées, notamment du genre *Gammarus* sp. (Dunn *et al.*, 1993).

- *Effets des microsporidies à transmission verticale chez Gammarus sp.*

Les microsporidies à transmission verticale n'induisent aucune virulence envers leur hôte puisque leur développement, leur survie et leur transmission dépendent entièrement de la survie de l'hôte (Smith et Dunn, 1991; Ebert et Herre, 1996).

Le **tableau I-4** regroupe plusieurs études sur l'interaction de parasite microsporidies à transmission verticale et *Gammarus* sp. Le principal effet des microsporidies étudiées chez le gammare est un phénomène de féminisation. Ce phénomène perturbe le sex-ratio de la population en convertissant les mâles génotypiques en femelles phénotypiques fonctionnelles (Dunn *et al.*, 1995; 2001).

Tableau I-4. Études de l'interaction entre des parasites microsporidies à transmission verticale et leur hôte Gammarus sp.

Hôte	Parasite	Paramètre étudié	Observation	Référence
G. duebeni	*Octosporea effeminans*	Description	Retrouvé dans le tissu gonadique des femelles uniquement Transmission verticale Absence de pathogénicité sur les tissus ou les cellules hôtes	Bulnheim et Vàvra, 1968
G. duebeni	*Octosporea effeminans* *Theleahania herediteria*	Féminisation Effet de facteurs abiotique	Féminisation influencée par facteur abiotique comme la salinité Exposition longue à faible température (< 4°C) peut avoir effet négatif sur les spores, donc tous les œufs ne sont pas parasités	Bulnheim, 1978
***G. duebeni* de 3 sites**	Microsporidies	Prévalence Efficacité de transmission Fitness de l'hôte	Prévalence différente selon le site de prélèvement Efficacité de transmission identique quelle que soit l'origine de l'hôte Fitness de l'hôte non influencée par les parasites	Dunn et Hatcher, 1996
G. duebeni	*N. granulosis*	Infection expérimentale	*N. granulosis* implantée chez femelle saine conduit à une infestation des gonades et à une transmission verticale couplée à une féminisation	Dunn et Rigaud, 1998
G. duebeni	*N. granulosis* *O. effeminans*	Charge parasitaire dans zygotes	Charge parasitaire de *N. granulosis* dans zygote > charge parasitaire de *O. effeminans*	Dunn et al., 1998
G. duebeni	Microsporidie	Efficacité de transmission	Transmission hautement efficace car 96% des œufs de femelles parasitées sont infectés	Dunn et al., 1995
G. duebeni	*N. granulosis*	Allocation spermatique	Allocation spermatique des mâles inférieure lorsque la femelles est infectée	Dunn et al., 2006
G. roeseli	*N. granulosis*	Survie Féminisation	↑ survie de l'hôte Féminisation des mâles	Haine et al., 2007
G. roeseli	Diverses microsporidies	Screening Fitness de l'hôte	3 espèces de microsporidies : *N. granulosis, D. roeselum, D. muelleri* Femelles infectées atteignent plus rapidement leur période de reproduction	Haine et al., 2004
***G. duebeni* de 3 sites**	*N. granulosis*	Adaptation locale Fitness de l'hôte	Implantation *N. granulosis* identique dans 3 populations hôtes de localités différentes ↓ fécondité et survie lors d'une infection artificiel Pas d'influence d'une infection naturelle sur fécondité et survie	Hatcher et al., 2005
G. duebeni	Microsporidies	Screening par PCR-RFLP	50% des femelles sont infectées par 2 espèces de microsporidies: *Nosema granulosis* (33%) et *Microsporidium* sp. (17%)	Hogg et al., 2003
G. duebeni	*N. granulosis* *Microsporidium* sp.	Féminisation des juvéniles	Femelles infectées produisent moins de mâles que les non-infectées	Ironside et al., 2003
G. duebeni	*N. granulosis*	Effet de la température sur féminisation et transmission	Pas d'effet de la température sur transmission à la génération F_1, mais ↓ transmission à la génération F_2 ↓ féminisation quand ↓ température	Kelly et al., 2002
G. duebeni	*N. granulosis*	Croissance et survie	Pas d'effet sur la survie ↓ croissance des juvéniles Condition de stress (compétition hôte et restriction alimentaire), ↓ croissance de *G. duebeni*	Kelly et al., 2003
35 populations de *G. duebeni* d'eaux douces et marines	Microsporidies	Screening par PCR	Microsporidies retrouvées dans 91 % des populations échantillonnées dont *N. granulosis, D. duebeni, D. muelleri* et *Pleistophora muelleri* 7 nouvelles microsporidies non identifiés ont été classées dans le genre *Microsporidium* sp.	Krebs et al., 2010
G. duebeni	*N. granulosis*	Activité glande androgène	*N. granulosis* manipule le sexe de l'hôte en empêchant la différenciation par la glande androgène et la production d'hormone androgène	Rodgers-Gray et al., 2004

Tableau I-4(suite). Études de l'interaction entre des parasites microsporidies à transmission verticale et leur hôte Gammarus sp.

Hôte	Parasite	Paramètre étudié	Observation	Référence
4 populations de *G. pseudolimnaeus*	*Dictyocoela* sp. *Microsporidium* sp.	Prévalence	*Dictyocoela* sp. est présent dans les 4 populations *Microsporidium* sp présent dans 2 populations Forte prévalence chez femelles (37-85%), mais faible chez mâles (5%)	Ryan et Kohler, 2010
		Fécondité	↑ dans les 2 populations, ↓ dans 1 population et inchangée dans la 4ème population	
Divers amphipodes	Divers microsporidies	Transmission verticale	11 espèces de microsporidies détectées dans 16 espèces hôtes Prévalence supérieure chez les femelles Transmission verticale retrouvée dans toutes les branches de l'arbre phylogénétique	Terry et al., 2004
G. duebeni	*Nosema* sp.	Distribution cellulaire	Localisées dans gonades, principalement follicules primaires et secondaires Sporogonie dans cellules folliculaires et synchronisation avec vitellogenèse	Terry et al., 1997
G. duebeni	*Nosema* sp.	Prévalence	46% des femelles sont infectées	Terry et al., 1998
		Transmission verticale	Forte transmission verticale: 91% des embryons sont infectés	
		Charge parasitaire	Forte charge parasitaire (288 parasite/embryons)	
		Croissance	↓ croissance	
G. duebeni	*D. duebenum* *N. granulosis*	Distribution microsporidies durant embryogenèse	*D. duebenum* replique durant les 1ères divisions cellulaires de l'hôte contrairement à *N. granulosis* *D. duebenum* et *N. granulosis* infectent cellules précurseurs de l'ectoderme *N. granulosis* infecte également directement les cellules germinales	Weedall et al., 2006

La féminisation a donc un effet direct sur la population puisqu'elle induit une augmentation du nombre de femelles infectées capables de transmettre le parasite aux générations futures (Dunn *et al.*, 1993; 1995). En effet, Dunn *et al.* (1993) ont démontré que 90% des juvéniles provenant d'une femelle *Gammarus duebeni* infectée par des microsporidies à transmission verticale, devenaient des femelles. L'hypothèse d'une féminisation de *G. duebeni* induit par *Nosema* sp. a également été vérifiée par Dunn et Rigaud (1998). Le mécanisme de différenciation sexuelle des amphipodes étant sous le contrôle des hormones de la glande androgène (Charniaux-Cotton et Payen, 1985), il a été suggéré que les microsporidies pourraient supprimer le développement de cette glande (Rigaud *et al.*, 1997; Rodgers-Gray *et al.*, 2004) provoquant ainsi une féminisation des juvéniles (Ironside *et al.*, 2003). L'influence de microsporidies sur la survie de son hôte dépend de l'espèce hôte. Il a été démontré que *Nosema granulosis* n'avait pas d'influence sur la survie de *Gammarus duebeni* (Kelly *et al.*, 2003; Hatcher *et al.*, 2005), mais augmentait celle de *Gammarus roeseli* (Haine *et al.*, 2007).

5.2.4. Le genre *Dictyocoela* sp.

Le genre *Dictyocoela* contient plusieurs espèces de microsporidies parasites de gammare incluant notamment des microsporidies féminisantes telles que *D. duebenum* et *D. muelleri* (**Tableau I-5**). Ce genre a été défini par Terry *et al.* (2004) qui a décrit 6 *Dictyocoela* sp. sur la base de différences au niveau de la séquence 16S de l'ADN ribosomal.

A notre connaissance, très peu d'études ont eu pour thème l'effet de microsporidies du genre *Dictyocoela* sur un hôte *Gammarus* sp. Cependant, il a été défini que ces microsporidies sont transmises verticalement et qu'elles ont une efficacité de transmission à la descendance d'environ 55% (Haine *et al.*, 2004). Dans cette même étude, les auteurs ont démontré que la prévalence de *D. muelleri* et *D. roeselum* chez *G. roeseli* était constante au cours de l'année, mais pouvait varier selon le site d'échantillonnage. En effet, les auteurs ont déterminé que dans la rivière Ouche (Côte d'Or, France), *D. muelleri* était présente chez 35% des femelles infectées alors que *D. roeselum* ne l'était que chez 10% des femelles parasitées. Inversement, dans la rivière Thille (Côte d'Or, France), *D. muelleri* et *D. roeselum* étaient respectivement présentes chez 6% et 58% des femelles infectées.

Tableau I-5. Espèces du genre Dictyocoela sp. identifiées chez différents amphipodes *(d'après Wilkinson et al., 2011)*

Espèces	Hôtes	Références
Dictyocoela duebenum	*Gammarus duebeni*	Hogg et al., 2003
D. duebenum	*G. duebeni*	Krebes et al., 2010
D. muelleri	*G. roeseli*	Terry et al., 2004
D. muelleri	*G. duebeni*	Krebes et al., 2010
D. berillonum	*Echinogammarus berilloni*	Terry et al., 2004
D. cavimanum	*Orchestia cavimana*	Terry et al., 2004
D. deshayesum	*Talorchestia deshayesei*	Terry et al., 2004
D. gammarellum	*Orchestia gammarellus*	Terry et al., 2004
Dictyocoela sp.	*G. fossarum*	GenBank
Dictyocoela sp.	*G. lacustris*	GenBank
Dictyocoela sp.	*Dikérogammarus haemobaphes*	GenBank
Dictyocoela sp.	*Gmelinoïdes fasciatus*	GenBank

6. Le cadmium

6.1. Généralités

Le cadmium (Cd) est un métal de transition. C'est un sous-produit de l'industrie du zinc qui a couramment été utilisé comme stabilisants des plastiques et pigments de peinture, mais également dans les opérations de cadmiage visant à lutter contre la corrosion de l'acier. En 1997, il a été estimé en France que sa répartition dans les différents secteurs d'activités était la suivante: batteries 75%, pigments 12%, cadmiage 8% et stabilisants 5%. De nos jours, l'utilisation du cadmium est en forte baisse du fait de nombreuses interdictions ordonnées par la Commission Européenne REACH (Directive 76/769/EEC). La décision la plus récente de cette Commission Européenne est l'interdiction de l'utilisation du cadmium dans la joaillerie (montres, bijoux) depuis décembre 2011.

Bien que le cadmium soit extrait du sol d'anciennes mines de zinc, il peut se retrouver facilement dans les eaux de surface par effet de lessivage, mais aussi par les effluents d'industries. Il peut alors facilement être bioaccumulé par les algues ($1636 < BCF^{1} < 23143$), les poissons ($0,5 < BCF < 6484$) ou les invertébrés ($396 < BCF < 17560$), provoquant ainsi

[1] Le facteur de bioaccumulation (BCF) désigne le rapport entre la concentration d'un composé chimique dans l'organisme vivant et celle dans le milieu d'exposition.

des effets néfastes sur l'organisme (INERIS, Septembre 2011). En Europe, il a été décidé que la concentration maximale admissible dans l'eau potable était de 5 µg/L (DC 98/83/EC, 1998).

6.2. Toxicité du cadmium

Le cadmium, métal non-essentiel pour les organismes, a un très fort pouvoir inhibiteur d'activités enzymatiques (Lockwood, 1976). Sa forte solubilité lui confère un caractère très toxique pour les organismes aquatiques (Taylor, 1983); c'est pourquoi, le cadmium est considéré comme un métal de forte préoccupation dans les environnements d'eaux douces (Canadian Environmental Protection Act, 1994).

Le cadmium a été décrit comme toxique notamment pour la reproduction des organismes comme cela a été démontré chez *Daphnia magna* exposée à 0,17 µg Cd/L pendant 21 jours (Biesinger et Christensen, 1972). La fécondité du copépode *Acartia tonsa* est également diminuée après 96 heures d'exposition à 30 µg Cd/L (Toudal et Riisgard, 1987). Ce métal peut aussi provoquer des anomalies de développement puisqu'il diminue le poids ainsi que la longueur à la fourche d'alevins de saumons exposés à 0,47 µg Cd/L pendant 46 jours (Rombough et Garside, 1982). De même, il provoque des modifications structurales et des destructions tissulaires, par exemple sur les branchies de *Penaeus japonicus* exposés pendant 4 jours à 2 et 4 mg/L de cadmium (Soegianto *et al.*, 1999).

Comme tout métal de transition, le cadmium peut induire un stress oxydant chez les organismes. Sa toxicité a donc également un effet sur les défenses antioxydantes des individus. Il a été décrit chez le gastéropode *Hexaplex trunculus* qu'une intoxication au cadmium entrainait une augmentation de l'activité de la catalase alors que celle de la glutathion-S-transférase était diminuée (Roméo *et al.*, 2006). De même, une augmentation de la concentration en métallothionéines a été observée chez le crabe *Cancer pagurus* (Overnell et Trewhella, 1979) ainsi que chez deux bivalves *Pyganodon grandis* (Wang *et al.*, 1999) et *Ruditapes decussatus* (Hamza-Chaffai *et al.*, 2000) exposés à ce toxique.

Les amphipodes ont également été utilisés comme modèles biologiques dans les études d'impacts du cadmium sur les invertébrés, tant au niveau de leurs défenses qu'au niveau de leur survie (**Tableau I-6**). De nombreuses études ont déterminé les CL_{50} du cadmium chez différents amphipodes et à différents temps d'exposition. Il a notamment été démontré que la CL_{50} de *G. pulex* diminuait au cours du temps (Felten *et al.*, 2008). Alonso *et al.*, (2009) ont mis en évidence que les adultes des espèces *G. pulex* et *G. fossarum* étaient

plus résistants que leur juvéniles respectifs. Certaines études ont souligné la capacité d'un amphipode à bioaccumuler le cadmium (Abel et Barlocher, 1988; Sundelin, 1983; Wright, 1980, Felten *et al.*, 2008; Geffard *et al.*, 2010). L'entrée du cadmium dans l'amphipode provoque alors des dysfonctionnements de l'organisme, notamment au niveau de l'ionorégulation qui se trouve être diminuée, probablement à cause d'une destruction branchiales (Issartel *et al.*, 2010). Des modifications des réponses des systèmes antitoxiques ont également été mises en évidence telles qu'une augmentation des protéines de choc thermique (Hsp), ou une diminution des activités peroxydases (Schill *et al.*, 2003; Timofeyev *et al.*, 2008).

Tableau I-6. Études ayant rapporté des effets du cadmium sur des amphipodes

Espèces	Conditions	Paramètres étudiés	Observations	Références
G. fossarum	Exposition avec ou sans nourriture	Bioaccumulation Survie	En présence de nourriture, ↓ survie et ↑ bioaccumulation	Abel et Bärlocher, 1988
G. pulex **adulte** **juvénile** ***G. fossarum*** **adulte** **juvénile**	0,3 - 0,5 - 0,7 - 1,0 - 2,0 mg/l 0,1 - 0,3 - 0,5 - 0,7 - 1,0 mg/l 0,1 - 0,3 - 0,5 - 0,7 - 1,0 mg/l 0,05 - 0,1 - 0,3 - 0,5 - 0,7 mg/l	CL_{50}-$_{48h}$ / CL_{50-96h}	48h *G. pulex*: adulte: 8 mg/L juvénile: 1,5 mg/L *G. fossarum :* adulte: 1 mg/L juvénile: 0,2 mg/L 96h *G. pulex*: adulte: 1,8 mg/L juvénile: 0,25 mg/L *G. fossarum*: adulte: 0,6 mg/L juvénile: 0,1 mg/L	Alonso et al., 2009
G. pulex	7,5 et 15 µg/L	Suivi CL_{50} Bioaccumulation/Mortalité Na/K ATPase Comportement (ventilation, nourrissage)	CL_{50-96h} = 82,1 µg/L $CL_{50-120h}$ = 37,1 µg/L $CL_{50-168h}$ = 21,6 µg/L $CL_{50-264h}$ = 10,6 µg/L exposés > témoins Na/K ATPase ↑ chez exposés Comportement ↓ chez exposés	Felten et al., 2008
G. fossarum	0 - 6,5 - 25 µg/L	Bioaccumulation dans différentes fractions subcellulaire	Cd majoritairement accumulé dans la fraction cytosolique	Geffard A. et al., 2010
G. fossarum	15 µg/L	Osmorégulation Structure branchiales	↓ osmorégulation Destruction branchiales	Issartel et al., 2010
G. pulex		CL_{50-48h}	juvéniles: 0,019 mg/L adulte: 4,7 mg/L	McCahon et Pascoe, 1988
G. fossarum		Sensibilité au cadmium en fonction du pH	↑ sensibilité quand ↑ pH	Muskó et al., 1990
Echinogammarus meridonalis	2 - 4 - 6 µg/L	CL_{50-96h} Alimentation	CL_{50-96h} = 36,17 µg/L ↓ alimentation quand ↑ [Cd]	Pestana et al., 2007
G. fossarum	8 - 16 - 31 - 62 - 125 - 250 - 500 - 1000 - 2000 µg/L	Survie Réponse Hsp70	Forte mortalité des femelles Femelles plus sensibles ↑ Hsp70 aux faibles concentrations mais ↓ aux fortes concentrations	Schill et al., 2003
G. pulex	Cd: 5 - 10 - 20 - 50 µg/L Zn: 50 - 100 - 200 - 300 µg/L	Tolérance au cadmium Bioaccumulation	↑ tolérance lors d'une pré-exposition à 20 µg Cd/L et 200 µg Zn/L ↑ tolérance liée à ↑ protéines MT-like Pas d'effet de la pré-exposition sur bioaccumulation	Stuhlbacher et Maltby, 1992
Pontoporeia affinis	0 - 6,3 - 41 - 127 µg/L	Bioaccumulation Embryogenèse	Accumulation de Cd ↑ Cd, ↑ mortalité des juvéniles	Sundelin, 1983
Eulimnogammarus verrucosus ***Eulimnogammarus cyaneus*** ***G. lacustris***	0,02 - 0,16 - 5 mg /L	Hsp Catalase Peroxydases	*E. verrucosus*, *E. cyaneus*, *G. lacustris*: ↓ peroxydases, ↑ Hsp Catalase: réponse uniquement chez *G. lacustris*	Timofeyev et al., 2008

Tableau I-6(suite). Études ayant rapporté des effets du cadmium sur des amphipodes

Espèces	Conditions	Paramètres étudiés	Observations	Références
G. pulex	0 - 2 - 3,8 - 8 - 14,9 - 27 - 56,7 µg/L	CL_{50}	$CL_{50\text{-}240h}$ = 10,55 µg/L	Vellinger et al., 2012
		Battement de pléopodes	↓ battements de pléopodes après exposition 240h à des concentrations supérieurs à 10,55 µg/L	
G. lawrencianus	12 - 62 - 125 - 250 - 500 µg/L	Activité de nages horizontale et verticale	↓ nage horizontale aux fortes concentrations ↓ nage verticale aux faibles concentrations	Wallace et Estephan, 2004
G. pulex		Bioaccumulation	Accumulation de Cd dans cuticule puis hépatopancréas	Wright, 1980
		Influx de calcium	Inhibition de l'influx de calcium	
G. pulex	0,5 mg/L	CL_{50}	$CL_{50\text{-}48h}$ = 0,68 mg/L $CL_{50\text{-}96h}$ = 0,12 mg/L	Wright et Frain, 1981
		Concentration en calcium	↑ concentration calcium ↓ toxicité du cadmium	
		Mue	Individus en post-mue plus sensible que ceux en intermue	
Elasmopus rapax	de 0,25 à 5,5 µM	CL_{50}	$CL_{50\text{-}48h}$ = 4µM $CL_{50\text{-}96h}$ = 1,6 µM	Zanders et Rojas, 1992
		Consommation d'O_2	↓ consommation O_2 après exposition à 0,5 µM	

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

1. Sites d'étude

L'espèce *Gammarus roeseli*, utilisée comme modèle d'étude, a été échantillonnée dans la Nied française en Moselle (57), sur deux sites de prélèvements situés dans des communes voisines de 10 km: Laquenexy (49° 05' N, 6° 19' E) et Rémilly (49° 00' N, 6° 23' E) (**Figure II-1**). Ces deux sites possèdent des caractéristiques physico-chimiques semblables (**Annexe 1**).

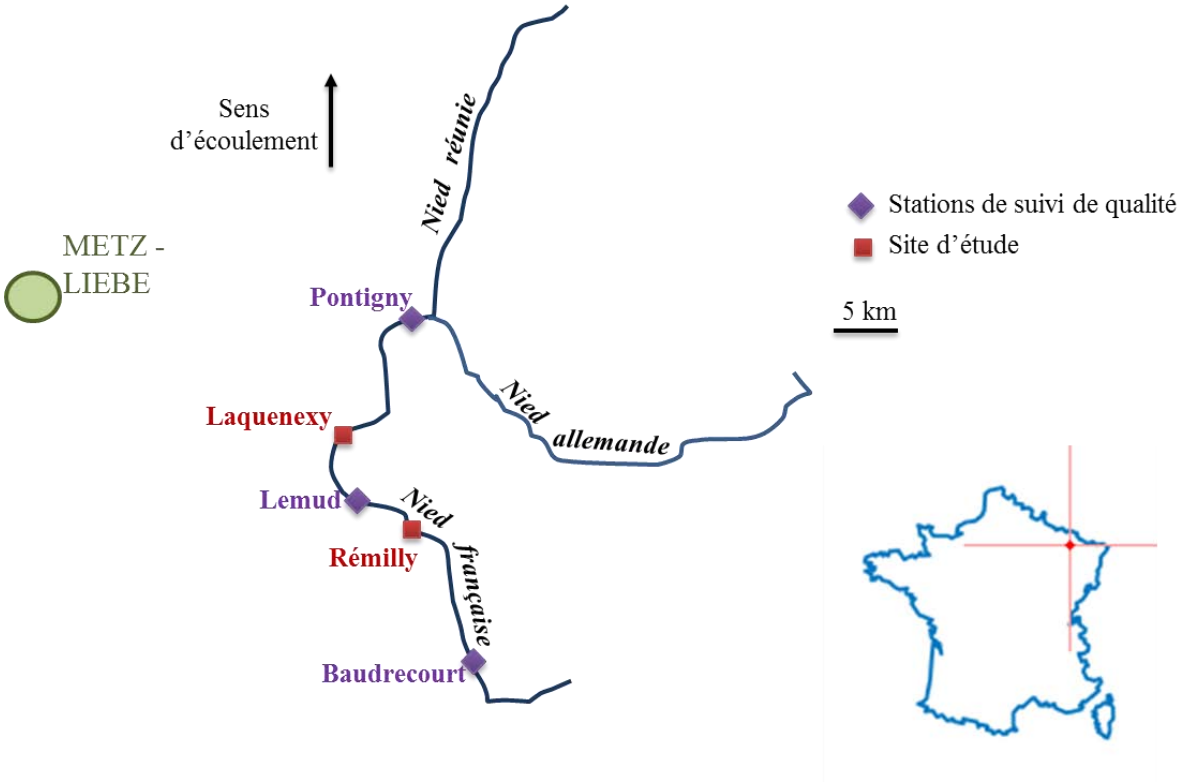


Figure II-1. Carte de la Nied localisant les sites de prélèvements (carré rouge), les stations de suivi de la qualité de l'eau (losange violet) et le laboratoire LIEBE (rond vert)

1.1. Caractéristiques et intérêt de la Nied française

La Nied française est une petite rivière de Moselle (57) prenant sa source dans la commune de Marthille, longue de 59 km et drainant un bassin versant de 504 km² principalement constitué de prairies et de champs agricoles. Son régime hydrologique est un régime pluvial et son débit moyen a été estimé à 3,9 m^3/seconde par la DIrection Régionale de l'ENvironnement (DIREN – Banque Hydro, Station A9752010).

La Nied française représente un site d'étude d'intérêt de par: (*i*) sa proximité par rapport au laboratoire (~20km), facilitant ainsi les campagnes d'échantillonnages et les transferts d'organismes, (*ii*) sa faible contamination anthropique permettant le prélèvement

d'organismes très peu acclimatés à un milieu perturbé, (*iii*) l'abondance de l'amphipode *G. roeseli* et (*iv*) la présence de parasites chez *G. roeseli* tel que l'acanthocéphale *P. minutus*, unique macro-parasite d'amphipode présent, ainsi que des microsporidies à transmission verticale, *D. roeselum* et *D. muelleri*.

1.2. Qualité écologique

Trois stations situées le long de la Nied française permettent le suivi de la qualité du cours d'eau: à Baudrecourt, Lemud et Pontigny (d'amont en aval) (**Figure II-1**). Les Indices Biologiques Globaux Normalisés (IBGN) mesurés à Baudrecourt et Pontigny de 2002 à 2009 évaluent la qualité biologique de la Nied française comme étant bonne. Cet indice reflète la qualité globale de la rivière (eau et habitat physique) à partir des inventaires d'invertébrés benthiques qui y vivent. Pour leur part, les Indices Biologiques Diatomiques (IBD), plutôt sensibles à la qualité physico-chimique de l'eau, révèlent sur ces trois stations une eau de qualité moyenne en 2005. La Nied française présente donc très globalement une qualité d'eau et/ou d'habitat qui peut être qualifiée de moyenne à bonne.

2. Matériel biologique

G. roeseli est l'espèce amphipode utilisée comme modèle biologique dans ces travaux de thèse. Afin de réaliser les différentes expérimentations souhaitées, il a été nécessaire d'effectuer plusieurs campagnes d'échantillonnages sur les deux sites d'études précédemment décrits.

2.1. Technique de prélèvement

Les différents échantillonnages de *G. roeseli* sur nos sites de prélèvements ont été réalisés par deux méthodes généralement conduites en parallèle afin de garantir un nombre d'individus suffisant (**Figure II-2**).



***Figure II-2**. **Matériels utilisés pour l'échantillonnage de G. roeseli**: tamis de 500 µm de vide maille (gauche) et pièges artificiels (droite)*

L'échantillonnage des gammares a été réalisé à l'aide de tamis de mailles 500 µm utilisés pour racler la végétation présente le long des berges et récupérer les organismes qui y vivent accrochés.

Par ailleurs, des pièges ou habitats artificiels ont été utilisés et laissés sur site. Ce sont de petites cages en plastiques remplies de pierres et de feuilles permettant ainsi de mimer les habitats convoités pour les gammares, à savoir des emplacements de faible courant et présentant une forte ressource alimentaire. Ces pièges ont été installés le long des berges et laissés pendant toute la durée des travaux de thèse afin de permettre leur colonisation régulière par les gammares (**Figure II-2**). Lors des campagnes d'échantillonnage, les pièges sont secoués au-dessus d'un tamis de maille 500 µm afin de récupérer l'intégralité des organismes présents dans cet habitat artificiel.

2.2. Tri des organismes

Une fois prélevés, on procède à une étape de vérification de l'espèce *G. roeseli*. En effet, *G. roeseli* possède des spicules sur sa carène dorsale. Les individus sont ensuite sexés grâce à la taille des gnathopodes, plus grandes chez les mâles (voir chapitre I, paragraphe 4.3.2.). La présence du cystacanthe de l'acanthocéphale *P. minutus* est également identifiée par observation de la présence d'un point rouge-orangé vif au travers de la cuticule (voir chapitre I, paragraphe 5.1.5.). Les individus ainsi triés sont placés dans des bidons en plastique de 1 ou 2 L contenant de l'eau de rivière et maintenus dans la rivière pour limiter les variations de température avant le transfert au laboratoire. Au cours de l'échantillonnage, l'eau des bidons est généralement renouvelée 2 à 3 fois pour éviter les variations de température et la diminution de l'oxygène.

Il est à noter qu'au cours de ces échantillonnages, d'autres espèces dulçaquicoles ont pu être présentes dans les tamis et pièges. Une attention particulière a alors été apportée lors du tri pour remettre à l'eau ses espèces non étudiées afin de ne pas endommager la faune des sites d'études.

Une fois transférés au laboratoire, les individus prélevés ont été à nouveau triés afin de d'affranchir de toute erreur de tri possible sur le terrain. Par la suite, selon l'expérimentation souhaitée, les individus *G. roeseli* ont été: (*i*) soit directement congelés à l'azote liquide -196°C puis maintenus à -80°C en vue des analyses en conditions physiologiques, (*ii*) soit mis en stabulation en vue d'exposition en conditions contrôlées de laboratoire, puis congelés avant analyses des biomarqueurs.

Les étapes de congélation $^{et}/_{ou}$ d'acclimatation des individus sont développées dans la suite de ce chapitre en parallèle des expériences correspondantes.

3. Méthodes de préparation et d'analyses des échantillons biologiques

Avant toute description des expériences réalisées au cours de ces travaux de thèse, il est important de décrire les différentes méthodes de préparation et de dosages utilisés pour chaque biomarqueur. Tous les protocoles de dosages exposés ci-dessous ont été réalisés sur des homogénats frais pour éviter toutes altérations possibles dues à la congélation.

3.1. Préparation des homogénats

Les échantillons sont décongelés et pesés. Un volume de tampon d'homogénéisation équivalent à 2 fois le poids de l'échantillon est ajouté (*e.g.* 400 µL de tampon d'homogénéisation pour 200 mg de tissu). La composition de 5 mL de tampon d'homogénéisation est la suivante: 4,8 mL de tampon phosphate 50 mM (K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,6) additionné de 100 µL de L-sérine borate 100 mM et 100 µL de PMSF 100 mM, utilisés comme inhibiteurs de protéases, et de 1 mL de phénylglyoxal 5 mM, inhibiteur de la γ-glutamyl transpeptidase, enzyme qui dégrade le glutathion. L'échantillon est broyé manuellement à l'aide d'un Potter Elvejhem. L'homogénat total ainsi obtenu est divisé en différentes parties en fonction du volume nécessaire au dosage de chaque paramètre (**Figure II-3**).

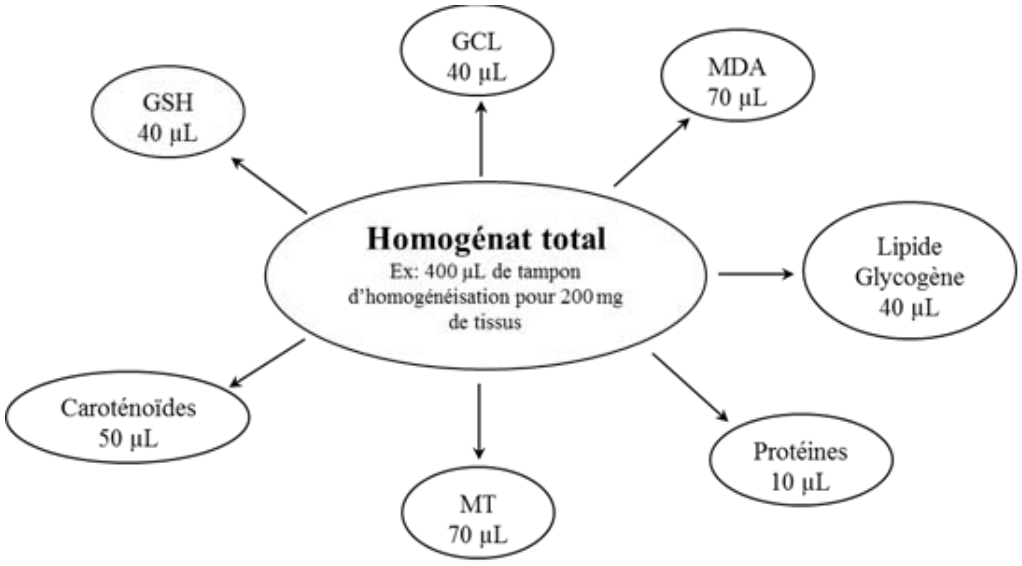


***Figure II-3. Répartition de l'homogénat total en vue du dosage des différents biomarqueurs**. GSH: glutathion réduit, GCL: γ-glutamylcystéine ligase, MDA: malondialdéhyde, MT: métallothionéines*

3.2. Mesure des réserves énergétiques chez *G. roeseli*

3.2.1. Dosages des lipides totaux et du glycogène

Les dosages des teneurs en lipides totaux et glycogène sont adaptés de la méthode de Plaistow *et al.* (2001). Quarante microlitres d'homogénat total précédemment obtenu sont additionnés de 20 µL de sulfate de sodium 2% (m:v) et de 540 µL de chloroforme/méthanol (1:2, v:v). Après une heure d'incubation dans de la glace, l'échantillon est centrifugé à 3000*g* pendant 10 minutes. Le surnageant est alors récupéré pour le dosage des lipides totaux tandis que le culot est réservé au dosage du glycogène.

- *Lipides totaux*

Cent microlitres de surnageant sont transférés dans un tube en pyrex qui est placé dans un bain à sec à 95°C sous hotte pendant 10 minutes afin de permettre l'évaporation des solvants. Ensuite, 200 µL d'acide sulfurique 95% sont ajoutés dans chaque tube (toujours placés dans le bain à sec). Après 10 minutes de réaction, les tubes sont refroidis dans de la glace, puis 4,8 mL de solution de phospho-vanilline sont ajoutés à température ambiante. Ce réactif est composé de 960 mg de vanilline, 160 mL d'éthanol 95% et 640 mL d'acide ortho-phosphorique 85%. Après une réaction de 10 minutes à température ambiante, les tubes sont mélangés au vortex et la densité optique est lue au spectrophotomètre à 535 nm.

Une droite standard de cholestérol commercial comprenant 6 concentrations, 0 - 100 – 200 – 400 – 800 et 1600 µg/mL, est réalisée simultanément afin d'estimer les teneurs en lipides totaux qui sont exprimées en mg/mL.

- *Glycogène*

Le culot initialement obtenu est remis en suspension dans 400 µL d'eau ultrapure (eau milliQ) dans un microtube puis placé dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes afin de le dissoudre en totalité. Après dissolution totale, 100 µL du mélange obtenu sont transférés dans un tube en pyrex auxquels sont ajoutés 4,9 mL de réactif d'anthrone composé de 1,13 g d'anthrone, 630 mL d'acide sulfurique et 170 mL d'eau ultrapure. Les tubes sont mélangés au vortex et placés dans un bain à sec à 95°C pendant 17 minutes. Ils sont ensuite refroidis dans la glace et homogénéisés au vortex, avant de lire la densité optique à 625 nm.

Une droite standard de 6 concentrations de glucose commercial, 0 – 15 – 30 – 60 – 120 et 240 µg/mL, est réalisée simultanément afin de calculer les concentrations en glycogène qui sont exprimées en µg/mg de tissu.

3.2.2. Dosage des protéines

Les concentrations en protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (1976). Une dilution au 64ème de l'homogénat total est réalisée dans une solution de NaCl 0,9%. Cent microlitres de cette dilution sont placés dans un tube hémolyse et 5 mL de réactif de Bradford sont ajoutés. Après 10 minutes de réaction à température ambiante, la DO de l'échantillon est lue à 595 nm. Le réactif de Bradford utilisé est composé de 100 mg de bleu de Coomassie, 50 mL d'éthanol 95% et 100 mL d'acide ortho-phosphorique, complété à 1L avec de l'eau ultrapure. Celui-ci est ensuite filtré sur membrane à 0,45 µm puis placé à 4°C une nuit avant utilisation.

Une droite standard de 6 concentrations de sérum d'albumine bovine, 0 – 25 – 50 – 100 – 200 et 400 µg/mL, est réalisée en parallèle pour permet la détermination des concentrations en protéines qui sont exprimées en mg/mL.

3.3. Mesure des capacités de défenses antitoxiques de *G. roeseli*

La plupart des dosages suivant étant réalisés par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC), le **tableau II-1** présente les conditions expérimentales utilisées pour chaque biomarqueur.

Après un traitement de l'homogénat total, propre à chaque biomarqueur et définit dans la suite de ce chapitre, l'échantillon est injecté dans le système HPLC, comme décrit sur la **figure II-4**. La phase mobile est entrainée dans le système HPLC à débit constant grâce à une pompe. L'échantillon, injecté dans le système grâce à une vanne d'injection, va être entrainé par la phase mobile vers la colonne séparative remplie de phase stationnaire. Cette colonne va alors séparer différents composants de l'échantillon, puis un détecteur placé à sa sortie permet d'émettre un signal proportionnel à la concentration de chaque composé. Le signal émis est ensuite récupéré par un intégrateur qui trace ainsi un chromatogramme, courbe représentant le signal en fonction du temps. Le chromatogramme permet dans un premier temps de caractériser la présence dans l'échantillon du composé étudié, grâce au temps de rétention qui lui est spécifique; mais aussi de calculer sa concentration, à l'aide de l'aire mesurée sous le pic du signal.

Tableau II-1. Conditions expérimentales des analyses par HPLC

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

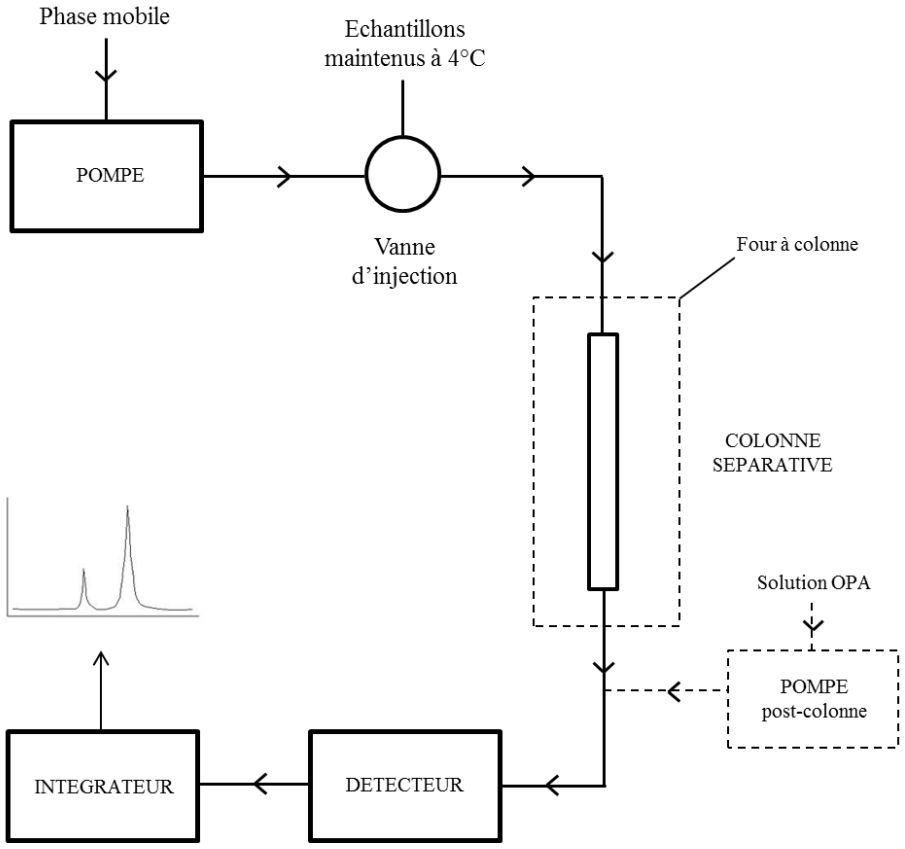


Figure II-4. Schéma de fonctionnement d'un système de HPLC

La pompe post-colonne présente à la sortie de la colonne permet, pour le dosage du glutathion réduit et de l'activité γ-glutamylcystéine ligase, de fixer l'*ortho*-phthalaldéhyde aux groupements thiols au fur et à mesure de leur séparation, conduisant ainsi à leur détection en fluorescence.

3.3.1. Dosage des concentrations en glutathion réduit (GSH)

Le dosage des concentrations en GSH a été adapté de la méthode de Leroy *et al.* (1993). Les protéines de 40 µL d'homogénat total sont précipitées grâce à 14 µL d'acide perchlorique 10% (v :v). Les échantillons sont ensuite centrifugés 10 minutes à 20 000*g* à 4°C, puis le surnageant est dilué 40 fois dans de l'acide chlorhydrique 0,1 M. Deux cents microlitres de surnageant dilué sont injectés dans le système HPLC et élués pendant 13 minutes selon les conditions présentées dans le **tableau II-1**.

Une gamme étalon de 6 concentrations de GSH commercial, 0 – 0,625 – 1,25 – 2,5 – 5 et 10 µg/mL, permet de définir son temps de rétention et de calculer les concentrations qui sont exprimées en nmol/mg de protéines. Le temps de rétention moyen du glutathion réduit obtenu dans ces conditions de dosage était de 7,5 minutes.

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

L'activité GCL a été évaluée par une méthode HPLC adaptée de Parmentier *et al.* (1998). Le principe de ce dosage était de mesurer la quantité de glutamylcysteine (GC) formée à partir d'acide glutamique, de cystéine et d'ATP (**Figure II-5**).

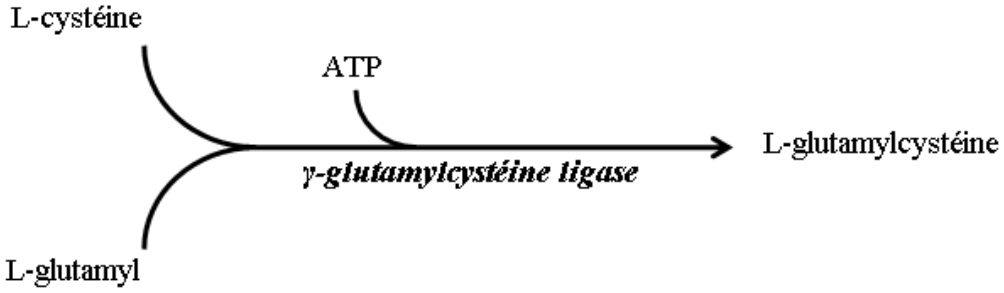


Figure II-5. Réaction enzymatique de synthèse de la L-glutamylcystéine par la γ-glutamylcystéine ligase à partir de ses 3 substrats : L-cystéine, L-glutamyl et ATP

La fraction S12000 nécessaire à la mesure de cette activité est obtenue après deux centrifugations successives de 40 µL d'homogénat total. La première centrifugation est réalisée à 500*g* pendant 15 minutes à 4°C, puis le surnageant obtenu est à nouveau centrifugé 30 minutes à 12 000*g* à 4°C. La fraction S12000 est ensuite diluée au 20ème dans du tampon d'homogénéisation, puis 40 µL de cette fraction diluée sont ajoutés à 112 µL d'un cocktail d'incubation contenant 0,5 M de Tris HCl, 200 mM de $MgCl_2$ $6H_2O$, 500 mM de KCl, 45 mM d'acide glutamique, 90 mM de cystéine, 1 mM de DTT, 90 mM d'ATP et 0,5 mM de phénylglyoxal. La réaction s'effectue à 25°C pendant 20 minutes, avant d'être stoppée par une dilution au quart dans de l'acide chlorhydrique 0,1 M. Deux cents microlitres de solution finale sont injectés dans le système HPLC et élués pendant 13 minutes à l'aide des conditions expérimentales présentées dans le **tableau II-1**.

Une gamme étalon de 6 concentrations de GC commercial, 0 – 0,625 – 1,5 – 2,5 – 5 et 10 µM, permet de définir son temps de rétention et de calculer les concentrations qui sont exprimées en nmol GC formées/min/mg de protéines. Le temps de rétention moyen de la molécule de GC obtenu dans ces conditions est de 10 minutes.

3.3.3. Dosage des concentrations en métallothionéines (MT)

Les concentrations en MT sont déterminées par une méthode HPLC adaptée d'Alhama *et al.* (2006). Dans un premier temps, 70 µL d'homogénat total sont centrifugés à 3500*g* à 4°C pendant 10 minutes, puis le surnageant récupéré est à nouveau centrifugé à 22 000*g* à 4°C durant 30 minutes afin d'obtenir la fraction S22000. Cette dernière est diluée au 20ème dans du tampon d'homogénéisation avant de réaliser le dosage.

La première étape du dosage consiste à dénaturer les métallothionéines et réduire les fonctions thiols. Pour cela, 125 µL de fraction S22000 diluée sont incubés pendant 20 minutes à 70°C dans 108 µL de tampon d'incubation contenant 30 µL de Tris 230 mM, 10 µL de DTT 300 mM, 5µL d'EDTA 100 mM et 63 µL de SDS 10% (m:v). Dans ce cocktail réactif, le SDS permet la dénaturation de la protéine et le DTT la réduction des fonctions thiols.

La seconde étape est le marquage des métallothionéines grâce à l'ajout de 17 µL de monobromobimane (mBBr) 180 mM. Après 15 minutes de réaction à l'obscurité, le mBBR a réagi avec toutes les fonctions thiols, permettant ainsi la détection des métallothionéines. Deux cents microlitres d'échantillon sont injectés dans le système HPLC, puis élués pendant 30 minutes selon les conditions présentées dans le **tableau II-1**.

Une gamme étalon de 5 concentrations de MT de foie de lapin, 0 – 0,625 – 1,5 – 2,5 – 5 µM permet de définir le temps de rétention et de calculer les concentrations qui sont exprimées en nmol MT/mg de protéines. Le temps de rétention moyen des MTs obtenu dans ces conditions était de 14 minutes.

3.3.4. Dosages des caroténoïdes

Les concentrations en caroténoïdes sont déterminées par une méthode spectrophotométrie adaptée de Rauque et Semenas (2009). L'extraction est réalisée en ajoutant 450 µL d'éthanol 95% à 50 µL d'homogénat total. L'échantillon est vortexé puis placé pendant 6 heures à 4°C. Après cette incubation, les échantillons sont centrifugés à 3500*g* pendant 5 minutes à 4°C. La densité optique du surnageant est ensuite lue à 422, 448 et 472 nm. Ces longueurs d'ondes ont été choisies après avoir effectué un spectre d'absorption des caroténoïdes du gammare et d'une solution mère d'un mélange de caroténoïdes. Elles permettent de quantifier la concentration de caroténoïdes totaux.

Une gamme étalon de 6 concentrations d'un mélange de caroténoïdes, 0 – 0,625 – 1,25 – 2,5 – 5 et 10 µg/mL lues aux trois longueurs d'ondes permet de calculer les concentrations en caroténoïdes, exprimées en µg caroténoïdes/mg lipides.

3.4. Dosage de la concentration en malondialdéhyde (MDA)

Le dosage du malondialdéhyde a été réalisé par HPLC après adaptation de la méthode de Behrens et Madère (1991). Les protéines de 70 µL d'homogénat total sont précipitées à l'aide de 210 µL d'éthanol 95% de qualité CHROMANORM pendant 1h30 dans la glace. L'échantillon est ensuite centrifugé à 18 000*g* durant 30 minutes à 4°C, puis 100 µL de surnageant sont injectés dans le système HPLC et élués pendant 35 minutes selon les conditions expérimentales décrites dans le **tableau II-1**.

Les concentrations en MDA sont calculées à partir d'une gamme étalon établie après une hydrolyse du 1,1,3,3-tétrahoxypropane pendant 2h à l'obscurité. Cette gamme étalon est composée de 5 concentrations, 0 – 0,125 – 0,25 – 0,5 et 1 µM. Les concentrations en MDA sont exprimées en nmol MDA/mg de lipides. Le temps de rétention moyen du MDA obtenus dans ces conditions était de 8,3 minutes.

3.5. Dosages des concentrations en lipides totaux, caroténoïdes et MDA chez *P. minutus*

Les dosages des lipides totaux, des concentrations en caroténoïdes et des taux de MDA chez *P. minutus* ont été réalisés comme décrit ci-dessus. Seule la préparation de l'échantillon a été modifiée. En effet, des pools de 5 cystacanthes ont été formés, et homogénéisés dans 350 µL d'éthanol 95%. L'homogénat est alors incubé pendant 1h30 dans de la glace puis divisé en trois parties pour les différents dosages.

Cent dix microlitres d'homogénat sont directement utilisés pour le dosage du MDA.

Soixante microlitres d'homogénat sont dilués au demi dans du chloroforme/méthanol (1:2, v/v) afin de réaliser le dosage de la teneur en lipides totaux.

Enfin, 150 µL d'échantillon sont dilués au quart dans de l'éthanol 95%, permettant ainsi le dosage des caroténoïdes.

4. Etude de variations mensuelles des marqueurs énergétiques et de capacités de défense chez *G. roeseli*

Afin d'étudier l'influence de facteurs abiotiques tels que la température, le pH ou encore le taux d'oxygénation de l'eau, sur les biomarqueurs étudiés chez *G. roeseli*, un suivi saisonnier a été réalisé d'octobre 2008 à septembre 2009.

Pour cela, des individus *G. roeseli* mâles et femelles non-parasités par le cystacanthe de *P. minutus* ont été prélevés mensuellement à l'aide de tamis (mailles 0,5 mm) et de pièges artificiels, puis triés comme décrit précédemment. Parallèlement, des paramètres physico-chimiques de l'eau du site de prélèvement ont été mesurés: température (°C), oxygène dissous (O_2 mg/L), pH, conductivité (µS/cm) et pourcentage de saturation en oxygène (O_2 %).

Les individus ont ensuite été transférés au laboratoire dans de l'eau de rivière, où des pools de 7 mâles et 10 femelles sont formés, congelés dans l'azote liquide -196°C et maintenus à -80°C jusqu'à la mesure des différents biomarqueurs. Avant analyse des biomarqueurs, les individus sont décongelés puis le sexe a été vérifié sous loupe binoculaire par observation de la présence de papilles génitales au niveau du $7^{ème}$ segment ventral chez les mâles (voir chapitre II, partie 4.3.2.).

Les différents pools ont ensuite été traités comme décrit précédemment et les biomarqueurs analysés.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont fait l'objet d'un article scientifique (*Publication 1*).

5. Influence du parasitisme et de l'interaction parasite/contaminant sur les biomarqueurs de *G. roeseli*

Dans cette partie des travaux, le but était d'appréhender les effets de la présence de parasites dans les organismes en étudiant les variations de réponses biologiques de *G. roeseli* en conditions physiologiques, c'est-à-dire en l'absence de stress, et après un stress métallique au cadmium. Cette partie de l'étude a aussi été l'occasion d'évaluer la nature confondante d'un parasite dans le cadre de l'utilisation des gammares en écotoxicologie.

Avant chaque expérience d'exposition au cadmium, les organismes utilisés ont été acclimatés dans un milieu M4 Elendt modifié, à 15°C pendant 5 jours et nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulnes préalablement conditionnées dans de l'eau de rivière pendant 2 semaines. Ce procédé permet la formation d'un biofilm rendant ainsi les feuilles plus appétantes pour les gammares. Le milieu M4 Elendt utilisé est dit « modifié » car sa composition ne contient pas d'EDTA afin d'éviter toute chélation du cadmium lors des expositions (**Annexe 2**). De plus, avant de transférer les organismes dans les différents récipients ou aquariums, ces derniers ont été saturés pendant 5 jours à l'aide de solutions cadmiées à la concentration correspondante, afin de s'affranchir de toute adsorption du cadmium sur les parois. Les milieux d'exposition sont alors renouvelés juste avant le transfert des organismes. Enfin, lors des diverses expositions, les organismes n'ont pas été nourris afin d'éviter toute contamination par ingestion, suite à l'adsorption éventuelle de cadmium sur les feuilles d'aulne. Chaque expérimentation décrite ci-dessous a été réalisée dans une enceinte thermostatée à 16°C, avec un cycle jour/nuit 14/10.

5.1. Influence de l'acanthocéphale *P. minutus* sur son hôte intermédiaire *G. roeseli*

Polymorphus minutus est le seul macroparasite acanthocéphale retrouvé chez *G. roeseli* sur notre site d'étude (Médoc et Beisel, 2009 et observations personnelles). Le stade cystacanthe de ce parasite a déjà été démontré comme manipulateur de son hôte, du fait qu'il modifie son géotactisme, en particulier suite à un stress biotique (Médoc *et al.*, 2006). L'expérience mise en place avait pour but d'évaluer l'influence de *P. minutus* sur les marqueurs énergétiques et de défenses antitoxiques de *G. roeseli*. Pour cela, l'étude a été divisée en trois parties afin de répondre aux questions suivantes:

a- P. minutus influence-t-il la réponse des biomarqueurs énergétiques et de défenses de *G. roeseli* en l'absence de stress ?

b- P. minutus influence-t-il la toxicité du cadmium et sa bioaccumulation chez *G. roeseli* lors d'une exposition de 4 jours, modifiant ainsi la résistance de son hôte ?

c- P. minutus influence-t-il la réponse des biomarqueurs de défenses et d'énergie de *G. roeseli* lors d'une exposition au cadmium ?

5.1.1. Effets de *P. minutus* sur *G. roeseli* en conditions physiologiques

L'étude de l'influence de *P. minutus* sur les biomarqueurs de *G. roeseli* a été conduite sur des individus mâles et femelles non-parasités et parasités par *P. minutus*, prélevés en mai, juin et août 2009 à Laquenexy, période de forte prévalence du cystacanthe de *P. minutus* sur notre site d'étude. Le faible nombre d'individus parasités au cours du mois de juillet 2008 n'a pas permis d'effectuer une comparaison des biomarqueurs à cette date.

Une fois échantillonnés, les individus sont transférés au laboratoire, congelés dans l'azote liquide -196°C et conservés à -80°C jusqu'à la mesure des biomarqueurs. Avant analyse, les gammares sont disséqués dans du liquide de Ringer crustacés (**Annexe 3**) afin de vérifier l'absence de *P. minutus*, et retirer le cystacanthe lorsque celui-ci est présent, permettant ainsi le dosage des biomarqueurs uniquement sur l'hôte. Trois pools de 7 mâles et 10 femelles ayant le même statut parasitaire ont été formés. La concentration en glutathion ainsi que son activité de synthèse (activité GCL) ont été mesurées en parallèle des teneurs en MDA, lipides et glycogène.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis la rédaction d'un article scientifique (*Publication 2*).

5.1.2. Influence de *P. minutus* sur la réponse de *G. roeseli* après exposition au cadmium

Cette expérience en conditions contrôlées de laboratoire a permis de déterminer si le sexe de l'individu et la présence de *P. minutus* modifie la résistance de *G. roeseli*. Pour cela, les concentrations léthales 50% ($CL_{50\text{-}96h}$) et la bioaccumulation du cadmium dans les organismes après une exposition de 96 heures ont été déterminés.

Des individus mâles et femelles, sain(e)s et parasité(e)s par *P. minutus* ont été exposés à une gamme de concentrations en cadmium durant 96h. La gamme de concentrations utilisée

a été choisie sur la base des valeurs de CL_{50} de cadmium déterminées par Felten *et al.* (2008) sur l'espèce *G. pulex*.

- *Détermination de la CL_{50}*

La détermination de la CL_{50} est une étape importante dans une étude écotoxicologique car elle permet le choix des concentrations d'exposition utilisées dans la suite des expérimentations. La CL_{50} du cadmium est déterminée pour quatre groupes d'organismes: mâles/femelles sain(e)s et mâles/femelles parasité(e)s par *P. minutus*. Dix individus de chaque groupe ont été placés dans un récipient contenant 500 mL de milieu cadmié à cinq concentrations différentes: 0 (témoin), 6, 18, 54 et 162 µg/L. Des billes de verre ont été placées au fond du récipient afin de créer un substrat artificiel. Chaque condition est réalisée en triplicat (**Figure II-6**). Au cours de l'exposition, les organismes n'ont pas été nourris, afin d'éviter l'ingestion de cadmium adsorbé sur les feuilles. La mortalité des organismes a été dénombrée toutes les 24h et les individus morts retirés, évitant ainsi tout risque de cannibalisme. La valeur de la $CL_{50\text{-}96h}$ de chaque groupe d'individus a ensuite été calculée à l'aide de la macro Excel « REGTOX_EV7.0.4 » selon le modèle de Hill (Vindimian *et al.*, 1999).

- *Bioaccumulation du cadmium*

L'influence de la présence de *P. minutus* sur la bioaccumulation de cadmium par *G. roeseli* a été testée à la suite de la détermination des $CL_{50\text{-}96h}$. En effet, à la fin de l'exposition, les individus encore en vie ont été congelés à l'azote liquide -196°C et conservés à -80°C jusqu'à analyse. La forte mortalité des individus exposés à 54 et 162 µg/L n'a pas permis la mesure de la bioaccumulation de cadmium. Ces mesures ont donc été réalisées sur des individus témoins et exposés à 6 et 18µg Cd/L.

Avant analyse, les organismes ont été décongelés, puis disséqués pour retirer le cystacanthe de *P. minutus* ou vérifier son absence. Les concentrations en cadmium accumulées dans les cystacanthes ont également été mesurées. Pour chaque condition d'exposition, les poids secs de 5 gammares et de 5 pools de 5 cystacanthes ont été déterminés après une étape de déshydratation à 100°C pendant 48h. Les échantillons ont ensuite été minéralisés à 80°C pendant 12h à l'aide de 50 µL d'acide nitrique de qualité SUPRAPUR, afin d'obtenir une solution limpide, ajustée à 1 mL avec de l'eau ultrapure. Le dosage du cadmium a ensuite été réalisé par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA), et les concentrations exprimées en ng Cd/mg de poids sec.

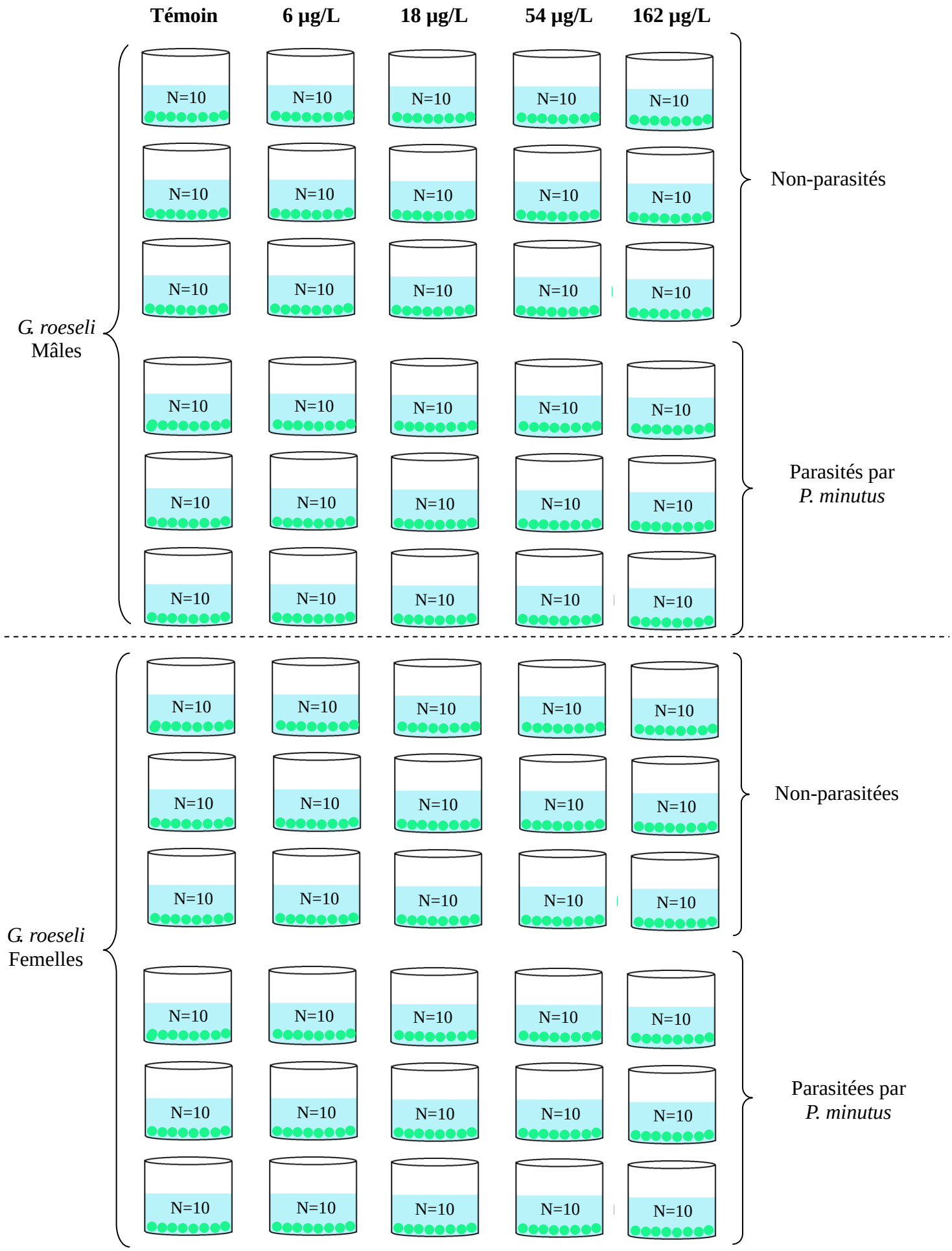


Figure II-6. Dispositif expérimental utilisé pour la détermination de la CL_{50} de G. roeseli non parasités et parasités par P. minutus après 96h d'exposition au cadmium. *N: nombre d'individus exposés*

Les résultats de la détermination des $CL_{50\text{-}96h}$ de *G. roeseli* non-infecté(e)s et infecté(e)s par *P. minutus*, ainsi que les résultats de la bioaccumulation de cadmium ont fait l'objet d'une publication (*Publication 3*).

- *Effet de l'interaction P. minutus/cadmium sur G. roeseli*

L'effet de l'interaction *P. minutus*/cadmium sur les biomarqueurs de *G. roeseli* a été traité lors de l'étude de l'influence de la co-infection afin d'éviter toute redondance d'expérimentation. Le processus expérimental utilisé est détaillé dans la partie 5.3 de ce chapitre.

Les résultats de cette étude ont permis la rédaction d'un article (*Publication 4*).

5.2. Influence des microsporidies à transmission verticale sur *G. roeseli*

5.2.1. Mise en évidence de la présence de microsporidies

La détection de la présence de microsporidies à transmission verticale ainsi que la détermination de l'espèce s'effectue après dissection des tissus gonadiques des gammares. Pour cela, chaque individu est disséqué dans du liquide de Ringer « Crustacés » (Van Harreveld, 1936) afin de retirer les gonades.

- *Dissection des gonades*

Après avoir coupé en deux les gammares au niveau des segments IV et V, le tube digestif, les caeca ainsi que les gonades sont facilement identifiables (**Figure II-7**). Les tissus gonadiques ont alors été retirés et transférés individuellement dans un microtube stérile qui a été conservé à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. Les deux parties restantes de l'individu ont ensuite été regroupés dans un cryotube, congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à analyse des biomarqueurs. Une attention particulière a été accordée à la notation des tubes afin que chaque gonade disséquée corresponde à l'individu de départ.

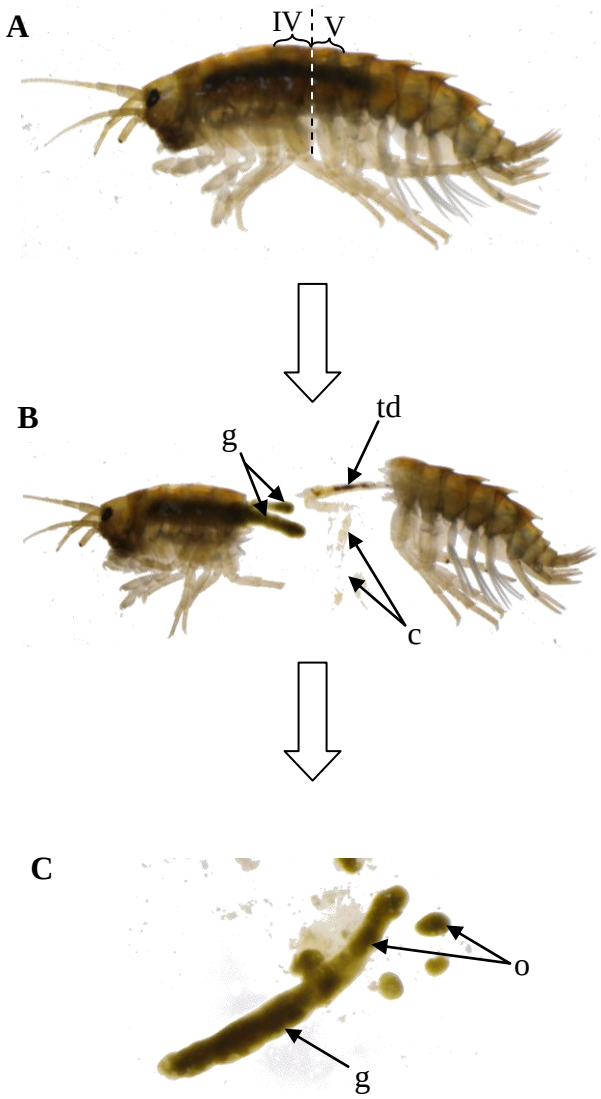


Figure II-7. Étapes de dissection des gonades de G. roeseli femelles. *(A) localisation des segments IV et V (x 12,5). (B) visualisation du tissu gonadiques (x 12,5), g: gonades, td: tube digestif, c: caeca. (C) tissu gonadique de G. roeseli (x 25), g: gonade, o: ovocytes* (photo: E. Gismondi)

- *Extraction d'ADN*

Après décongélation des tissus, chaque gonade est digérée à l'aide de 300 µL de CTAB 10 mM (4 mL de CTAB 100 mM, 2 mL de tampon Tris-EDTA 10mM, 14 mL d'eau ultrapure et 1,63 g de NaCl) additionné de 10 µL de protéinase K à 20 mg/mL durant 4h dans un bain marie à 55°C. Après digestion du tissu, 3 µL de RNase A à 10 mg/mL sont ajoutés afin de détruire l'ARN présent dans l'échantillon. La RNase A ayant une température optimale de 37°C, les échantillons ont donc été placés à cette température dans un bain à sec pendant 30 minutes (**Figure II-8**).

Une fois l'étape de dégradation de l'ARN terminée, une succession de lavages a été réalisée afin de récupérer un culot d'ADN (**Figure II-8**). Le premier lavage consistait en l'ajout de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1, v/v) permettant la précipitation des protéines de l'échantillon. Le surnageant a été récupéré puis lavé une seconde fois de façon similaire afin d'obtenir un surnageant totalement déprotéinisé. Ensuite, l'ajout de chloroforme a permis d'éliminer toute trace de phénol encore présent dans l'échantillon. Une fois l'échantillon déprotéinisé, l'addition d'isopropanol glacé (isopropanol conservé à -20°C) a permis la précipitation de l'ADN pendant une nuit à -20°C. Le culot d'ADN ainsi récupéré a ensuite été lavé à deux reprises avec de l'éthanol 70% glacé (éthanol conservé à -20°C). Après évaporation totale de l'éthanol, l'ADN a été remis en suspension dans 50 µL de tampon Tris-EDTA 10 mM, puis conservé à -80°C jusqu'à la détermination du statut parasitaire.

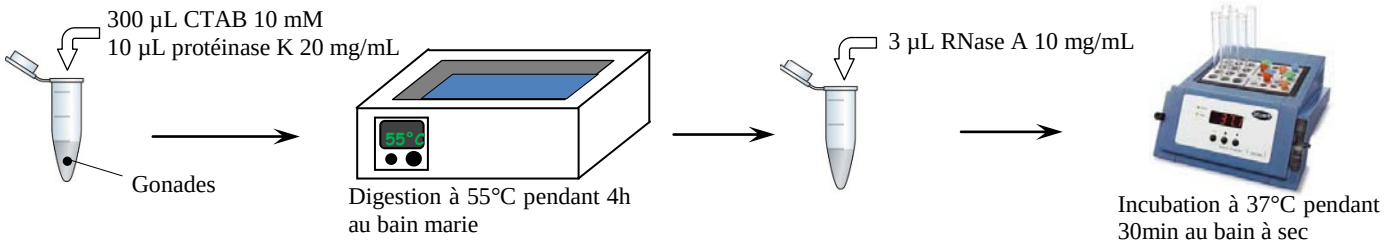
- *PCR-RFLP*

La technique de PCR-RFLP est une technique qui permet d'amplifier une matrice d'ADN, puis de digérer les fragments amplifiés à l'aide d'enzymes de restriction afin, dans le cas de ces travaux, d'identifier les microsporidies à transmission verticale présentes chez *G. roeseli* en allant jusqu'à l'espèce.

Dans un premier temps, la technique de PCR permet de mettre en évidence la présence de microsporidies dans les gonades de gammares. Pour cela, deux amorces spécifiques, 530R et V1F, sont utilisées pour amplifier un fragment spécifique d'environ 480 pb de l'ADNr 16S de microsporidies. Les séquences des amorces spécifiques sont les suivantes:

530R 5' - CCG CGG CTG CTG GCA C - 3'

V1F 5' - CAC CAG GTT GAT TCT GCC TGA C - 3'



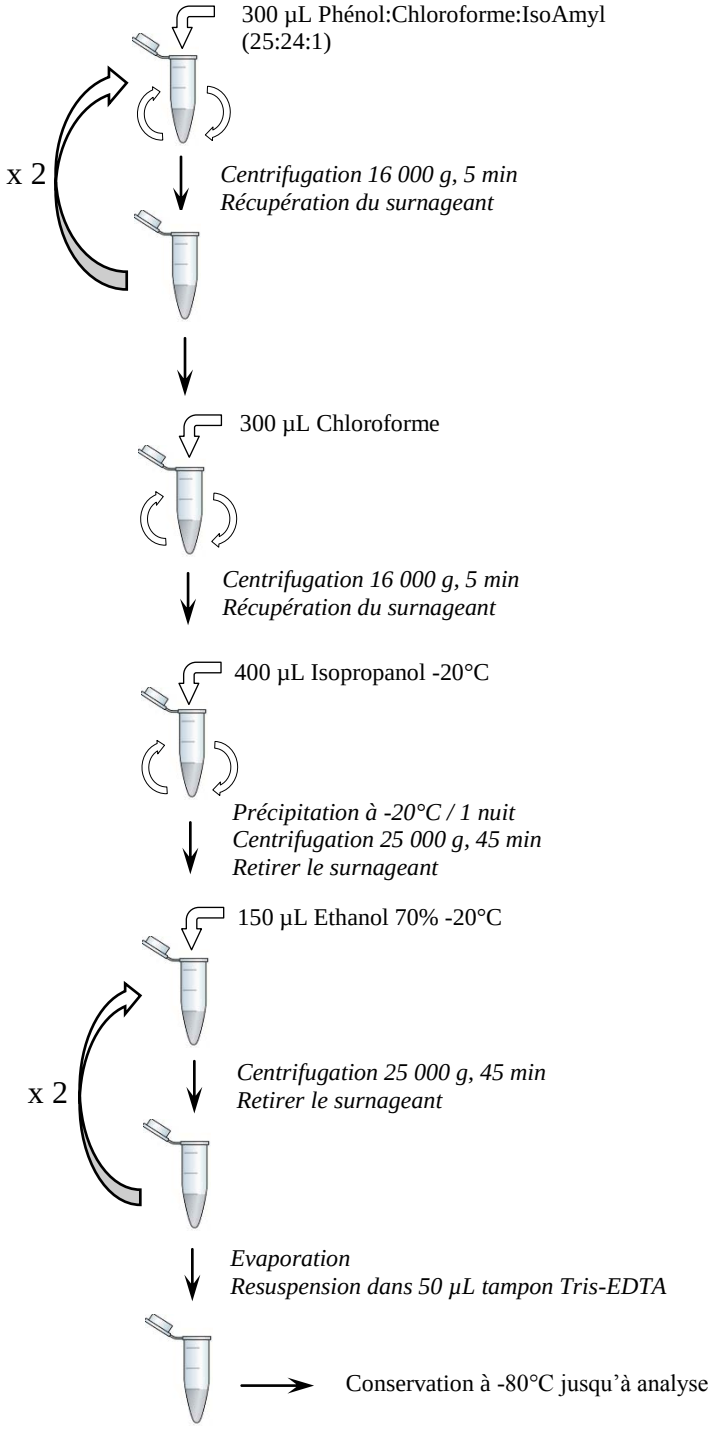


Figure II-8. Étapes d'extraction d'ADN des tissus gonadiques

Le milieu réactionnel pour une réaction de PCR est la suivante:

- 2,5 µL de tampon 1X
- 1 µL de dNTPs 200 µM
- 1 µL d'amorce 530R 200 nM
- 1 µL d'amorce V1F 200 nM
- 0,2 µL de Taq Polymérase HotStart 5U/µL
- 14,3 µL d'eau ultrapure stérile

La réaction est initiée en additionnant 5 µL d'ADN à 20 µL de ce milieu réactionnel.
Les conditions d'amplification de l'ADN de microsporidies sont les suivants:

	Dénaturation initiale	94°C	2 min	
Amplification	Dénaturation	95°C	30 sec	39 cycles
	Hybridation	57°C	30 sec	
	Élongation	65°C	35 sec	
	Élongation finale	65°C	5 min	

Une migration des produits PCR sur gel d'agarose 2% pendant 1h30 à 90V suivi d'une révélation sous lampe UV permet d'observer les résultats et d'identifier les échantillons parasités.

A la suite de ces amplifications, l'ADN des échantillons parasités est digéré par la technique de RFLP (**Figure II-9**) à l'aide d'enzymes de restriction utilisées par Haine *et al.* (2004) sur une population de *G. roeseli*. Ces enzymes de restriction sont *VspI, Bst1107I, Esp3I* et *BglII* et permettent d'identifier respectivement 5 espèces de microsporidies: *Dictyocoela muelleri, Microsporidium sp., D. roeselum, D. berillonum* et *N. granulosis* (**Tableau II-2**) grâce aux profils de restriction qu'elles produisent.

La réaction de digestion est initiée par l'ajout de 10 µL d'ADN amplifié à 10 µL de milieu réactionnel décrit ci-dessous, puis placé à 37°C pendant 1h30 dans un thermocycleur.

Milieu réactionnel :

- 2 µL de tampon O
- 1 µL d'enzyme de restriction *VspI, Esp3I, Bst1107I* ou *BglII*
- 7 µL d'eau ultrapure stérile

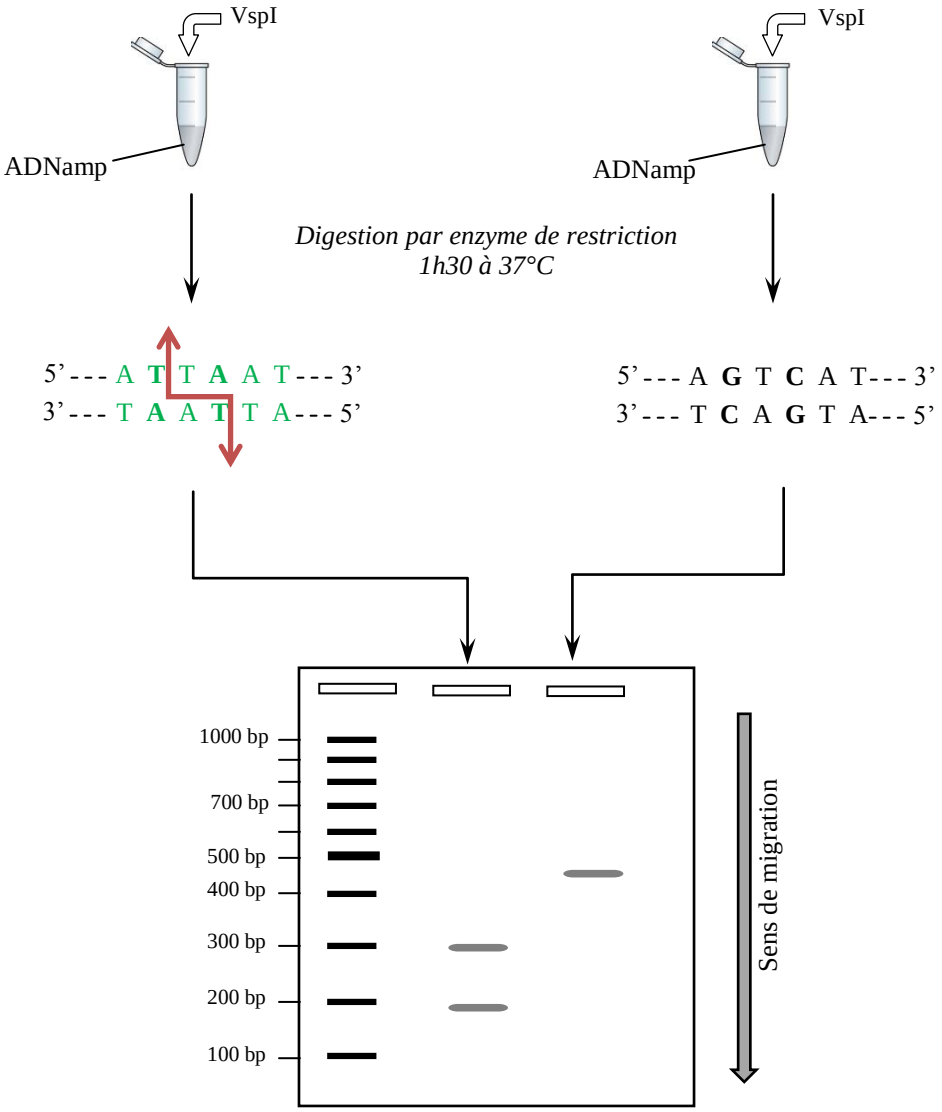


***Figure II-9. Schéma explicatif de la technique de RFLP**. En présence d'un site de restriction (en vert) dans la séquence d'ADN, l'enzyme de restriction procède à une coupure ( ) donnant ainsi deux fragments distincts et permettant, dans notre étude, l'identification de l'espèce de microsporidie. ADNamp: ADN amplifié après PCR.*

Tableau II-2. Détermination de l'espèce de microsporidies en fonction de l'enzyme de restriction utilisée et du profil de restriction obtenu

Enzyme de restriction	Profils de restriction (longueur des deux bandes)	Espèces microsporidiennes
VspI	~ 300 pb et ~ 180 pb	*Dictyocoela muelleri*
	~ 400 pb et ~ 80 pb	*Microsporidium* sp.
	non coupé	-
Bst1107I	~ 450 pb et ~ 30 pb (non visible)	*Dictyocoela roeselum*
	non coupé	-
Esp3I	~ 400 pb et ~ 80 pb	*Dictyocoela berillonum*
BglII	~ 400 pb et ~ 80 pb	*Nosema granulosis*

Les résultats sont visualisés sous lampe UV après migration des échantillons sur gel d'agarose 2% pendant 1h30 à 90V.

5.2.2. Prévalence saisonnière

Avant toute expérimentation permettant d'étudier l'influence des microsporidies à transmission verticale sur les biomarqueurs de *G. roeseli*, il a été nécessaire d'évaluer la présence de microsporidies et d'identifier les espèces présentes dans notre modèle. Pour cela, un suivi saisonnier a été réalisé.

Des individus mâles et femelles ont été prélevés en avril, juillet, octobre et décembre 2010 dans la Nied française à Rémilly. Les gonades ont été disséquées et l'ADN extrait. Les espèces de microsporidies présentes chez *G. roeseli* ont ainsi pu être déterminées grâce à la technique de PCR-RFLP.

Les résultats de prévalence obtenus lors de ce suivi ont été intégrés à un article scientifique (*Publication 5*), traitant de l'influence des microsporidies à transmission verticale sur les biomarqueurs énergétiques et de capacités de défenses de *G. roeseli*.

Le screening des espèces de microsporidies a révélé la présence de deux espèces de microsporidies: *Dictyocoela roeselum* et *D. muelleri*. Pour la suite des travaux, seules deux enzymes de restriction ont alors été utilisées pour la technique RFLP, à savoir: *VspI* et *Bst1107I*. Ces 2 enzymes de restriction ayant une température d'activation identique, une double digestion de l'ADN amplifié a permis de regrouper les 2 digestions précédemment utilisées. Pour cela, le milieu réactionnel a été modifié comme suit:

Milieu réactionnel:

- 2 µL tampon Tango
- 1 µL d'enzyme de restriction *VspI*
- 1 µL d'enzyme de restriction *Bst1107I*
- 6 µL d'eau ultrapure stérile

De plus, il a été observé au cours de ce suivi, que seules les gonades de femelles étaient parasitées par des microsporidies à transmission verticale; c'est pourquoi, dans la suite de ces travaux, les expérimentations ont été uniquement réalisées sur *G. roeseli* femelles.

5.2.3. Influence des microsporidies à transmission verticale en conditions physiologiques

Afin de limiter le nombre de femelles prélevées, l'influence des microsporidies en absence de stress environnemental a été mesurée sur les individus prélevés en avril 2010 et dont les gonades avaient été précédemment disséquées pour l'étude de la prévalence.

Le but de cette étude a été de déterminer si la présence de microsporidies à transmission verticale avait un impact sur les réserves énergétiques et les capacités de défenses antitoxiques de *G. roeseli* en absence de stress environnemental (conditions physiologiques). Les femelles prélevées en avril 2010 et disséquées pour le suivi de la prévalence, ont été décongelées puis regroupées par 6 selon leur statut parasitaire, à savoir: non-parasitées, parasitées par *D. roeselum* ou parasitées par *D. muelleri*. L'analyse des biomarqueurs a ensuite été effectuée comme décrit précédemment. Aucune femelle n'était co-infectée par *D. roeselum* et *D. muelleri*; cette condition n'a donc pas pu être testée.

5.2.4. Influence des microsporidies à transmission verticale lors d'une exposition au cadmium

Cette expérience a permis d'appréhender les effets de la présence de microsporidies à transmission verticale, sur les marqueurs énergétiques et de défenses antitoxiques de *G. roeseli* femelles, lors d'une exposition au cadmium.

Pour cela, des femelles ont été prélevées en juillet 2010, puis exposées à trois conditions différentes de cadmium: 0 (témoin), 2 et 8 µg/L. Ces concentrations ont été définies à l'aide de la $CL_{50\text{-}96h}$ déterminée au début de ces travaux (voir chapitre 4.1.2, *Publication 3*), de la concentration en cadmium dans la Nied française égale à 0,2 µg/L et de la concentration maximale de cadmium autorisée dans l'eau potable égale à 5 µg/L (DC 98/83/EC, 1998).

L'inconvénient majeur de l'étude de l'impact de microsporidies sur des biomarqueurs de *G. roeseli* réside dans le fait que ces parasites sont invisibles pour l'expérimentateur. Le nombre de femelles alors prélevées pour cette expérience a donc été optimisé en fonction des prévalences des deux espèces de microsporidies *D. roeselum* (70% des femelles infectées) et *D. muelleri* (30% des femelles infectées) déterminées chez *G. roeseli* femelles; ceci afin d'obtenir un nombre suffisant d'individus pour permettre la comparaison des 3 statuts parasitaires, qui étaient: (i) femelles non-parasitées, (ii) femelles parasitées par *D. roeselum* ou (iii) parasitées par *D. muelleri* pour chacune des conditions d'exposition. Cinq cents femelles ont été échantillonnées.

Lors de l'exposition, 150 femelles ont été réparties dans les 3 conditions d'exposition réalisées en triplicat (50 femelles par aquarium) (**Figure II-10**). Après 96h d'exposition, les gonades de chaque femelle ont été retirées et stockées à -80°C jusqu'à l'analyse de la présence de microsporidies; le reste de l'individu étant congelé individuellement à l'azote liquide à -196°C, puis stocké à -80°C en vue de l'analyse des différents biomarqueurs. Après avoir déterminé la présence et l'espèce de microsporidies, 3 pools de 6 femelles ayant le même statut parasitaire sont formés pour chaque concentration d'exposition. L'analyse des différents biomarqueurs est réalisée comme décrit précédemment.

Les résultats obtenus au cours de cette expérimentation ont été intégrés à l'article scientifique présentant la prévalence des microsporidies à transmission verticale (*Publication 5*).

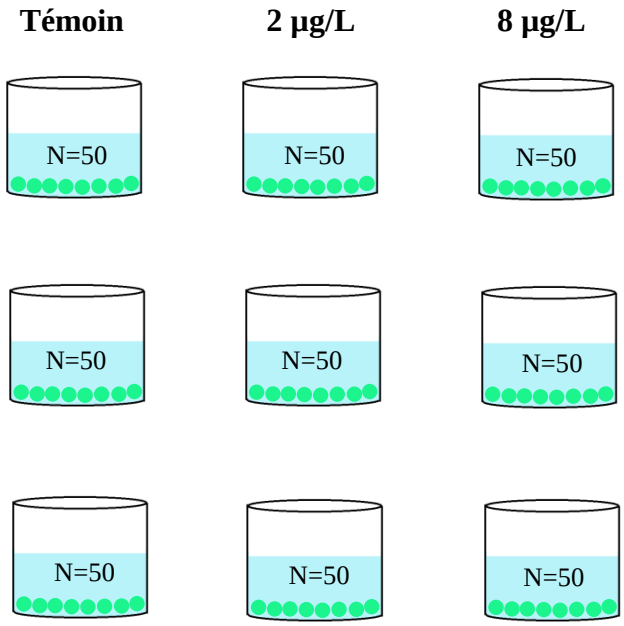


Figure II-10. Dispositif expérimental utilisé pour l'étude de l'impact de microsporidies à transmission vertical sur les biomarqueurs de G. roeseli*. N: nombre d'organismes exposés*

5.3. Influence de la co-infection *P. minutus*/microsporidies à transmission verticale chez *G. roeseli* lors d'un stress au cadmium

L'expérimentation mise en place pour étudier l'impact d'une co-infection *P. minutus*/microsporidies à transmission verticale chez *G. roeseli* a permis:

- d'évaluer l'influence de *P. minutus* seul sur les réserves énergétiques et les capacités de défenses antitoxiques de *G. roeseli* femelles lors d'un stress au cadmium,

- de confirmer les effets des microsporidies à transmission verticale observés lors de la précédente expérience menée sur *G. roeseli* femelles en condition de stress,

- d'étudier l'impact d'une co-infection *P. minutus*/microsporidies sur les biomarqueurs énergétiques et de défense de *G. roeseli* femelles exposées au cadmium.

Dans une étude préliminaire, il a été nécessaire de déterminer la proportion d'individus doublement parasités afin de connaitre le nombre d'organismes à échantillonner. Ceci a permis de mettre en évidence que 50% des femelles parasitées par *P. minutus* étaient également parasitées par des microsporidies, et majoritairement par *D. roeselum* (90%). La proportion de femelles parasitées à la fois par *P. minutus* et *D. muelleri* étant trop faible, seules quatre conditions parasitaires ont donc été étudiées: (i) femelles non-parasitées, (ii) femelles parasitées par *P. minutus*, (iii) femelles parasitées par *D. roeselum* et (iv) femelles co-infectées par *P. minutus* et *D. roeselum*. Les trois premières conditions parasitaires testées servent de témoins pour l'effet de la co-infection, mais permettent également d'étudier l'impact dû à la présence seule de *P. minutus* (Chapitre II, paragraphe 5.1.2.).

L'échantillonnage de 600 femelles non-parasitées par *P. minutus* et 600 femelles parasitées par *P. minutus* a été réalisé en avril 2011. Après la période d'acclimatation de 5 jours, les organismes ont été exposés aux 2 concentrations de cadmium (2 et 8 µg/L) et des témoins ont été conduits en parallèle. Les solutions de cadmium ont été préparées dans 1,5 L de milieu M4 Elendt modifié. Chaque condition d'exposition a été réalisée en duplicat (**Figure II-11**).

Après 96 heures d'exposition, chaque femelle a été disséquée afin de retirer les gonades qui ont été stockées à -80°C, ainsi que le cystacanthe de *P. minutus* lorsque celui-ci était présent. Le parasite ainsi que le reste de l'individu ont ensuite été congelés individuellement à l'azote liquide -196°C, puis stockés à -80°C jusqu'aux analyses des biomarqueurs. Après avoir déterminé l'état parasitaire de chaque femelle (présence/absence de *P. minutus* $^{et}/_{ou}$ présence/absence de microsporidies), 6 pools de 6 femelles ayant le même statut parasitaire ont été formés pour chaque condition d'exposition. L'analyse des biomarqueurs a été réalisée comme précédemment sur les différents pools d'individus hôtes. Les teneurs en lipides, MDA et caroténoïdes ont également été mesurées sur des pools de 10 cystacanthes ayant les mêmes conditions d'origines (concentration en cadmium et hôte mono- ou co-infecté).

Les résultats de cette étude ont fait l'objet de la rédaction d'un article scientifique (*Publication 6*).

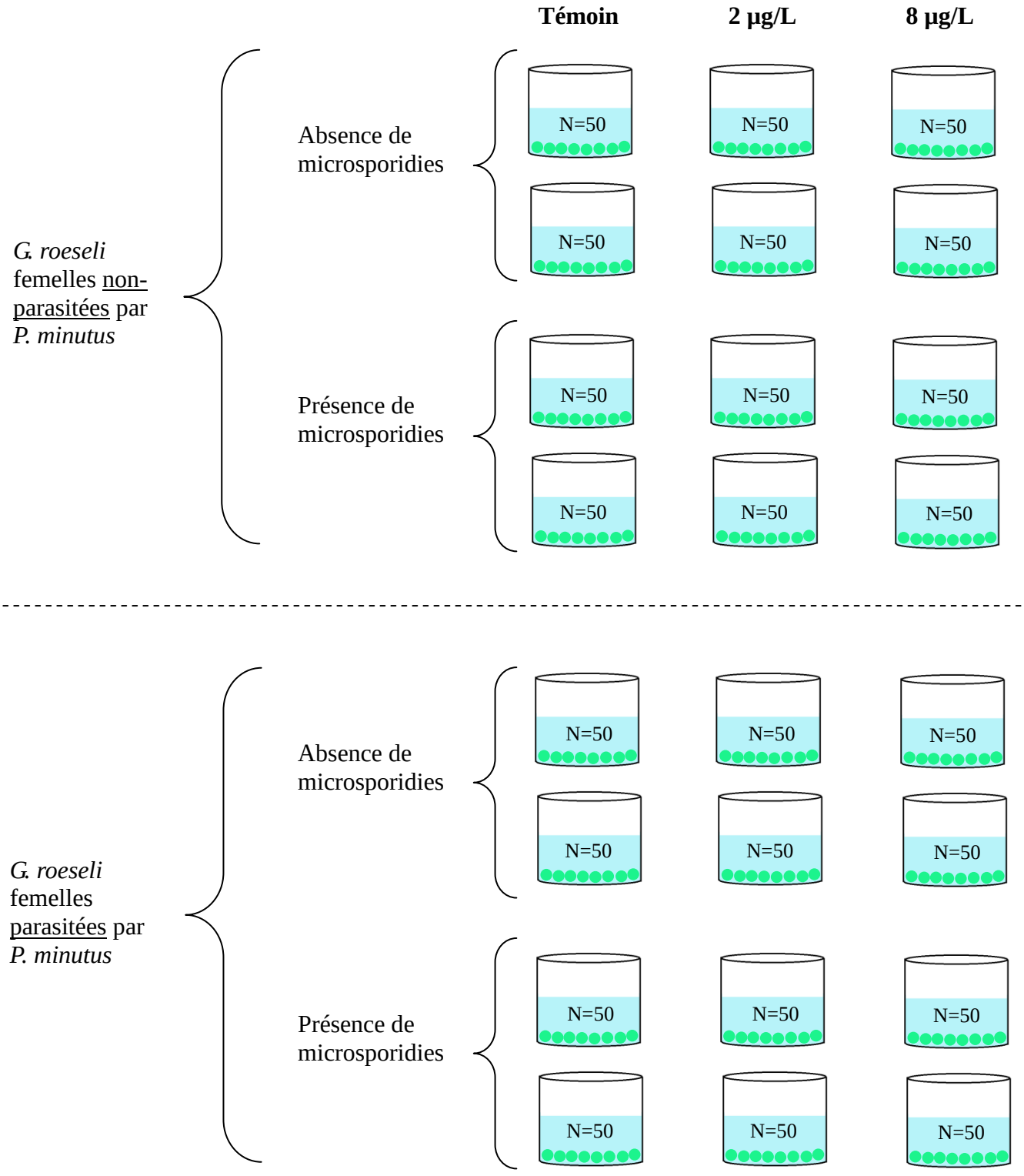


Figure II-11. Dispositif expérimental utilisé pour l'évaluation de l'effet d'une co-infection par P. minutus et Dictyocoela roeselum sur les biomarqueurs de G. roeseli. *N: nombre d'organismes exposés*

6. Analyses statistiques

Les résultats obtenus pour chaque étude ont été analysés à l'aide d'une analyse multiple de variances (MANOVA) après avoir préalablement testé la normalité des distributions par un test de Shapiro et l'homogénéité des variances par un test de Bartlett. Le test MANOVA permet de mettre en évidence un effet global du parasitisme $^{et}/_{ou}$ du cadmium sur l'intégralité des biomarqueurs mesurés. Les différences significatives ainsi déterminées ont été par la suite identifiées pour chaque biomarqueur à l'aide d'une analyse de variances (ANOVA) à un, ou plusieurs facteurs, suivi de tests post-hoc de Tukey HSD.

L'étude de l'influence de la co-infection en présence de cadmium a mis en évidence de nombreux résultats. Le calcul de l'« *Integrated Biomarker Response* » (IBR) a permis de combiner la totalité des réponses des biomarqueurs mesurés en un indice appelé « indice général » (Beliaeff et Burgeot, 2002) afin de mieux visualiser les réponses significatives obtenues. Le détail du calcul de cet indice est présenté en **annexe 4**.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel de statistique R, et le seuil de significativité a été fixé à 5% (risque α choisi).

CHAPITRE III

RESULTATS DES TRAVAUX

Ce chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux. Il est divisé en 3 parties distinctes traitant toutes de l'influence de facteurs biotiques et abiotiques sur les biomarqueurs énergétiques et de défenses antitoxiques de *Gammarus roeseli*.

Une **première partie** présente les résultats de l'influence du sexe de l'individu et de la saison sur la concentration en glutathion réduit, sa synthèse, les réserves énergétiques et les dommages cellulaires chez *Gammarus roeseli* au cours d'un suivi mensuel. Cette partie a fait l'objet d'une 1ère publication intitulée: « *Influence of gender and season on reduced glutathione and energy reserves of Gammarus roeseli* ».

Une **seconde partie** présente les résultats de l'influence de la présence de parasites sur les différents biomarqueurs de l'amphipode *Gammarus roeseli*: (i) en absence de stress chimique et (ii) lors d'une exposition au cadmium.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'influence d'un macroparasite acanthocéphale *Polymorphus minutus*. Cette étude se compose d'un 2nd article intitulé « *Does the acanthocephalan parasite P. minutus modify the energy reserves and antitoxic defence of its intermediate host G. roeseli ?* » traitant de l'influence du parasite en absence de stress, d'un 3ème article intitulé « *Acanthocephalan parasites: help or burden in Gammarid amphipods exposed to cadmium?*» traitant de l'influence de *P. minutus* sur la résistance et la bioaccumulation du cadmium chez *G. roeseli* lors d'une exposition au cadmium, et d'un 4ème article intitulé « *Polymorphus minutus affects antitoxic responses of Gammarus roeseli exposed to cadmium* » traitant de l'effet de *P. minutus* sur les défenses antitoxiques de *G. roeseli* exposé à ce même stress.

Dans un second temps, une étude similaire a été réalisée lors de la présence de microsporidies à transmission verticale chez *G. roeseli* soumis ou non à un stress au cadmium. Cette partie a fait l'objet d'une 5ème publication intitulée « *Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a Gammarid* ».

Enfin, une **troisième partie** présente les effets d'une co-infection par *P. minutus* et *D. roeselum* sur les biomarqueurs de *G. roeseli* exposé au cadmium. Les résultats ont fait l'objet d'un 6ème article intitulé « *Effect of parasitic multiple-infection on cadmium tolerance in freshwater amphipod* »

PARTIE I
ETUDE DE L'INFLUENCE DU SEXE ET DE LA SAISON SUR DES BIOMARQUEURS DE *G. ROESELI*

Publication 1
Influence of gender and season on reduced glutathione and energy reserves of Gammarus roeseli†

Le but de cette 1ère partie des travaux a été d'étudier l'influence du sexe et de la saison sur la concentration en glutathion réduit, ainsi que sur l'activité de la γ-glutamylcystéine ligase, enzyme limitant la synthèse du glutathion, chez *Gammarus roeseli*. Le glutathion réduit a été choisi car il représente un élément central du système de détoxication. En effet, il peut neutraliser directement les xénobiotiques de par sa fonction thiol, et également être le substrat d'enzymes antioxydantes telles que les glutathion peroxydases, ou les glutathion-S-transférases. Les systèmes de défenses étant coûteux en énergie, les réserves énergétiques ont également été étudiées. En parallèle, le malondialdéhyde, produit de dégradation des lipides membranaires, a été mesuré.

Pour cela, un suivi saisonnier a été réalisé. Des individus *Gammarus roeseli* mâles et femelles non-parasités par le cystacanthe de *P. minutus* ont été prélevés d'octobre 2008 à septembre 2009 dans la Nied française (Moselle). En parallèle, la température, le pH, la conductivité, le taux d'oxygène dissous du site de prélèvements ont été mesurés. Les mâles ont été regroupés par 7 et les femelles par 10. Les mesures de la concentration en glutathion réduit (GSH), de l'activité de la γ-glutamylcystéine ligase (GCL) et de la concentration en malondialdéhyde (MDA) ont été réalisées par HPLC, selon des méthodes respectivement adaptés de Leroy *et al.* (1993), Parmentier *et al.* (1998) et Behrens et Madère (1991). Une méthode par spectrophotométrie a été utilisée pour le dosage des taux de lipides, glycogène et protéines.

† Article soumis à *Ecotoxicology*

Nos résultats révèlent que les concentrations en glutathion réduit sont corrélées négativement à la température de l'eau, quel que soit le sexe de l'individu, et sont plus importantes chez les femelles quelle que soit la saison. De même, les teneurs en lipides et glycogène sont supérieures chez les femelles, notamment au printemps, ce qui pourrait leur permettre d'avoir suffisamment d'énergie nécessaire au maintien des fortes concentrations en glutathion réduit et de la reproduction. L'augmentation de la température au printemps, période de reproduction des gammares, induirait une augmentation de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) responsable de dommages cellulaires. La diminution en GSH pourrait alors être due à sa mobilisation par l'organisme pour se défendre des ROS.

Les fortes concentrations en glutathion réduit des femelles pourraient leur conférer une meilleure résistance que les mâles face à un stress environnemental. Cette hypothèse est supportée par des taux de malondialdéhyde inférieurs chez les femelles, reflétant de faibles dommages cellulaires, en comparaison aux mâles.

Notre étude révèle une variation des concentrations en GSH et de l'activité GCL en fonction du sexe de l'individu et de la saison. Les concentrations en GSH sont négativement corrélées à la température de l'eau et les plus faibles ont été mesurées en été. Par ailleurs, les plus fortes concentrations ont été mesurées chez les femelles, suggérant ainsi une meilleure capacité de défense en comparaison aux mâles, dans un contexte de contamination environnementale. Des variations selon le sexe et la saison ont également été déterminées pour les réserves énergétiques (i.e. lipides et glycogène).

En considérant nos résultats, le printemps et l'été semblent être les périodes d'échantillonnage les moins favorables à des études écotoxicologiques ayant pour modèle le gammare, car le statut physiologique de l'organisme (i.e. sexe, maturation sexuelle, reproduction) et la saison (i.e. température) impactent la mobilisation des défenses antitoxiques et des réserves énergétiques. Il est donc essentiel de tenir compte de ces facteurs de confusion lors de l'interprétation des réponses des biomarqueurs chez les individus exposés à un stress.

Influences of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*

Eric GISMONDI*, Jean-Nicolas BEISEL, Carole COSSU-LEGUILLE

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

ABSTRACT

Aquatic ecosystems are increasingly impacted by human activities. To cope with pollutants, organisms, such as Gammarid, developed antitoxic defences commonly used as biomarkers. These defence capacities involve glutathione, a major compound of the non-enzymatic defence system, also used as a substrate for many antioxidant enzymes (e.g. glutathione-S-transferases or glutathione peroxidases) extensively studied. However, no study has investigated its assessment in *Gammarus* sp., widely used as biological model in ecotoxicological studies.

As biomarkers are known to be influenced by biotic and abiotic factor (e.g. gender, temperature), we investigated over a one-year long sampling period, the influence of season and gender on reduced glutathione concentrations and its synthesis in *Gammarus roeseli*. In parallel, we assessed energy reserves and malondialdehyde level as a toxic biomarker. In both genders, reduced glutathione concentrations were inversely correlated to water temperature, and higher in females than in males whatever the season. Total lipid and glycogen contents were higher in females than in males, allowing females to have enough energy to assume the reproductive period and maintain high GSH concentrations for detoxification processes. Conversely, females have lower cell damages than males. These differences between genders could induce differential sensitivity in a contamination context, and thus impact the population. Females could resist better than males in contaminated environments, especially in spring when reduced glutathione concentration is the highest.

Keyword: Seasonal variations, reduced glutathione, *Gammarus roeseli*, biomarkers, energy reserves

1. INTRODUCTION

Biomarkers are tools used in environmental risk assessment (Galloway 2006; Hagger et al. 2008). Most of them belong to defence mechanisms of organisms against oxidative damage caused by the formation of reactive oxygen species (ROS) (Sies 1986). If enzymatic activities such as catalase (EC 1.11.1.6), superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), selenium-dependent glutathione peroxide (SeGPx; EC 1.11.1.9), glutathione reductase (GRd; EC 1.6.4.2), glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18), ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) or acetylcholinesterase are widely studied in ecotoxicology as sensitive biomarkers (Cossu et al. 1997; Doyotte et al. 1997; Regoli et al. 1998; Timofeyev et al. 2006; Box et al. 2009; Sroda and Cossu-Leguille, 2011a, 2011b), the free radical and xenobiotic scavengers of the non-enzymatic system such as vitamin E, vitamin A (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996), or glutathione are often overlooked although they may constitute useful biomarkers.

Glutathione is a tripeptide widely distributed in animal and plant tissues. In its reduced form (GSH), it plays a central role into the detoxification system thanks to its thiol function which acts as a scavenger of organic or metallic xenobiotics (Griffith, 1999; Vasseur and Leguille, 2004). It participates in a lot of fundamental cellular processes, including protein synthesis, amino acid transport, enzymatic activity and cell defence against a wide range of stressors (Meister and Anderson, 1983; Singhal et al. 1987; Akira et al. 1990). It also plays an important role as a reducer which could prevent the toxic effect of ROS (Meister, 1988). Its contents have therefore been assayed in ecotoxicological studies about invertebrates, especially in bivalves (Doyotte et al. 1997; Yan et al. 1997; Ringwood et al. 1998; Canesi et al. 1999; Romero-Ruiz et al. 2003).

Among freshwater species, *Gammarus* sp. is a suitable organism for ecotoxicological assessment of environmental pollutants at a large scale, mostly because gammarid are present in most (if not all) river in Europe. Gammarids are known to be sensitive to pollutants and can easily be used for laboratory and field studies (Kunz et al. 2010). Hence, many ecotoxicological studies were carried out using gammarids to evaluate toxic impact of xenobiotics (Krapp et al. 2009; Adam et al. 2010; Sornom et al. 2010; Zubrod et al. 2010; Khan et al. 2011; Bundschuh et al. 2011; Sroda and Cossu-Leguille, 2011b). However, to our knowledge, no studies have been devoted to glutathione as a biomarker in *Gammarus* sp., although it could be the limiting factor for many antitoxic enzymes that use it as substrate and

which are commonly assessed in these organisms (Correia et al. 2003; Timofeyev et al. 2006; Bedulina et al. 2010; Sroda and Cossu-Leguille, 2011a, 2011b).

As biomarker are known to be influenced by biotic and abiotic factors (e.g. gender, temperature) (Fader et al. 1994; Minier et al. 2000; Geffard et al. 2007; Bigot et al. 2011; Sroda and Cossu-Leguille, 2011a), the aim of the present study was to investigate the influence of gender and season on the GSH concentrations and its synthesis (i.e. γ-glutamylcysteine ligase activity) in *Gammarus roeseli*, a widespread amphipod crustacean which originates from the Balkan area, and has colonized several Western European rivers (Jazdzewski, 1980; Barnard and Barnard, 1983). In parallel, we measured the energy reserves by assaying glycogen and lipid contents. Glycogen represents a short-term energy source available for current activities (Sparkes et al. 1996), whereas lipids are used for long-term storage to be used as nutrients during starvation or reproduction periods (Cargill et al. 1985). Finally, we measured the level of malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation which reflects cellular damage. To test if gender could influence on biomarker levels, all measurements were carried out on both males and females.

2. MATERIELS AND METHODS

2.1. Sampling and maintenance of *G. roeseli*

Males and females *G. roeseli* were sampled monthly from October 2008 to September 2009 with a hand net in the Nied River (Laquenexy, North-eastern France, 49°05’ N and 6°16’ E). Each month, water parameters such as temperature, pH, conductivity, dissolved oxygen and oxygen saturation were measured in the field with a WTW Multi 340i/set measurement (Germany). Male and female gammarids were sorted on the spot according to gnatopod size, a sexual dimorphism character. They were then transported to the laboratory in river water, where pools of seven males and pools of ten females were formed to measure biomarkers and energy reserves. Prior to the analysis, *G. roeseli* gender was checked by observing genital papillas, which are present in males only, on the 7th ventral segment.

2.2. Biomarkers measurement

2.2.1. Sample preparation

Each pool was homogenized with a manual Potter Elvejhem tissue grinder in a 50 mM phosphate buffer KH_2PO_4/K_2HPO_4 (pH 7.6) supplemented with 1 mM phenylmethyl sulphonylfluoride (PMSF), and 1 mM L-serine-borate mixture as proteases inhibitors and 5 mM phenylglyoxal as a γ-glutamyl transpeptidase inhibitor. The homogenization buffer was adjusted at a volume two-fold the wet weight of the sample pool (e.g. 400 µL of homogenization buffer for 200 mg of wet weight tissue). The homogenate was divided into five parts to measure the different parameters. For each replicate, two independent measurements were performed for each biomarker.

2.2.2. Biomarkers assays.

Reduced glutathione (GSH) concentrations measurement was adapted from Leroy et al. (1993) using High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) separation. The proteins of 40 µL of the total homogenate were precipitated with 10% perchloric acid (v/v). After a 10-min centrifugation at 20,000x *g* at 4°C, the resulting supernatant was diluted 40-fold in 0.1M chlorhydric acid (HCl). Twenty microlitres of the diluted supernatant were injected in a reverse-phase LiChrospher 100 RP18-encapped column (125 mm x 4 mm, 5 µm) and separation was carried out at 25°C. Elution was performed with 7% acetonitrile (Chromanorm, 95%) in a 0.01M phosphate buffer (pH 2.5) containing 0.5 mM *n*-decylsodiumsulfate as an ion-pairing reagent. Commercial GSH diluted in 0.1M HCl was used as a standard and GSH concentrations were expressed in $nmol.mg^{-1}$ protein.

The GCL activity was assayed using an HPLC method adapted from Parmentier et al. (1998). Measurements were carried out on the S12000 fraction obtained after centrifuging 40 µL of the total homogenate for 15 min at 500 x *g* and then centrifuging the resulting supernatant at 12,000 x g and 4°C for 30 min. The resulting S12000 fraction was diluted 20-fold in the homogenization buffer and 40 µL of this diluted solution were added to 112 µL of incubation cocktail (0.5 M Tris-HCl, 200 mM $MgCl_2,6H_2O$, 500 mM KCl, 45 mM glutamic acid, 90 mM cysteine, 1 mM DTT, 90 mM ATP, 0.5 mM phenylglyoxal, pH 8.25) to initiate the reaction. After a 20 min-incubation period at 25°C, the reaction was stopped by a four-fold dilution with 0.1 M HCl. Twenty microlitres of the resulting solution were injected into a LiChrospher 100 RP18-encapped HPLC column (125 mm x 4 mm, 5 µm). Commercial glutamylcysteine (GC) solution was used as a standard and GCL activity was expressed in $nmol\ GC.min^{-1}.mg^{-1}$ protein.

The total protein content of each sample was quantified according to Bradford (1976) with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Results were expressed in $mg.mL^{-1}$.

2.2.3. Lipoperoxidation

Malondialdehyde (MDA) levels were measured with an HPLC method adapted from Behrens and Madère (1991) with UV detection at 267 nm. Seventy microlitres of the total homogenate were diluted four-fold with 95% ethanol (HPLC grade) and cooled on ice for 1.5hrs to deproteinize them. The mixture was then centrifuged at 18,000 x *g* for 30 min at 4°C. One hundred microlitre of the resulting supernatant were injected directly into a reversed-phase LiChrospher 100RP18-encapped HPLC column. The 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 tetradecylmethylammoniun bromide as an ion-paring reagent. MDA levels were expressed in ng MDA.mg^{-1} lipid.

2.2.4. Energy reserves

The measurement of total lipid and glycogen contents was adapted from Plaistow et al. (2001). Twenty microlitres of 2% sodium sulphate (w/v) and 540 µL of chloroform/methanol 1:2 (v/v) were added to 40 µL of total homogenate. After 1h on ice, the samples were centrifuged at 3,000 x *g* for 5 min, at 4°C. The resulting supernatant and the pellet were used to determinate the total lipid and glycogen contents, respectively.

One hundred microlitre of the supernatant were transferred into culture tubes and placed into a dry bath at 95°C to evaporate the solvent. Then, 200 µL of 95% sulphuric acid were added in each tube and left for 10 min. The culture tubes were cooled on ice and then 4.8 mL of a vanillin-phosphoric acid reagent were added. After a 10-min reaction, the optical density was measured at 535 nm. Commercial cholesterol was used as a standard and lipid contents were expressed in mg.mL^{-1}.

Total dissolution of the pellet was performed in 400 µL of deionized water for 10 minutes in an ultrasonic bath. One hundred microlitre of each sample were placed in culture tubes and 4.9 mL of anthrone reagent were added. The mixture was placed in a dry bath at 95°C for 17 min and then cooled on ice. Optical density was measured at 625 nm. Glucose was used as a standard and concentrations were expressed in µg.mg^{-1} wet weight.

2.3. Statistical analysis

Data analysis was performed using a multivariate analysis of variance (MANOVA, Pillai's trace) with respect to "gender" and "sampling month" as fixed factors. All data met normality and homogeneity of variance assumptions. Since the MANOVA test was significant, each biomarker was then analyzed using ANOVA tests, followed by the TukeyHSD post-hoc test. Pearson correlations were calculated to investigate the relationship between biomarker values and water quality parameters. All tests were performed with a 5% type I error risk, using R 2.9.0 Software.

3. RESULTS

3.1. Water parameters

Monthly measure physico-chemical parameters are summarized in Table 1. Among the different parameters we measured, temperature was the most variable with a variance coefficient of 55.2%, whereas pH was the least variable. Indeed, temperature ranged from 2.3°C in January to 20°C in June. All other parameters were stable over time and mean values for pH, conductivity, dissolved oxygen and oxygen saturation were respectively 8.1, 1403.8 $\mu s.cm^{-1}$, 10.3 $mg.L^{-1}$ and 95.4%.

3.2. Seasonal variations

Global MANOVA analysis revealed an effect of individual gender, sampling month, and of their interactions on the variations of the biomarker levels (Table 2). The results are detailed below for each biomarker category.

Table 1. Physico-chemical parameters of the Nied River at Laquenexy measured at each sampling date. Means and standard deviations are presented at the end of the table

		Temperature (°C)	*pH*	*Conductivity (µS.cm^{-1})*	*Dissolved oxygen (mg.L^{-1})*	*Oxygen saturation (%)*
2008	***Oct***	9.6	8.1	1722.0	11.0	97.8
	Nov	8.6	8.0	1460.0	10.0	84.4
	Dec	3.6	7.9	1136.0	10.8	81.4
2009	***Jan***	2.3	8.0	1135.0	11.1	81.5
	Feb	4.9	8.3	1051.0	10.7	84.7
	Mar	9.0	8.3	1091.0	12.5	108.6
	Apr	12.7	8.2	1353.0	9.9	97.3
	May	17.3	8.0	1463.0	9.1	96.0
	Jun	20.0	8.4	1580.0	11.0	123.8
	Jul	19.6	7.8	1171.0	6.4	71.9
	Aug	20.5	8.2	1685.0	10.4	105.3
	Sep	17.1	8.1	1998.0	10.5	111.9
	Mean	**12.1**	**8.1**	**1387.1**	**10.3**	**95.4**
	SD	**6.7**	**0.2**	**326.4**	**1.5**	**15.2**
	VC%	**55.2**	**2.1**	**23.5**	**14.2**	**15.9**

Table 2. Multivariate (Pillai's trace) and univariate analyses of variance investigating variation of energy reserves (protein, lipid, glycogen), defences capacities (GSH, GCL) and biomarker of toxicity (MDA) of Gammarus roeseli, as function of gender and sampling month.

Models	**Parameter**	**Source of variation**	***num d.f.*** [a]***, den d.f.*** [b]	**F**	***P***
MANOVA		Whole model	138, 432	17.44	**<0.0001** [c]
		Gender	6, 67	47.46	**<0.0001**
		Month	66, 432	24.04	**<0.0001**
		Gender : Month	66, 432	5.61	**<0.0001**
ANOVAs	Proteins	Whole model	23, 72	18.85	**<0.0001**
		Gender	1, 72	92.61	**<0.0001**
		Month	11, 72	27.85	**<0.0001**
		Gender : Month	11, 72	3.15	**0.0016**
	Total lipids	Whole model	23, 72	38.73	**<0.0001**
		Gender	1, 72	214.61	**<0.0001**
		Month	11, 72	42.01	**<0.0001**
		Gender : Month	11, 72	19.46	**<0.0001**
	Glycogen	Whole model	23, 72	13.26	**<0.0001**
		Gender	1, 72	22.82	**<0.0001**
		Month	11, 72	23.74	**<0.0001**
		Gender : Month	11, 72	1.90	**0.0520**
	GSH	Whole model	23, 72	15.45	**<0.0001**
		Gender	1, 72	39.04	**<0.0001**
		Month	11, 72	23.94	**<0.0001**
		Gender : Month	11, 72	4.81	**<0.0001**
	GCL	Whole model	23, 72	30.64	**<0.0001**
		Gender	1, 72	0.20	0.6544
		Month	11, 72	50.88	**<0.0001**
		Gender : Month	11, 72	13.16	**<0.0001**
	MDA	Whole model	23, 72	24.56	**<0.0001**
		Gender	1, 72	95.28	**<0.0001**
		Month	11, 72	29.14	**<0.0001**
		Gender : Month	11, 72	13.54	**<0.0001**

[a] Numerator degrees of freedom.
[b] Denominator degrees of freedom
[c] Significant values shown in bold

3.2.1. Antitoxic defences and biomarker of effect

Reduced glutathione concentrations measured over one year in *G. roeseli* were influenced by gender and sampling month (Table 2). For both genders, GSH concentrations increased in winter (from November to February) and decreased in summer (from May to August) (Fig. 1). Overall, females had higher GSH concentrations than males. In females, the highest values were measured in spring (March and April) with an average 4.5 nmol GSH.mg^{-1} protein, while in males, the highest GSH concentrations were observed in January (3.7 nmol GSH.mg^{-1} protein). This observation was supported by the fact that, in both genders, GSH concentrations were negatively correlated to water temperature (r = -0.68, *p*-value < 0.001; r = -0.79, *p*-value < 0.001, for females and males respectively).

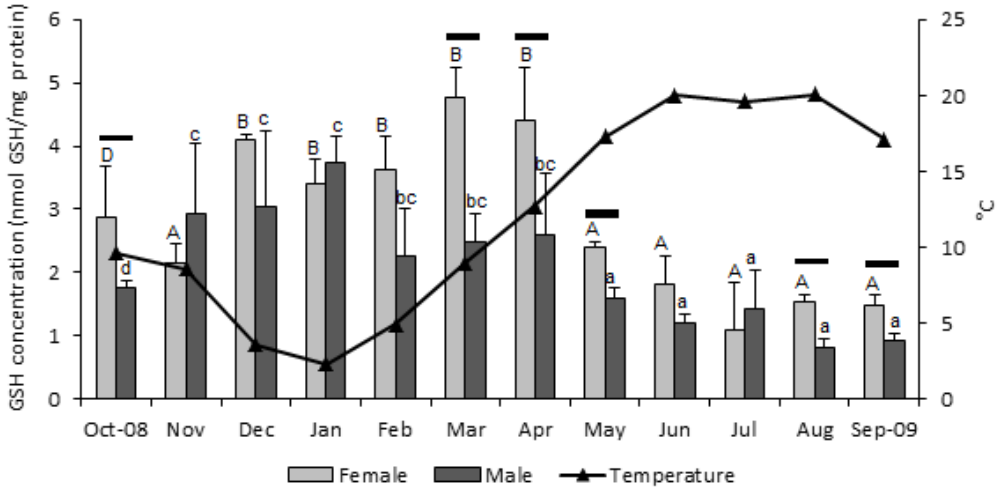


Fig. 1. Seasonal variations of GSH concentrations in G. roeseli males and females, and the temperature. *Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, p-values < 0.05).*

GCL activity was also measured and varied significantly depending on sampling month, unlike gender (Table 2, Fig. 2). Indeed, no significant difference was determined between males and females: the annual mean value of GCL activity was 0.34 and 0.35 nmol GC.min^{-1}.mg^{-1} protein for females and males, respectively. In both genders, GCL activity was lower from October to April (winter), except in January, with an average 0.22 and 0.26 nmol GC.min^{-1}.mg^{-1} protein in males and females, respectively. The highest activities were measured from May to September (summer) and were about 0.41 and 0.43 nmol GC.min^{-1}.mg^{-1} protein for females and males, respectively. Moreover, in females, GCL activity was positively correlated with water temperature (r = 0.38, *p*-value < 0.001).

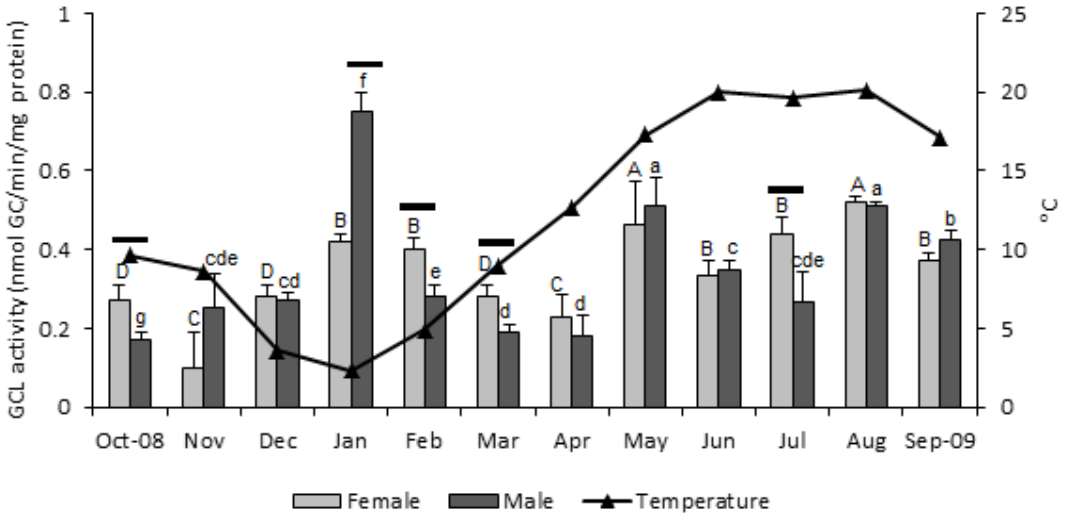


Fig. 2. Seasonal variations of GCL activities in G. roeseli males and females, and the temperature. *Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, p-values < 0.05).*

MDA levels, used as a toxicity biomarker, were influenced by gender, sampling month and the interactions between them (Table 2, Fig. 3). Males had higher MDA levels than females, regardless of the month (Fig. 3). Indeed, the annual MDA mean level in males was 6.60 ng.mg^{-1} lipid and ranged from 2.74 ng.mg^{-1} lipid in August to 14.44 ng.mg^{-1} lipid in March, whereas females exhibited an average 4.26 ng.mg-1 lipid and ranged from 2.00 ng.mg^{-1} lipid in February to 7.78 ng.mg^{-1} lipid in June. Significant differences between males and females were mainly observed in spring (from February to May).

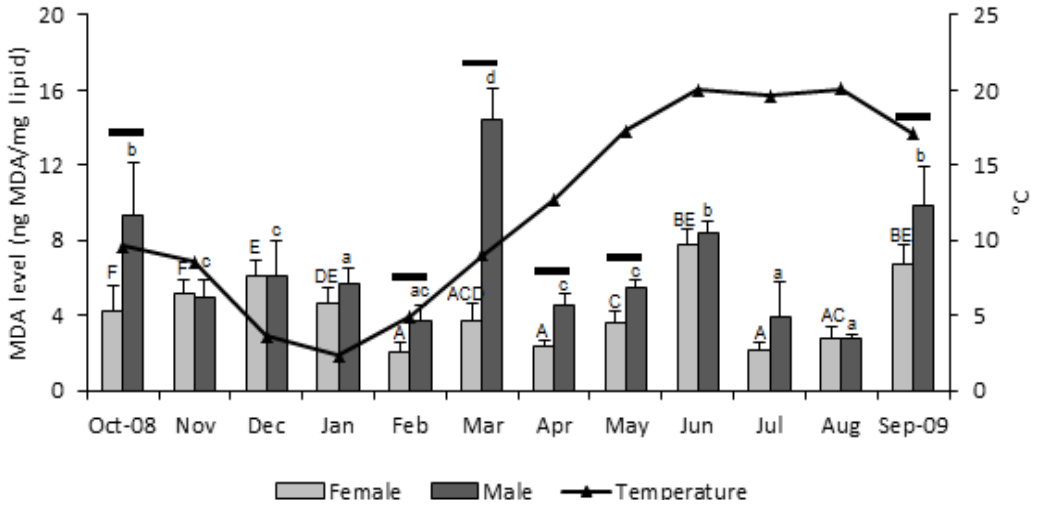


Fig. 3. Seasonal variations of MDA levels in G. roeseli males and females, and the temperature. *Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, p-values < 0.05).*

3.2.2. Energy reserves

Total lipid contents were influenced by gender, month and the interactions between them (Table 2). Total lipid contents were higher in females than in males (Table 3) with

annual mean of lipid contents of 4.91 mg.mL^{-1} and 3.33 mg.mL^{-1}, respectively. Significant differences between males and females were observed all year long, except in November and January. For both genders, the lowest total lipid content was measured in September with 2.91 mg.mL^{-1} and 1.52 mg.mL^{-1} in females and males, respectively; while the highest was observed in February for females (8.36 mg.mL^{-1}) and in August for males (5.72 mg.mL^{-1}).

As total lipid content, protein concentration was influenced by gender, sampling month and the interactions between them (Table 2). Mean annual protein concentration was higher in *G. roeseli* females than in males (data not shown). Protein concentrations in females were significantly higher than in males from February to June. For both genders, maximal protein concentrations were measured in September with 24.97 and 27.24 mg.mL^{-1} in males and females, respectively; whereas minimal values were observed in January in males (16.71 mg.mL^{-1}) and in November in females (18.33 mg.mL^{-1}) (data not shown).

Glycogen content was influenced by gender and the interaction of gender and sampling month (Tables 2 and 3). Significant differences between males and females were observed during the spring period, from March to June. In males, glycogen contents ranged from 0.79 µg.mg^{-1} tissue in March to 7.04 µg.mg^{-1} tissue in December; while in females, it ranged from 2.58 µg.mg^{-1} tissue in October to 7.54 µg.mg^{-1} tissue in December.

Table 3. Monthly variations of energy reserves (lipid, glycogen) of G. roeseli males and females. *Majuscule and minuscule letters indicate significant differences in males and females, respectively. Asterisk highlighted differences between males and females for each month. Minimum and maximum of each parameter for each gender were indicated in bold type.*

Month ***(°C)***	**Total lipid content (mg/mL)**			**Glycogen content (µg/mg tissue)**		
	Males	*Females*		*Males*	*Females*	
Oct *(9.6)*	2.67 ± 0.52 ^{bc}	5.45 ± 0.96 ^{F}	*	3.34 ± 0.43 ^{a}	**2.58 ± 0.63** $^{\mathbf{A}}$	
Nov *(8.6)*	3.27 ± 1.00 ^{cd}	3.54 ± 0.98 ^{D}		2.51 ± 0.72 ^{a}	2.59 ± 1.41 ^{A}	
Dec *(3.6)*	2.54 ± 0.54 ^{bc}	4.97 ± 0.59 ^{EF}	*	**7.04 ± 1.90** $^{\mathbf{b}}$	**7.54 ± 2.38** $^{\mathbf{B}}$	
Jan *(2.3)*	3.56 ± 0.09 ^{cde}	3.74 ± 0.32 ^{DEF}		3.53 ± 0.66 ^{a}	4.28 ± 0.50 ^{AC}	
Feb *(4.9)*	**4.92 ± 0.92** $^{\mathbf{ae}}$	**8.36 ± 0.59** $^{\mathbf{C}}$	*	3.62 ± 0.33 ^{a}	4.03 ± 0.20 ^{AC}	
Mar *(9.0)*	1.55 ± 0.11 ^{b}	3.76 ± 0.37 ^{DE}	*	**0.79 ± 0.28** $^{\mathbf{c}}$	2.60 ± 0.32 ^{A}	*
Apr *(12.7)*	3.38 ± 0.24 ^{cd}	5.83 ± 0.43 ^{BEF}	*	2.19 ± 0.43 ^{a}	3.13 ± 0.32 ^{A}	*
May *(17.3)*	4.16 ± 0.16 ^{de}	7.35 ± 0.63 ^{C}	*	1.94 ± 0.43 ^{a}	4.23 ± 0.62 ^{AC}	*
Jun *(20.0)*	3.07 ± 0.20 ^{c}	4.85 ± 0.35 ^{BEF}	*	2.18 ± 0.24 ^{a}	3.27 ± 0.33 ^{A}	*
Jul *(19.6)*	3.62 ± 0.48 ^{cde}	4.94 ± 0.55 ^{BEF}	*	4.06 ± 0.73 ^{a}	4.95 ± 0.45 ^{C}	
Aug *(20.5)*	3.22 ± 0.22 ^{cde}	5.72 ± 0.13 ^{BEF}	*	2.49 ± 0.09 ^{a}	2.79 ± 0.74 ^{A}	
Sep *(17.1)*	**1.52 ± 0.10** $^{\mathbf{b}}$	**2.91 ± 0.20** $^{\mathbf{AD}}$	*	2.67 ± 0.71 ^{a}	4.04 ± 0.38 ^{AC}	
Annual mean	*3.12 ± 0.38*	*5.12 ± 0.51*	*	*3.03 ± 0.58*	*3.83 ± 0.69*	

4. DISCUSSION

A seasonal variation in reduced glutathione concentrations was observed. GSH concentrations were higher in autumn and winter, then decreased in spring and finally reached their lowest in summer, in both genders. Similar variations were observed by Verlecar et al. (2008) in the digestive gland and gills of the mussel *Perna viridis*. Indeed, whatever the tissue fraction of the bivalve, lower GSH concentrations were measured in summer and higher concentrations in winter. Nevertheless, inverse trends were measured in the bivalves *Mytilus edulis* and *Perna perna* (Power and Sheehan, 1996; Wilhelm Filho et al. 2001). The decrease in GSH concentration observed in summer in our study could be explained by the rise in temperatures, resulting in an increase in oxygen consumption, as observed in *Gammarus limnaeus* (Krog, 1954), and in *Gammarus fossarum* (Issartel et al. 2005). In fact, an increase in oxygen consumption could favour the formation of reactive oxygen species (ROS) following a process already described by Verlecar et al. (2007) in the brown mussel *Perna viridis*. Thus, to prevent the cellular damage caused by high ROS levels in summer, GSH could be used for detoxification, resulting in its decrease. This hypothesis is supported by the fact that GCL activity was higher in summer in both genders compared to autumn and winter, which reflects high GSH production. Consequently, our results suggest that high levels of GSH are produced in summer and are likely to be used for cell defence.

Our results highlighted also gender-based GSH concentrations, as *G. roeseli* females had higher GSH concentrations than males. This higher GSH content in females, as compared to males, could be linked to a higher activity of antioxidant enzymes (e.g. selenium-dependent glutathione peroxidase) using GSH as a substrate (Sroda and Cossu-Leguille, 2011a). This difference in GSH concentrations between males and females could also be caused by the physiological status of the organisms. Viarengo et al. (1991) and Wilhelm Filho et al. (2001) have shown a close link between GSH concentrations and the reproduction cycle in *Mytilus* sp. and *Perna perna*, respectively. In our study, the GSH variations could be related to the changing metabolic status of the organism, which could itself depend on gonad maturation. In *G. roeseli*, Pöckl (1992) showed that sexual maturity was reached faster at 16-20°C, which corresponds to the temperatures measured from May to September on our study site. Therefore, we can hypothesize that the higher GSH concentrations measured in March and April, especially in females, could be an adaptation of the organism to increase their defence capacities before the breeding period. Higher defence capacities observed in females allow us to hypothesize that females could be less sensitive than males in a contamination

context. On the one hand, this hypothesis is also supported by the measurement of lower MDA levels in *G. roeseli* females than in males ones (this study; Sroda and Cossu-Leguille, 2011a), reflecting lower cell damage. On the other hand, this hypothesis could be also explained by a difference in energy reserves between both genders. Indeed, total lipid and glycogen contents were higher in females than in males. We could hypothesize that a higher energy reserves in females could allow them to produce higher antitoxic defences and thus having a better defence than males in polluted environment. However, energy reserves are also influenced by the physiological status of the organism.

In females, the highest lipid and glycogen content, as compared to males, were measured from March to May, which corresponds to the maturation period, linked to the oogenesis process. This process involves the vitellus production (required for eggs development) which uses lipids (Rosa and Nunes, 2002, Oliveira et al. 2007), and pleopod beats (considered as brood care for juveniles oxygenation - Dick et al. 1998) which could use glycogen (short-term energy – Sparkes et al. 1996). This hypothesis is supported by Clarke et al. (1985) who observed an increase in lipid contents during female maturation in *Gammarus oceanicus*. The higher energy reserves in females than in males could also be explained by the energy needed to produce antioxidant compounds and activate antitoxic enzymes. Indeed, Sroda and Cossu-Leguille (2011a) have demonstrated that *G. roeseli* females have higher activity of GSH-dependent antitoxic enzymes than males ones; thus, females could need higher GSH concentrations. However, the GSH synthesis is performed by two successive ATP-dependent reactions (Meister and Anderson, 1983), which consume energy coming from lipids and glycogen degradation. Hence, we can hypothesize that females have higher lipid contents than males to assume the reproductive period and to maintain high GSH concentrations for detoxification processes.

In both genders, the low glycogen contents measured in spring could be linked to its use as energy source to the GSH synthesis, since GCL activity was increased. Moreover, although in females, this decreased could be explain by the breeding period (see above), in males, the lowest glycogen contents measured in spring could be explained by an increase of the locomotor activity to seek for receptive females for breeding, as supposed by Plaistow et al. (2003) and Sroda and Cossu-Leguille (2011a).

5. CONCLUSION

The present work highlighted variations in GSH concentrations and GCL activity in *G. roeseli* according to gender and season. GSH concentrations were found to be negatively correlated to water temperature and lowest in summer. Higher GSH concentrations were measured in females, suggesting a better antitoxic defence than males in contaminated environments. Our results demonstrated also that total lipid and glycogen contents were influenced by season and gender too. Considering our results, spring and summer seems to be the less favorable sampling period to ecotoxicological studies using gammarid as biological model, due to the fact that the physiological state of the organism (i.e. gender, maturation process, reproduction) and the season (i.e. high temperature) cause changes in the mobilization of defence capacities and energy reserves in both genders, potentially leading to different sensitivities under stress conditions. It would therefore be cautious to consider these confounding factors, in order to interpret biomarker responses more relevantly as possible.

Acknowledgments: *The PhD thesis of Eric Gismondi was supported by the French Ministry of Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) which we sincerely thank here. The present work was funded the research program EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière) and the Zone Atelier Moselle (ZAM, Région Lorraine). We are grateful to Annie Buchwalter for improving the English text.*

REFERENCES

Adam O, Degiorgi F, Crini G, Badot P (2010). High sensitivity of *Gammarus* sp. juveniles to deltamethrin: Outcomes for risk assessment. Ecotox Environ Safe 73:1402-1407.

Akira N, Anderson ME, Meister A (1990). Cellular glutathione as a determinant of sensitivity to mercuric chloride toxicity: Prevention of toxicity by giving glutathione monoester. Biochem Pharmacol 40:693-697.

Barnard JL, Barnard CM (1983). Freshwater Amphipoda of the World I & II, Hayfield Associates, Mt. Vernon.

Bedulina DS, Timofeyev MA, Zimmer M, Zwirnmann E, Menzel R, Steinberg CEW (2010). Different natural organic matter isolates cause similar stress response patterns in the freshwater amphipod, *Gammarus pulex*. Environ Sci Pollut R 17:261-269.

Behrens W, Madère R (1991). Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography. Lipids 26:232-236.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.

Bigot A, Doyen P, Vasseur P, Rodius F (2011). Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: Transcriptional and histochemical studies. Environ Toxicol 26:623-632.

Box A, Sureda A, Deudero S (2009). Antioxidant response of the bivalve *Pinna nobilis* colonised by invasive red macroalgae *Lophocladia lallemandii*. Comp Biochem Phys C 149:456-460.

Bundschuh M, Zubrod JP, Schulz R (2011). The functional and physiological status of *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda) exposed to secondary treated wastewater. Environ Pollut 159:244-249.

Canesi L, Viarengo A, Leonzio C, Filippelli M, Gallo G (1999). Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. Aquat Toxicol 46:67-76.

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.

Clarke A, Skadsheim A, Holmes LJ (1985). Lipid biochemistry and reproductive biology in two species of Gammaridae (Crustacea: Amphipoda). Mar Biol 88:247-263.

Correia AD, Helena Costa M, Luis OJ, Livingstone DR (2003). Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). J Exp Mar Biol Ecol 289:83-101.

Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A, Vasseur P (1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*,as biomarkers of aquatic contamination in field Studies. Ecotox Environ Safe 38:122-131.

Dick JTA, Faloon SE, Elwood RW (1998). Active brood care in an amphipod: influences of embryonic development, temperature and oxygen. Anim Behav 56:663-672.

Doyotte A, Cossu C, Jacquin M, Babut M, Vasseur P (1997). Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquat Toxicol 39:93-110.

Fader SC, Yu Z, Spotila JR (1994). Seasonal variation in heat shock proteins (hsp 70) in stream fish under natural conditions. J Therm Biol 19:335-341.

Galloway TS (2006). Biomarkers in environmental and human health risk assessment. Mar Pollut Bull 53:606-613.

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

Griffith OW (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Radical Biol Med 27:922-935.

Hagger JA, Jones MB, Lowe D, Leonard DP, Owen R, Galloway TS (2008). Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study. Mar Pollut Bull 56:1111-1118.

Issartel J, Hervant F, Voituron Y, Renault D, Vernon P (2005). Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigean and hypogean crustaceans to different temperatures. Comp Biochem Phys A 141:1-7.

Jażdżewski K (1980). Range extensions of some gammaridean species in european inland waters caused by human activity. Crustaceana 6:84-107.

Kamal-Eldin A, Appelqvist L (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids 31:671-701.

Khan FR, Irving JR, Bury NR, Hogstrand C (2011). Differential tolerance of two *Gammarus pulex* populations transplanted from different metallogenic regions to a polymetal gradient. Aquat Toxicol 102:95-103.

Krapp RH, Bassinet T, Berge J, Pampanin DM, Camus L (2009). Antioxidant responses in the polar marine sea-ice amphipod *Gammarus wilkitzkii* to natural and experimentally increased UV levels. Aquat Toxicol 94:1-7.

Krog J (1954). The influence of seasonal environmental changes upon the metabolism, lethal temperature and rate of heart beat of *Gammarus limnaeus* (Smith) aken from an Alaskan Lake. Biol Bull 107:397-410.

Kunz PY, 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.

Leroy P, Nicolas A, Wellmann M, Michelet F, Oster T, Siest G (1993). Evaluation of *o*-phthalaldehyde as bifunctional fluorogenic post-column reagent for glutathione in LC. Chromatographia 36:130-134.

Martin AL (1965). The histochemistry of the moulting cycle in *Gammarus pulex (*Crustacea, Amphipoda). Proceedings of the Zoological Society of London 147:185-200.

Meister A, Anderson ME (1983). Glutathione. Annu Rev Biochem 52:711-760.

Meister A (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. J Biol Chem 263:17205–17208.

Minier C, Borghi V, Moore MN, Porte C (2000). Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Aquat Toxicol 50:167-176.

Parmentier C, Leroy P, Wellman M, Nicolas A (1998). Determination of cellular thiols and glutathione-related enzyme activities: versatility of high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetric detection. J Chromatogr B 719:37-46.

Parvathy K (1971). Glycogen storage in relation to the moult cycle in the two crustaceans *Emerita asiatica* and *Ligia exotica*. Mar Biol 10:82-86.

Plaistow SJ, Troussard JP, Cézilly F (2001). The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. Int J Parasitol 31:346-351.

Plaistow SJ, Bollache L, Cézilly F (2003). Energetically costly precopulatory mate guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences. Anim Behav 65:683-691.

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

Power A, Sheehan D (1996). Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. Comp Biochem Phys C 114:99-103.

Ray S, Misso NLA, Lenzo JC, Robinson C, Thompson PJ (1999). Gamma-glutamylcysteine synthetase activity in human lung epithelial (A549) cells: Factors influencing its measurement. Free Radical Biol Med 27:1346-1356.

Ray S, Watkins DN, Misso NLA, Thompson PJ (2002). Oxidant stress induces gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in human bronchial epithelial NCI-H292 cells. Clin Exp Allergy 32:571-577.

Regoli F, Hummel H, Amiard-Triquet C, Larroux C, Sukhotin A (1998). Trace metals and variations of antioxidant enzymes in Arctic bivalve populations. Arch Environ Cont Tox 35:594-601.

Ringwood AH, Conners DE, DiNovo A (1998). The effects of copper exposures on cellular responses in oysters. Mar Environ Res 46:591-595.

Romero-Ruiz A, Amezcua O, Rodríguez-Ortega MJ, Muñoz JL, Alhama J, Rodríguez-Ariza A, Gómez-Ariza JL, López-Barea J (2003). Oxidative stress biomarkers in bivalves transplanted to the Guadalquivir estuary after Aznalcóllar spill. Environ Toxicol Chem 22:92-100.

Sies H (1986). Biochemistry of oxidative stress. Angewandte Chemie International Edition in English 25:1058-1071.

Singhal R, Anderson M, Meister A (1987). Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. The FASEB Journal 1:220-223.

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

Sparkes TC, Keogh DP, Pary RA (1996). Energetic costs of mate guarding behavior in male stream-dwelling isopods. Oecologia 106:166-171.

Sroda S, Cossu-Leguille C (2011a). Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. Chemosphere 83:538-544.

Sroda S, Cossu-Leguille C (2011b). Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor? Ecotoxicology 20:264-273.

Sutcliffe DW (1993). Reproduction in Gammarus (Crustacea, Amphipoda) female strategies. *Freshwater Forum* 3:26-64.

Timofeyev MA, Shatilina ZM, Kolesnichenko AV, Bedulina DS, Kolesnichenko VV, Pflugmacher S, Steinberg CE (2006). Natural organic matter (NOM) induces oxidative stress in freshwater amphipods *Gammarus lacustris* Sars and *Gammarus tigrinus* (Sexton). Sci Total Environ 366:673-681.

Travis DF (1957). The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille. IV. Post-Ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. The Biological Bulletin 113:451-479.

Vasseur P, Leguille C (2004). Defense systems of benthic invertebrates in response to environmental stressors. Environ Toxicol 19:433-436.

Verlecar X, Jena K, Chainy G (2007). Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. Chem Biol Interact 167:219-226.

Verlecar X, Jena K, Chainy G (2008). Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. Estuar Coastal Shelf S 76:745-752.

Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Livingstone DR (1991). Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. Comp Biochem Phys C 100:187-190.

Wilhelm Filho D, Tribess T, Gaspari C, Claudio FD, Torres MA, Magalhaes ARM (2001). Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). Aquaculture 203:149-158.

Yan T, Teo LH, Sin YM (1997). Effects of mercury and lead on tissue glutathione of the green mussel, *Perna viridis* L.. B Environ Contam Tox 58:845-850.

Zubrod JP, Bundschuh M, Schulz R (2010). Effects of subchronic fungicide exposure on the energy processing of *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda). Ecotox Environ Safe 73:1674-1680.

PARTIE II
ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE LA PRESENCE DE PARASITE SUR DES BIOMARQUEURS DE *G. ROESELI*
~
L'ACANTHOCEPHALE *POLYMORPHUS MINUTUS*

Publication 2

Does the acanthocephalan parasite Polymorphus minutus modify the energy reserves and antitoxic defences of its intermediate host Gammarus roeseli?

Acceptée dans Parasitology

Cette étude avait pour but d'appréhender l'influence de la présence de parasite sur les éléments de défense et les réserves énergétiques de l'hôte. Dans les environnements perturbés, les organismes parasités doivent faire face à deux stress: un stress chimique et un stress dû à la présence du parasite. Cependant, en dépit de cette situation courante, peu d'études se sont intéressées aux effets d'une infection parasitaire sur les réserves énergétiques et les capacités de défense de l'hôte, alors que la survie du parasite dépend de la survie de son hôte.

Nous avons étudié l'acanthocéphale *Polymorphus minutus,* parasite manipulateur de son hôte intermédiaire, l'amphipode *Gammarus roeseli,* résultant à une surexposition du gammare parasité à l'hôte définitif, un oiseau d'eau. Nous avons étudié les conséquences de cette infection sur les réserves énergétiques (*i.e.* protéines, lipides, glycogène) ainsi que sur les capacités antioxydantes (*i.e* glutathion réduit et sa synthèse) de *G. roeseli*. En complément, la concentration en malondialdehyde a été utilisée comme biomarqueur d'effet toxique. Pour cela, des individus *G. roeseli* mâles et femelles, parasités ou non-parasités par *P. minutus* ont été échantillonnés en mai, juin et août 2009, correspondant à la période de forte prévalence du parasite (0.08 en mai et 0.13 en août – Médoc et Beisel, 2009). Le manque d'individus parasités en juillet n'a pas permis d'effectuer les mesures à cette période. Avant toute analyse, le sexe des individus a été vérifié, puis le parasite a été retiré, afin de réaliser les mesures des biomarqueurs uniquement sur l'hôte. Les concentrations des

capacités de défense et du malondialdéhyde ont été mesurées par HPLC, tandis que les réserves énergétiques ont été estimées par spectrophotométrie.

Les résultats ont révélé que *G. roeseli* infectés avaient des teneurs plus faibles en protéines et lipides mais des concentrations en glycogène plus élevées, quels que soient le sexe et la période d'échantillonnage. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le parasite détournerait une partie de l'énergie de son hôte pour son propre développement et métabolsime. De plus, les concentrations en glutathion réduit et l'activité GCL étaient diminuées, conduisant à de plus faibles capacités de défense en présence du parasite. Néanmoins, les faibles teneurs de malondialdéhyde chez les gammares infectés suggéreraient un probable effet bénéfique de *P. minutus* sur son hôte.

La présente étude corrobore qu'un parasite acanthocéphale réduit les réserves d'énergie de son hôte. Nous avons également observé, dans un contexte physiologique, une baisse des capacités de défense chez les individus infectés par rapport à ceux non-infectés. Les informations fournies par le glutathion suggèrerait une plus faible résistance des gammares infectés par rapport aux non-infectés; cependant les teneurs en MDA ont démontré des dommages cellulaires plus faibles lors de la présence du parasite, suggérant un effet bénéfique du parasite. Pour aller plus loin, les conséquences des modifications observées dans cette étude chez les gammares infectés par P. minutus, doivent être évaluées dans un contexte de contamination.

Does the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* modify the energy reserves and antitoxic defences of its intermediate host *Gammarus roeseli*?

Eric GISMONDI, Carole COSSU-LEGUILLE and Jean-Nicolas BEISEL

Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie Biodiversité Ecosystèmes (LIEBE) – CNRS UMR 7146, Université de Lorraine (UdL), Campus Bridoux, Bât. IBiSE, 8 Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

ABSTRACT

In disturbed environments, infected organisms have to face with parasitic and chemical stresses. Although this situation is common, few studies have been devoted to the effects of infection on hosts' energy reserves and antitoxic defence capacities, while parasite survival depends on host survival. In this study, we tested the consequences of an infection by *Polymorphus minutus* on the energy reserves (protein, lipid and glycogen) and antioxidant defences capacities (reduced glutathione, γ-glutamylcysteine ligase activity) of *G. roeseli* males and females, in absence of chemical stress. Moreover, malondialdehyde concentration was used as a toxicity biomarker. The results revealed that in infected *G. roeseli*, whatever their gender and the sampling month, protein and lipid contents were lower, but glycogen contents were higher. This could be explained by the fact that the parasite diverts part of the host's energy for its own development. Moreover, glutathione concentrations and γ-glutamylcysteine ligase activity were both lower, which could lead to lower antitoxic defence in the host. These results suggest negative effects on individuals in case of additional stress (e.g. pollutant exposure). In absence of chemical stress, the lower malondialdehyde level in infected gammarids could suggest a probable protective effect of the parasite.

Key-Words: Acanthocephalan, cystacanth stage, amphipod, energy reserves, antitoxic defences, glutathione, malondialdehyde

1. INTRODUCTION

Among the numerous parasite species known to alter the phenotype of their intermediate hosts, acanthocephalan parasites have been shown to manipulate the behaviour of their intermediate arthropod host to make it more prone to predation by their final vertebrate host (Poulin, 1995; Lafferty, 1999; Kennedy, 2006). The behavioural changes induced by acanthocephalans can vary and include reaction to light (Bauer *et al.* 2000; Cézilly *et al.* 2000; Perrot-Minnot, 2004), vertical distribution (Cézilly *et al.* 2000; Bauer *et al.* 2005; Médoc *et al.* 2006), drift behaviour (McCahon *et al.* 1991; Maynard *et al.* 1998), activity level (Dezfuli *et al.* 2003) or the refuge use and the escape performance faced with non-host predators (Baldauf *et al.* 2007; Perrot-Minnot *et al.* 2007; Médoc and Beisel, 2009; Médoc *et al.* 2009; Beisel and Médoc, 2010). Behavioural changes make gammarids more likely to be preyed upon by the parasite's final host (Lagrue *et al.* 2007; Perrot-Minnot *et al.* 2007, Cézilly *et al.*, 2010). Although much attention has been focused on behavioural changes, few studies have been devoted to the physiological consequences of acanthocephalan infection in the intermediate host. For example, Cornet *et al.* (2009) described that acanthocephalans reduced the immune capacity of *Gammarus pulex*. In addition, parasites need their host to survive both in terms of energy supply for their own development and of their transmission to a final host (Plaistow *et al.* 2001). In disturbed environments, antitoxic defence capacities may play a key-role to allow the survival of the intermediate host faced with biotic (parasite) and abiotic (pollutants) stresses. A conflict between these two factors may occur and compromise the future of infected individuals. The parasite could also protect the host from a pollutant as sometimes demonstrated about adult acanthocephalans in their fish hosts (Sures and Siddall, 1999; Sures *et al.* 2003).

Gammarus roeseli is a widespread amphipod crustacean of Balkan-European origin (Jazdzewski, 1980; Barnard and Barnard, 1983), often used as a biological model in ecotoxicological studies that aim at developing biomarkers, especially antitoxic defence system biomarkers (Sroda and Cossu-Leguille, 2011a,b). In natural populations, *G. roeseli* commonly serves as an intermediate host for numerous acanthocephalan parasites, including the water bird acanthocephalan *Polymorphus minutus* (Médoc and Beisel, 2009). *G. roeseli* get infected as a result of eating *P. minutus* eggs released in the final host's faeces. They hatch in the intestine and release acanthor which move into the haemocoel, where they develop into cystacanths (infective larvae). This larval stage is characterized by an orange

carotenoid-based colour which makes it visible through the translucent cuticle of infested gammarids (Kennedy, 2006).

The aim of our study was to investigate the influence of *Polymorphus minutus* on the energy reserves and antitoxic defence capacities of its intermediate host *Gammarus roeseli* in May, June and August, which correspond to the period of high prevalence in our study site (Médoc and Beisel, 2009). As parasite survival and transmission depend on host survival, we hypothesized that *P. minutus* could protect its host. We therefore assumed that *P. minutus*-infected gammarids could have higher defence capacities (higher GSH concentrations) as well as lower cell damage (lower MDA levels) as compared to uninfected ones. Energy reserves were assessed by assaying protein concentrations as well as total lipid and glycogen contents. Glycogen levels are representative of the energy available for current activities (Sparkes *et al.* 1996) whereas lipids are stored in fat bodies and serve as nutrients used during starvation or reproduction periods (Cargill *et al.* 1985). Antitoxic defences were estimated by measuring reduced glutathione (GSH) concentrations. GSH is a tripeptide whose role is essential in the detoxification system thanks to its thiol function, and its acts as a scavenger of organic or metal xenobiotics (Griffith, 1999; Vasseur and Leguille, 2004). GSH is commonly used in ecotoxicology studies on invertebrates; its concentration may be drop in organisms exposed to copper (Doyotte *et al.* 1997; Canesi *et al.* 1999) or lead (Yan *et al.* 1997). It also plays an important role as a substrate for several antioxidant enzymes like selenium-dependent glutathione peroxidase (SeGPx, EC 1.11.1.9) or glutathione-S-tranferases. The activity of γ-glutamylcysteine ligase (GCL, EC 6.3.2.2), the enzyme that limits *de novo* synthesis of glutathione, was measured in parallel to glutathione concentrations. Finally, we measured the level of malondialdehyde (MDA), which is a product of lipid peroxidation reflecting cellular damage (Correia *et al.* 2002; Neuparth *et al.* 2005). This toxicity biomarker enables us to assess the probable protective effect of the parasite on its host: lower MDA levels reflect lower cell damage. In this study, we also hypothesized that gender could influence on biomarker variations as shown by Sroda and Cossu-Leguille (2011a, b) on antioxidant enzyme activities; therefore measurements were performed separately on males and females.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Gammarus roeseli sampling

Male and female *G. roeseli* were collected using hand net and artificial traps in the

Nied River (Laquenexy, North-eastern France, 49°05' N and 6°19' E) in May, June and August 2009. The low number of infected gammarids in July did not allow us to perform comparison. Infected *G. roeseli* were easily identified as the parasite appears as an intense orange dot through the cuticle. Dissection was performed to confirm infection by *P. minutus*. According to a previous study, the overall prevalence of *P. minutus* varied over the sampling period, ranging from 0.08 in May and October to 0.13 in August (Médoc and Beisel, 2009). Male and female gammarids were sorted on the spot according to gnathopod size, a sexual dimorphism character. The animals were immediately transported to the laboratory in river water, where they were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Four pools of 7 males and four pools of 10 non-gravid females were prepared for each analysis. Prior to analyses, *G. roeseli* gender was checked by observing genital papillae on the 7th ventral segment, which are found in males only.

Two conditions were studied: (i) uninfected gammarids corresponding to controls, and (ii) infected gammarids out of which the parasite was removed by dissection.

2.2. Sample preparation

Each pool was homogenized with a manual Potter Elvejhem tissue grinder in a 50 mM phosphate buffer KH_2PO_4/K_2HPO_4 (pH 7.6) supplemented with 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) and 1 mM L-serine-borate mixture as proteases inhibitors and 5 mM phenylglyoxal as a γ-glutamyl transpeptidase inhibitor. The homogenization buffer was adjusted at a volume two-fold the wet weight of the sample pool (e.g. 400 µL of homogenization buffer for 200 mg of wet weight tissue). All homogenates were used for the assays immediately after being prepared.

The homogenate was divided into five parts to measure the different parameters. For each replicate, two independent measures were performed for each biomarker. Then, the average of the two independent measures was estimated.

2.3. Lipid and glycogen assays

The measurement of total lipid and glycogen contents was adapted from Plaistow *et al.* (2001). Twenty microlitres of 2% sodium sulphate (w/v) and 540 µL of chloroform/methanol 1:2 (v/v) were added to 40 µL of total homogenate. After 1hr on ice, the samples were centrifuged at 3,000 x *g* for 5 min at 4°C. The resulting supernatant and the pellet were used to determine the total lipid and glycogen contents, respectively.

One hundred microlitres of the supernatant were transferred to culture tubes and placed in a dry bath at 95°C to evaporate the solvent. Then, 200 µL of 95% sulphuric acid were added in each tube and left for 10 min. The culture tubes were cooled on ice and then 4.8 mL of a vanillin-phosphoric acid reagent, composed of 120 mg of vanillin, 20 mL of ultrapure ethanol (95%) and 80 mL of phosphoric acid (85%), were added. After a 10-min reaction, optical density was measured at 535 nm. Commercial cholesterol was used as a standard and lipid contents were expressed in $mg.mL^{-1}$.

Total dissolution of the pellet was performed in 400 µL of deionised (milliQ) water for 10 minutes in an ultrasonic bath. One hundred microlitres of sample were placed in culture tubes and 4.9 mL of anthrone reagent were added. The anthrone reagent is a mixture of 1.13 g of anthrone, 170 mL of ultrapure water and 630 mL of sulphuric acid (95%). The mixture was placed in a dry bath at 95°C for 17 min and then cooled on ice. Optical density was measured at 625 nm. Glucose was used as a standard and concentrations were expressed in $\mu g.mg^{-1}$ tissue.

2.4. Total protein assay

The total protein content of each sample was quantified according to Bradford's method (1976) with bovin serum albumin (BSA) as a standard. The results were expressed in $mg.mL^{-1}$.

2.5. Reduced glutathione assay

Reduced glutathione (GSH) concentration measurement was adapted from Leroy *et al.* (1993) using High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) separation, which consisted in a post-column derivatization with *ortho*-phtaldialdehyde solution and fluorimetric detection at 340 nm excitation and 440 nm emission wavelengths. The proteins of 40µL of the total homogenate were precipitated with 10% perchloric acid (v/v). After a 10-min centrifugation at 20,000 x *g* at 4°C, the resulting supernatant was diluted 40-fold in 0.1 M chlorhydric acid (HCl). Twenty microlitres of the diluted supernatant were injected in a reverse-phase LiChrospher 100 RP18-encapped column (125 mm x 4mm, 5µm) and separation was carried out at 25°C. Elution was performed with 7% acetonitrile (Chromanorm, 95%) in a 0.01 M phosphate buffer KH_2PO_4/Na_2EDTA (pH 2.50) containing 0.5 mM *n*-decylsodiumsulfate as an ion-pairing reagent. Commercial GSH diluted in 0.1 M

HCl was used as a standard and GSH concentrations were expressed in nmol GSH.mg^{-1} protein.

2.6. Enzymatic assay

The activity of γ-glutamylcystein ligase (GCL) was assayed using an HPLC method adapted from Parmentier *et al.* (1998). Measurements were carried out on the S12000 fraction obtained after centrifuging 40 µL of the total homogenate for 15 min at 500 x *g* and then centrifuging the resulting supernatant at 12,000 x *g* and 4°C for 30 min. The resulting S12000 fraction was diluted 20-fold in the homogenization buffer and 40 µL of this diluted solution were added to 112 µL of incubation cocktail (0.5 M Tris HCl, 200 mM $MgCl_2$ $6H_2O$, 500 mM KCl, 45 mM glutamic acid, 90 mM cystein, 1mM DTT, 90 mM ATP, 0.5 mM phénylglyoxal, pH 8.25) in a 1.5 mL tube to initiate the reaction. After a 20 min-incubation period at 25°C, the reaction was stopped by a four-fold dilution with 0.1 M HCl. Twenty microlitres of the resulting solution were injected into a LiChrospher 100 RP18-encapped HPLC column (125 mm x 4 mm, 5 µm). Commercial glutamylcysteine (GC) solution was used as a standard and GCL activity was expressed in nmol GC.min^{-1}.mg^{-1} protein.

2.7. Lipoperoxidation

Malondialdehyde (MDA) levels were measured with an HPLC method adapted from Behrens and Madère (1991) with UV detection at 267 nm. Seventy microlitres of the total homogenate were diluted four-fold in 95 % ethanol (HPLC grade) and cooled on ice for 1.5hrs to deproteinize them. The mixture was then centrifuged at 18,000 x *g* for 30 min at 4°C. One hundred microlitres of the resulting supernatant were injected directly into a reserved-phase LiChrospher 100RP18-encapped HPLC column. Separation was performed at 25°C and elution was carried out with sodium phosphate buffer (pH 6.5) containing 25% ethanol and 0.5 mM tetradecylmethylammoniun bromide as an ion-paring reagent. MDA levels were expressed in ng MDA.mg^{-1} lipid.

2.8. Statistical analysis

Data analysis was performed using a multivariate analysis of variance (MANOVA, Pillai's trace) with respect to 'gender', 'infection status' and 'sampling month' as fixed factors. All data met normality and homogeneity of variance assumptions. MDA levels were

not included in this analysis because the low number of infected gammarids in August did not allow us to measure them. As the MANOVA test was significant, each biomarker was then analysed using the ANOVA test, followed by the TukeyHSD post-hoc test. All tests were performed with a 5 % type I error risk, using R 2.9.0 Software.

3. RESULTS

3.1. Acanthocephalan effect on G. roeseli biomarker

Global MANOVA and ANOVA analysis revealed an effect of the sampling month, of individual gender, of parasite infection and of their interactions on the variations of biomarker levels (Tables 1 & 2). The results are detailed below for each biomarker category.

Table 1. Multivariate analyses of variance (Pillai's trace) investigating variation of energy reserves (protein, lipid, glycogen) and defences capacities (GSH, GCL) of Gammarus roeseli, as function of infection by acanthocephalan parasites, month sampling and individual gender.

Source of variation	*num d.f* [a], *den d.f* [b]	F	*p-value*
Whole model	55, 180	18.94	< 0.0001
Month	5, 36	41.75	< 0.0001
Gender	5, 36	30.10	< 0.0001
Infection status	5, 36	102.27	< 0.0001
Month x Gender	5, 36	10.57	< 0.0001
Month x Infection status	5, 36	10.33	< 0.0001
Gender x Infection status	5, 36	6.37	0.0002
Month x Gender x Infection status	5, 36	5.83	0.0004

a Numerator degrees of freedom.
b Denominator degrees of freedom

Table 2. Univariate analyses of variance (ANOVA) investigating variations in energy reserves (protein, lipid, and glycogen), defence capacity (GSH, GCL) and biomarkers for toxicity (MDA) of Gammarus roeseli, according to the sampling month, gender and infection by P. minutus.

		Df	Mean Square	F	*p-value*
Protein	Month	2	4.96	6.52	0.004
	Gender	1	59.05	77.61	< 0.001
	Parasite	1	117.09	156.49	< 0.001
	Month:Gender	2	4.8	6.30	0.004
	Month:Parasite	2	1.46	1.91	0.162
	Gender:Parasite	1	0.28	0.37	0.548
	Gender:Parasite:Month	2	12.76	16.76	< 0.001
Lipid	Month	2	9.31	64.76	< 0.001
	Gender	1	33.99	236.4	< 0.001
	Parasite	1	14.98	104.16	< 0.001
	Month:Gender	2	1.99	13.81	< 0.001
	Month:Parasite	2	1.1	7.67	0.001
	Gender:Parasite	1	7.8	54.26	< 0.001
	Gender:Parasite:Month	2	0.06	0.40	0.671
Glycogen	Month	2	14.73	25.42	< 0.001
	Gender	1	10.38	17.91	< 0.001
	Parasite	1	28.52	49.23	< 0.001
	Month:Gender	2	5.12	8.84	< 0.001
	Month:Parasite	2	23.89	41.23	< 0.001
	Gender:Parasite	1	6.87	11.86	0.001
	Gender:Parasite:Month	2	0.52	0.9	0.417
GSH	Month	2	4.06	93.26	< 0.001
	Gender	1	0.51	11.64	0.001
	Parasite	1	4.81	110.46	< 0.001
	Month:Gender	2	1.47	33.82	< 0.001
	Month:Parasite	2	0.11	2.63	0.086
	Gender:Parasite	1	0.04	0.82	0.371
	Gender:Parasite:Month	2	0.13	2.91	0.067
GCL	Month	2	0.2440	67.61	< 0.001
	Gender	1	0.0010	0.19	0.668
	Parasite	1	0.2000	55.44	< 0.001
	Month:Gender	2	0.0260	7.12	0.002
	Month:Parasite	2	0.0240	6.75	0.003
	Gender:Parasite	1	0.0001	0.04	0.849
	Gender:Parasite:Month	2	0.0060	1.62	0.211
MDA	Month	1	87.09	244.33	< 0.001
	Gender	1	12.97	36.38	< 0.001
	Parasite	1	38.70	108.57	< 0.001
	Month:Gender	1	0.18	0.49	0.489
	Month:Parasite	1	0.51	1.44	0.242
	Gender:Parasite	1	0.01	0.01	0.904
	Gender:Parasite:Month	1	1.58	4.43	0.046

3.2. Parasitism and energy reserves

Energy reserves (protein, lipid and glycogen) were influenced upon by *P. minutus* infection, gender and sampling month (Table 2). Gammarid protein concentrations were lower in the presence of *P. minutus* in the two gender and whatever the sampling month (Fig. 1A). Moreover, no significant monthly variations were observed in uninfected and infected males and females. The same trend was observed for total lipid contents, which were lower in the presence of *P. minutus* in the two genders at each sampling month, except for males in August (Fig. 1B). Total lipid contents in infected females were on average 1.5-fold lower as compared to uninfected ones; while in infected males, they were on average 1.2-fold lower than in uninfected ones. Comparing males and females showed that lipid contents were higher in uninfected females than in uninfected males whatever the sampling month, whereas there was no significant difference between infected males and females. In males, monthly variations of total lipid contents were observed only in uninfected individuals, whereas in females, these variations were marked whatever the infection status (Fig. 1B).

Conversely, the presence of the acanthocephalan *P. minutus* increased glycogen contents whatever the gender and the sampling month, except for females in May (Fig. 1C). In infected males, glycogen contents were 1.7-fold higher as compared to uninfected ones, whereas in infected females they were 2.4-fold higher as compared to uninfected ones. The differences in glycogen contents were highest in August in both genders. Indeed during that month, glycogen contents in infected males were 1.5-fold higher than in uninfected ones and were three-fold higher in infected females as compared to uninfected ones. Unlike in uninfected males and females, no significant difference in glycogen contents was observed between infected males and females depending on the sampling month, except in June.

3.3. *Parasitism and antitoxic defences*

P. minutus has an influence on the defence capacities of *G. roeseli* by decreasing GSH concentrations in both genders whatever the sampling month (Fig. 2A). Indeed, infected males and females displayed on average 1.5- to 2.5-fold less GSH that uninfected ones, whatever the sampling month. The same variation in GSH concentration was observed in uninfected and infected individuals, whatever the gender and the sampling month. The decrease in GSH concentrations could be linked with the decrease in GCL activity, which was also marked in infected males and females (Fig. 2B). GCL activity was on average 2-fold lower in infected gammarids, whatever their gender and the sampling month. No significant difference was observed between males and females each month, whatever the infection status.

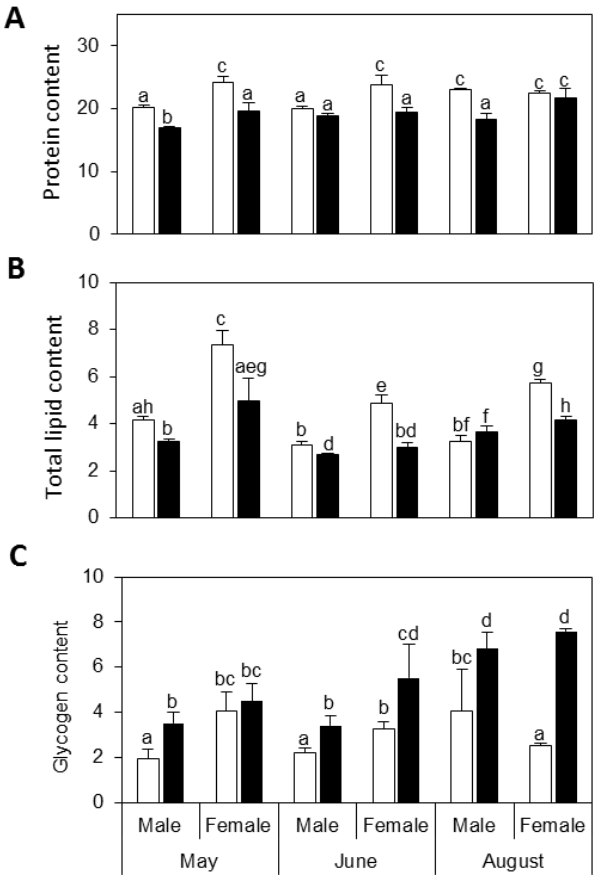


Figure 1. Protein concentration (mg/mL) (A), total lipid (mg/mL) (B) and glycogen contents (µg/mg tissus) (C) depending on sampling period, Gammarus roeseli gender and infection status. *Different letters above the bars indicate significantly different values (Tukey's HSD test, p-values <0.05). White bars represent uninfected G. roeseli and black bars represent infected G. roeseli.*

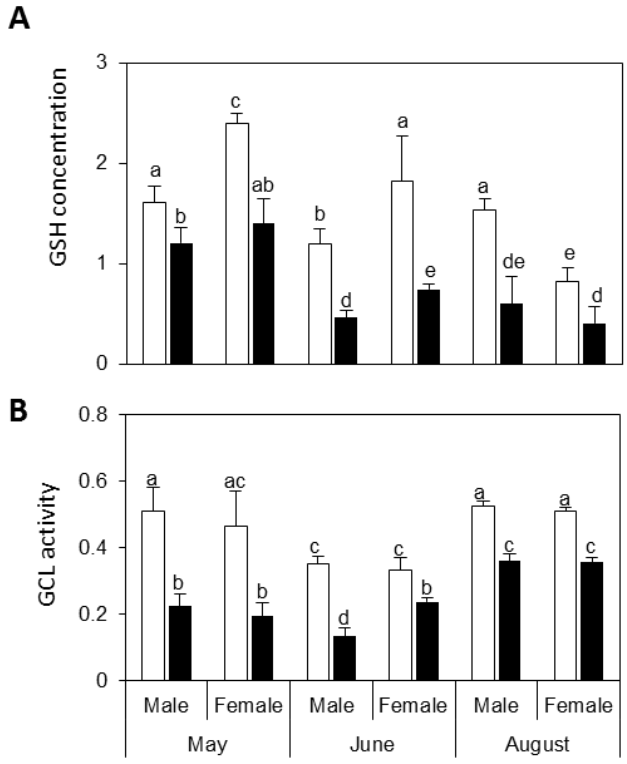


Figure 2. GSH concentration (nmol GSH/mg protein) (A) and GCL activity (nmol GC/min/mg protein) (B) depending on sampling month, Gammarus roeseli gender and infection status. *Different letters above the bars indicate significantly different values (Tukey's HSD test, p-values <0.05). White bars represent uninfected G. roeseli and black bars represent infected G. roeseli.*

3.4. Parasitism and toxic effect biomarker

MDA levels were not measured in August due to the lack of infected *G. roeseli*, which led to a low total homogenate quantity. Univariate analysis of MDA levels revealed an effect of the presence of *P. minutus* (Table 2). MDA levels were lower in infected gammarids as compared to uninfected ones, whatever their gender and the sampling month (Table 3). Indeed, MDA levels were 1.5-fold lower in infected males and females than in uninfected ones. In addition, MDA levels were 1.5-fold higher in males than in females, whatever the infection status. Monthly variations were observed in uninfected and infected gammarids whatever the gender.

Table 3. MDA levels (ng MDA/mg lipids) depending on sampling period, Gammarus roeseli gender and infection status. *P-values highlighted significant differences depending on the infection status and asterisk underlined seasonal variation. nd: not determined.*

	Males			Females		
	Uninfected	*Infected*	*p-values*	*Uninfected*	*Infected*	*p-values*
May	5.47 ± 0.47*	3.11 ± 0.70*	0.00216	3.63 ± 0.60*	2.10 ± 0.33*	0.00754
June	8.43 ± 0.58*	6.45 ± 0.52*	0.00227	7.78 ± 0.85*	4.85 ± 0.59*	0.00193
August	nd	nd	nd	nd	nd	nd

4. DISCUSSION

This study was carried out (i) to improve knowledge about the physiological effects of the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* on its intermediate host *Gammarus roeseli*, especially on its energy reserves and (ii) to assess the potential of infected individuals to deal with chemical stress by measuring defence capacities.

The presence of *P. minutus* in *G. roeseli* clearly influenced on the energy reserves of its host by decreasing protein and total lipid concentrations and increasing glycogen contents in both genders. Plaistow *et al.* (2001) demonstrated that the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* decreased total lipid content in infected *Gammarus pulex* gravid females, but did not observe any difference in males depending on the infection status. Additionally, they also observed an increase in glycogen content in *P. laevis*-infected *G. pulex* whatever the gender. However, Médoc *et al.* (2011) showed no difference in neutral lipid contents in *P. minutus*-infected *G. roeseli* as compared to uninfected ones. While a decrease in total lipid content in infected individuals has already been observed, the results

obtained for glycogen content are rather more contrasting. Some studies highlighted an increase (*P. laevis* in *G. pulex* - Plaistow *et al.* 2001) as in our study, or an absence of modification (*P. ringueletti* - Isopoda ectoparasite - in *P. argentinus* - Neves *et al.* 2004); but no one reported a glycogen decrease in an acanthocephalan-infected host although such a decrease was observed in other host-parasite systems as in Norway lobsters *Nephrops norvegicus* infected by the dinoflagellate *Hematodinium* sp. (Stentiford *et al.* 2001). Our study underlined higher glycogen contents in *P. minutus*-infected *G. roeseli* as compared to uninfected ones, whatever the gender. We can hypothesize that the higher glycogen content in infected gammarids could be due to their immobility, since *P. minutus*-infected gammarids are known to stay at the water surface where they become more vulnerable to final host predation (Bakker *et al.* 1997; Bauer *et al.* 2000, 2005; Cézilly and Perrot-Minnot, 2005; Médoc *et al.* 2006). It could also be due to a feeding rate increase as described in *G. pulex* infected by *Echinorhynchus truttae* (Dick *et al.* 2010) but another study showed that *P. minutus*-infected *G. roeseli* consumed as many dead isopods, but fewer living isopods and less leaf material as compared to uninfected ones (Médoc *et al.* 2011). We can also hypothesize that glycogen could be stored by gammarids as an alternative energy source because lipids are partly used by *P. minutus*.

The decrease in total lipid contents measured in our study could be due to the parasite's development. It is well known that parasite need energy for their own development inside their hosts, as demonstrated for *P. minutus*, which must store up host nutriments to attain the last larval stage (Crompton and Nickol, 1985; Taraschewski, 2000). So, the reduction of total lipid contents in infected *G. roeseli* could be explained by their consumption by *P. minutus* by osmotrophy. This hypothesis is supported by the study of Barrett and Butterworth (1968) who demonstrated that *P. minutus* gets its carotenoids from its host. Carotenoids, which are lipid constituents, are the main compound of the crustacean vitellus (Mantiri *et al.* 1996). *P. minutus* diverts carotenoids for its own development and consequently *G. roeseli* females become castrated (Bollache *et al.* 2002).

P. minutus decreased *G. roeseli* defence capacities: whatever the gender, a drop in reduced glutathione concentrations linked with a decrease in GCL activity was observed in *P. minutus*-infected *G. roeseli* as compared to uninfected ones. Several studies about gammarids infected by an acanthocephalan parasite have shown a decrease in host defence capacities. Cornet *et al.* (2009) measured a reduction of the prophenoloxidase system as well as of haemocyte concentration, two major parameters of crustacean immunity, in *Gammarus pulex* infected by one of the three following acanthocephalan parasites: *Pomphorhynchus laevis*,

Pomphorhynchus tereticollis and *P. minutus*. Sures and Radszuweit (2007) also demonstrated that the cystacanth stage of *P. minutus* prevented the synthesis of heat shock protein 70 in *Gammarus roeseli* subjected to a thermal disturbance or palladium exposure. Additionally, a decrease in defence capacities was also observed in other host-parasite relationships. For example, digenean-infected cockles exposed to cadmium displayed lower metallothionein concentrations than uninfected ones (Baudrimont *et al.* 2006). According to our results, malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation reflecting cellular damage, was weaker in infected individuals. Thus, on the one hand the drop in antitoxic defences in infected gammarids suggests a higher sensitivity to stress conditions, but on the other hand, a decrease in MDA levels suggests a protective effect of the parasite on its host. Inside the host, the parasite has to escape from/survive the host's defence system and consequently weaken it, but if the host's antitoxic defence capacities are too low, the survival of the host-parasite pair can be compromised in stressful conditions. A compensation system may occur to counterbalance the weakening of the host's defence system.

Sures and Radszuweit (2007) demonstrated that *P. minutus* cystacanths of *G. roeseli* exposed to palladium had accumulated 10 times as much metal as their hosts. In a previous study, we demonstrated that *P. minutus* cystacanths could accumulate cadmium (Gismondi *et al.* unpublished data). So, we can hypothesize that if the parasite can accumulate toxic contaminants, toxicity to the host may be reduced. Consequently, the host may need lower antitoxic defences, and the parasite may protect it during environmental stress. However, this hypothesis remains to be tested.

The present study confirms that an acanthocephalan parasite reduces the energy reserves of its host. We also observed lower defence capacities in infected individuals as compared to uninfected ones, in the absence of stressors. We cannot rule out that parasites may infect organisms with a low defence system but the information provided by glutathione concentrations and MDA levels altogether suggest that the physiological modifications we observed resulted from infection, but did not cause it. To go further, the consequences of the modifications we observed in *P. minutus*-infected gammarids on fitness will have to be assessed in a contamination context.

Acknowledgments: *This study was supported by the French Ministry of Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) we sincerely thanks here. The present work takes part of the research program EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière). We are grateful to Annie Buchwalter for improving the English text and we wish to thank the two anonymous reviewers for their helpful comments on a previous draft of this paper.*

REFERENCES

Bakker, T. C., Mazzi., D. and Zala, S. (1997). Parasite-induced changes in behavior and color make *Gammarus pulex* more prone to fish predation. *Ecology* **78**, 1098–1104.

Baldauf, S.A., Thünken, T., Frommen, J.G., Bakker, T.C.M., Heupel, O. and Kullmann, H. (2007). Infection with an acanthocephalan manipulates an amphipod's reaction to a fish predator's odours. *International Journal for Parasitology* **37**, 61-65. doi:10.1016/j.ijpara.2006.09.003.

Barnard, J.L. and Barnard, C.M. (1983). Freshwater Amphipoda of the World I & II, Hayfield Associates, Mt. Vernon, VA, 471pp.

Barrett, J. and Butterworth, P.E. (1968). The carotenoids of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala) and its intermediate host, *Gammarus Pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **27**, 575-581. doi:10.1016/0010-406X(68)90254-5.

Baudrimont, M., De Montaudouin, X. and Palvadeau, A. (2006). Impact of digenean parasite infection on metallothionein synthesis by the cockle (*Cerastoderma edule*): A multivariate field monitoring. *Marine Pollution Bulletin* **52**, 494–502. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.09.035.

Bauer, A., Trouvé, S., Grégoire, A., Bollache, L. and Cézilly, F. (2000). Differential influence of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) on the behaviour of native and invader gammarid species. *International Journal for Parasitology* **30**, 1453–1457. doi:10.1016/S0020-7519(00)00138-7.

Bauer, A., Haine, E.R., Perrot-Minnot, M.J. and Rigaud, T. (2005). The acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* alters the geotactic and clinging behaviours of two sympatric amphipod hosts: the native *Gammarus pulex* and the invasive *Gammarus roeseli*. *Journal of Zoology* **267**, 39–43. doi: 10.1017/S0952836905007223.

Behrens, W. and Madère, R. (1991). Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Lipids* **26**, 232-236. doi: 10.1007/BF02543977.

Beisel, J.N. and Médoc, V. (2010). Bird and amphipod parasites illustrate a gradient from adaptation to exaptation in complex life cycle. *Ethology Ecology and Evolution* **22**, 265-270. doi: 10.1080/03949370.2010.502321.

Bollache, L., Rigaud, T. and Cézilly, F. (2002). Effects of two acanthocephalan parasites on the fecundity and pairing status of female *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Invertebrate Pathology* **79**, 102–110. doi:10.1016/S0022-2011(02)00027-7.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M. and Gallo, G. (1999). Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology* **46**, 67-76. doi:10.1016/S0166-445X(98)00116-7.

Cargill, A.S., Cummin, K.W., Hanson, B.J. and Lowry, R.R. (1985). The role of lipids as feeding stimulants for shredding aquatic insects. *Freshwater Biology* **15**, 455-464. doi: 10.1111/j.1365-2427.1985.tb00215.x.

Cézilly, F., Gregoire, A. and Bertin, A. (2000). Conflict between co-occurring manipulative parasites? An experimental study of the joint influence of two acanthocephalan parasites on the behaviour of *Gammarus pulex*. *Parasitology* **120**, 625-630.

Cézilly, F. and Perrot-Minnot, M.J. (2005). Studying adaptive changes in the behaviour of infected hosts: a long and winding road. *Behavioural Processes* **68**, 223–228. doi:10.1016/j.beproc.2004.08.013.

Cézilly, F., Thomas, F., Médoc, V. and Perrot-Minnot, M.J. (2010). Host-manipulation by parasites with complex life cycles: adaptive or not? *Trends in Parasitology* 26, 311-317. doi: 10.1016/j.pt.2010.03.009.

Cornet, S., Franceschi, N., Bauer, A., Rigaud, T. and Moret, Y. (2009). Immune depression induced by acanthocephalan parasites in their intermediate crustacean host: Consequences for the risk of super-infection and links with host behavioural manipulation. *International Journal for Parasitology* **39**, 221–229. doi:10.1016/j.ijpara.2008.06.007.

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

Crompton, D.W.T. and Nickol, B.B. (1985). Biology of the Acanthocephala, Cambridge University Press.

Dezfuli, B.S., Giari, L., Arrighi, S., Domeneghini, C. and Bosi, G. (2003). Influence of enteric helminths on the distribution of intestinal endocrine cells belonging to the diffuse endocrine system in brown trout, *Salmo trutta* L. *Journal of Fish Diseases* **26**, 155-166. doi: 10.1046/j.1365-2761.2003.00446.x.

Dick, J.T.A., Armstrong, M., Clarke, H.C., Farnsworth, K.D., Hatcher, M.J., Ennis, M., Kelly, A., Dunn, A.M. (2010). Parasitism may enhance rather than reduce the predatory impact of an invader. *Biology Letters* 6, 636-638. doi: 10.1098/rsbl.2010.0171.

Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M. and Vasseur, P. (1997). Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* **39**, 93-110. doi:10.1016/S0166-445X(97)00024-6.

Griffith, O.W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicin*e **27**, 922-935. doi:10.1016/S0891-5849(99)00176-8.

Jazdzewski, K. (1980). Range extensions of some gammaridean species in european inland waters caused by human activity. *Crustaceana* **6**, 84-107.

Kennedy, C.R. (2006). Ecology of the Acanthocephala. Cambridge University Press, Cambridge, England.

Lafferty, K.D. (1999). The evolution of trophic transmission. *Parasitology* **15**, 111–115. doi:10.1016/S0169-4758(99)01397-6.

Lagrue, C., Kaldonski, N., Perrot-Minnot, M.J., Motreuil, S. and Bollache, L. (2007). Modification of hosts' behavior by a parasite: field evidence for adaptive manipulation. *Ecology* **88**, 2839-2847. doi:10.1890/06-2105.1.

Leroy, P., Nicolas, A., Thioudellet, C., Oster, T., Wellman, M. and Siest, G. (1993). Rapid liquid chromatographic assay of glutathione in cultured cells. *Biomedical Chromatography* **7**, 86-89. doi: 10.1002/bmc.1130070208.

Mantiri, D.M.H., Negre-Sadargues, G., Charmantier, G., Trilles, J.P., Milicua, J.C.G. and Castillo, R. (1996). Nature and metabolism of carotenoid pigments during the embryogenesis of the European Lobster *Homarus gammarus* (Linne, 1758). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **115**, 237-241. doi:10.1016/0300-9629(96)00054-0.

Maynard, B.J., Wellnitz, T.A., Zanini, N., Wright, W.G. and Dezfuli, B.S. (1998). Parasite-altered behavior in a crustacean intermediate host : field and laboratory studies. *Journal of Parasitology* **84**, 1102-1106.

McCahon, C.P., Maund, S.J. and Poulton, M.J. (1991). The effect of the acanthocephalan parasite (*Pomphorhynchus laevis*) on the drift of its intermediate host (*Gammarus pulex*). *Freshwater Biology* **25**, 507-513. doi: 10.1111/j.1365-2427.1991.tb01393.x.

Médoc, V., Bollache, L. and Beisel, J.N. (2006). Host manipulation of a freshwater crustacean (*Gammarus roeseli*) by an acanthocephalan parasite (*Polymorphus minutus*) in a biological invasion context. *International Journal for Parasitology* **36**, 1351-1358. doi:10.1016/j.ijpara.2006.07.001.

Médoc, V., Rigaud, T., Bollache, L. and Beisel, J.N. (2009). A manipulative parasite increasing an antipredator response decreases its vulnerability to a nonhost predator. *Animal Behaviour* **77**, 1235–1241. doi:10.1016/j.anbehav.2009.01.029.

Médoc, V. and Beisel, J.N. (2009). Field evidence for non-host predator avoidance in a manipulated amphipod. *Naturwissenschaften* **96**, 513-523. doi: 10.1007/s00114-008-0503-8.

Médoc, V., Piscart, C., Maazouzi, C., Simon, L. and Beisel, J.-N. (2011). Parasite-Induced Changes in the Diet of a Freshwater Amphipod: Field and Laboratory Evidence. *Parasitology*, 138, 537-546. doi: 10.1017/S0031182010001617.

Neuparth, T., Correia, AD., Costa, F.O., Lima, G. and Costa, M.H. (2005). Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: I. Biochemical endpoints. *Marine Environmental Research* **60**, 69-91. doi:10.1016/j.marenvres.2004.08.006.

Neves, C.A., Sampedro, Pastor, M.P., Nery, L.E.M. and Santos, E.A. (2004). Effects of the parasite *Probopyrus ringueleti* (Isopoda) on glucose, glycogen and lipid concentration in starved *Palaemonetes argentinus* (Decapoda). *Diseases of Aquatic Organisms* **58**, 209–213.

Parmentier, C., Leroy, P., Wellman, M. and Nicolas, A. (1998). Determination of cellular thiols and glutathione-related enzyme activities: versatility of high-performance liquid chromatography–spectrofluorimetric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **719**, 37–46. doi:10.1016/S0378-4347(98)00414-9.

Perrot-Minnot, M.J. (2004). Larval morphology, genetic divergence, and contrasting levels of host manipulation between forms of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *International Journal for Parasitology* **34**, 45-54. doi:10.1016/j.ijpara.2003.10.005.

Perrot-Minnot, M.J., Kaldonski, N. and Cézilly, F. (2007). Increased susceptibility to predation and altered anti-predator behaviour in an acanthocephalan-infected amphipod. *International Journal for Parasitology* **37**, 645-651. doi:10.1016/j.ijpara.2006.12.005.

Plaistow, S.J., Troussard, J.P. and Cézilly, F. (2001). The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *International Journal for Parasitology* **31**, 346–351. doi:10.1016/S0020-7519(01)00115-1.

Poulin, R. (1995). "Adaptive" changes in the behaviour of parasitized animals: A critical review. *International Journal for Parasitology* **25**, 1371–1383. doi:10.1016/0020-7519(95)00100-X.

Sparkes, T.C., Keogh, D.P. and Pary, R.A. (1996). Energetic costs of mate guarding behavior in male stream-dwelling isopods. *Oecologia* **106**, 166-171. doi: 10.1007/BF00328595.

Sroda, S. and Cossu-Leguille, C. (2011a). Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere* **83**, 538-544. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.023.

Sroda, S. and Cossu-Leguille, C. (2011b). Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor?. *Ecotoxicology* **20**, 264-273. doi: 10.1007/s10646-010-0578-9.

Stentiford, G.D., Neil, D.M. and Coombs, G.H. (2001). Development and application of an immunoassay diagnostic technique for studying *Hematodinium* infections in *Nephrops norvegicus* populations. *Diseases of Aquatic Organisms* **46**, 223-229.

Sures, B., Taraschewski, H. and Jackwerth, E. (1994). Lead accumulation in *Pomphorhynchus laevis* and its host. *Journal of Parasitology* **80**, 355–357. doi: 10.2307/3283403.

Sures, B. and Siddall, R. (1999). *Pomphorhynchus laevis*: The intestinal Acanthocephalan as a lead sink for its fish host, chub (*Leuciscus cephalus*). *Experimental Parasitology* **93**, 66-72. doi:10.1006/expr.1999.4437.

Sures, B., Dezfuli, B.S. and Krug, H.F. (2003). The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) interferes with the uptake and accumulation of lead (^{210}Pb) in its fish host chub (*Leuciscus cephalus*). *International Journal for Parasitology* **33**, 1617-1622. doi:10.1016/S0020-7519(03)00251-0.

Sures, B. and Radszuweit, H. (2007). Pollution induced heat shock protein expression in the amphipod *Gammarus roeseli* is affected by larvae of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). *Journal of Helminthology* **81**, 191-197. doi: 10.1017/S0022149X07751465.

Sutcliffe, D.W. (1993). Reproduction in *Gammarus* (Crustacea Amphipoda): female strategies. *Freshwater Forum* **3**, 26-65.

Taraschewski, H. (2000). Host-parasite interactions in acanthocephalan: a morphological approach. *Advances in Parasitology* **46**, 1-179.

Thielen, F., Zimmermann, S., Baska, F., Taraschewski, H. and Sures, B. (2004). The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) from barbel as a bioindicator for metal pollution in the Danube River near Budapest, Hungary. *Environmental Pollution* **129**, 421-429. doi:10.1016/j.envpol.2003.11.011.

Vasseur, P. and Leguille, C. (2004). Defense systems of benthic invertebrates in response to environmental stressors. *Environmental Toxicology* **19**, 433-436. doi: 10.1002/tox.20024.

Yan, T., Teo, L.H. and Sin, Y.M. (1997). Effects of mercury and lead on tissue glutathione of the green mussel, *Perna viridis* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **58**, 845-850. doi: 10.1007/s001289900411.

Publication 3

Acanthocephalan parasites: help or burden in Gammarid amphipods exposed to cadmium?

Acceptée dans Ecotoxicology

Il a été démontré dans l'article 2‡ que la présence de *P. minutus* diminuait les capacités de défense et les réserves énergétiques de son hôte intermédiaire *G. roeseli*, mais qu'il diminuait également les taux de malondialdéhyde, traduisant de faibles dommages cellulaires.

Dans cette étude, nous avons voulu tester l'influence de *P. minutus* sur les capacités de défense de *G. roeseli* lors d'une exposition au cadmium, en comparaison avec des individus sains exposés aux mêmes concentrations en cadmium. Pour cela, nous avons estimé la concentration léthale 50 (CL_{50}) chez *G. roeseli* parasités et non-parasités, ainsi que la bioaccumulation de cadmium chez l'hôte et le parasite après une exposition de 96h au cadmium. La CL_{50} a été estimée après avoir exposé pendant 96h, 3 réplicats de 10 individus mâles/femelles, parasité(e)s/non-parasité(e)s à 5 concentrations de cadmium: 0 - 6 - 18 - 54 - 162 µg $Cd.L^{-1}$. Pendant l'exposition, les individus morts ont été retirés afin d'éviter tout cannibalisme. A la fin de l'expérimentation, les organismes vivants ont été comptabilisés puis congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C afin d'analyser la bioaccumulation du cadmium. Cinq individus de chaque condition d'exposition et 5 pools de 5 cystacanthes ont été analysés pour estimer la concentration du cadmium accumulée.

Cette expérimentation a démontré que les mâles infectés avaient une meilleure résistance que les mâles non-infectés, avec des CL_{50} respectivement égales à 146 et 50 µg $Cd.L^{-1}$; alors que l'inverse a été observé chez les femelles. En effet, les femelles non-infectées avaient une CL_{50} égale à 107 µg $Cd.L^{-1}$ alors que chez les femelles infectées, elle était de 35 µg $Cd.L^{-1}$. Chez les mâles, cette différence de résistance peut s'expliquer par le fait que les individus parasités ont de plus faibles concentrations de cadmium accumulées que

‡ Gismondi et al. (2012) Does the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* modify the energy reserves and antitoxic defences of its intermediate host *Gammarus roeseli*? Parasitology, 139, 1-8.

les non-parasités. Chez les organismes infectés, les plus faibles concentrations en cadmium pourraient être expliquées par l'absorption de cadmium par *P. minutus* observée dans cette étude.

Cependant, bien que les femelles infectées aient un faible facteur de concentration (BCF) et de faibles concentrations de cadmium dans leurs organismes, la présence de *P. minutus* ne conduit pas à une meilleure résistance par rapport aux non-infectées. Au contraire, les femelles infectées ont été démontré comme plus sensible au cadmium que les non-infectées. Ceci pourrait être dû à la présence d'autres parasites, tels que les microsporidies à transmission verticale, invisibles pour l'observateur, infectant uniquement les femelles et pouvant induire une augmentation des dommages cellulaires lors d'un stress au cadmium.

Notre étude a démontré, dans un premier temps, que la présence de P. minutus chez G. roeseli modifiait la résistance de l'hôte exposé au cadmium, ainsi que la bioaccumulation de ce métal. Cependant, dans un second temps, il a été démontré que cette différence de résistance induite par la présence de P. minutus, était dépendante du sexe de l'individu, puisque les mâles parasités ont une meilleure résistance que les mâles non-parasités, tandis que les femelles parasitées sont plus sensibles que les femelles saines. Les résultats ont également révélés que la bioaccumulation du cadmium par le gammare se trouvait réduit en présence de l'acanthocéphale, quel que soit le sexe de l'individu.

Acanthocephalan parasites: help or burden in Gammarid amphipods exposed to cadmium?

Eric GISMONDI*, Carole COSSU-LEGUILLE, Jean-Nicolas BEISEL

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

ABSTRACT

We investigated the influence of the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* on the mortality of its intermediate host, *Gammarus roeseli*, exposed to cadmium, by the measure of $LC_{50\text{-}96hrs}$ values as well as the bioaccumulation of cadmium both in the host and in its parasite. LC_{50} results revealed that infected *G. roeseli* males died less under cadmium stress than uninfected ones; while the converse has been observed in females. Cadmium resistance of infected males could be explained by a weaker bioconcentration factor (BCF) than in females. The lower BCF in infected individuals was closely related with an uptake of cadmium by *P. minutus* in its host. Nevertheless, although infected females had both weaker BCF and cadmium concentration in their body, the presence of *P. minutus* did not induce lower mortality than uninfected females. On the contrary, their sensitivity to cadmium was increased by the presence of *P. minutus*. We discuss the hypothesis that differences of mortality between uninfected and infected gammarids could be explained by a difference of cadmium bioconcentration in host, and by the cadmium bioaccumulation in the parasite. Indeed, results suggested that *P. minutus* could help *G. roeseli* to face with stress, what contributed to keep the host alive and favour the parasite transmission.

Key-Words: Cadmium, parasitism, *Gammarus roeseli*, *Polymorphus minutus*, LC_{50}, BCF

1. INTRODUCTION

In recent years, there has been an increase of interest about the influence of parasite in their host under environmental contaminations. Parasites are known to disrupt behavioural and physiological host responses (Sures 2004; Marcogliese and Pietrock 2011), and several studies underlined the parasite influence on host responses when exposed to pollutants. Marcogliese et al. (2005) described an increase of antitoxic enzymes activities (i.e. catalase, glutathione S-transferase) in the yellow perch infected by nematode and digenean parasites in river impacted by several metals. In contrast, a depletion of the antitoxic defences has been observed in digenean-infected cockles exposed to cadmium (Baudrimont et al. 2006) or in zebra mussels infected by *Ophryoglena* sp. exposed to a multistress environment (Minguez et al. 2009). This decrease of antitoxic defence compounds could lead to an increase of host damage as it was the case in *Gammarus roeseli* infected by vertically-transmitted microsporidia parasites exposed to cadmium (Gismondi et al. 2012).

In the case of complex life cycles, parasite uses at least one intermediate host to its larval development and a final host to mature and reproduce. Among the numerous complex life cycle parasites, acanthocephalans are known to alter the phenotype of their intermediate hosts in a way that make it more prone to predation and thus, favour its transmission to the final vertebrate host (Kennedy 2006; Lagrue et al. 2007). If behavioural changes induced by the parasite have been intensively studied (Cézilly et al. 2000; Bauer et al. 2005; Médoc et al. 2006), the modifications of host antitoxic responses has become a topic of interest in a context of rising pollution in freshwater ecosystems. Sures and Radszuweit (2007) described that the cystacanth stage of *Polymorphus minutus* prevented the synthesis of heat shock protein 70 in *Gammarus roeseli*, when subjected to a thermal disturbance or a palladium exposure. Cornet et al. (2009) have shown a decrease of the prophenoloxidase system and the haemocyte concentration, two major parameters of crustacean immunity, in *Gammarus pulex* infected by three acanthocephalan parasites: *Pomphorhynchus laevis*, *P. tereticollis* and *Polymorphus minutus*.

Because acanthocephalan parasites need their host to survive both for their own development and for their transmission to a definitive host (Plaistow et al. 2001), we hypothesized that parasite could help its intermediate host to cope with stress conditions, what favours its transmission to the final host. We also hypothesized that the decrease of antitoxic defences already shown in previous ecotoxicological studies could be due to the fact that the host could need less defences to face with stress.

We tested our hypothesis in the widespread amphipod *Gammarus roeseli*, an intermediate host for the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus*, which modifies the gammarid behaviour (Médoc et al. 2006; Médoc and Beisel 2009). We first studied the influence of the acanthocephalan parasite *P. minutus* on the lethal concentration 50 of cadmium (LC_{50} – concentration that caused the death of 50% of individuals) reflecting the resistance of the gammarid host. Then, we compared the cadmium accumulation in the body-whole of uninfected and infected *G. roeseli* after having removed parasites. The accumulation of cadmium was also measured in the body-whole of *P. minutus* extracted from its host.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sampling collection and maintenance

G. roeseli uninfected and infected by *P. minutus* were collected in April 2010 with a pond net in the French Nied River (Rémilly, North-eastern France, 49° 00′ N and 6° 23′ E), where cadmium concentrations were less than 0.2 $\mu g.L^{-1}$ (unpublished data). Infected *G. roeseli* were easily identified thanks to the cystacanth stage of *P. minutus* appearing as an intense orange dot through the cuticle. Individual gammarids were sorted in field after observation of the gnatopod size, a sexual dimorphism, males having gnathopod size, a sexually dimorphic character, males having gnathopod size larger than females. Gammarids were transferred to the laboratory in containers filled with river water, and then acclimated at 15°C in an EDTA-free Elendt M4 solution. Animals were fed *ad libitum* with alder leaves and acclimated 5 days in these conditions before being used in experiments. This acclimation period allows selecting only healthy individuals for the experiment.

2.2. LC_{50} assessment

This experimentation aimed at determining the cadmium LC_{50} values of *G. roeseli* uninfected and infected by *P. minutus*. Four conditions were tested according to the gender and the infection status (i.e. uninfected versus *P. minutus*-infected). Five different cadmium concentrations were prepared using a 12 $mg.L^{-1}$ of $CdCl_2$ stock solution and Elendt M4 modified solution: 0, 6, 18, 54 and 162 µg $Cd.L^{-1}$. These concentrations were chosen according to a preliminary cadmium exposition (data not shown) and the $LC_{50\text{-}96h}$ observed by Felten et al. (2008) in *Gammarus pulex* (82.1 µg $Cd.L^{-1}$). Three replicates of 10 gammarids were exposed at 15°C for 96hrs to the 5 cadmium concentrations in 500 mL glass

tank with a photoperiod of 14:10 (d:n) and without alimentary resource. Dead individuals were removed each 24hrs to avoid cannibalism and survivors were counted at the end of the experimentation.

2.3. Cadmium accumulation

At the end of the exposure, alive uninfected and infected *G. roeseli* of each gender, exposed to each cadmium condition, were immediately frozen at -196°C and stored at -80°C awaiting the cadmium analysis, taking care to remove the cystacanth from the infected hosts. Similarly, five pools of 5 cystacanths were carried out being careful to separate the parasites from infected males and infected females, and stored as above prior to cadmium analysis. Due to high mortality rates in the highest cadmium concentrations, the cadmium analysis was conducted only on *G. roeseli* exposed to the first three concentrations: 0, 6 and 18 µg $Cd.L^{-1}$. To analyze cadmium concentration, samples were dried at 100°C during 48hrs, and weighted. Then, they were digested with 50 µL Suprapur nitric acid (HNO_3) at 80°C for a minimum of 12hrs until a limpid solution was obtained. The volume was then adjusted to 1 mL with deionized water. Cadmium was measured in these acid solutions by flameless atomic absorption spectrophotometry (AAS). Cadmium controls were based on the Spectrapure standards AS - SPS quality control material (Oslo, Norway). The cadmium accumulation was expressed in ng $Cd.mg^{-1}$ dry weight.

The bioconcentration factors (BCF) were calculated using the method of Taylor (1983) described in Duquesne et al. (2000). BCFs were only estimated for *G. roeseli* due to the fact that *P. minutus* are located in haemolymph of the gammarid and thus, not exposed to cadmium concentration in the water. Moreover, the bioaccumulation of cadmium was measured in the body-whole of *Gammarus roeseli*, so we could not estimate that this value also corresponded to the concentration of cadmium in the haemolymph, concentration at which the cystacanth was exposed.

2.4. Statistical analysis

$LC_{50\text{-}96hrs}$ values were estimated by using the Excel macro REGTOX according to the method of Vindimian et al. (1999). Statistical comparisons of cadmium accumulation data were performed using a two way-ANOVAs following by the post-hoc HSD Tukey tests, after having log transformed data to meet the normality and the variance homogeneity conditions. Similarly, significant differences of BCFs were tested using three way-ANOVAs followed by

post-hoc HSD Tukey tests. All tests were two-tailed with significant differences considered at the level of $p \leq 0.05$.

3. RESULTS

3.1. LC_{50} assessment

Results of $LC_{50\text{-}96hrs}$ values according to gender and infection status of *G. roeseli* were summarized in Table 1. Cadmium sensitivity was different according to gender. Indeed, uninfected females were twice more resistant to cadmium than uninfected males. However, when *G. roeseli* were infected by *P. minutus*, males were four times more resistant to cadmium than females. Finally, results shown that *P. minutus*-infected males were twice less sensitive to cadmium than uninfected ones; while *P. minutus*-infected females were three times more sensitive than uninfected ones.

Table 1. LC_{50} values (± 95% confidence interval) of Gammarus roeseli according to gender and the presence/absence of Polymorphus minutus, after 96hrs of cadmium exposure (n=30 for each condition).

$LC_{50\text{-}96hrs}$ (µg $Cd.L^{-1}$)			
Males		**Females**	
Uninfected	*Infected*	*Uninfected*	*Infected*
50 *(26-92)*	146 *(94-269)*	107 *(72-167)*	35 *(25 – 50)*

3.2. Cadmium accumulation

After 96hrs of cadmium exposure, there was a dose-response relationship for the cadmium accumulation in *G. roeseli*, whatever the gender and infection status (Fig. 1). Indeed, whatsoever the gender, cadmium concentrations in uninfected gammarids exposed at 6 µg $Cd.L^{-1}$ and 18 µg $Cd.L^{-1}$ were on average 12 and 24 times higher than controls. When *P. minutus* was present, cadmium concentrations in exposed males were 4 and 10-fold higher than their controls; while in exposed females, they were 12 and 20-fold higher than unexposed ones. Results have also shown that cadmium accumulation in gammarids was higher in absence of *P. minutus* whatever the cadmium exposure. In fact, infected males had accumulated in average twice less cadmium than uninfected ones; while infected female had in average accumulated 1.5-fold less than uninfected ones.

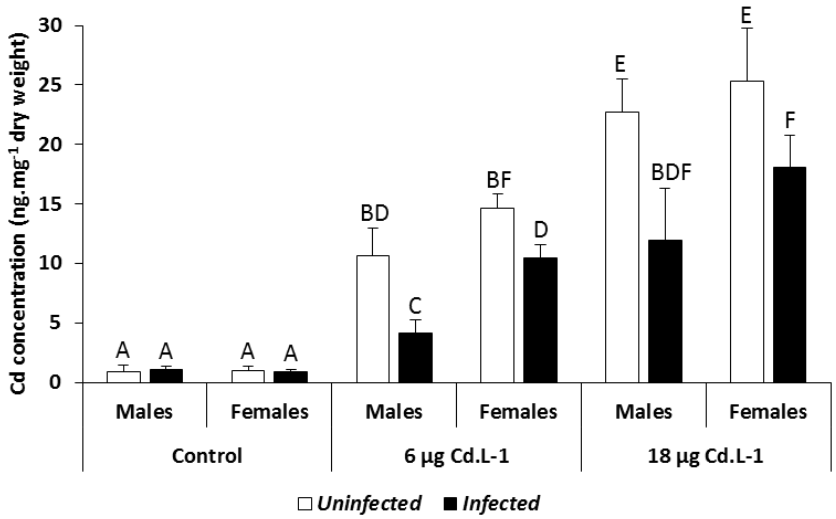


Fig. 1. Concentrations of cadmium measured in G. roeseli exposed at 6 and 18 µg Cd.L^{-1} according to the gender and the infected status. *Five individuals were analyzed for each condition. Different letters above the bars indicate significantly different values (p-values < 0.05).*

In the cystacanth of *P. minutus*, the cadmium accumulation was also described by a dose-response relationship (Fig. 2). Indeed, *P. minutus* cystacanths from gammarids exposed to 6 µg Cd.L^{-1} tended to accumulate more cadmium than their respective controls. Moreover, *P. minutus* from individuals exposed to 18 µg Cd.L^{-1} showed significantly higher cadmium concentrations than their respective control. No difference was observed in the cystacanth accumulation according to the host gender.

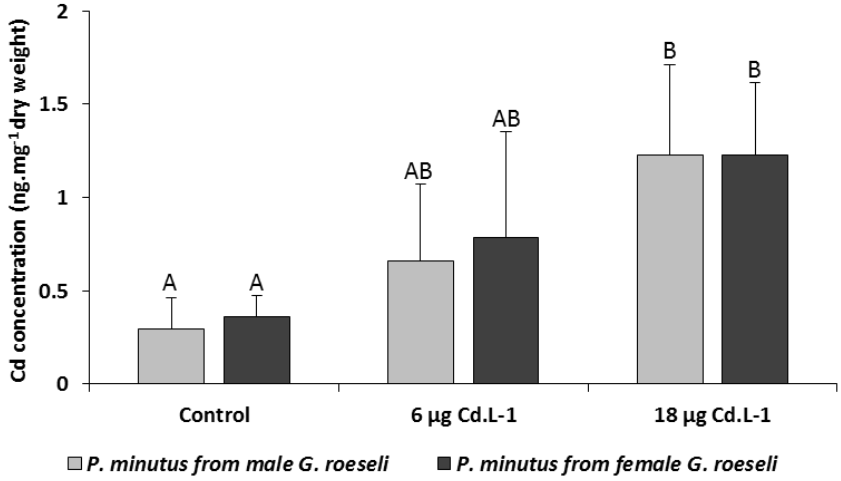


Fig. 2. Concentrations of cadmium determined in P. minutus from G. roeseli males and females exposed at 6 and 18 µg Cd.L^{-1}. *Five pools of 5 cystacanths were analyzed for each condition. Different letters above the bars indicate significantly different values (p-values < 0.05).*

Results revealed that *P. minutus* cystacanth accumulated less cadmium concentration than *G. roeseli* host. In fact, according to the cadmium concentration in the exposure medium, gammarids had on average from 3 to 15 times more cadmium than their respective

cystacanths. A linear relationship between both cadmium concentrations in *G. roeseli* and *P. minutus* was observed (Fig. 3). Slopes of relationships between the cadmium concentrations in *P. minutus* and its host were approximately the same for both genders (ANCOVA test, p = 0.21).

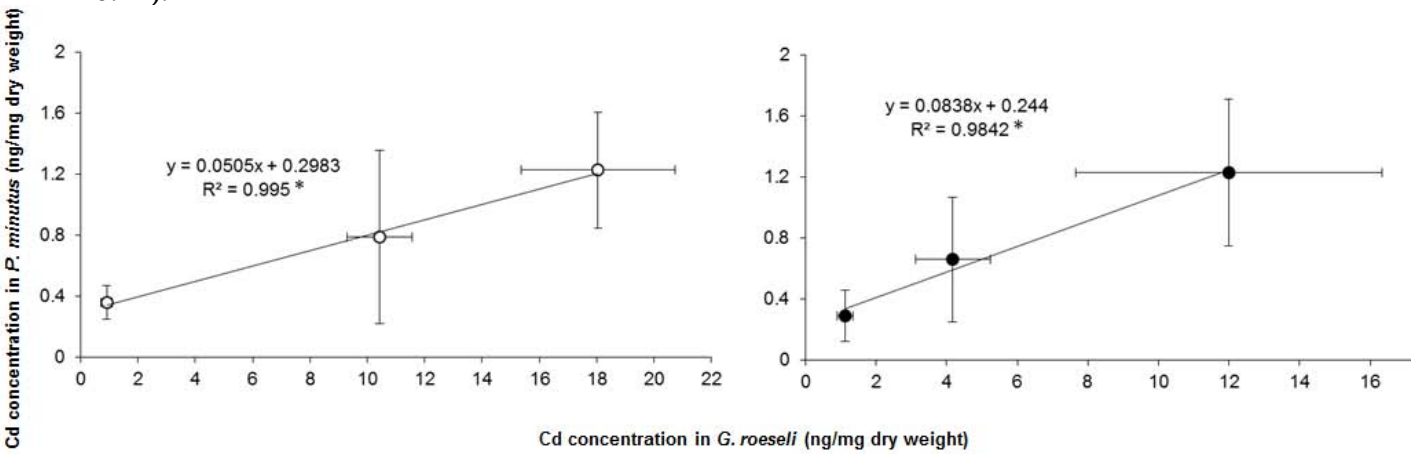


Fig. 3. Relationship between cadmium concentrations in P. minutus body tissues and G. roeseli females (○) and males (●) body tissues after 96 hrs of exposure. Asterisks indicate p-value < 0.015.

3.3. Bioconcentration factors

BCFs were evaluated in *G. roeseli* males and females, uninfected or infected and exposed to 6 µg $Cd.L^{-1}$ and 18 µg $Cd.L^{-1}$. Results confirmed that uninfected gammarids accumulated more cadmium than infected ones (Fig. 4). Whatever the individual gender and the cadmium concentration, uninfected *G. roeseli* had a BCF value higher than infected ones. When infected, BCFs were not different according to the cadmium concentration; while BCFs were higher for uninfected gammarid exposed at 6 µg $Cd.L^{-1}$ (130 on average) than for uninfected ones exposed to 18 µg $Cd.L^{-1}$ (85 on average).

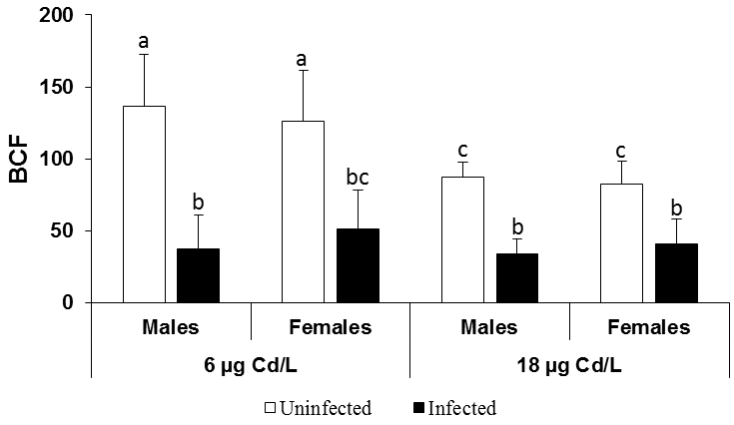


Fig. 4. Bioconcentration factors (BCFs) of G. roeseli according to the gender, the infection status and the cadmium exposure. *Five individuals were analyzed for each condition. Different letters above the bars indicate significantly different values (p-values < 0.05).*

4. DISCUSSION

This study was carried out to investigate the effect of the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* on the mortality of its intermediate host *Gammarus roeseli*, especially on its $LC_{50\text{-}96hrs}$ value and cadmium bioaccumulation.

The $LC_{50\text{-}96h}$ values showed that gammarids have different mortality depending on gender, and infection status. Indeed, in the absence of *P. minutus*, females were two times less sensitive than males. This could be due to higher antitoxic defences reflecting by higher antioxidant enzyme activities (Sroda and Cossu-Leguille 2011a) or higher reduced glutathione concentration (Gismondi et al. unpublished data), but also due to higher energy reserves in females, for reproductive demand, and mobilized if necessary for antitoxic defence syntheses. However, previous studies reported different sensitivity between genders in a pollutant context. Sroda and Cossu-Leguille (2011b) demonstrated that females of *G. roeseli* and *Dikerogammarus villosus* were more sensitive to copper than respective males, the converse of our results with cadmium. *G. roeseli* submitted to a salinity stress revealed a significant higher sensitivity of females in survival, ventilation and ionoregulation (Sornom et al. 2010). When authors have reported a lower mortality of females in comparison to males (Emery 1970; Benoit et al. 1976; Heit and Fingerman 1977, our study), the tested substances were always a non-essential molecule (e.g. cadmium, mercury, cresol).

In our study, cadmium $LC_{50\text{-}96h}$ of uninfected *G. roeseli* was in the same range that those obtained by Felten et al. (2008), 82 µg $Cd.L^{-1}$ for *G.* pulex. Our study highlighted that male gammarids infected by *P. minutus* were more resistant to cadmium exposure than uninfected ones, while infected females were more sensitive than uninfected ones. Female results were in agreement with McCahon et al. (1988) who had determined cadmium LC_{50} value higher for uninfected *G. pulex* than *Pomphorynchus laevis*-infected ones. Similarly, Brown and Pascoe (1989) showed that *P. laevis*-infected *G. pulex* exposed to 2.1 µg $Cd.L^{-1}$ died faster than uninfected ones. In our study, the difference observed between cadmium $LC_{50\text{-}96h}$ of uninfected and infected males illustrates a help from the parasite to its host to face with cadmium stress, what contributes to keep it alive. The parasite help could be due to its antitoxic defences such as heat shock protein 70 increased in *P. minutus* exposed to palladium (Sures and Radszuweit 2007), or catalase activity present in secretion products and total extracts as observed in nematode or helminth parasites (Dzik 2006; Morassutti et al. 2011). By this action on its intermediate host, *P. minutus* could increase its own survival and favour its transmission to its final vertebrate host, a water bird.

The gammarid death could be closely related to a modification of cadmium accumulation. Cadmium accumulation in gammarids has been described in the literature for *G. pulex* (Stuhlbacher et Maltby 1992; Felten et al. 2008; Vellinger et al. 2012), *G. locustra* (Clason and Zauke 2000), or *G. oceanicus* (Zauke et al. 2003), but no study has been devoted to *G. roeseli* and only a few ones have investigated the influence of parasite on the metal bioaccumulation in the host. The present work highlighted that infected *G. roeseli* accumulated less cadmium in their body-whole than uninfected ones, conducting to the weakest BCF in *P. minutus*-infected gammarids. This result was in agreement with Heinonen et al. (2000) in *Pisidium amnicum* clams who observed lower BCF in trematode-infected individuals than in uninfected ones. Our results have shown that *P. minutus* had absorbed cadmium. The cystacanth lives in the haemocoel of *G. roeseli*, surrounded by the haemolymph which contain toxic metals when individuals are exposed to pollutants (Xu and Pascoe (1993): *G. pulex* exposed to zinc). The cadmium accumulation by an acanthocephalan parasite has already been determined in *P. laevis* infecting *G. pulex* (Brown and Pascoe 1989). Moreover, other metal pollutants can be accumulated by acanthocephalan cystacanth, as palladium in *P. minutus* cystacanth (Sures and Radszuweit 2007).

Regarding results of this work, *P. minutus* could influence the mortality of *G. roeseli* males by influencing the cadmium bioaccumulation. Indeed, a weak uptake of cadmium by the host could lead to a weak formation of reactive oxygen species, responsible of cellular damage in organisms (Sies 1986).

In contrast of *G. roeseli* male results, *G. roeseli* females were more sensitive to cadmium when *P. minutus* was present, although their BCF and the cadmium concentration in the body-whole were weaker compared to uninfected ones. This higher mortality could be explained by the presence of other parasites as vertically-transmitted microsporidia parasites which are found in many arthropod species (Terry et al. 1999; Ironside et al. 2003; Weedall et al. 2006; Haine et al. 2007), especially in females (Haine et al. 2004). In a previous study, we demonstrated that these microsporidia parasites accentuated oxidative stress in *G. roeseli* females exposed to cadmium (Gismondi et al. 2012) leading to a stress on stress exposition of females. Higher malondialdehyde levels (marker of cellular damage) were observed in microsporidia-infected *G. roeseli* females compared to uninfected ones. Results obtained in the present study suggested that the potential presence of two parasites (i.e. *P. minutus* and vertically-transmitted microsporidia) could weaken the host survival and accentuate the cadmium stress.

Indeed, *P. minutus*-infected *G. roeseli* males had a higher resistance to a cadmium stress than uninfected ones, probably due to the fact that the parasite decreased the cadmium

concentration in the host body by absorbing a part of the pollutant. A decreased of cadmium in the body-whole of *G. roeseli* could lead to weak cellular damage, what favored both the host survival and the parasite transmission. In contrast, results have shown that infected females were less resistant than uninfected ones. In this *G. roeseli* gender, the presence of vertically-transmitted microsporidia parasite in addition to the presence of *P. minutus* could be the cause of an increase of sensitivity and probably an increase of toxic effect; however this hypothesis remained to be tested.

Acknowledgments: This study was supported by the French Ministry of Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) we sincerely thanks here. The present work takes part of the research program EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière). We thank Philippe Rousselle for cadmium concentration analysis. We wish to thank the anonymous reviewers for their helpful comments on a previous draft of this paper.

REFERENCES

Baudrimont M, de Montaudouin X, Palvadeau A (2006) Impact of digenean parasite infection on metallothionein synthesis by the cockle (Cerastoderma edule): A multivariate field monitoring. Mar Pollut Bull 52:494-502.

Bauer A, Haine ER, Perrot-Minnot MJ, Rigaud T (2005) The acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* alters the geotactic and clinging behaviours of two sympatric amphipod hosts: the native *Gammarus pulex* and the invasive *Gammarus roeseli*. J Zool 267:39-43.

Benoit DA, Leonard EN, Christensen GM, Fiandt JT (1976) Toxic effects of cadmium on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). T Am Fish Soc 105:550–560.

Bollache L, Rigaud T, Cézilly F (2002) Effects of two acanthocephalan parasites on the fecundity and pairing status of female *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). J Invertebr Pathol 79:102-110.

Brown, AF, Pascoe D (1989) Parasitism and host sensitivity to cadmium: An acanthocephalan infection of the freshwater amphipod *Gammarus pulex.* J Appl Ecol 26:473-487.

Cézilly F, Gregoire A, Bertin A (2000) Conflict between co-occurring manipulative parasites? An experimental study of the joint influence of two acanthocephalan parasites on the behaviour of *Gammarus pulex*. Parasitology 120:625-630.

Clason B, Zauke GP (2000) Bioaccumulation of trace metals in marine and estuarine amphipods: evaluation and verification of toxicokinetic models. Can J Fish Aquat Sci 57:1410-1422.

Cornet S, Franceschi N, Bauer A, Rigaud T, Moret Y (2009) Immune depression induced by acanthocephalan parasites in their intermediate crustacean host: Consequences for the risk of super-infection and links with host behavioural manipulation. Int J Parasitol 39:221-229.

Dzik JM (2006) Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. Acta Biochim Pol 53:33-64.

Duquesne S, Riddle M, Schulz R, Liess M (2000) Effects of contaminants in the Antarctic environment — potential of the gammarid amphipod crustacean *Paramorea walkeri* as a biological indicator for Antarctic ecosystems based on toxicity and bioacccumulation of copper and cadmium. Aquat Toxicol 49:131-143.

Emery RM (1970) The comparative acute toxicity of cresol to two benthic crustaceans. Water Res 4:485–491.

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

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.

Haine ER, Brondani E, Hume KD, Perrot-Minnot MJ, Gaillard M (2004) Coexistence of three microsporidia parasites in populations of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli*: evidence for vertical transmission and positive effect on reproduction. Int J Parasitol 34:1137-1146.

Haine ER, Motreuil S, Rigaud T (2007). Infection by a vertically-transmitted microsporidian parasite is associated with a female-biased sex ratio and survival advantage in the amphipod *Gammarus roeseli*. Parasitology 134:1363-1367.

Heinonen JVKK (2000) Toxicokinetics of 2,4,5-Trichlorophenol and Benzo(a)pyrene in the clam *Pisidium amnicum* : Effects of seasonal temperatures and trematode parasites. Arch Environ Con Tox 39:352-359.

Heit M, Fingerman M (1977) The influences of size, sex and temperature on the toxicity of mercury to two species of crayfishes. B Environ Contam Toxi 18:572-580.

Ironside JE, Dunn AM, Rollinson D, Smith JE (2003) Two species of feminizing microsporidian parasite coexist in populations of *Gammarus duebeni*. J Evolution Biol 1:467-473.

Kennedy CR (2006) Ecology of the Acanthocephala. Cambridge University Press, Cambridge, England.

Lagrue C, Kaldonski N, Perrot-Minnot MJ, Motreuil S, Bollache L (2007) Modification of hosts' behavior by a parasite: field evidence for adaptive manipulation. Ecology 88, 2839-2847.

Marcogliese DJ, Brambilla L, Gagné F, Gendron AD (2005) Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch *Perca flavescens*. Dis Aquat Organ 63:77–84.

Marcogliese DJ, Pietrock M (2011) Combined effects of parasites and contaminants on animal health: parasites do matter. Trends in Parasitology 27:123-130.

McCahon CP, Brown AF, Pascoe D (1988) The effect of the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis* (Müller 1776) on the acute toxicity of cadmium to its intermediate host, the amphipod *Gammarus pulex* (L.). Arch Environ Cont Tox 17:239-243.

Médoc V, Bollache L, Beisel JN (2006) Host manipulation of a freshwater crustacean (*Gammarus roeseli*) by an acanthocephalan parasite (*Polymorphus minutus*) in a biological invasion context. Int J Parasitol 36:1351-1358.

Médoc V, Beisel JN (2009) Field evidence for non-host predator avoidance in a manipulated amphipod. Naturwissenschaften 96:513-523.

Minguez L, Meyer A, Molloy D, Giambérini L (2009). Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Importance in ecotoxicological studies. Environ Res 109:843-850.

Morassutti AL, Pinto PM, Dutra BK, Oliveira GT, Ferreira HB, Graeff-Teixeira C (2011) Detection of anti-oxidant enzymatic activities and purification of glutathione transferases from *Angiostrongylus cantonensis*. Experimental Parasitology 127:365-369.

Plaistow SJ, Troussard JP, Cézilly F (2001) The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. Int J Parasitol 31:346-351.

Sies H (1986) Biochemistry of oxidative stress. Angew Chem Int Edit 25:1058-1071.

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

Sroda S, Cossu-Leguille C (2011a) Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. Chemosphere 83:538-544.

Sroda S, Cossu-Leguille C (2011b) Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor? Ecotoxicology 20:264-273.

Stuhlbacher A, Maltby L (1992) Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). Arch Environ Cont Tox 22:319-324.

Sures B (2004). Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. Trends in Parasitology 20:170-177.

Sures B, Radszuweit H (2007) Pollution-induced heat shock protein expression in the amphipod *Gammarus roeseli* is affected by larvae of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). J Helminthol 81:191-197.

Taylor D (1983) The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. Ecotox Environ Safe 7:33-42.

Terry RS, Smith J, Bouchon D, Rigaud T, Duncan P, Sharpe R, Dunn AM (1999) Ultrastructural characterisation and molecular taxonomic identification of *Nosema granulosis* n. sp., a Transovarially Transmitted Feminising (TTF) Microsporidium. J Eukaryot Microbiol 46:492-499.

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

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

Weedall RT, Robinson M, Smith J, Dunn AM (2006) Targeting of host cell lineages by vertically transmitted, feminising microsporidia. Int J Parasitol 36:749-756.

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

Zauke GP, Clason B, Savinov VM, Savinova T (2003) Heavy metals of inshore Benthic invertebrates from the Barents Sea. Sci Total Environ 306:99-110.

Publication 4

Polymorphus minutus affects antitoxic responses of Gammarus roeseli exposed to cadmium[§]

Les études précédentes nous ont permis de déterminer que (i) *P. minutus* influence les réserves énergétiques et les défenses antitoxiques de *G. roeseli* en absence de stress, (ii) qu'il modifie la résistance de son hôte ainsi que la bioaccumulation du toxique lors d'un stress au cadmium, et (iii) que *P. minutus*, logé dans l'hémocoele de *G. roeseli*, absorbait également du cadmium.

L'étude suivante a eu pour objectif d'essayer de comprendre, à l'aide de la réponse des biomarqueurs de défense antitoxique, la différence de sensibilité observée chez *G. roeseli* parasités ou non par *P. minutus* seul, et soumis à un stress au cadmium. Du fait d'un très faible nombre de mâles parasités retrouvés sur notre site d'étude, cette expérimentation n'a été réalisée uniquement sur *G. roeseli* femelles, en prenant soin de vérifier la présence de microsporidie à transmission verticale pour éviter un double parasitisme.

Pour cette étude, *G. roeseli* femelles parasitées ou non par *P. minutus* ont été exposées à 2 et 8 µg Cd/L pendant 96h. Ces concentrations ont été choisies en fonction des CL_{50} précédemment déterminées (article 3) et de la concentration de cadmium dans le site d'échantillonnage qui est de 0,2 µg Cd/L. A la fin de l'exposition, les gonades des femelles ont été disséquées afin de déterminer la présence/absence de microsporidies. Les femelles ont été congelées à l'azote liquide puis maintenues à -80°C jusqu'aux analyses des biomarqueurs. Les cystacanthes des individus parasités ont été soigneusement retirés et congelés de la même façon afin de permettre le dosage de biomarqueurs sur ces organismes. Des biomarqueurs de défenses (glutathion réduit, métallothionéines, caroténoïdes), énergétiques (lipides, glycogène) et d'effets toxiques (malondialdéhyde) ont été mesurés chez l'hôte. Les teneurs en lipides, caroténoïdes et malondialdéhyde ont été mesurées chez le parasite.

Les résultats mettent en évidence que les femelles infectées par *P. minutus* et exposées au cadmium subissent des dommages cellulaires plus importants que les femelles saines, bien que les capacités de défenses soient mobilisées. En effet, lors de l'exposition au cadmium, les concentrations en glutathion réduit et métallothionéines étaient plus fortement augmentées chez les femelles parasitées que chez les femelles saines. Cependant, ces capacités de défense

§ Article soumis à PLoS One

accrues n'ont pas permis de protéger davantage l'organisme qui a subi une plus forte toxicité en présence du parasite, comme en témoignent les niveaux de malondialdéhyde. Ceci pourrait être lié à la diminution de la concentration en caroténoïdes chez *G. roeseli*, probablement dû à leur absorption par *P. minutus*, les rendant ainsi indisponibles pour la défense de l'hôte. L'intégralité des défenses antitoxiques de *G. roeseli* se trouvait alors diminuée en présence de *P. minutus*.

Nos résultats ont également confirmé que *P. minutus* subissait également des dommages cellulaires traduit par une augmentation du taux de malondialdéhyde, probablement liée à l'absorption de cadmium par le parasite, démontrée dans notre précédente étude (article 3). Cette augmentation des dommages cellulaires était accompagnée d'une diminution des teneurs en lipides, ce qui soulève l'hypothèse que *P. minutus* aurait son propre système de défense, nécessitant une mobilisation de l'énergie.

Cette étude souligne l'influence du cystacanthe de P. minutus sur les défenses antitoxiques et les réserves énergétiques de son hôte intermédiaire G. roeseli femelle lors d'une exposition au cadmium. Les résultats ont révélé que P. minutus pourrait influencer G. roeseli à utiliser davantage certaines défenses antitoxiques (GSH et MT), tandis que d'autres (caroténoïdes), nécessaire à son propre métabolisme, sont maintenues. Cependant, le fait que G. roeseli ne possédait pas l'intégralité de ses défenses antitoxiques, pourrait expliquer l'augmentation de la toxicité, traduit par des niveaux élevés de MDA. Cette étude est la première, à notre connaissance, a montré un effet toxique du cadmium sur le cystacanthe de P. minutus, probablement due à l'absorption de cadmium. L'hypothèse d'un système de détoxication chez P. minutus reste cependant à tester.

Polymorphus minutus affects antitoxic responses of *Gammarus roeseli* exposed to cadmium

E. GISMONDI*, J.-N. BEISEL, C. COSSU-LEGUILLE

Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie Biodiversité Ecosystèmes (LIEBE) - CNRS UMR 7146, Université de Lorraine (UdL), Campus Bridoux, Bât. IBiSE, 8 Rue du Général Delestraint, 57070 METZ, France

ABSTRACT

The acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* is a manipulator of its intermediate host *Gammarus roeseli*, which favours its transmission to the final host, a water bird. In contaminated environments, *G. roeseli* have to cope with two stresses, i.e. *P. minutus* infection and pollutants. As *P. minutus* survival relies on its host's survival, we investigated the influence of *P. minutus* on the antitoxic defence capacities and the energy reserves of *G. roeseli* females after cadmium exposure. In parallel, malondialdehyde, a toxic effect biomarker, was measured in *G. roeseli* and in *P. minutus*. The results revealed that infected gammarids displayed higher cell damage than uninfected ones, despite an apparent increase in reduced glutathione and metallothionein production. In fact, the increase of these antitoxic systems could be counterbalanced by carotenoid intake by the parasite, so that the overall defence system seemed less efficient in infected gammarids than in uninfected ones. In addition, we demonstrated that cadmium induced cell damage in *P. minutus*, probably linked with cadmium accumulation in the parasite. Altogether, we observed a paradoxical pattern of responses suggesting that *P. minutus* increases cadmium toxicity in *G. roeseli* females although (i) it tends to increase several host antitoxic defence capacities and (ii) it bears part of the pollutant, as reflected by cell damage in the parasite.

Key-Words: Acanthocephalan parasite, *Polymorphus minutus*, *Gammarus roeseli*, antitoxic defences, energy reserves, cadmium exposure

1. INTRODUCTION

Over the last decade the study of parasitism in ecotoxicology has arisen increasing interest, and numerous studies have already underlined the influence of parasites on infected host physiology in contaminated environments (bivalves [1,2]; arthropods [3–5]; fish [6]). Parasites need energy for their own development, so that they could reallocate host energy [7], which could weaken host detoxification processes. It has been demonstrated that parasites can disrupt the antitoxic defences of their hosts [5,8] as well as their immune system [9]. Conversely, some studies have described that parasites can help their host to cope with pollutants, for example by accumulating heavy metals in their own tissues [10,11] or by increasing antioxidant enzyme activities [12]. Most of these studies were conducted in freshwater environments.

Gammarid amphipods are increasingly used in ecotoxicological studies in both freshwater and marine environments, especially due to their important role in the trophic chain [13]. They can be infected by several parasites such as nematodes, trematodes [14,15], microsporidia [5,16–18] or acanthocephalans [19–22].

Acanthocephalans are the most widely studied parasites in gammarids. Their complex life cycle includes an intermediate host (an arthropod) to grow up and a final host (a vertebrate) to mature and reproduce. Acanthocephalan parasites at the cystacanth stage are known to alter the phenotype of their intermediate host by a behavioural manipulation, in a way that makes it more prone to predation and thus favours their transmission to the final vertebrate host [23,24]. Although acanthocephalan parasites need their gammarid hosts in order to develop before being transmitted to the final host, in polluted environments, they may represent an additional burden for gammarids. Indeed, in contaminated ecosystems, gammarids are faced with two different stresses: the presence of the parasite and the toxicity of pollutants. In a previous study, we demonstrated that the acanthocephalan *Polymorphus minutus* influenced on the cadmium resistance of its intermediate host *Gammarus roeseli*, by increasing or decreasing the cadmium LC_{50} after 96hrs exposure in males and females, respectively [11]. In that study, cadmium accumulation in *P. minutus* as well as a lower cadmium bioaccumulation in infected gammarids than in uninfected ones were observed. However, up to now, only few studies have investigated the effect of an acanthocephalan parasite on the host antitoxic defence capacities, which could explain the difference in resistance between uninfected and infected gammarids. We described a reduction of the antitoxic defence capacities of *P. minutus*-infected *G. roeseli* in the absence of environmental stress [25]. The cystacanth stage of *P. minutus* prevents the synthesis of heat shock protein 70

in *G. roeseli*, subjected to thermal disturbance or palladium exposure [8]. In addition, a weakening of two major parameters of crustacean immunity, i.e. the prophenoloxidase system and haemocyte concentrations have benn shown in *Gammarus pulex* infected by one of the three following acanthocephalan parasites: *Pomphorhynchus laevis*, *P. tereticollis* and *P. minutus* [26].

Accordingly, in this study we hypothesized that in a contamination context, the parasite could influence on host antitoxic defences, to provide host with a better defence capacity and therefore lead to increased host survival. This host survival is believed to favour parasite survival and consequently its transmission. We tested our hypothesis by determining, in controlled laboratory conditions, the effect of the acanthocephalan *P. minutus* on the antitoxic defence capacities and energy reserves of its intermediate host *G. roeseli* exposed to a cadmium stress. Antitoxic defences were assayed by measuring concentrations of reduced glutathione (GSH), a tripeptide that plays an essential role in the detoxification system by scavenging organic or metallic xenobiotics, responsible of oxidative stress (i.e. production of reactive oxygen species), thanks to its thiol group [27]. In parallel, the activity of γ-glutamylcysteine ligase (GCL, EC 6.3.2.2), the limiting enzyme of *de novo* GSH synthesis, was assayed. Concentrations of metallothioneins (MT), which are involved in binding metal compounds thanks to the thiol groups of cysteine residues and contribute to protecting tissues against oxidative damage [28,29], were measured. Their induction was related to metal exposure in many monitoring studies [30]. Carotenoids, which are involved in reproduction [31] and in antioxidant defences [32], were also measured; as well as levels of malondialdehyde (MDA), product of the lipid membrane degradation (i.e. lipoperoxidation) which reflects cell damage, and thus considered as a biomarker of toxic effect. Moreover, energy reserves were assessed by measuring total lipid and glycogen contents. The levels of glycogen are representative of the energy available for current activities [33] whereas lipids are used during starvation or reproduction periods [34]. Finally, as acanthocephalan parasites contained carotenoïds [35], carotenoïd concentrations were measured in *P. minutus*, in parallel to lipid contents and MDA levels.

2. MATERIELS AND METHODS

2.1. Sampling collection, maintenance and cadmium exposure

Due to the lack of infected males, this study was carried out only in *G. roeseli* females. *P. minutus*-infected *G. roeseli* females were collected in April 2011 with a pond net

in the French Nied River (Rémilly, North-eastern France, 49° 00′ N and 6° 23′ E), where cadmium concentrations were less than 0.2 µg.L^{-1}(LADROME laboratory, Valence, France). Females were sorted out on the spot by observing gnathopods, which are smaller in females than in males. In addition, *P. minutus* cystacanths were easily identified in living individuals: they appeared as intense orange dots through the cuticle. The animals were transferred to the laboratory in large containers filled with river water, acclimated 5 days at 15°C in an Elendt M4 modified solution, and fed *ad libitum* with alder leaves. The Elendt M4 solution was modified due to the fact that no EDTA was added to avoid cadmium chelation during exposure.

Test solutions were prepared using Elendt M4 modified solution with $CdCl_2$ added to obtain two cadmium exposure concentrations: 2 and 8 µg Cd.L^{-1}. Controls consisted of Elendt M4-modified solution only. Cadmium concentrations were defined (i) from the LC_{50} (lethal concentration for 50% of individuals) within 96hrs, which were 107 and 35 µg Cd.L^{-1} for uninfected and *P. minutus*-infected females, respectively [5]; and (ii) from the maximum admissible cadmium concentration in drinking water, which is 5 µg.L^{-1} (CD 98/83/EC, 1998). For each condition, two replicates of 50 females were exposed to the different conditions at 15°C for 96hrs, in a 1.5L aquarium previously saturated with the corresponding cadmium solutions for 5 days. At the end of the exposure, cadmium concentration were measured and averaged 1.97 ± 0.04 µg Cd/L and 7.96 ± 0.05 µg Cd/L.

As *G. roeseli* females can be infected with microsporidia parasites, and to avoid co-infected females, the presence of microsporidia was investigated by PCR-RFLP [5], which allowed us to keep females infected by *P. minutus* for biomarker analyses. In *P. minutus* infected individuals, cystacanths were removed and stored individually at -80°C awaiting marker analyses. Similarly, gammarid bodies were individually frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C awaiting biomarker analyses.

2.2. G. roeseli biomarker assays

Assaying antitoxic defences is impossible to perform on individual gammarid, so a minimum number of six gammarids was necessary to get enough tissues to analyse all the parameters. Therefore, for each exposure condition, 6 replicates of 6 individual females with the same parasitic status (i.e. absence/presence of *P. minutus*) were made to measure energy reserves and antitoxic defences as described below. Two different conditions were established: (i) uninfected females and (ii) *P. minutus*-infected females.

2.2.1. Sample preparation

Each pool was homogenized with a Potter Elvejhem manual tissue grinder in 50 mM phosphate buffer KH_2PO_4/K_2HPO_4 (pH 7.6) supplemented with 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) and 1 mM L-serine-borate mixture as proteases inhibitors, and 5 mM phenylglyoxal as a γ-glutamyl transpeptidase inhibitor. The homogenization buffer was adjusted to a volume two-fold the wet weight of the sample pool (e.g. 200 µL of homogenization buffer for 100 mg of wet weight tissue). The total homogenate was divided into seven parts to measure the different parameters. For each replicate, two independent measures were made for each biomarker.

2.2.2. Energy reserves

The measurement of total lipid and glycogen contents was adapted from Plaistow et al. [7]. A volume of 20 µL of 2% sodium sulphate (w/v) and 540 µL of chloroform/methanol 1:2 (v/v) were added to 40 µL of the total homogenate. After 1hr on ice, the samples were centrifuged at 3,000 x g for 5 min at 4°C. The resulting supernatant and the pellet were used to determine the lipid and glycogen contents, respectively.

A volume of 100 µL of supernatant was transferred into culture tubes and placed in a dry bath at 95°C to evaporate the solvent. Then, 200 µL of 95% sulphuric acid were added in each tube and left for 10 min. The different tubes were removed and cooled on ice, and then 4.8 mL of phosphovanillin reagent were added. After a 10-min reaction, the optical density was measured at 535 nm. Commercial cholesterol was used as a standard and total lipid contents were expressed in $mg.mL^{-1}$.

The pellets were dissolved in 400 µL of deionised water, 100 µL of sample were placed into culture tubes and 4.9 mL of Anthrone reagent were added. The mixture was placed in a dry bath at 95°C for 17 min and then cooled on ice. Optical density was measured at 625 nm. Glucose was used as a standard and concentrations were expressed in $µg.mg^{-1}$ tissue.

The total protein content of each sample was quantified according to Bradford [36] with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Results were expressed in $mg.mL^{-1}$.

2.2.3. Antitoxic defence capacities

2.2.3.1. GSH concentration and GCL activity

Reduced glutathione (GSH) concentrations were assessed by High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) separation adapted from Leroy et al. [37]. The proteins contained in 40 µL of the total homogenate were precipitated with 10% perchloric acid (v/v). After a 10-min centrifugation at 20,000 x g and 4°C, the resulting supernatant was diluted 40-fold in 0.1 M HCl. Commercial GSH diluted in 0.1 M HCl was used as a standard and GSH concentrations were expressed in nmol GSH.mg^{-1} protein.

GCL activity was assayed using an HPLC method adapted from Parmentier et al. [38]. Measurements were carried out on the S12000 fraction obtained after centrifuging 40 µL of the total homogenate for 15 min at 500 x *g* and then centrifuging the resulting supernatant at 12,000 x g and 4°C for 30 min. The resulting S12000 supernatant was diluted 20-fold in homogenization buffer and 40 µL of this diluted solution were added to 112 µL of incubation cocktail (0.5 M Tris HCl, 200 mM $MgCl_2$ $6H_2O$, 500 mM KCl, 45 mM glutamic acid, 90 mM cystein, 1 mM DTT, 90 mM ATP, 0.5 mM phenylglyoxal, pH 8.25) to initiate the reaction. The mixture was incubated for 20 min at 25°C in a water bath and the reaction was stopped by a four-fold dilution with 0.1 M HCl. Commercial glutamylcysteine (GC) solution prepared in 0.1 M HCl was used as a standard and GCL activity was expressed in nmol GC.min^{-1}.mg^{-1}protein.

2.2.3.2. Metallothionein assay

Metallothionein (MT) concentrations were determined with an HPLC method adapted from Alhama et al. [39]. A volume of 40 µL of the total homogenate was centrifuged at 3,500 x g for 10 min. Then, the resulting supernatant was centrifuged at 22,000 x g for 30 min and 4°C to obtain the S22000 fraction. A ten-fold dilution of the S22000 fraction was prepared in 100 mM Tris buffer (pH 9.5) supplemented with 1 mM DTT and 100 mM PMSF as a protease inhibitor. To reduce and denature the protein, 125 µL of diluted sample were added to 108 µL of incubation cocktail (230 mM Tris pH 9.5, 300 mM DTT, 100 mM EDTA and 10% sodium dodecyl sulfate) and placed in a water bath at 70°C for 20 min. Then, the incubation mixture was supplemented with 17 µL of 180 mM monobromobimane (mBBr) and incubated in the dark at room temperature for 15 min, to mark MTs. Commercial rabbit-liver MT I solution prepared in 230 mM Tris, pH 9.5, was used as a standard and MT concentrations were expressed in nmol MT.mg^{-1} protein.

2.2.3.3. Carotenoïds concentration

Carotenoid concentrations were measured by a spectrophotometry method adapted from Rauque and Semenas [40]. A volume of 40µL of the total homogenate was diluted in 450 µL of 96% ethanol and kept 6hrs in the dark at 4°C, before being centrifuged 10 min at 3,500 x g. The optical density of the resulting supernatant was measured at 422, 448 and 476 nm using a commercial carotenoid mixture as a standard. Carotenoid concentrations were expressed in ng carotenoids.mg^{-1} lipid.

2.2.3.4. Toxic effect biomarker

Malondialdehyde (MDA) levels were determined using an HPLC method adapted from Behrens and Madère with UV detection at 267 nm [41]. A volume of 70 µL of the total homogenate was diluted four-fold in 95% ethanol (HPLC grade) and cooled on ice for 1.5hrs to deproteinize it. The mixture was then centrifuged at 18,000 x g for 30 min at 4°C. A volume of 100 µL of the resulting supernatant was injected into the HPLC separation system. MDA levels were expressed in ng MDA.mg^{-1} lipid.

2.3. P. minutus biomarker assays

In *P. minutus*, biomarkers were measured on 4 replicates of 9 *P. minutus* cystacanths each for each exposure condition. Each replicate was crushed in 350 µL of 96% ethanol and kept 1.5hrs in ice. The mixture was then centrifuged at 3,000 x g for 5 min at 4°C, and the resulting supernatant was divided into three parts to measure lipid contents, carotenoïd concentrations and MDA levels.

2.3.1. Lipid content

A volume of 60 µL of the resulting supernatant was two-fold diluted in chloroform-methanol 1:2 (v/v). Then, 100 µL of this diluted solution were used to measure lipid contents as described above.

2.3.2. Carotenoïd assays

A volume of 150 µL of the resulting supernatant was added to 300 µL of 95% ethanol, mixed and kept 6hrs in the dark at 4°C. Carotenoïds were then estimated as described above.

2.3.3. MDA levels

A volume of 100 µL of the resulting supernatant was directly injected into the HPLC system, to measure MDA levels as described above.

2.4. Statistical analysis

All data met normality and homogeneity of variance assumptions (*p*-values of Shapiro and Bartlett tests > 0.05). Our data were analysed by using a multivariate analysis of variance (MANOVA, Pillai's trace) with respect to "infection status" and "cadmium exposure" as fixed factors. Since the MANOVA test was significant, each biomarker was then analysed using ANOVA tests, followed by TukeyHSD post-hoc tests. All tests were performed with a 5% type-I error risk, using R 2.9.0 Software.

3. RESULTS

Global MANOVA analysis (Table 1) and ANOVAs tests (Table 2) revealed an effect of infection status, cadmium exposure, and their interactions on biomarker levels. Results are described below.

3.1. Effect of P. minutus without cadmium exposure

As shown in the figures and the post-hoc tests, infection by the acanthocephalan parasite *P. minutus* have influenced *G. roeseli* energy reserves, antitoxic defences and toxicity biomarkers (see white bars in figures 1 to 3). Indeed, MDA level, lipid content and MT concentration were unchanged but have a tendency to be lower in infected females than in uninfected ones (Figure 1, Figure 2C, Figure 3A). GSH concentrations were lower (Figure 2A) whereas GCL activity has a tendency to be slightly higher in infected females as compared to uninfected ones (Figure 2B). Conversely, carotenoïd concentrations and lipid contents remained unchanged in the presence of *P. minutus* (Figure2D, Figure 3A), while glycogen contents were higher in *P. minutus*-infected females than in uninfected ones (Figure 3B).

Table 1. Multivariate analyses of variance (Pillai's trace) investigating variations in energy reserves (lipid, glycogen) and defence capacity (GSH, GCL, MT, Carotenoid, MDA) of Gammarus roeseli, as a function of infection by acanthocephalan parasites and cadmium exposure.

Source of variation	num d.f.[a], den d.f.[b]	F	*p*-value
Infection status	7, 24	7.14	< 0.001
Cadmium exposure	14, 50	19.38	< 0.001
Infection : Cadmium	14, 50	15.73	< 0.001

[a] Numerator degrees of freedom

[b] Denominator degrees of freedom

Table 2. Univariate analyses of variance (ANOVA) investigating variations in energy reserves (lipid, and glycogen), in defence capacity (GSH, GCL, MT, carotenoid) and the variation of a toxicity biomarker (MDA), in Gammarus roeseli, according to infection by P. minutus and cadmium exposure. The significant differences are indicated in bold.

	Source of variation	Df	Mean square	F	*p*-value
Lipid	Infection status	1	0.84	5.69	**0.024**
	Cadmium exposure	2	9.08	61.48	**< 0.001**
	Infection : Cadmium	2	0.55	3.73	**0.035**
Glycogen	Infection status	1	0.29	11.65	**0.002**
	Cadmium exposure	2	4.39	178.61	**< 0.001**
	Infection : Cadmium	2	0.65	26.4	**< 0.001**
GSH	Infection status	1	0.029	0.401	0.53
	Cadmium exposure	2	7.39	100.8	**< 0.001**
	Infection : Cadmium	2	2.46	33.6	**< 0.001**
GCL	Infection status	1	0.002	0.56	0.49
	Cadmium exposure	2	0.144	46.84	**< 0.001**
	Infection : Cadmium	2	0.02	6.38	**0.005**
MT	Infection status	1	0.063	0.616	0.439
	Cadmium exposure	2	8.3	80.71	**< 0.001**
	Infection : Cadmium	2	0.31	3.08	**0.063**
Carotenoïd	Infection status	1	9.11	7.33	**0.011**
	Cadmium exposure	2	97.47	78.39	**< 0.001**
	Infection : Cadmium	2	5.07	4.07	**0.02**
MDA	Infection status	1	1.94	11.31	**< 0.001**
	Cadmium exposure	2	7.75	45.25	**< 0.001**
	Infection : Cadmium	2	1.95	11.39	**< 0.001**

3.2. Effects of P. minutus in G. roeseli exposed to cadmium

3.2.1. Toxicity biomarker

MDA levels increased in uninfected and in *P. minutus*-infected females exposed to cadmium as compared to the respective controls (Figure 1). In uninfected females, MDA levels were 1.5-fold higher at 8 µg $Cd.L^{-1}$, while only a limited increase was observed at 2 µg $Cd.L^{-1}$. In *P. minutus*-infected females, MDA levels increased according to a dose-response relationship. Indeed, they were 1.8- and 2.6-fold higher in infected females exposed to 2 and 8 µg $Cd.L^{-1}$, respectively, as compared to infected controls. Infection by *P. minutus* was therefore linked to higher MDA levels in the case of cadmium exposure, especially at 8 µg $Cd.L^{-1}$.

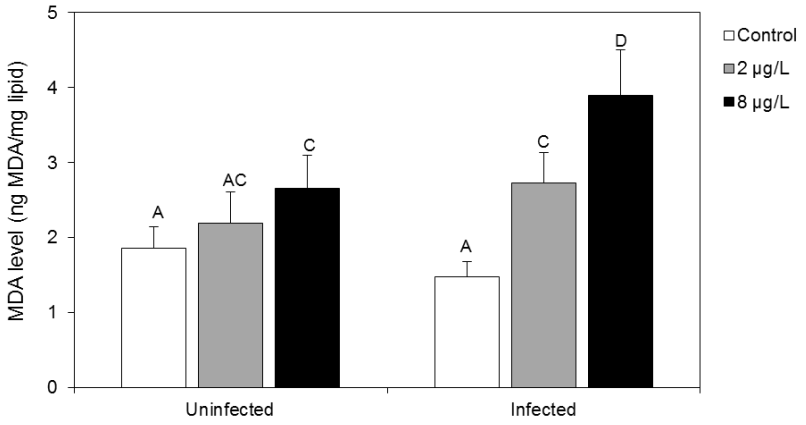


Figure 1. Influence of the presence of Polymorphus minutus on malondialdehyde levels of G. roeseli females exposed at 2 and 8 µg Cd/L for 96hrs. *Errors bars represent mean ± SE. Different letters above the bars indicate significantly different values (Tukey's HSD test, p-values < 0.05).*

3.2.2. Defence capacities

GSH concentrations increased in both infection statuses (Figure 2A). In uninfected females, GSH concentrations significantly increased with cadmium exposure, but no significant difference was observed between the two cadmium concentrations. However, a dose-response relationship was observed in infected females. GSH concentrations were 1.3 and 2-fold higher when infected gammarids were exposed to 2 and 8 µg $Cd.L^{-1}$, respectively, as compared to unexposed ones.

GCL responses were also influenced by the presence of *P. minutus* (Figure 2B). Indeed, in uninfected females, GCL activity increased according to a dose-response relationship. The activity was 1.7- and 2.3-fold higher with the lowest and the highest

cadmium concentrations, respectively. In *P. minutus*-infected females, a significant increase was only observed at 8 µg $Cd.L^{-1}$, when GCL activity increased 1.6-fold.

MT concentrations in exposed gammarids did not significantly differ between uninfected and infected females (Figure 2C). Whatever the infection status, a dose-response relationship was observed. In uninfected females, MT concentrations were 1.2- and 1.6-fold higher with 2 and 8 µg $Cd.L^{-1}$, respectively; while in infected females, they were 1.5- and 2-fold higher in the same conditions.

Carotenoïd levels decreased in uninfected females according to a dose-response relationship (Figure 2D). In fact, at 2 µg $Cd.L^{-1}$, carotenoïd concentration was 1.2-fold lower, while at 8 µg $Cd.L^{-1}$, it was 1.5-fold lower. In infected females, whatever the cadmium exposure, carotenoïd concentrations were 1.2-fold lower.

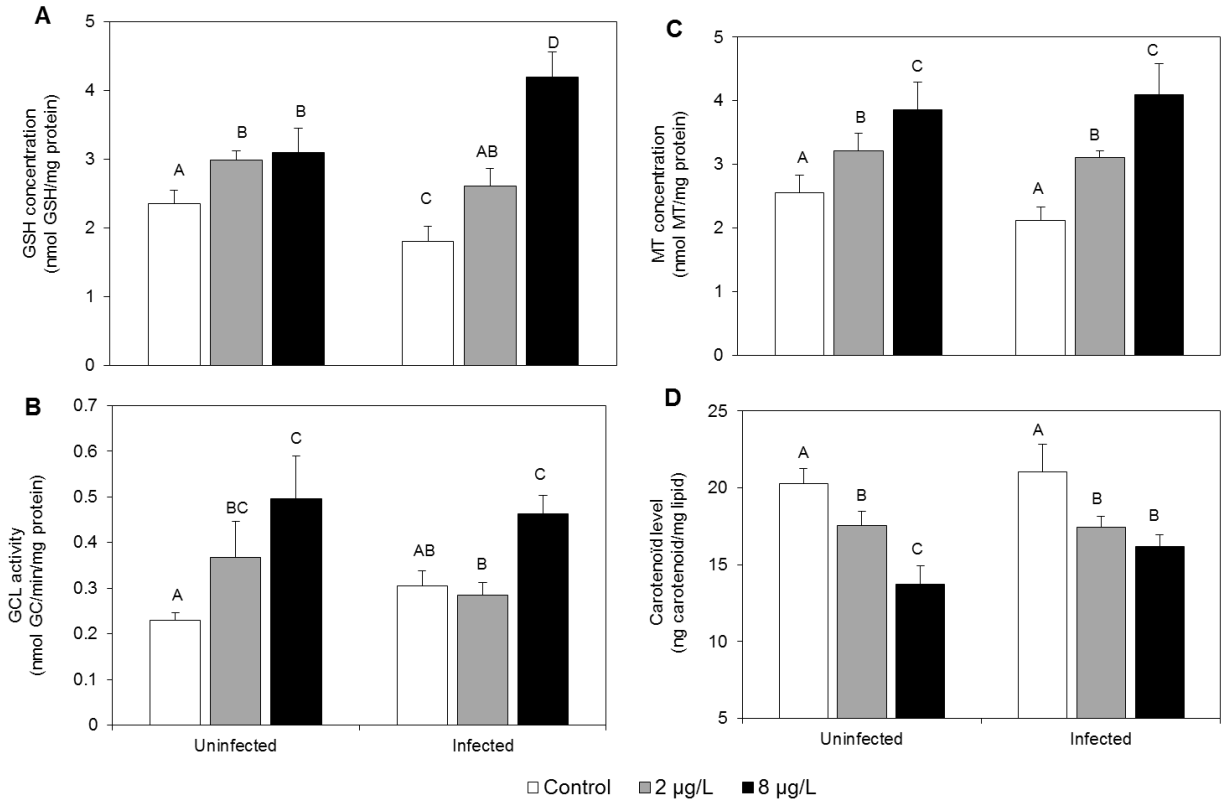


Figure 2. Influence of the presence of Polymorphus minutus on GSH concentrations (A), GCL activity (B), MT concentrations (C) and carotenoïd levels of G. roeseli females exposed at 2 µg Cd/L and 8 µg Cd/L for 96hrs. Errors bars represent mean ± SE*. Different letters above the bars indicate significantly different values (Tukey's HSD test, p-values < 0.05).*

3.2.3. Energy reserves

Energy reserves measurements were influenced upon by the presence of *P. minutus* (Figure 3). Uninfected females showed a significant decrease in total lipid contents whatever the cadmium exposure (Figure 3A). In fact, lipid contents were 1.3- and 1.9-fold lower at 2

and 8 µg $Cd.L^{-1}$ respectively. In infected females, lipid contents were also lower but no significant difference was observed between the two cadmium concentrations, as total lipid contents were 1.8-fold lower at 2 and 8 µg $Cd.L^{-1}$.

The glycogen contents of uninfected and *P. minutus*-infected females were decreased following the same pattern, whatever the cadmium exposure (Figure 3B). Indeed, at the two cadmium concentrations, glycogen contents were 1.3-fold lower in uninfected females, while they were 1.7-fold lower in infected ones.

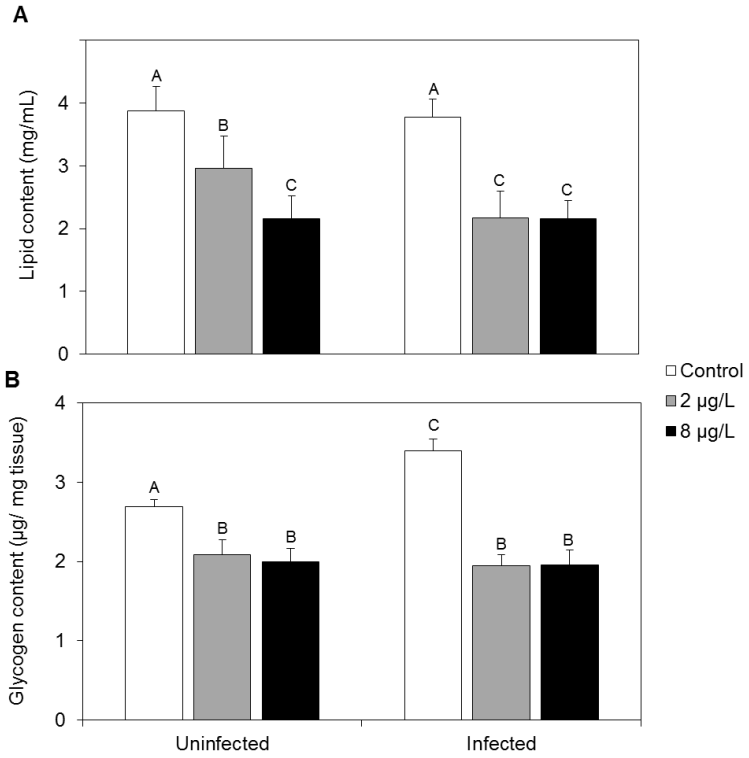


Figure 3. Influence of the presence of Polymorphus minutus on the total lipid (A) and glycogen (B) contents of Gammarus roeseli females exposed at 2 µg Cd/L and 8 µg Cd/L for 96hrs. Errors bars represent mean ± SE*. Different letters above the bars indicate significantly different values (Tukey's HSD test, p-values < 0.05).*

3.3. Effect of cadmium on P. minutus biomarkers

Global MANOVA analysis revealed an effect of infection status, cadmium exposure, and their interactions on biomarker levels (*p*-value < 0.001). The ANOVAs tests were presented in table 3.

Table 3. Univariate analyses of variance (ANOVA) investigating variations in lipid contents, carotenoid concentrations and MDA levels in P. minutus according to cadmium exposure.

	Df	Mean square	F	*p*-value
Lipid	2	0.454	75.38	< 0.001
Carotenoid	2	5.25	22.42	< 0.001
MDA	2	0.001	109.44	< 0.001

Lipid contents, carotenoïd and MDA levels were also measured directly in *P. minutus*. The results are presented in figure 4.

Lipid contents in the parasite also decreased according to a dose-response relationship (Figure 4A). In fact, lipid contents were 1.3- and 1.6-fold lower at 2 and 8 µg $Cd.L^{-1}$, respectively. In parallel, carotenoïd concentrations were measured and the results revealed a significant decrease only at 2 µg $Cd.L^{-1}$ (Figure 4B).

MDA levels were 1.9- and 1.4-fold higher in *P. minutus* exposed at 2 and 8 µg $Cd.L^{-1}$, respectively (Figure 4C).

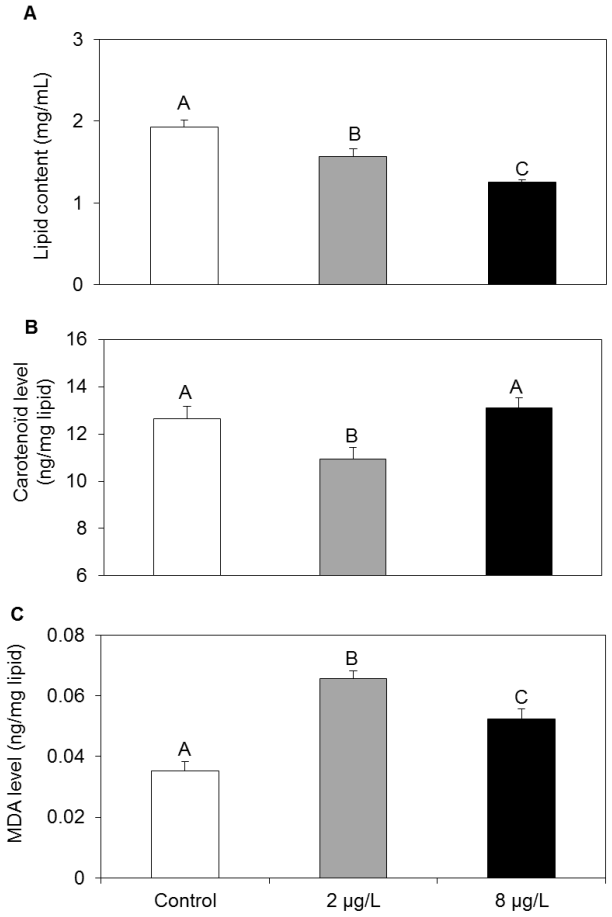


Figure 4. Lipid contents (A), carotenoïd (B) and MDA (C) levels in P. minutus dissected from G. roeseli exposed at 2 and 8 µg Cd/L for 96hrs. *Errors bars represent mean ± SE. Different letters above the bars indicate significantly different values (Tukey's HSD test, p-values < 0.05).*

4. DISCUSSION

This present work was carried out to investigate the influence of acanthocephalan cystacanth on the antitoxic defences and energy reserves of their intermediate host *G. roeseli* in an environmentally relevant cadmium exposure. Indeed, although macroparasites have already been shown to decrease significantly heavy metal accumulation in their hosts

[8,42,43], the influence of these parasites on antitoxic responses had remained quite overlooked so far.

4.1. P. minutus effects in absence of cadmium stress

In the absence of cadmium stress (white bars in figures 1 to 3), *P. minutus* influenced on *G. roeseli* biomarkers following different patterns. MDA levels were lower in infected-females than uninfected ones. This result is in accordance with one of our previous studies which showed a tendency towards lower MDA levels in *P. minutus*-infected gammarids [25]. This reflects lower cell damage, probably due to host protection by the parasite whose survival depends on its host's survival. However, this result is contradictory to the variations observed in defence capacities, especially GSH and MT concentrations which were lower in infected females than in uninfected ones, when gammarids were not exposed to stress. Indeed, weaker antitoxic defence capacities could allow us to predict that gammarid sensitivity should increase in contaminated environments. Other investigations have also shown lower MT and GSH concentrations in infected individuals [25,44,45], as well as lower immunity parameters (i.e. prophenoloxidase activity - [26]). Carotenoïd concentrations were not impacted by the presence of *P. minutus* although they are used by *P. minutus* for its own development [35,46]. This result was not expected as (i) carotenoïds are synthesized neither by the parasite nor by the host, and (ii) the characteristic colour of the cystacanth stage is based on an accumulation of carotenoïds coming from its host.

P. minutus cystacanths influenced on the energy reserves of their hosts by increasing glycogen contents and decreasing (or tending to decrease in this study) lipid contents. These results are in accordance with those obtained in one of our previous studies [25] and also with those of Plaistow et al. [7]. Lipid depletion could be explained by the fact that parasites draw out energy for their own development from their host [47]. However, glycogen increases could be linked to gammarid immobility as a consequence of parasite infection that makes the host-parasite system more vulnerable to final host predation [20,48].

4.2. Influence of P. minutus on G. roeseli antitoxic responses under cadmium stress

Although, a possible protective effect of *P. minutus* on *G. roeseli* was observed in the absence of stress, the results obtained under cadmium stress highlighted higher cell damage in infected females as compared to uninfected ones. Indeed, whatever the infection status, cadmium exposure induced lipoperoxidation (i.e. increased MDA levels), but cell damage

was higher in the presence of the parasite. This result is in agreement with those obtained when *G. roeseli* were infected by microsporidia parasites [5] and could be explained by a disruption of the antitoxic defence responses.

Thus, the antitoxic responses of infected females were different from those of uninfected ones. MT concentrations, whose synthesis is known to be induced by several metals including cadmium [49], increased significantly according to a dose-response relationship in *P. minutus*-infected females as compared to uninfected ones. We can hypothesize that *P. minutus* could influence on the transcription of the metallothionein gene to provide higher concentrations in its host than in uninfected individuals, and cope with cadmium stress. However, our result is in contradiction with those of Baudrimont et al. [50] who showed lower metallothionein concentrations in digenean-infected cockles exposed to cadmium as compared to uninfected ones, and of Paul-Pont et al. [45] who highlighted lower MT concentrations in the bivalve *Ruditapes philippinarum* infected by the trematode *Himasthla elongate* and/or the bacterium *Vibrio tapetis* and exposed to cadmium. In these two studies, the results were explained by the fact that other efficient intracellular metal ligands such as glutathione could interfere with cadmium sequestration process [51]. Our results showed that glutathione concentrations also increased according to a dose-response relationship in infected females as compared to uninfected ones. The highest GSH concentration we measured was obtained with the highest Cd exposure in infected individuals. This increase observed in infected females could be linked to the increase in GCL activity at the highest cadmium concentration. In uninfected females, the relatively low GSH concentration at the highest cadmium exposure while GCL activity increased could result from the fact that glutathione could be directly used as a metal scavenger as well as a substrate for antioxidant enzymes [52]. We can thus hypothesize that *P. minutus* could influence on the activity of these antioxidant enzymes, which could lead to less glutathione being used and thus a weaker decrease in GSH concentration.

The important increase in GSH and MT concentrations could also be linked to the fact that carotenoid concentration decreased less in infected females as compared to the uninfected ones, according to a dose-response relationship. Indeed, no difference was observed in carotenoïd concentrations between the lowest and the highest cadmium exposures in infected females. This could be explained by the fact that *P. minutus* needs carotenoïds for its own metabolism [46]; therefore, it could reduce carotenoïd use by *G. roeseli* by drawing them from its host, and hence maintain a sufficient stock for itself. Indeed, in gammarids, this carotenoïd stock cannot be completed because gammarids cannot

synthesize carotenoïds and must get them from food [53]; however, in our study, gammarids were not fed during cadmium exposure.

All antitoxic defence capacities involve an energy cost for the organism; however, in infected individuals, energy could be reallocated by the parasite to its own metabolism [7]. Our results highlighted a strong decreased in lipid and glycogen contents starting from the lowest cadmium exposure in infected females, whereas in uninfected females, these parameters decrease according to a dose-response relationship. On the one hand, these decreases could be explained by an energy mobilization by *G. roeseli* to cope with cadmium stress as already observed in several ecotoxicological investigations [5,52,54,55]. However, on the other hand, the strong decreases observed in infected females could also be linked to the fact that the parasite diverts energy from its host not only for its own development, but also for its own defence system. In a previous study, we observed that *P. minutus* located within the *G. roeseli* hemocoel accumulated cadmium [11], which could explain the higher cell damage measured in cadmium-exposed *P. minutus* than in controls. If the parasite accumulates cadmium, we hypothesize that it can also detoxify it. The carotenoïd depletions observed in this work in *P. minutus* at the lowest cadmium exposure could support this hypothesis as they are antioxidant compounds [32], possibly linked in to a detoxification process. As in *G. roeseli*, total lipid contents in *P. minutus* decreased in a dose-response relationship; this observation is consistent with a potential lipid mobilization to provide energy to detoxification process. This hypothesis is supported by the fact that Sures and Radszuweit [8] described an induction of the Hsp70 defence protein in *P. minutus* exposed to thermal disturbance.

5. CONCLUSION

This study highlights the influence of the *P. minutus* cystacanth on the antitoxic defence capacities and the energy reserves of its intermediate host *G. roeseli* in cadmium stress conditions. The results revealed that *P. minutus* could increase the use of some antitoxic defences (GSH and MT), whereas others (carotenoïds) necessary for its own metabolism were maintained. However, the fact that *G. roeseli* did not use all these antitoxic defences could explain the toxicity increase reflected by higher MDA levels. To our knowledge, this is the first study that shows a toxic effect of cadmium in *P. minutus* cystacanths; probably linked to cadmium absorption by the parasite [11]. The hypothesis of a detoxification system in *P. minutus* remains to be tested.

***Acknowledgments**: This study was supported by the French Ministry of Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche), which sincerely thank here. The present work is part of the research program EC2CO (ECosphère COntinentale et CÔtière). We are grateful to Annie Buchwalter for improving the English text and we wish to thank the three anonymous reviewers for their helpful comments on a previous draft of this paper.*

REFERENCES

1. Minguez L, Meyer A, Molloy DP, Giambérini L (2009) Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (Dreissena polymorpha): Importance in ecotoxicological studies. Environ Res 109: 843–850. DOI: 10.1016/j.envres.2009.07.012.

2. Minguez L, Boiché A, Sroda S, Mastitsky S, Brulé N, et al. (2011) Cross-effects of nickel contamination and parasitism on zebra mussel physiology. Ecotoxicology. Available:http://www.springerlink.com.gate1.inist.fr/content/13q6447701874j23/. Accessed 22 November 2011.

3. Sures B, Scheef G, Klar B, Kloas W, Taraschewski H (2002) Interaction between cadmium exposure and infection with the intestinal parasite *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala) on the stress hormone levels in rats. Environ Pollut 119: 333–340. DOI: 10.1016/S0269-7491(01)00340-2.

4. Sures B (2004) Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. Trends in Parasitology 20: 170–177. doi:10.1016/j.pt.2004.01.014.

5. Gismondi E, Rigaud T, Beisel J-N, Cossu-Leguille C (2012) Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a gammarid. Environ Pollut 160: 17–23. DOI:10.1016/j.envpol.2011.09.021.

6. Sures B, Thielen F, Baska F, Messerschmidt J, von Bohlen A (2005) The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* as a sensitive accumulation indicator for the platinum group metals Pt, Pd, and Rh. Environ Res 98: 83–88. DOI: 10.1016/j.envres.2004.05.010.

7. Plaistow SJ, Troussard J-P, Cézilly F (2001) The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. Int J Parasitol 31: 346–351. DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00115-1.

8. Sures B, Radszuweit H (2007) Pollution-induced heat shock protein expression in the amphipod *Gammarus roeseli* is affected by larvae of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). J Helminthol 81: 191–197. DOI:10.1017/S0022149X07751465.

9. Rigaud T, Moret Y (2003) Differential phenoloxidase activity between native and invasive Gammarids infected by local acanthocephalans: Differential immunosuppression? Parasitology 127: 571–577. DOI:10.1017/S0031182003004050.

10. Sures B, Siddall R, Taraschewski H (1999) Parasites as accumulation indicators of heavy metal pollution. Parasitology Today 15: 16–21. DOI: 10.1016/S0169-4758(98)01358-1.

11. Gismondi E, Cossu-Leguille C, Beisel J-N Acanthocephalan parasites: help or burden in Gammarid amphipods exposed to cadmium? Ecotoxicology. In press.

12. Marcogliese DJ, Brambilla LG, Gagn F, Gendron AD (2005) Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch *Perca flavescens*. Dis Aquat Org 63: 77–84. DOI:10.3354/dao063077.

13. Forrow DM, Maltby L (2000) Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. Environ Toxicol Chem 19: 2100–2106. DOI:10.1002/etc.5620190820.

14. Thomas F, Guldner E, Renaud F (2000) Differential parasite (Trematoda) encapsulation in *Gammarus aequicauda* (Amphipoda). J Parasitol 86: 650–654. DOI: 10.1645/0022-3395(2000)086[0650:DPTEIG]2.0.CO;2.

15. Thomas F, Renaud F, Derothe JM, Lambert A, Meeüs T, et al. (2003) Assortative pairing in *Gammarus insensibilis* (Amphipoda) infected by a trematode parasite. Oecologia 104: 259–264–264. DOI:10.1007/BF00328591.

16. Haine ER, Brondani E, Hume KD, Perrot-Minnot M-J, Gaillard M, et al. (2004) Coexistence of three microsporidia parasites in populations of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli*: evidence for vertical transmission and positive effect on reproduction. Int J Parasitol 34: 1137–1146. DOI: 10.1016/j.ijpara.2004.06.006.

17. Haine ER, Motreuil S, Rigaud T (2007) Infection by a vertically-transmitted microsporidian parasite is associated with a female-biased sex ratio and survival advantage in the amphipod *Gammarus roeseli*. Parasitology 134: 1363–1367. DOI:10.1017/S0031182007002715.

18. Terry RS, Smith JE, Sharpe RG, Rigaud T, Littlewood DTJ, et al. (2004) Widespread vertical transmission and associated host sex–ratio distortion within the eukaryotic phylum Microspora. P Roy Soc Lond B Bio 271: 1783–1789. DOI:10.1098/rspb.2004.2793.

19. Bollache L, Rigaud T, Cézilly F (2002) Effects of two acanthocephalan parasites on the fecundity and pairing status of female *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). J Invertebr Pathol 79: 102–110. DOI: 10.1016/S0022-2011(02)00027-7.

20. Médoc V, Bollache L, Beisel J-N (2006) Host manipulation of a freshwater crustacean (*Gammarus roeseli*) by an acanthocephalan parasite (*Polymorphus minutus*) in a biological invasion context. Int J Parasitol 36: 1351–1358. DOI: 10.1016/j.ijpara.2006.07.001.

21. Médoc V, Beisel J-N (2009) Field evidence for non-host predator avoidance in a manipulated amphipod. Naturwissenschaften 96: 513–523. DOI:10.1007/s00114-008-0503-8.

22. Médoc V, Beisel J-N (2011) When trophically-transmitted parasites combine predation enhancement with predation suppression to optimize their transmission. Oikos 120: 1452–1458. DOI:10.1111/j.1600-0706.2011.19585.x.

23. Kennedy CR (2006) Ecology of the Acanthocephala. Cambridge Univ Pr. p. 249.

24. Lagrue C, Kaldonski N, Perrot-Minnot MJ, Motreuil S, Bollache L (2007) Modification of hosts' behavior by a parasite: field evidence for adaptive manipulation. Ecology 88: 2839–2847.

25. Gismondi E, Cossu-Leguille C, Beisel J-N Does the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* modify the energy reserves and antitoxic defences of its intermediate host *Gammarus roeseli*? Parasitology. In press.

26. Cornet S, Franceschi N, Bauer A, Rigaud T, Moret Y (2009) Immune depression induced by acanthocephalan parasites in their intermediate crustacean host: Consequences for the risk of super-infection and links with host behavioural manipulation. Int J Parasitol 39: 221–229. DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.06.007.

27. Vasseur P, Leguille C (2004) Defense systems of benthic invertebrates in response to environmental stressors. Environ Toxicol 19: 433–436. DOI:10.1002/tox.20024.

28. Roesijadi G (1992) Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Aquat Toxicol 22: 81–113. DOI:16/0166-445X(92)90026-J.

29. Bigot A, Minguez L, Giambérini L, Rodius F (2011) Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: Transcriptional and histochemical studies. Environ Toxicol 26: 623–632. DOI:10.1002/tox.20599.

30. Amiard J-C, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquat Toxicol 76: 160–202. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.08.015.

31. Gilchrist BM, Lee WL (1972) Carotenoid pigments and their possible role in reproduction in the sand crab, *Emerita analoga* (Stimpson, 1857). Comp Biochem Phys B 42: 263–294. DOI:10.1016/0305-0491(72)90273-8.

32. Palozza P, Krinsky NI (1992) Antioxidant effects of carotenoids in Vivo and in Vitro: An overview. Carotenoids Part A: Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation. Academic Press, Vol. Volume 213. pp. 403–420. Available:http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799213142K.

33. Sparkes TC, Keogh DP, Pary RA (1996) Energetic costs of mate guarding behavior in male stream-dwelling isopods. Oecologia 106: 166–171. DOI:10.1007/BF00328595.

34. 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. DOI:10.1111/j.1365-2427.1985.tb00215.x.

35. Gaillard M, Juillet C, Cézilly F, Perrot-Minnot M-J (2004) Carotenoids of two freshwater amphipod species (*Gammarus pulex* and *G. roeseli*) and their common acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus*. Comp Biochem Phys B 139: 129–136. DOI: 10.1016/j.cbpc.2004.07.001.

36. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

37. Leroy P, Nicolas A, Wellmann M, Michelet F, Oster T, et al. (1993) Evaluation of*o*-phthalaldehyde as bifunctional fluorogenic post-column reagent for glutathione in LC. Chromatographia 36: 130–134. DOI: 10.1007/BF02263849.

38. Parmentier C, Leroy P, Wellman M, Nicolas A (1998) Determination of cellular thiols and glutathione-related enzyme activities: versatility of high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetric detection. J Chromatogr B 719: 37–46. DOI: 10.1016/S0378-4347(98)00414-9.

39. Alhama J, Romero-Ruiz A, Lopez-Barea J (2006) Metallothionein quantification in clams by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization. J Chromatogr A 1107: 52–58. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.11.057.

40. Rauque CA, Semenas L (2009) Effects of two acanthocephalan species on the reproduction of *Hyalella patagonica* (Amphipoda, Hyalellidae) in an Andean Patagonian Lake (Argentina). J Invertebr Pathol 100: 35–39. DOI: 10.1016/j.jip.2008.10.001.

41. Behrens W, Madère R (1991) Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography. Lipids 26: 232–236. DOI:10.1007/BF02543977.

42. Siddall R, Sures B (1998) Uptake of lead by *Pomphorhynchus laevis* cystacanths in *Gammarus pulex* and immature worms in chub (*Leuciscus cephalus*). Parasitol Res 84: 573–577. DOI:10.1007/s004360050451.

43. Sures B, Taraschewski H (1995) Cadmium concentrations in two adult acanthocephalans, *Pomphorhynchus laevis* and *Acanthocephalus lucii*, as compared with their fish hosts and cadmium and lead levels in larvae of *A. lucii* as compared with their crustacean host. Parasitol Res 81: 494–497. DOI:10.1007/BF00931792.

44. Paul-Pont I, Gonzalez P, Baudrimont M, Jude F, Raymond N, et al. (2010) Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the marine bivalve *Cerastoderma edule*. Mar Pollut Bull 60: 515–525. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2009.11.013.

45. Paul-Pont I, de Montaudouin X, Gonzalez P, Jude F, Raymond N, et al. (2010) Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve *Ruditapes philippinarum* in European populations. Environ Pollut 158: 3401–3410. DOI:10.1016/j.envpol.2010.07.028.

46. Barrett J, Butterworth PE (1968) The carotenoids of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala) and its intermediate host, *Gammarus pulex*. Comp Biochem Phys 27: 575–581. DOI:10.1016/0010-406X(68)90254-5.

47. Taraschewski H (2000) Host-parasite interactions in Acanthocephala: A morphological approach. Adv Parasit 46: 1–179. DOI:10.1016/S0065-308X(00)46008-2.

48. Cézilly F, Perrot-Minnot M-J (2005) Studying adaptive changes in the behaviour of infected hosts: a long and winding road. Behav Process 68: 223–228. DOI: 10.1016/j.beproc.2004.08.013.

49. Stillman MJ (1995) Metallothioneins. Coordination chemistry reviews 144: 461–511. DOI:10.1016/0010-8545(95)01173-M.

50. Baudrimont M, de Montaudouin X, Palvadeau A (2006) Impact of digenean parasite infection on metallothionein synthesis by the cockle (*Cerastoderma edule*): A multivariate field monitoring. Mar Pollut Bull 52: 494–502. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2005.09.035.

51. Langston WJ (1998) Metal metabolism in aquatic environments. CRC Press. p.

52. Sroda S, Cossu-Leguille C (2011) Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor? Ecotoxicology 20: 264–273. DOI:10.1007/s10646-010-0578-9.

53. Nègre-Sadargues G, Castillo R, Segonzac M (2000) Carotenoid pigments and trophic behaviour of deep-sea shrimps (Crustacea, Decapoda, Alvinocarididae) from a hydrothermal area of the Mid-Atlantic Ridge. Comp Biochem Phys A 127: 293–300. DOI: 10.1016/S1095-6433(00)00258-0.

54. Lee WY, Macko SA, Nicol JAC (1981) Changes in nesting behavior and lipid content of a marine amphipod (*Amphithoe valida*) to the toxicity of a no. 2 fuel oil. Water, Air, & Soil Pollution 15: 185–195. DOI:10.1007/BF00161252.

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. DOI: 10.1016/j.cca.2005.01.013.

PARTIE II (suite)

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE LA PRESENCE DE PARASITE SUR DES BIOMARQUEURS DE *G. ROESELI*

~

LES MICROSPORIDIES A TRANSMISSION VERTICALE

Publication 5

Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a Gammarid

Acceptée dans Environmental Pollution

Nos travaux ont montré que *P. minutus*, macro-parasite du genre acanthocéphale, influençait les niveaux de base des capacités de défense et des réserves énergétiques de son hôte *G. roeseli*. Lors d'une exposition au cadmium, la présence de cet acanthocéphale modifiait la résistance de son hôte face au stress chimique ainsi que les capacités de défenses antitoxiques. Par ailleurs, nous avons pu démontrer que *P. minutus* absorbait du cadmium et mobilisait ses réserves énergétiques pour faire face au stress.

G. roeseli est un amphipode également parasité par des micro-parasites de type microsporidies à transmission verticale. Le but de cette étude a été d'évaluer l'influence de la présence de microsporidies à transmission verticale sur les capacités de défense et les réserves énergétiques de *G. roeseli* en absence de stress et lors d'une exposition au cadmium. Ces parasites étant localisés dans les gonades des amphipodes, la détermination de la présence de microsporidies a été réalisée par une technique de PCR-RFLP. Les différentes mesures des biomarqueurs ont été réalisées par HPLC et spectrophotométrie.

Dans un premier temps, un screening de la population de *G. roeseli* a été nécessaire pour déterminer quelles espèces de microsporidies à transmission verticale étaient présentes. Pour cela, des individus mâles et femelles ont été échantillonnés à chaque saison. Au laboratoire, les gonades ont été immédiatement retirées, puis analysées par PCR-RFLP après extraction de l'ADN.

Cette partie de l'étude a permis de déterminer que seules les femelles étaient parasitées par deux microsporidies à transmission verticale: *Dictyocoela roeselum* et *D.*

muelleri. Quelle que soit la saison, environ 50% des femelles étaient parasitées par des microsporidies: 70% par *D. roeselum* et 30% par *D. muelleri* (30%). Aucune co-infection n'a été observée. Par la suite, seules les femelles ont été utilisées pour l'étude.

Dans un second temps, une exposition des femelles à 3 conditions de cadmium (0 – 2 – 8 µg $Cd.L^{-1}$) pendant 96h a été réalisée afin d'appréhender l'effet de la présence de microsporidies lors d'une contamination.

Les résultats ont mis en évidence qu'en absence de stress (témoins), les microsporidies n'ont pas d'effets majeurs sur les biomarqueurs testés, tandis qu'après une exposition au cadmium, les réserves énergétiques étaient plus fortement diminuées et les capacités de défense davantage mobilisées par rapport aux femelles non-parasités. De plus, les forts taux de malondialdéhyde mesurés chez les femelles parasitées révélaient qu'elles avaient subi davantage de dommages cellulaires.

Notre étude a permis de souligner l'importance de prendre en compte la présence de microparasites tels que les microsporidies à transmission verticale dans les études écotoxicologiques utilisant les gammares comme modèle biologique. Premièrement, les microsporidies peuvent être un facteur de confusion puisqu'elles augmentent la sensibilité des femelles à un stress cadmié. Ces parasites induiraient un stress qui pourrait être compensé par le gammare en conditions physiologiques, mais pas en conditions de stress, pouvant aboutir ainsi à un phénomène de stress-on-stress. Deuxièmement, les microsporidies infectent environ 50% des femelles d'une population de G. roeseli et leur prévalence est variable selon la population (Haine et al., 2005). Par conséquent, comparer les réponses de deux populations de gammares sans tenir compte de la présence de microsporidies conduirait à des interprétations fausses.

Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a Gammarid.

Eric GISMONDI[a], Thierry RIGAUD[b], Jean-Nicolas BEISEL[a], Carole COSSU-LEGUILLE[a]

[a] Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie Biodiversité Ecosystèmes (LIEBE), Université Paul Verlaine – METZ, CNRS UMR 7146, Campus Bridoux, Avenue du général Delestraint, 57070 Metz, France.

[b] Equipe Ecologie Evolutive, UMR CNRS 5561, Biogeosciences, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21000 DIJON, France

Environmental Pollution, 2012, 160(1), 17-23

ABSTRACT

Microsporidia parasites are commonly found in amphipods, where they are often asymptomatic, vertically-transmitted and have several effects on host sexuality and behaviour. As amphipods are often used as models in ecotoxicological studies, we investigated the effect of microsporidian infections on energy reserves and defence capacities of *Gammarus roeseli* under cadmium stress. Only females were infected by two microsporidia parasites: *Dictyocoela roeselum* or *D. muelleri*. In physiological conditions, microsporidia had no major effect on energy reserves and defence capacities of *G. roeseli*, while under cadmium exposure, energy reserves and antioxidant defence were weaker in infected females. Moreover, higher malondialdehyde levels detected in infected females revealed that they suffered more cellular damages. Our results suggest that microsporidia may affect gammarid fitness in stressful conditions, when parasitic stress cannot be compensated by the host. Consequently, microsporidia parasites should be a factor necessary to take into account in ecotoxicology studies involving amphipods.

Keywords: *Gammarus roeseli*, microsporidian parasites, biomarkers, confounding factor, cadmium stress

1. INTRODUCTION

Numerous studies have highlighted the confounding effect of parasites on the physiology of infected freshwater hosts such as bivalves (Minguez et al., 2009), arthropods (McCahon et al., 1991; Pascoe et al., 1995; Sures et al., 2002; Prenter et al., 2004; Sures, 2004), or fish (Sures et al., 2005). Parasites can either disrupt the detoxification capacity of the hosts (Sures and Radszuweit, 2007) or, conversely, can help the host detoxify by accumulating heavy metals in their own tissues (review in Sures et al., 1999).

Gammarid amphipods are increasingly used in ecotoxicological studies in both freshwater and marine environments, due to their important ecological role in the trophic chain (Forrow and Maltby, 2000). Although several biomarkers have been developed in gammarids (Geffard et al., 2007; Timofeyev et al., 2006, 2008; Guerlet et al., 2008), most studies ignore the possible effect of the presence of parasites like micro-parasites belonging to the Microspora phylum, which infect several amphipods species (Terry et al., 2004).

Microsporidia are obligate intracellular parasites closely related to fungi (Mathis, 2000) but lacking mitochondria. They therefore take their energy from the host (Wittner and Weiss, 1999). Their life-cycle may use horizontal transmission (trophic transmission) and/or vertical transmission from mothers to offspring (Dunn and Smith, 2001). In gammarids, numerous microsporidia are transmitted vertically, and primarily infect ovaries and eggs (Terry et al., 2004). Different microsporidian species disrupt the normal sex differentiation in gammarids. They reverse genetic males into phenotypic functional females (Rodgers-Gray et al., 2004), which induces female-biased sex-ratios in host population (e.g. Haine et al., 2004). By increasing the number of females, vertically-transmitted microsporidia are able to maintain and spread within host populations (Bandi et al., 2001). Because they are asymptomatic and do not induce severe disease in their hosts, these microsporidia are "hidden" for observers and are often neglected during ecological or physiological studies about amphipods.

The aim of this study is to investigate if the presence of these vertically-transmitted microsporidia parasites could influence host responses to the stress induced by pollutants, therefore inducing variations in this response within the population, a phenomenon that would be a confounding factor in ecotoxicological studies. More precisely, we tested whether microsporidia could help the host to cope with stress, or conversely, if they increase the sensitivity of their hosts by causing a further weakening. The first hypothesis is based on the fact that vertically-transmitted microsporidia exhibit low virulence in amphipods (i.e. have a

low impact on host survival and fecundity, reviewed in Dunn and Smith, 2001), and may even show beneficial effects on breeding and survival, (Haine et al., 2004, 2007; Mautner et al., 2007). Theory predicts that vertically-transmitted parasites can evolve toward low virulence (Ebert and Herre, 1996), and can even develop traits favouring their host's fitness. A trait that helps the host cope with various stresses could therefore have been selected. Nevertheless, such mutualism would be surprising in microsporidia because they are far from being neutral to their host physiology. As stated before, they entirely depend on their host for energy. In addition, the propagation of microsporidian infection within the host relies on a traumatic process, i.e. spore germination. The polar filament of the spore pierces the host cell membrane and allows the injection of the sporoplasm into a new cell (Wittner and Weiss, 1999). These obvious costs could be lowered by host compensation in non-stressful environmental conditions, as in other host-parasite systems (e.g. Barber et al., 2008). However, in stressful conditions, the host may be unable to compensate for that cost and related symptoms could appear. That is the alternative hypothesis tested in the present study, the source of stress being exposure to pollutants.

Our hypotheses were tested in *Gammarus roeseli* a widespread amphipod which serves as an intermediate or final host for several parasites, microsporidia included. In addition to inducing sex ratio biases, three vertically-transmitted microsporidia species, namely *Nosema granulosis, Dictyocoela muelleri* and *Dictyocoela roeselum* can influence the life history traits of *G. roeseli* by favouring survival of the young and inducing an earlier breeding in the reproductive season, respectively (Haine et al., 2004, 2007). Their prevalence can reach 60% in females, but only 0 to 10% in males (Haine et al., 2004). *G. roeseli* populations therefore harbour a mix of infected and uninfected individuals, and infection among populations also varied (Haine et al., 2004). We first analysed the prevalence of microsporidia in a *G. roeseli* population. Then we determined, in laboratory conditions, the effects of these parasites on energy reserves and antitoxic defence capacities of the host under cadmium stress.

Antitoxic defences were assayed by measuring concentrations of reduced glutathione (GSH), a tripeptide that play an essential role in the detoxification system by scavenging organic or metallic xenobiotics thanks to its thiol group (Vasseur and Leguille, 2004), as well as concentrations of metallothioneins (MT) which are involved in binding metallic compounds and contribute to protecting tissues against oxidative damage (Roesijadi, 1992; Bigot et al., 2011). In parallel, the activity of γ-glutamylcysteine ligase (GCL, EC 6.3.2.2), the enzyme which limits the *de novo* synthesis of glutathione, and the level of

malondialdehyde (MDA), product of the lipoperoxidation considered as a biomarker of toxic effect, were also measured. Moreover, energy reserves were estimated by measuring protein concentrations as well as total lipid and glycogen contents. The levels of glycogen are representative of the energy available for current activities (Sparkes et al., 1996) whereas lipids are stored in fat bodies and are used during starvation or reproduction periods (Cargill et al., 1985).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Measurement of microsporidia prevalence in G. roeseli

Male and female *Gammarus roeseli* were collected using pond nets and artificial traps in the Nied River (Rémilly, North-eastern France, 49°00' N and 6°23'E) in April, July, October and December 2010. Gammarids were transferred to the laboratory in large containers filled with river water. The gonadal tissues of each gammarid were dissected and stored at -80°C awaiting DNA extraction.

After DNA extraction from the gonads, the infection status of each *G. roeseli* individual (i.e. presence or absence of microsporidia) was determined using a PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. DNA extraction and PCR reactions were conducted as described in Haine et al. (2004). The PCR products were digested by four restriction enzymes *VspI*, *Bst1107I*, *Esp3I* and *BglII*, following the manufacturer's instructions (MBI Fermentas) in order to identify four different microsporidia species potentially infecting *G. roeseli*: *Dictyocoela muelleri*, *D. roeselum*, *D. berillonum* and *Nosema granulosis*, respectively.

2.2. Sensitivity of G. roeseli to cadmium depending on the presence/absence of microsporidia

In a preliminary experiment, the cadmium concentration that caused the death of 50% *G. roeseli* females (lethal concentration 50, LC_{50}) within 96hrs was determined to be around 107 µg $Cd.L^{-1}$ at 15°C. The cadmium concentration in the French Nied River is 0.2 µg $Cd.L^{-1}$ and the maximum admissible cadmium concentration is 5µg$.L^{-1}$ (LADROME laboratory, Valence, France); therefore two environmentally relevant cadmium concentrations were chosen in between these 3 values for the experimental exposures: 0 (control), 2 and 8 µg$.L^{-1}$.

Exposure solutions were prepared using Elendt M4 modified solution with addition of 12 mg $Cd.L^{-1}$ stock solution.

2.2.1. Sample preparation

Non-gravid *G. roeseli* females were collected in summer 2010 as indicated above, acclimated for 5 days before being used for experimentation at 15°C in an Elendt M4 modified solution, and fed *ad libitum* with alder leaves.

Three replicates of 50 *G. roeseli* females each were exposed for 96hrs at 15°C at the three different cadmium conditions: 0 $\mu g.L^{-1}$ (control group), 2 $\mu g.L^{-1}$ (C1 group) and 8 $\mu g.L^{-1}$ (C2 group). After exposure, each gammarid was dissected to remove the gonads which were stored at -80°C awaiting DNA extraction. Microsporidia infection status (i.e. uninfected, infected by *D. roeselum* or *D. muelleri*) was determined using the PCR-RFLP method (see above). Assaying antitoxic defences is impossible to perform on individual gammarids, so a minimum number of six gammarids was necessary to have enough tissues to analyse. Therefore, for each exposure condition, three replicates of six individuals with the same microsporidian status were made to measure energy reserves and antitoxic defences as described below. The prevalence of *D. muelleri* was relatively low in this sampling, so we were unable to run metallothionein assays for this infection status.

Each replicate was homogenized with a manual Potter Elvejhem tissue grinder in 50 mM phosphate buffer KH_2PO_4/K_2HPO_4 (pH 7.6) supplemented with 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), and 1 mM L-serine-borate mixture as proteases inhibitors and 5 mM phenylglyoxal as a γ-glutamyl transpeptidase inhibitor. The homogenization buffer was adjusted at a volume two fold the wet weight of the sample pool (e.g. 400 µL of homogenization buffer for 200 mg of wet weight tissue). The homogenate was divided into five parts to measure the different parameters. For each replicate, two independent measures were made for each biomarker.

2.2.2. Biomarker measurement

2.2.2.1. Energy reserves

Measures of lipid and glycogen contents were adapted from Plaistow et al. (2001). Twenty microliters of 2% sodium sulphate (w/v) and 540 µL of chloroform/methanol 1:2 (v/v) were added to 40 µL of the total homogenate. After 1hr in ice, the samples were centrifuged at 3000 x *g* for 5 min at 4°C. The resulting supernatant was used to determine the lipid content and the pellet was used to measure the glycogen content. One hundred microliters of supernatant were transferred to clean culture tubes and placed in a dry bath at 95°C to evaporate the solvent. Then, 200 µL of 95% sulphuric acid were added and left for 10 min at 95°C. The different tubes were removed and cooled in ice, and then 4.8 mL of phosphovanillin reagent were added. After a 10-min reaction time, the optical density was measured at 535 nm using cholesterol as standard. The total lipid contents were expressed in $mg.mL^{-1}$. The pellet was dissolved in 400 µL of deionised water and 100 µL of sample were placed into clean culture tubes supplemented with 4.9 mL of Anthrone reagent, boiled in a dry bath at 95°C for 17 min, and cooled in ice. Then, the optical density was measured at 625 nm using glucose as a standard. Glycogen concentrations were expressed in $µg.mg^{-1}$ tissue.

The total protein content of each sample was quantified as described in Bradford (1976) with bovine serum albumin (BSA) as a standard. The results were expressed in $mg.mL^{-1}$.

2.2.2.2. Antitoxic defences capacities

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

The γ-glutamylcysteine ligase (GCL) activity was assayed using an HPLC method adapted from Parmentier et al. (1998). Measurements were carried out on the S12000 fraction obtained after centrifuging 40 µL of the total homogenate for 15 min at 500 x *g* and then centrifuging the resulting supernatant at 12000 x g and 4°C for 30 min. A forty-fold dilution of the S12000 supernatant was prepared in 100 mM HCl and forty microliters of this diluted

solution were added to 112 µL of incubation cocktail (0.5 M Tris HCl, 200 mM $MgCl_2$ $6H_2O$, 500 mM KCl, 45 mM glutamic acid, 90 mM cystein, 1mM DTT, 90 mM ATP, 0.5 mM phenylglyoxal, pH 8.25) in a 1.5 mL tube to initiate the reaction. The mixture was incubated for 20 min in a water bath at 25°C and the reaction was stopped by a four-fold dilution with 0.1 M HCl. Commercial glutamylcysteine (GC) solution prepared in 0.1 M HCl was used as a standard and GCL activity was expressed in nmol $GC.min^{-1}.mg^{-1}$protein.

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

2.2.2.3. Biomarker of toxic effect

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

2.3. Statistical analysis

Our data were analysed by using a multivariate analysis of variance (MANOVA, Pillai's trace) with respect to "infection status" and "cadmium concentration" as fixed factors. Since the MANOVA test was significant, each biomarker was then analysed using ANOVA tests, followed by TukeyHSD post-hoc tests.

The tests were performed using R 2.9.0 and JMP v5.0 (SAS Institute, Cary, USA) and were two-tailed with significant differences considered at the level of $P \leq 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Microsporidia species and prevalence in G. roeseli

Two microsporidia species, *Dictyocoela muelleri* and *Dictyocoela roeselum* were identified using PCR-RFLP method (Table 1).

Whatever the season, only females were infected by microsporidia. In spring, the proportion of infected *G. roeseli* females was the highest (77.7%). In the others seasons, the proportion was about 40% (Likelihood-Ratio $\chi 2 = 34.74$, 3 d.f., $P < 0.0001$). The most abundant microsporidia species found in females was *D. roeselum*, which averaged 70% of infected females whatever the season. No female was found co-infected by both parasite species.

3.2. Effects of microsporidia without cadmium exposure

As shown in the figures and the post-hoc tests, the infection by microsporidia rarely had an effect on the tested biomarkers (see the control groups only in Figures 1 to 3). Only the glycogen content was higher in gammarid females infected by *D. roeselum* (Figure 3c).

3.3. Microsporidian effect in G. roeseli after cadmium exposures

Global MANOVA analysis revealed an effect of cadmium exposure, parasite infection, and their interactions on biomarker levels (Table 2). The results are described below in detail for each biomarker below.

3.3.1. Toxic effect biomarker

MDA levels, used as a toxicity biomarker, were much higher in females exposed to cadmium compared to unexposed controls, whatever the infection status (Table 2, Fig. 1). However, the infection by microsporidia parasites also influenced MDA levels significantly, and in interaction with cadmium exposure (Table 2). In uninfected females, the higher the cadmium concentration, the higher the MDA level. Indeed, it increased two-fold at 2 µg $Cd.L^{-1}$ and threefold at 8 µg $Cd.L^{-1}$ compared to the control.

Table 1. Table of microsporidia prevalence according to the season and to G. roeseli gender

	G. roeseli* genders *(N)	**Infected (*N*)**	**Microsporidia species**	**Prevalence (*N*)**
Spring	Females *(166)*	77.7% *(129)*	*Dictyocoela roeselum*	67.4% *(87)*
			Dictyocoela muelleri	32.6% *(42)*
	Males *(30)*	0% *(0)*	-	-
Summer	Females *(124)*	41.9% *(52)*	*Dictyocoela roeselum*	73.1% *(38)*
			Dictyocoela muelleri	26.9% *(14)*
	Males *(34)*	0% *(0)*	-	-
Autumn	Females *(95)*	40% *(38)*	*Dictyocoela roeselum*	65.8% *(25)*
			Dictyocoela muelleri	34.2% *(13)*
	Males *(20)*	0% *(0)*	-	-
Winter	Females *(102)*	45% *(46)*	*Dictyocoela roeselum*	67.4% *(31)*
			Dictyocoela muelleri	32.6% *(15)*
	Males *(26)*	0% *(0)*	-	-

N: number of individuals

Table 2. Multivariate (Pillai's trace) and univariate analyses of variance investigating variations in biomarkers for toxicity (MDA), defence capacity (GSH, GCL) and energy reserves (protein, lipid, glycogen) of Gammarus roeseli, according to the infection by microsporidian parasites, and cadmium contamination.

Models	**Parameter**	**Source of variation**	***num d.f.*[a], *den d.f.*[b]**	**F**	***P***
MANOVA		Whole model	48, 108	5.98	**<0.0001** [c]
		Infection status	12, 28	5.46	**0.0001**
		Cadmium exposure	12, 28	12.28	**<0.0001**
		Infection : Cadmium	24, 64	4.75	**<0.0001**
ANOVAs	MDA	Whole model	8, 18	68.80	**<0.0001**
		Infection status	2, 18	3.12	**<0.0001**
		Cadmium exposure	2, 18	257.22	**<0.0001**
		Infection : Cadmium	4, 18	7.43	**0.0010**
	GSH	Whole model	8, 18	11.00	**<0.0001**
		Infection status	2, 18	18.89	**<0.0001**
		Cadmium exposure	2, 18	3.16	0.0666
		Infection : Cadmium	4, 18	10.98	**0.0001**
	GCL	Whole model	8, 18	7.82	**0.0002**
		Infection status	2, 18	4.32	**0.0294**
		Cadmium exposure	2, 18	16.25	**<0.0001**
		Infection : Cadmium	4, 18	5.35	**0.0051**
	Proteins	Whole model	8, 18	3.66	**0.0105**
		Infection status	2, 18	0.38	0.6882
		Cadmium exposure	2, 18	8.63	**0.0024**
		Infection : Cadmium	4, 18	2.83	0.0556
	Total lipids	Whole model	8, 18	16.05	**<0.0001**
		Infection status	2, 18	4.87	**0.0204**
		Cadmium exposure	2, 18	33.59	**<0.0001**
		Infection : Cadmium	4, 18	12.88	**<0.0001**
	Glycogen	Whole model	8, 18	9.85	**<0.0001**
		Infection status	2, 18	0.37	0.6935
		Cadmium exposure	2, 18	18.25	**<0.0001**
		Infection : Cadmium	4, 18	10.38	**0.0002**

[a] Numerator degrees of freedom.

[b] Denominator degrees of freedom

[c] Significant values shown in bold

This dose-response relationship was not found in infected females, in which the MDA level already showed a threefold increase at the lowest cadmium concentration (Fig. 1). Microsporidian infection was therefore linked with a higher MDA level, only in the case of cadmium exposure.

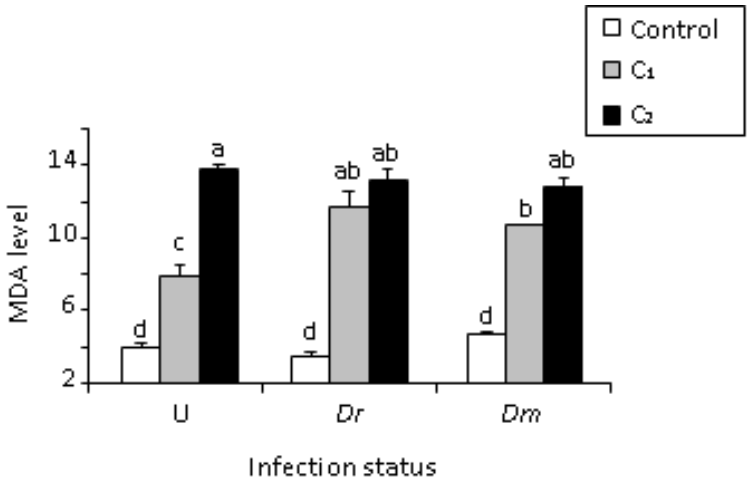


Fig. 1. Influence of the presence of microsporidia parasite on the malondialdehyde level (ng MDA/mg lipids) of G. roeseli females exposed to $CdCl_2$ during 96h. *U: uninfected, Dr: Dictyocoela roeselum-infected females, Dm: Dictyocoela muelleri-infected females, C_1: 2 µg $Cd.L^{-1}$, C_2: 8 µg $Cd.L^{-1}$. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, p-values <0.05).*

3.3.2. Defence capacities

GSH concentrations and GCL activity were significantly influenced by the interaction between the infection status and cadmium contamination (Table 2). In uninfected females, GSH concentration increased after exposure to the lowest cadmium dose (2 µg $Cd.L^{-1}$) compared to unexposed control females, but remained unchanged after exposure to our highest cadmium dose (8 µg $Cd.L^{-1}$) (Fig. 2a). However, when females were infected by *D. roeselum* or *D. muelleri*, no significant change in GSH concentration was observed after cadmium exposure (Fig. 2a).

The pattern of change in GCL activity was similar to the one observed for GSH in uninfected females: it showed an increase at the lowest cadmium exposure (Fig. 2b). No major significant difference was observed in GCL activity in *D. roeselum*-infected females. Contrastingly, females infected by *D. muelleri* showed a significantly increased GCL activity after cadmium exposure, whatever the cadmium concentration (Fig. 2b).

Metallothionein concentrations were only measured in uninfected and *D. roeselum*-infected females due to the lack of females infected by *D. muelleri*. Univariate analysis of variance (ANOVA) highlighted that the variation in MT concentration was influenced by the interaction between microsporidia presence and cadmium exposure (Table 3). In uninfected

females, MT showed a significant increase at the two cadmium concentrations, whereas in *D. roeselum*-infected females, a significant increase was observed at 2 µg $Cd.L^{-1}$ and a significant decrease at 8 µg $Cd.L^{-1}$ (Fig. 2c).

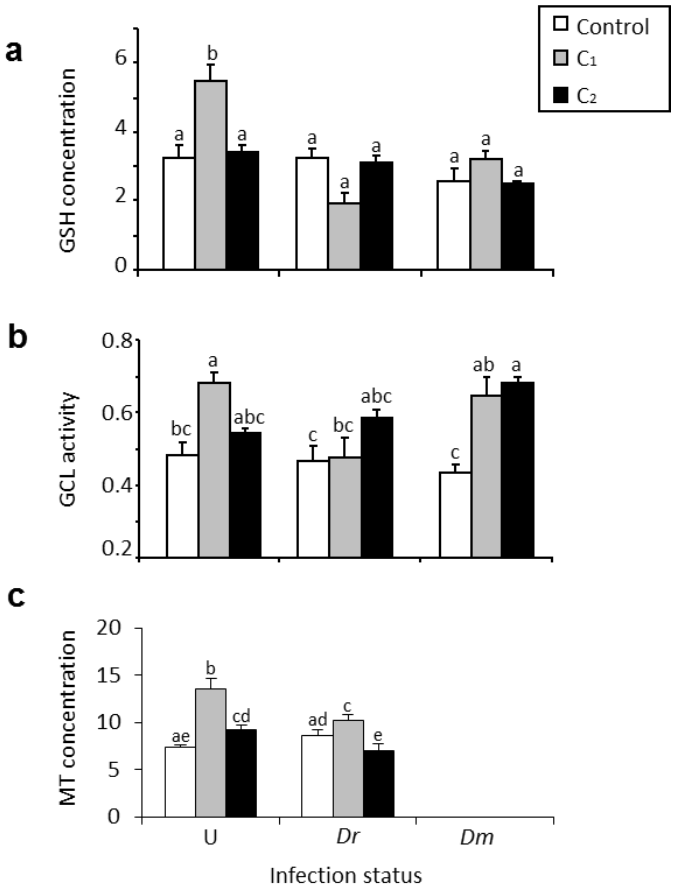


Fig. 2. Influence of the presence of microsporidia parasite on reduced glutathione concentration (nmol GSH/mg protein) (a), γ-glutamylcysteine ligase activity (nmol GC/min/mg protein) (b) and metallothionein concentration (nmol MT/mg protein) (c) of Gammarus roeseli females exposed to $CdCl_2$ during 96h. *U: uninfected, Dr: Dictyocoela roeselum-infected females, Dm: Dictyocoela muelleri-infected females, C_1: 2 µg $Cd.L^{-1}$, C_2: 8 µg $Cd.L^{-1}$. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, p-values < 0.05).*

Table 3. Univariate analysis of variance investigating variations in MT concentration in Gammarus roeseli, according to the infection by microsporidian parasites, and cadmium contamination.

Source of variation	Sum of squares	d.f.	F	*P*
Infection status	15.05	1	30.00	**<0.0001**
Cadmium exposure	97.54	2	97.18	**<0.0001**
Infection x Cadmium	28.48	2	28.37	**<0.0001**

Significant values shown in bold

3.3.3. *Energy reserves*

Proteins, lipids and glycogen levels were significantly influenced by the interaction between the infection status and cadmium exposure (Table 2). However the significance was marginal for proteins. Protein concentrations remained globally unchanged after cadmium exposure; except for *D. muelleri*-infected females which appeared to have a lower protein concentration after exposure compared to their respective control (Fig. 3a).

Uninfected females showed a significant decrease in total lipid contents only after the highest cadmium exposure (Fig. 3b). Contrastingly, this dose-response relationship was not found in females infected by the two parasite species, among which the decrease in lipid content was only measured at 2 µg $Cd.L^{-1}$ (Fig. 3b). In fact, the total lipid content was reduced by half in the presence of *D. muelleri* and divided by three when *D. roeselum* was present compared to their respective controls.

The glycogen content of uninfected females and *D. muelleri*-infected females was not impacted by cadmium exposure, but it decreased by an average 50% in *D. roeselum*-infected females whatever the cadmium concentration (Fig. 3c).

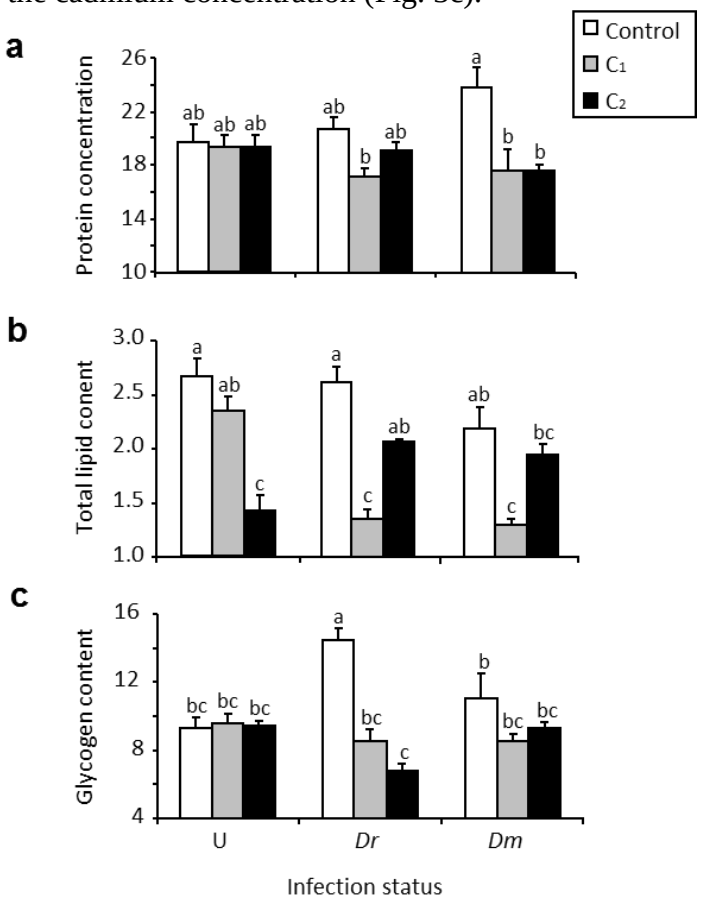


Figure 3. Influence of the presence of microsporidia parasite on the protein concentration (mg/mL) (a), total lipid (mg/mL) (b) and glycogen (µg/mg tissue) (c) contents of Gammarus roeseli females exposed to $CdCl_2$ during 96h. *U: uninfected, Dr: Dictyocoela roeselum-infected females, Dm: Dictyocoela muelleri-infected females, C_1: 2 µg $Cd.L^{-1}$, C_2: 8 µg $Cd.L^{-1}$. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, p-values < 0.05).*

4. DISCUSSION

This study was carried out to understand the influence of the presence of parasites in an ecotoxicological context by studying the effect of the presence of intracellular, vertically-transmitted microsporidia in the amphipod *Gammarus roeseli*. Indeed, while macroparasites have already been shown to decrease significantly the degree of accumulation of heavy metals in their hosts (Siddall and Sures 1998; Sures and Radszuweit 2007; Sures and Taraschewski 1995), the effect of microparasites on the response to toxics has remained quite overlooked so far.

4.1. Prevalence and identification of microsporidia

No *G. roeseli* male was found infected, whereas females were infected by two microsporidia species: *D. roeselum* and *D. muelleri*. Our results are in line with those of Haine et al. (2004) who found these two species in two populations of *G. roeseli* in Burgundy (France), and demonstrated that they were vertically-transmitted. However, a third parasite identified in Burgundy, *Nosema granulosis* (Haine et al. 2004) was not found in our study. The prevalence of these two *Dictyocoela* species was found to vary among populations (Haine et al., 2004) but in our study *D. roeselum* dominated regardless of the season. The fact that only females were infected by microsporidia in our population confirms that these parasites are likely sex ratio distorters (Haine et al. 2004, 2007).

4.2. Influence of the microsporidia presence in physiological conditions

In physiological conditions (i.e. in the absence of cadmium stress), the presence of *D. roeselum* or *D. muelleri* had no or little influence on the energy reserves and antitoxic defences of *G. roeseli* females. From an evolutionary point of view, this absence of effect could be explained by the fact that vertically-transmitted microsporidia are directly depend on the survival and reproduction of their host for their own transmission. Indeed, a low virulence could lead to better survival of the host, resulting in a more successful transmission (Dunn et al. 1995; Kelly et al. 2003; Smith 2009). For example, Terry et al. (1998) demonstrated that *Gammarus duebeni* survival was not affected by *Nosema granulosis*. Haine et al. (2007) even found a survival advantage in young infected *G. roeseli*. However, the absence of a negative impact on host physiology is surprising considering that microsporidia, which are

amitochondrial parasites; totally rely on their host for their metabolism (Wittner and Weiss 1999). Instead of considering that these parasites have no impact on their hosts, it is probably more reasonable to consider that the host can easily compensate for the cost related to this kind of parasitism in a physiological context. Such compensation could depend on environmental conditions, as shown in certain studies; for example, Terry et al. (1998) and Kelly et al. (2001) showed that *Nosema granulosis* caused a reduced egg production in *G. duebeni* females. In addition, in the sea amphipod *M. affinis*, increased microsporidia prevalence due to organic pollutant exposure was correlated to an increase in the amount of dead eggs in the gonads (Jacobson et al. 2010; 2011).

4.3. Influence of microsporidian infection under cadmium exposure

For all biomarkers, microsporidian infection mainly had an effect in interaction with cadmium exposure (although the significance was lower for protein contents).

Reduced glutathione concentration increased in uninfected females exposed at 2 µg $Cd.L^{-1}$ while it remained unchanged in infected ones. These results are in tune with other studies which show that GSH concentration can increase (Tort et al. 1996; Schlenk and Rice 1998; Lange et al. 2002), remain unchanged (Thomas and Wofford 1993) or decrease (Soussi et al., 2008) in organisms exposed to cadmium. GCL is the enzyme that limits GSH synthesis (Ray et al. 1999); therefore variations in GSH concentration should be correlated with GCL activity in stress conditions. GCL activity increased during cadmium exposure whatever the parasitic status of *G. roeseli* females, especially when infected females were exposed at 8µg $Cd.L^{-1}$. This result is in agreement with Lee et al. (2003) who described an increase in GCL activity as well as in GSH concentration in different stress conditions. However, in our study, GSH concentration was unchanged in infected females although GCL activity increased. This could be explained by the fact that reduced glutathione could be used immediately to detoxify the organism (Meister, 1983; Singhal et al., 1987; Akira et al., 1990). In the same way, the content in metallothioneins, which are proteins that protect against cytotoxicity (Cajaraville et al. 2000), significantly increased in uninfected females whereas it only slightly increased in infected ones. This result agrees with some studies which demonstrate that cadmium induces MT synthesis in invertebrate organisms (Stuhlbacher and Maltby 1992; Bigot et al. 2011). We can hypothesize that MT, like GSH, could be used in infected females more than in uninfected ones to fight against cadmium stress. The variations in defence capacities, found in this study, therefore highlight that infected gammarids could be more susceptible in an

environmental contamination context. The MDA levels measured in this experiment could support this hypothesis. Indeed, MDA level increased during cadmium exposure in both uninfected and infected *G. roeseli* females, reflecting the toxic effect of cadmium. The same pattern was observed by Khan et al. (2010) who demonstrated an increase of lipoperoxidation in *Gammarus pulex* exposed to metal contamination, while Correia et al. (2002) and Sroda and Cossu-Leguille (2011) demonstrated an increase in MDA levels in *G. locusta* or *G. roeseli*, respectively, after copper intoxication. In addition, in our study, MDA levels were higher in infected females (especially when exposed to 2 $\mu g.L^{-1}$ of cadmium) compared to uninfected ones, which confirms the hypothesis of higher toxic effects in infected-*G. roeseli* females. Microsporidia germination may explain this higher stress in infected females. Indeed, Keeling and Fast (2002) demonstrated that various physical or chemical stimuli (pH alterations, ultraviolet or peroxide exposure) could induce microsporidia spore germination which could in turn be considered by gammarid as a supplementary stress. Ford et al. (2006) observed that gammarid intersex specimens were significantly more likely to be infected with microsporidian parasites at sites receiving waste effluent rather than at reference sites; suggesting that parasitism is related to water quality. Moreover, Jacobson et al. (2011) demonstrated that there was an increase in the percentage of parasites infecting the amphipod *Monoporeia affinis* exposed to the antifouling agent tributyltin. It remains to be investigated whether the increased proportion of parasite-infected animals could be due to an immunotoxic effect of tributyltin or to a consequence of competition for energy between the detoxification machinery and the immune system (Jacobson et al., 2011). Thus, cadmium could induce microsporidian germination, a hypothesis which remains to be tested.

Total lipid and glycogen contents were also affected by infection during our exposure experiments. Sroda and Cossu-Leguille (2011) highlighted a decrease in total lipid and glycogen contents in *G. roeseli* females exposed to copper. Lee et al. (1981) also observed a decrease in lipid content in *Amphithoe valida* (Crustacea, Amphipoda) exposed to No. 2 fuel oil containing benzene extracted organics. Moreover, Barata et al. (2005) demonstrated a decrease in lipid content in *Daphnia magna* exposed to cadmium for 48hrs. In our study, total lipid decrease was more marked in infected females than in uninfected ones at the low cadmium dose. This could be explained by a consumption of host lipids by the parasite. As microsporidian parasites and their hosts share similar membrane lipids (Vivarès et al. 1980; Biderre et al. 2000), microsporidia could perhaps use host lipids to make new membranes and form new spores.

Contrasting with lipids, glycogen content remained unchanged after cadmium exposure in uninfected females, a result that confirms those of Dietrich et al. (2010) in *G. fossarum* exposed to a pharmaceutical mixture. However, when females were infected by microsporidia species, there was a decrease in glycogen content, recalling the one described by Vivarès and Cuq (1981) in *Carcinus mediterraneus* (Crustacea: Decapoda) massively infected by *Thelohania meanadis* microsporidia. The decrease in total lipid and glycogen contents observed at 2µg $Cd.L^{-1}$ in our study suggests differences in their mobilization to respond to the energetic demand in a toxic environment. Glycogen may be easily catabolized to produce a rapid source of energy necessary for the organism to cope with stress (Sancho et al. 1998; Dutra et al. 2009). On the other hand, it is well known that microsporidia are amitochondrial, so they could use host glycogen as an energy source. This hypothesis is supported by the fact that five enzymes of the glycolysis pathway were found to be significantly active and functional in *Nosema* spores (Méténier and Vivarès 2001).

5. CONCLUSION

This study highlights the importance of taking into account the presence of 'unseen' (i.e. asymptomatic) microsporidia in ecotoxicological studies when using gammarids as a biological model. First, microsporidia could be a confounding factor in ecotoxicology because infected females could be more sensitive to cadmium stress. Indeed, microsporidia induce a stress that gammarids could be able to compensate for in physiological conditions but not under stress conditions. Pollution by heavy metals in addition to microsporidian infection could be described as a stress-on-stress phenomenon. Second, microsporidia infect almost half the females in *G. roeseli* populations, and their prevalence is variable among populations (e.g. Haine et al. 2004). Therefore, comparing the response to pollutants in two gammarid populations with unknown infection levels would probably lead to misleading results.

Acknowledgments*: This study was supported by the French Ministry of Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche), which we sincerely thank here. The present work was funded by the research program EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière). We are grateful to Annie Buchwalter for improving the English text and we wish to thank the anonymous reviewers for their helpful comments on a previous draft of this paper.*

REFERENCES

Akira, N., Anderson, M.E., Meister, A., 1990. Cellular glutathione as a determinant of sensitivity to mercuric chloride toxicity: Prevention of toxicity by giving glutathione monoester. Biochemical Pharmacology 40, 693-697.

Alhama, J., Romero-Ruiz, A., Lopez-Barea, J., 2006. Metallothionein quantification in clams by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization. Journal of Chromatography A 1107, 52-58.

Bandi, C., Dunn, A.M., Hurst, G.D.D., Rigaud, T., 2001. Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. Trends in Parasitology 17, 88-94.

Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C., 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 140, 175-186.

Barber, I., Wright, H.A, Arnott, S.A., Wootton, R.J., 2008. Growth and energetics in the stickleback *Schistocephalus* host-parasite system: a review of experimental infection studies. Behaviour 145, 647-668.

Behrens, W., Madère, R., 1991. Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography. Lipids 26, 232-236.

Biderre, C., Babin, F., Vivarès, C.P., 2000. Fatty acid composition of four Microsporidian species compared to that of their host fishes. Journal of Eukaryotic Microbiology 47, 7-10.

Bigot, A., Minguez, L., Giambérini, L., Rodius, F., 2010. Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: Transcriptional and histochemical studies. Environmental Toxicology doi: 10.1002/tox.20599.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.

Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. The Science of The Total Environment 247, 295-311.

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.

Correia, A.D., Livingstone, D.R., Costa, M.H., 2002. Effects of water-borne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod *Gammarus locusta*. Marine Environmental Research 54, 357-360.

Dietrich, S., Dammel, S., Ploessl, F., Bracher, F., Laforsch, C., 2010. Effects of a pharmaceutical mixture at environmentally relevant concentrations on the amphipod *Gammarus fossarum*. Marine and Freshwater Research 61, 196-203.

Dunn, A.M., Hatcher, M.J., Terry, R.S., Tofts, C., 1995. Evolutionary ecology of vertically transmitted parasites: Transovarial transmission of a microsporidian sex ratio distorter in *Gammarus duebeni*. Parasitology 111(Supplement S1), S91-S109.

Dunn, A.M., Smith, J.E., 2001. Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. Microbes and Infection 3, 381-388.

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: Toxicology and Pharmacology 149, 640-646.

Ebert, D., Herre, E.A., 1996. The evolution of parasitic diseases. Parasitology Today 12, 96-101.

Ford, A.T., Fernandes T.F., Robinson C.D., Davies I.M., Read P.A., 2006. Can industrial pollution cause intersexuality in the amphipod, *Echinogammarus marinus*? Marine Pollution Bulletin 53, 100-106.

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.

Geffard, A., Quéau, H., Dedourge, O., Biagianti-Risboug, S., Geffard, O., 2007. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 145, 632-640.

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.

Haine, E.R. Brondani, E., Hume, K.D., Perrot-Minnot, M., Gaillard, M., Rigaud, T., 2004. Coexistence of three microsporidia parasites in populations of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli*: evidence for vertical transmission and positive effect on reproduction. International Journal for Parasitology 34, 1137-1146.

Haine, E.R., Motreuil, S., Rigaud, T., 2007. Infection by a vertically-transmitted microsporidian parasite is associated with a female-biased sex ratio and survival advantage in the amphipod *Gammarus roeseli*. Parasitology 134, 1363-1367.

Jacobson, T., Holmström, K., Yang, G., Ford, A.T., Berger, U., Sundelin B., 2010. Perfluorooctane sulfonate accumulation and parasite infestation in a field population of the amphipod *Monoporeia affinis* after microcosm exposure. Aquatic Toxicology 98, 99-106.

Jacobson, T., Sundelin B., Yang, G., Ford, A.T., 2011. Low dose TBT exposure decreases amphipod immunocompetence and reproductive fitness. Aquatic Toxicology 101, 72-77.

Keeling, P.J., Fast, N.M., 2002. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Annual Review of Microbiology 56, 93-116.

Kelly, A., Dunn, A.M., Hatcher, M.J., 2001. Population dynamics of a vertically transmitted, parasitic sex ratio distorter and its amphipod host. Oikos 94, 392-402.

Kelly, A., Hatcher, M.J., Dunn, A.M., 2003. The impact of a vertically transmitted microsporidian, *Nosema granulosis* on the fitness of its *Gammarus duebeni* host under stressful environmental conditions. Parasitology 126, 119-124.

Khan, F.R., Bury, N.R., Hogstrand, C., 2010. Cadmium bound to metal rich granules and exoskeleton from *Gammarus pulex* causes increased gut lipid peroxidation in zebrafish following single dietary exposure. Aquatic Toxicology 96, 124-129.

Lange, A., Ausseil, O., Segner, H., 2002. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 131, 231-243.

Lee, W.Y., Macko, S.A., Nicol, J.A.C., 1981. Changes in nesting behavior and lipid content of a marine amphipod (*Amphithoe valida*) to the toxicity of a no. 2 fuel oil. Water, Air, and Soil Pollution 15, 185-195.

Leroy, P., Nicolas, A., Wellmann, M., Michelet, F., Oster, T., Siest, G., 1993. Evaluation of *o*-phthalaldehyde as bifunctional fluorogenic post-column reagent for glutathione in LC. Chromatographia 36, 130-134.

Mathis, A., 2000. Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. International Journal for Parasitology 30, 795-804.

Mautner, S., Cool, K.A., Forbes, M.R., McCurdy, D.G., Dunn, A.M., 2007. Evidence for sex ratio distortion by a new microsporidian parasite of a Corophiid amphipod. Parasitology 134, 1567-1573.

McCahon, C.P., Maund, S.J., Poulton, M.J., 1991. The effect of the acanthocephalan parasite (*Pomphorhynchus laevis*) on the drift of its intermediate host (*Gammarus pulex*). Freshwater Biology 25, 07-513.

Meister, A., 1983. Selective modification of glutathione metabolism. Science 220, 472 -477.

Méténier, G., Vivarès, C.P., 2001. Molecular characteristics and physiology of microsporidia. Microbes and Infection 3, 407-415.

Minguez, L., Meyer, A., Molloy, D.P., Giambérini, L., 2009. Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Importance in ecotoxicological studies. Environmental Research 109, 843-850.

Parmentier, C., Leroy, P., Wellman, M., Nicolas, A., 1998. Determination of cellular thiols and glutathione-related enzyme activities: versatility of high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetric detection. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 719, 37-46.

Pascoe, D., Kedwards, T.J., Blockwell, S.J., Taylor, E.J., 1995. *Gammarus pulex* (L.) feeding bioassay - Effects of parasitism. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 55, 629-632.

Plaistow, S.J., Troussard, J.P., Cézilly, F., 2001. The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. International Journal for Parasitology 31, 346-351.

Prenter, J., MacNeil, C., Dick, J.T.A., Riddell, G.E., Dunn, A.M., 2004. Lethal and sublethal toxicity of ammonia to native, invasive, and parasitised freshwater amphipods. Water Research 38, 2847-2850.

Ray, S., Misso, N.L.A., Lenzo, J.C., Robinson, C., Thompson, P.J., 1999. Gamma-glutamylcysteine synthetase activity in human lung epithelial (A549) cells: Factors influencing its measurement. Free Radical Biology and Medicine 27, 1346-1356.

Rodgers-Gray, T.P., Smith, J.E., Ashcroft, A.E., Isaac, R.E., Dunn, A.M., 2004. Mechanisms of parasite-induced sex reversal in *Gammarus duebeni*. International Journal for Parasitology 34, 747-753.

Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Aquatic Toxicology 22, 81-113.

Schlenk, D., Rice, C.D., 1998. Effect of zinc and cadmium treatment on hydrogen peroxide-induced mortality and expression of glutathione and metallothionein in a teleost hepatoma cell line. Aquatic Toxicology 43, 121-129.

Siddall, R., Sures, B., 1998. Uptake of lead by *Pomphorhynchus laevis* cystacanths in *Gammarus pulex* and immature worms in chub (*Leuciscus cephalus*). Parasitology Research 84, 573-577.

Singhal, R., Anderson, M., Meister, A., 1987. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. The FASEB Journal 1, 220 -223.

Smith, J.E., 2009. The ecology and evolution of microsporidian parasites. Parasitology 136(Special Issue 14), 1901-1914.

Soussi, M., Ouali, K., Hadj, M.W., Rouachdia, R., Djabouradi, A., Bensouilah, M., 2008. Proportioning of biomarkers (GSH, GST, AchE, catalase) indicator of pollution at *Gambusia affinis* (Teleostei fish) exposed to cadmium. Environmental Research Journal 2, 177-181.

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.

Sroda, S., Cossu-Leguille, C., 2011. Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor? Ecotoxicology 20, 264-273.

Stuhlbacher, A., Maltby, L., 1992. Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 22, 319-324.

Sures, B., Taraschewski, H., 1995. Cadmium concentrations in two adult acanthocephalans, *Pomphorhynchus laevis* and *Acanthocephalus lucii*, as compared with their fish hosts and cadmium and lead levels in larvae of *A. lucii* as compared with their crustacean host. Parasitology Research 81, 494-497.

Sures, B., Siddall, R., Taraschewski, H., 1999. Parasites as accumulation indicators of heavy metal pollution. Parasitology Today 15, 16-21.

Sures, B., Scheef, G., Klar, B., Kloas, W., Taraschewski, H., 2002. Interaction between cadmium exposure and infection with the intestinal parasite *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala) on the stress hormone levels in rats. Environmental Pollution 119, 333-340.

Sures, B, 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. Trends in Parasitology 20, 170-177.

Sures, B., Thielen, F., Baska, F., Messerschmidt, J., von Bohlen, A., 2005. The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* as a sensitive accumulation indicator for the platinum group metals Pt, Pd, and Rh. Environmental Research 98, 83-88.

Sures, B., Radszuweit, H., 2007. Pollution-induced heat shock protein expression in the amphipod *Gammarus roeseli* is affected by larvae of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). Journal of Helminthology 81, 191-197.

Terry, R.S., Smith, J.E., Dunn, A.M., 1998. Impact of a novel, feminising microsporidium on its crustacean host. Journal of Eukaryotic Microbiology 45, 497-501.

Terry, R.S., Smith, J.E., Sharpe, R.G., Rigaud, T., Littlewood, D.T.J., Ironside, J.E., Rollinson, D., Bouchon, D., MacNeil, C., Dick, J.T.A., Dunn, A.M., 2004. Widespread vertical transmission and associated host sex–ratio distortion within the eukaryotic phylum Microspora. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 271, 1783-1789.

Thomas, P., Wofford, H.W., 1993. Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. Aquatic Toxicology 27, 159-177.

Timofeyev, M.A., Shatilina, Z.M., Kolesnichenko, A.V., Bedulina, D.S., Kolesnichenko, V.V., Pflugmacher, S., Steinberg, C.E., 2006. Natural organic matter (NOM) induces oxidative stress in freshwater amphipods *Gammarus lacustris* Sars and *Gammarus tigrinus* (Sexton). Science of The Total Environment 366, 673-681.

Timofeyev, M.A., Shatilina, Z.M., Bedulina, D.S., Protopopova, M.V., Pavlichenko, V.V., Grabelnych, O.I., Kolesnichenko, A.V., 2008. Evaluation of biochemical responses in Palearctic and Lake Baikal endemic amphipod species exposed to $CdCl_2$. Ecotoxicology and Environmental Safety 70, 99-105.

Vasseur, P., Leguille, C., 2004. Defense systems of benthic invertebrates in response to environmental stressors. Environmental Toxicology 19, 433-436.

Vivarès, C.P., Martin, B.J., Ceccaldi, H.J., 1980. Acides gras de trois microsporidies (Protozoa) et de leur hôte *Carcinus mediterraneus* (Crustacea), sain et parasité par *Thelohania maenadis*. Parasitology Research 61, 99-107.

Vivarès, C.P., Cuq, J.L., 1981. Physiological and metabolic variations in *Carcinus mediterraneus* (Crustacea: Decapoda) parasitized by *Thelohania maenadis* (Microspora: Microsporida): An ecophysiopathological approach. Journal of Invertebrate Pathology 37, 38-46.

Wittner, M., Weiss, L.M., 1999. The Microsporidia and Microsporidiosis, American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 553 pp.

PARTIE III
ÉTUDE DE L'INFLUENCE D'UNE CO-INFECTION PARASITAIRE SUR DES BIOMARQUEURS DE *G. ROESELI*

Publication 6
Effect of parasitic multiple-infection on the tolerance of pollutant contamination, in freshwater amphipod[**]

Dans cette dernière partie des travaux, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'impact d'une co-infection par *P. minutus* et *D. roeselum* sur les défenses antitoxiques et des réserves énergétiques de *G. roeseli* soumis à un stress au cadmium.

Après avoir démontré dans les études précédentes qu'une mono-infection par *P. minutus* ou *D. roeselum* accentuait les effets toxiques subis par *G. roeseli* exposé au cadmium, nous avons émis l'hypothèse qu'une co-infection par ces deux parasites pourrait accentuer davantage les effets toxiques subits par leur hôte commun. Cependant, il a été démontré par Haine *et al.* (2005) que la manipulation comportementale induite pas *P. minutus* était diminuée par la présence de microsporidie, phénomène qualifié de « sabotage ». Ceci nous a alors permis d'émettre comme seconde hypothèse que l'effet induit par ces deux parasites ne serait pas plus grand que lors d'une infection unique.

Pour cela, des femelles *G. roeseli* ont été exposées pendant 96h aux mêmes concentrations de cadmium que lors des précédentes expositions, à savoir 2 et 8 µg Cd/L. Le statut infectieux de chaque organisme a été déterminé visuellement (*P. minutus*) et par PCR-RFLP (*D. roeselum*), puis 6 pools de 6 femelles ayant le même statut parasitaire et les mêmes conditions d'exposition ont été réalisés, afin de mesurer les différents biomarqueurs de défenses, énergétique et d'effets toxiques.

Nos résultats ont révélé que la co-infection augmentait légèrement l'effet toxique subi par *G. roeseli* lors de l'exposition à la plus forte concentration de cadmium, mais n'induisait

** Soumis à PLoS Biology

pas d'effets supérieurs à la plus faible concentration d'exposition. Ce résultat suggère que la présence de ces deux parasites chez *G. roeseli* femelles n'accentuerait pas davantage les effets toxiques dus à une exposition au cadmium. L'ensemble des réponses antitoxiques et énergétiques mesurées chez les individus co-infectées variaient dans des proportions identiques que les individus mono-infectés par *D. roeselum*. Cette observation suggère que la physiologie de l'hôte (et peut-être aussi la physiologie de l'acanthocéphale) pourrait être contrôlée dans une certaine mesure par les microsporidies dans des conditions stressantes. Ce résultat obtenu est donc en accord avec l'effet de sabotage des microsporidies induit sur la manipulation comportementale de l'acanthocéphale (Haine *et al.* 2005). Cette hypothèse est également supportée par le fait qu'aucun effet toxique dû à l'absorption de cadmium n'a été mesuré chez *P. minutus* provenant de femelles co-infectées (absence d'augmentation du taux de MDA), en comparaison à *P. minutus* prélevés chez des femelles mono-infectées par l'acanthocéphale.

Cette étude souligne de nouveau l'importance de prendre en compte la présence de microsporidies dans l'interprétation de résultats. En effet, il a clairement été établi ici que leur présence induit une modification de l'impact de P. minutus sur les défenses antitoxiques et les réserves énergétiques de leur hôte commun G. roeseli femelle exposée au cadmium. Les microsporidies pourraient donc être à même d'impacter la physiologie de leur hôte de même que celle de l'acanthocéphale présent dans l'hémocoele du gammare.

Effect of parasitic multiple-infection on the tolerance of pollutant contamination, in freshwater amphipod

E. GISMONDI[a]*, T. RIGAUD[b], J.-N. BEISEL[a], C. COSSU-LEGUILLE[a]

[a] Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie Biodiversité Ecosystèmes (LIEBE) - CNRS UMR 7146, Université de Lorraine (UdL), Campus Bridoux, Bât. IBiSE, 8 Rue du Général Delestraint, 57070 METZ, France

[b] Equipe Ecologie Evolutive, Biogeosciences, UMR CNRS 5561, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21000 DIJON, France

ABSTRACT

Both the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus*, horizontally-transmitted, and the microsporidia parasite *Dictyocoela roeselum*, vertically-transmitted, have been showed to influence antitoxic responses of singularly infected *Gammarus roeseli* exposed to cadmium. The present investigation studied the effect of this co-infection on the antitoxic defence capacities of *G. roeseli* females exposed to cadmium stress. Our results revealed that, depending on the cadmium dose, bi-infection induced only a slight significantly increase of cell damage in *G. roeseli* as compared to respective single-infected individuals. The pattern of bi-infected host antitoxic defences exposed to cadmium followed the pattern of *D. roeselum*-infected host. Reduced glutathione concentrations, carotenoids levels and γ-glutamylcystein ligase activity were decreased, while metallothionein concentrations were increased. This similar pattern indicates that the host physiology can be controlled to some extend by the microsporidia under stress condition, which supported the hypothesis of a sabotage effect of microsporidia on acanthocephalan influence. However, global negative effect of multiple-infection on the host condition should be tested on more biological models due to the fact that competition between parasites depends on life history trade-off.

Key-Words: Co-infection, parasite, *Gammarus roeseli*, cadmium, Acanthocephala, microsporidia, *Polymorphus minutus*, *Dictyocoela* sp.

1. INTRODUCTION

Aquatic environments are more and more contaminated by human activity, and these disturbances are now well known to induce dysfunction in organisms, which sometimes lead them to death. To face with stress caused by pollutants, organisms have developed antitoxic defence capacities, which represent key parameters to keep alive organism in contaminated environments and thus, to maintain their fitness [1,2].

In the last decade, influence of parasite on the host physiology has increasingly been studied in contaminated environments context. Previous studies have highlighted a disruption of the behavioural and biological host responses due to the presence of parasites [3,4]. Indeed, in a contamination context, host antitoxic responses could be increased [5] or decreased [6] by parasitic infection, which could lead to different sensitivity of the host [7]. However, these observations were often obtained in associations between one host and a single parasite, a situation far to be realistic in the field. Indeed, most living species are infected by parasite assemblages, and it is not rare that individual host harbour multiple parasite species (e.g. [8,9]). The presence of two parasites species co-infecting the same host could lead to competing or conflicting situations that could influence the parasite virulence [10] or the host resistance [11]. To our knowledge, no studies were devoted to investigate the effect of a multi-parasite infection on host antitoxic defence capacities.

Gammaridae (Crustacea, Amphipoda) are increasingly used as biological model for assessing contamination in freshwater ecosystems, mainly because of their key role and large distribution [12]. They are nevertheless also well known to be infected by numerous parasites, and multiple infections are reported recurrently [13,14]. *Gammarus roeseli* is the intermediate host of various acanthocephalan parasites, whose definitive hosts are fishes or water birds [15,16]. Acanthocephalans are known to alter the behaviour of their intermediate host in a way that make it more prone to predation and thus, favour its transmission to the final vertebrate host [17,18]. Behavioural changes induced by acanthocephalan are varied and include reaction to light [19,20], vertical distribution [21], drift behaviour [22,23], activity levels [24], or the refuge use and the escape performance [25–27]. Acanthocephalan parasites could also influence antitoxic defences of host [28]. *Polymorphus minutus*, a bird parasite, is also known to castrate its host intermediate host [29]. This trait, added to the parasite-induced increased predation by water birds, makes *P. minutus* clearly harmful to its host. *G. roeseli* is also the host of various vertically-transmitted microsporidia parasites, transmitted from mother to offspring, through eggs [7,30]. A conflicting situation is predicted when there is co-occurrence of vertically-transmitted parasites and obligate horizontally-transmitted

parasites in the same individual host [31]: acanthocephalans use intermediate hosts to be transmitted to the final host via the trophic chain, resulting in the death of the host, while microsporidia totally rely on their female host survival and reproduction for their transmission. Due to the fact that, in nature, the microsporidian infection always precedes the acanthocephalan infection, a super-infection by *P. minutus* is clearly unfavourable, leading to a potential conflict.

However, microsporidia parasites do not prevent co-infection by *P. minutus*. Rather, they induce a sabotage of behavioural manipulation exerted by the acanthocephalan [14]. A theoretical study showed that a virulent vertically-transmitted parasite could persist by protecting the host from horizontally-transmitted parasites virulence, especially if the latter is a castrating parasite [32]. However, no study was devoted to investigate the consequences of the presence of both vertically- and horizontally-transmitted parasites sharing the same host exposed to a chemical stress. Both *P. minutus* and microsporidia are known to disrupt antitoxic defences of *G. roeseli* in situations of single infections. Microsporidia has no major impact on their host in unstressed conditions, but their presence exacerbate host cell damage after a moderate cadmium exposure and induce a slight negative impact on antitoxic defences [7]. Similarly, we have shown the *P. minutus* increased cell damage in *G. roeseli* exposed to cadmium, although the antitoxic defence capacities were increased in infected individuals [28].

From these works, and from the former studies on multiple-infections described above, predictions on the outcome of co-infection in *G. roeseli* exposed to cadmium could be twice: either co-infections strongly weaken hosts and thus increase their sensitivity to pollutant (because multiple-infections could increase the virulence) or, conversely, co-infections could cause lower disturbance as compared to *P. minutus* alone (because of the protection that microsporidia could confer to their hosts).

In this work, we tested these hypotheses by studying the influence of co-occurring *P. minutus* and the microsporidia *Dictyocoela roeselum*, on the energetic reserves and antitoxic defences of their common host *G. roeseli*, under a cadmium stress (see Materials and Methods section for details). Antitoxic defence capacities were assayed by measuring concentrations of several markers: reduced glutathione (GSH), a tripeptide that play an essential role in the detoxification system by scavenging organic or metallic xenobiotics thanks to its thiol group [1]; the activity of γ-glutamylcysteine ligase (GCL, EC 6.3.2.2), the limiting enzyme of the *de novo* GSH synthesis; concentrations of metallothioneins (MT) which are involved in binding metallic compounds and contribute to protect tissues against

oxidative damage [33,34]; carotenoïds levels which are involved both in the reproduction [35] and in the antioxidant defences [36]. In parallel, the malondialdehyde level (MDA), product of the lipoperoxidation considered as a biomarker of toxic effect, was also measured. Moreover, energy reserves were estimated by measuring total lipid and glycogen contents. Glycogen levels are representative of the energy available for current activities [37] whereas lipids are stored in fat bodies and are used during starvation or reproduction periods [38]. Since *D. roeselum* microsporidia is a parasite infecting females specifically [7], this study was carried out on females only.

2. RESULTS

Results of the MANOVA for the combined effects of infection and cadmium exposure on energetic reserves and antitoxic defences are provided in Table 1. The two parameters have a general effect on the physiological conditions of *G. roeseli* females, both alone and in interaction. The general picture, as predicted, is that cadmium exposure generally decreased the energetic reserves of amphipods and increased the level of stress markers (Figure 1). However, the magnitude of these changes depended on the cadmium dose and the infection status, particularly between mono-infected individuals versus bi-infected ones.

2.1. Weak effects of the infection status in absence of pollution

There was no significant impact of parasitic infections on three markers studied here (lipid, carotenoid and MDA levels, see Figure 1A, Figure 1F and Figure 1G). The glycogen content was heavily increased by the two parasite species in mono-infections (Figure 1C) while its level under bi-infection was similar to uninfected individuals. Finally, *P. minutus* acanthocephalans in mono-infection impacted GSH, GCL and MT levels compared to uninfected animals or those infected by *D. roeselum*, but the levels of these markers of toxicity were restored to the level of uninfected animals when microsporidia co-occurred with acanthocephalans (Figure 1C, Figure 1D, Figure 1E).

2.2. Differential effects of cadmium exposures according to the infection status

Except for carotenoid concentration (Table 1), all biomarkers were impacted differentially by the cadmium exposure according to the infection status of the animals.

Whatever the infection status, lipid content was affected equally by low-dose cadmium exposure. After high-dose cadmium exposure, gammarids infected by *D. roeselum* suffer less the high pollutant dose than uninfected females. Multiple-infection did not accentuate the effect of cadmium exposure compared to single infections (Figure 1A).

Multiple-infection impacted negatively glycogen contents compared to single infections at the two cadmium exposures (Figure 1B). In females with single infections, the glycogen reserves tended to resemble those of uninfected ones, except for females infected with microsporidia at low cadmium dose where this parameter still remain higher, as in control.

The effect of multiple-infection on GSH and GCL parameters was similar: while the low dose of cadmium impacted all gammarids in a similar way, whatever their infection status, the situation is more contrasted at high cadmium dose (Figure 1C, Figure 1D). In the latter case, while acanthocephalan single infection either induced a higher response (GSH) or a similar response (GCL) than for uninfected females, single infection by microsporidia and co-infecting parasites induced similar responses to cadmium exposure.

The responses of MT concentration to cadmium exposure depended both on the infections status and the pollutant dose (Figure 1E). At low cadmium dose, the response of females infected by microsporidia was similar to that of multiple-infected ones, whose were higher than the response of uninfected or acanthocephalan-infected females. At high cadmium dose, the pattern of MT concentration did not show such differences, the bi-infected females showing lower concentration than microsporidia-infected ones. At high cadmium dose, the pattern of MT concentration did not show such differences, the bi-infected females showing lower concentration than microsporidia-infected ones.

For carotenoids, the higher the cadmium dose, the higher the reduction of concentration, with a similar pattern for all the infection status (Figure 1F). However, infection status also influenced carotenoid content: females infected by *D. roeselum* and multiply-infected contended less carotenoids than acanthocephalan-infected females (Figure 1F).

Finally, the MDA level was increased in all gammarids after cadmium exposure, whatever the infection status, but the phenomenon was accentuated for bi-infected females at high cadmium dose (Figure 1G).

Table 1. MANOVA and ANOVAs for the effects of parasite and cadmium on biomarkers

Models	**Parameters**	**Source of variation**	***num d.f*[a], *den d.f*[b]**	***F***	***p-values***
MANOVA		Parasite	21, 168	12.65	< **0.0001**
		Cadmium	14, 110	32.57	< **0.0001**
		Parasite x Cadmium	42, 354	6.28	< **0.0001**
ANOVAs	Total lipids	Parasite	3,60	3.18	**0.0302**
		Cadmium	2,60	83.64	< **0.0001**
		Parasite x Cadmium	6,60	5.82	< **0.0001**
	Glycogen	Parasite	3,60	92.68	< **0.0001**
		Cadmium	2,60	230.36	< **0.0001**
		Parasite x Cadmium	6,60	7.21	< **0.0001**
	GSH	Parasite	3,60	0.34	0.7955
		Cadmium	2,60	123.71	< **0.0001**
		Parasite x Cadmium	6,60	26.18	< **0.0001**
	GCL	Parasite	3,60	19.34	< **0.0001**
		Cadmium	2,60	88.72	< **0.0001**
		Parasite x Cadmium	6,60	8.2	< **0.0001**
	MT	Parasite	3,60	4.62	**0.0056**
		Cadmium	2,60	171.40	< **0.0001**
		Parasite x Cadmium	6,60	7.22	< **0.0001**
	Carotenoid	Parasite	3,60	7.26	**0.0003**
		Cadmium	2,60	101.32	< **0.0001**
		Parasite x Cadmium	6,60	1.61	0.1605
	MDA	Parasite	3,60	24.55	< **0.0001**
		Cadmium	2,60	209.73	< **0.0001**
		Parasite x Cadmium	6,60	12.43	< **0.0001**

Significant values shown in bold.

[a] Numerator degrees of freedom.

[b] Denominator degrees of freedom.

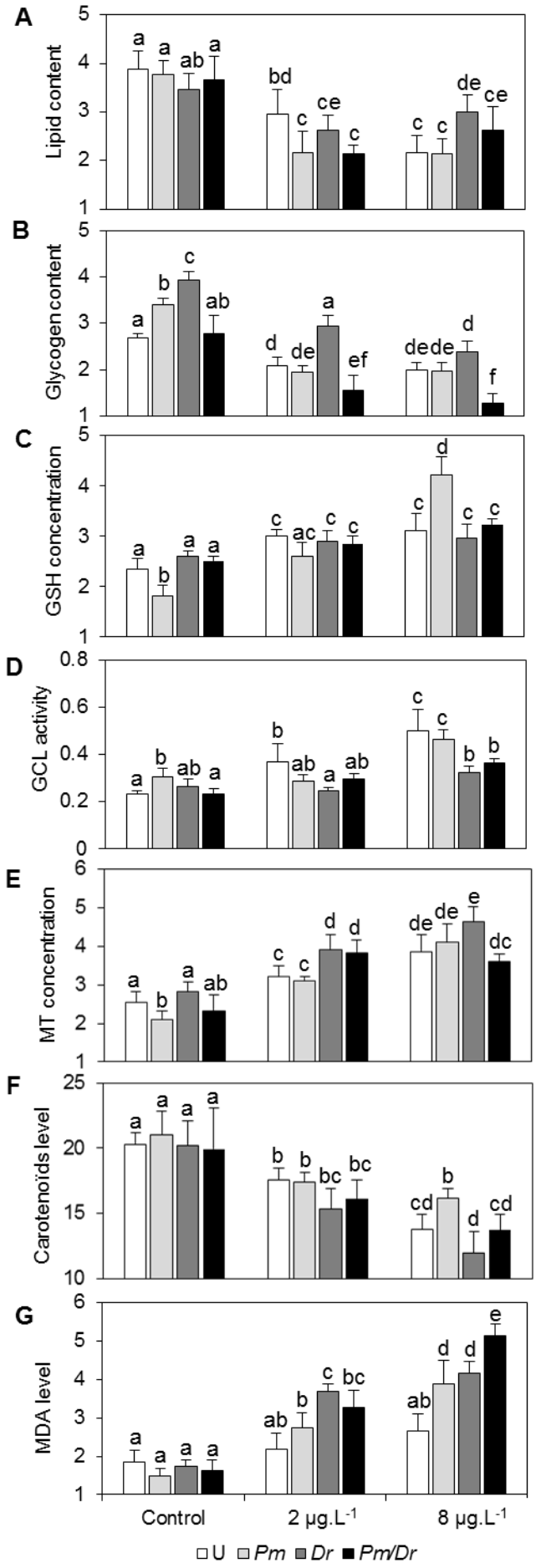


Figure 1. Influence of the presence of P. minutus and/or D. roeselum on energy and defences biomarkers of Gammarus roeseli females exposed at 2 and 8µg Cd/L for 96hrs. *Pm: P. minutus-infected females, Dr: D. roeselum-infected females, Pm/Dr: co-infected females. Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, p-values < 0.05). Lipids content: mg/mL; glycogen content: µg/mg tissue; GSH concentration: nmol GSH/mg protein; GCL activity: nmol GC/min/mg protein; MT: nmol MT/mg protein; carotenoïds: ng carotenoid/mg lipids; MDA: ng MDA/mg lipids.*

2.3. Integrated Biomarker Responses

Integrated Biomarker Responses (IBR hereafter) allows to examine differences in responses between several conditions thanks to biomarker combinations. The IBR was estimated to examine the stress induced in the antitoxic defence capacities (GSH, GCL, MT, carotenoid) and toxicity effect (MDA) measured in the four infection status. Energy reserves variations depending in part on the physiology status of the gammarids, they were not included in the estimation.

The higher the organisms were stress, the higher the IBR value (Figure 2). Results revealed that individuals were more stress at 8 µg $Cd.L^{-1}$ than at 2µg $Cd.L^{-1}$ whatever the infection status. However, it was observed that, when they were exposed to our lowest cadmium concentration (2 µg $Cd.L^{-1}$), individuals showing less stress were *P. minutus*-infected females, while they were also those showing a strong stress to the highest concentration of cadmium (8µg $Cd.L^{-1}$). At 2 µg $Cd.L^{-1}$, *D. roeselum*-infected females and co-infected females were more stress than uninfected ones and *P. minutus*-infected females. At the highest cadmium concentration, *D. roeselum*-infected females were slightly less stressed than uninfected ones; whereas co-infected females were slightly more stress than uninfected females but less than *P. minutus*-infected females.

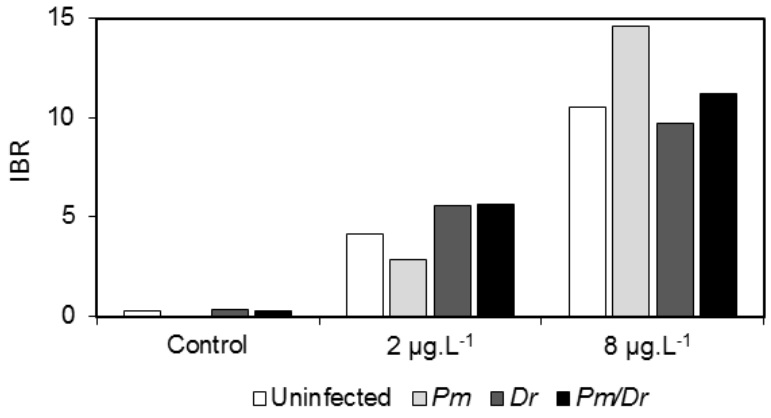


Figure 2. Integrated Biomarker Responses measured in G. roeseli exposed at 2 and 8 µg Cd/L for 96hrs. *Pm: P. minutus-infected females, Dr: D. roeselum-infected females, Pm/Dr: co-infected females^{-1}. IBR includes the defence capacities (GSH, GCL, MT, carotenoids) and the MDA responses.*

3.4 Malondialdehyde level in P. minutus

MDA levels were measured in *P. minutus*, either coming from females infected by P. minutus alone or from females bi-infected. When alone, *P. minutus* showed increase MDA levels after cadmium exposure. However, when *P. minutus* shared its host with *D. roeselum*, no significant differences were observed between the three cadmium conditions (Figure 3, Table 2).

Table 2. ANOVA for the effects of host infection status and cadmium on the P. minutus malondialdehyde level.

Source of variation	Sum of Square	d.f	F	*p*-values
Host infection status	0.0012	1	128.04	< **0.0001**
Cadmium	0.0006	2	34.40	< **0.0001**
Host infection status x Cadmium	0.0012	2	64.47	< **0.0001**

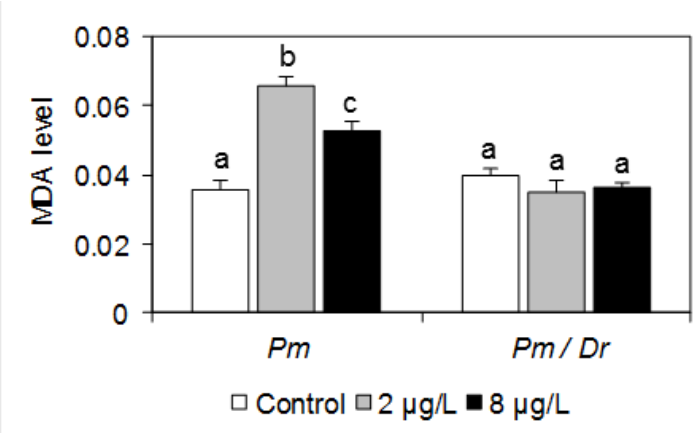


Figure 3. Malondialdehyde levels (ng MDA/mg lipids) measured in the acanthocephalan parasite P. minutus dissected from P. minutus-infected G. roeseli females (Pm) and G. roeseli females infected by P. minutus and D. roeselum (Pm/Dr) exposed at 2 and 8 µg Cd/L. *Different letters above the bars denote significantly different values (Tukey's HSD test, p-values < 0.05).*

3. DISCUSSION

The aim of the present study was to investigate the influence of a bi-infection by *P. minutus* (horizontally-transmitted parasite) and *D. roeselum* (vertically-transmitted parasite) on the energy reserves and the defence capacities of *G. roeseli* females after the exposure to an additional stress (cadmium exposure). Indeed, if previous studies have demonstrated the influence of a single parasite on their hosts under stressful conditions [7,39,40], no investigations have examined the effect of the presence of two parasites sharing the same host on the energy reserves and antitoxic defences in a contamination context, especially parasites

with different transmission strategies. The concomitant presence of *P. minutus* and *D. roeselum* in *G. roeseli* females clearly influenced the energy reserves and the defence capacities when exposed to cadmium, often in a way contrasting with single infection by the same parasite species.

First of all, it is worth noting that in absence of pollutant stress, the two studied parasite species did not influenced notably the physiological parameters measured in this study. The two exceptions are the depression of glycogen content in bi-infected hosts compared to single-infected ones (the latter showing a higher glycogen content compared to uninfected individuals, as previously observed [7], and the lower GSH concentration measured in gammarids infected with *P. minutus* alone. Such a global relatively weak effect of parasitism has already been observed, and interpreted as possibilities for the host to compensate the parasite effect in non-stressful conditions [7]. In addition, here, we show that bi-infection did not increase the parasite impact compared to single infections.

The exposure to cadmium changed sharply this pattern. Only carotenoid levels were depressed in the same way in all infection categories after pollutant exposure. All other parameters were changed differently according to cadmium dose, in interaction with the infection status. Two main categories of responses were observed. The first response type was an increased pathogenic effect of bi-infected hosts compared to mono-infected ones. This was observed in the glycogen content and, perhaps more importantly, on the MDA level at high cadmium dose. In this latter case, high MDA being a biomarker of high cell damage, the combined effect of the two parasites on damage was therefore stronger than their effect in isolation. The second type of response was a resemblance of response between hosts infected by *D. roeselum* and bi-infected. This was observed for all antitoxic defences: at all cadmium doses for carotenoids, at high cadmium dose for GSH concentration and GCL activity, at low cadmium dose for MT concentration. When combining all antitoxic and damage biomarkers in a single index (IBR, Integrated Biomarker Response), the same type of pattern emerged: the response of bi-infected hosts was similar to *D. roeselum*-infected hosts and contrasted with *P. minutus*-infected hosts. While the single infection by the acanthocephalan *P. minutus* induced a weaker response to pollution compared to uninfected hosts, both *D. roeselum* and bi-infected hosts showed a higher IBR. Conversely, under high cadmium exposure, the IBR was higher in *P. minutus*-infected females compared to uninfected, *D. roeselum*-infected and bi-infected hosts. This combined response therefore indicates that the response of host to the acanthocephalan parasite was overridden by the response to the microsporidian infection when the two parasites share the same individual host. Since the infection by the

microsporidia always precede the infection by the acanthocephalan (because of the vertical mode of transmission mode of *D. roeselum*), this could be interpreted as a prevention of the potential manipulation of host physiology by the first established parasite against the super-infecting parasite.

In cases of bi-infections, the precedence of the first established parasite has already been observed in different host-parasites systems (but see Lohr et al. [41]) for a counter-example). The microsporidia *Octospora bayeri*, after its vertical transmission, was able to withstand competition with the bacteria *Pasteuria ramose* in its host *Daphnia magna* to some degree, while *P. ramose* prevent *O. bayeri* development when both are infecting the host simultaneously [42]. However, in this case, both parasite fitness suffered multiple-infection and their virulence was increased compared to single infections. Even when the two co-infecting parasites have the same transmission mode, similar findings has been evidenced. Thomas et al. [43] found that avirulent fungal entomopathogen can alter the virulence and reproduction of a virulent one in the desert locust, depending on the order of infection and environmental conditions. Similarly, Hughes and Boomsma [44] have demonstrated that in the leaf-cutting ant host, the fungi *Aspergillus flavus*, avirulent, sporulated better in the presence of the virulent fungi *Metarhizum anisoplia*. Finally, numerous vertically-transmitted symbionts (mainly bacteria) protect their hosts from the infection by horizontally-transmitted parasite, for example parasitoids, viruses or *Plasmodium* (see Haine [45] for a review, and Moreira et al. [46] for an additional example).

In the host parasite system studied here, the vertically-transmitted microsporidia did not protect the gammarid from the acanthocephalan infection, but increased the tolerance of the host. Indeed *P. minutus* induces changes in the *G. roeseli* behaviour that favour parasite transmission to the next host but lead to the gammarid host death after the predation by this next host [21,25,47]. These behavioural changes, added to the castration that *P. minutus* also induced in *G. roeseli* [14], are unfavourable for vertically-transmitted microsporidia. Haine et al. [14] found that the behavioural manipulation of *P. minutus* was weaker in *G. roeseli* also infected by *D. roeselum*, compared to hosts infected by *P. minutus* alone.

The results described here (namely the *G. roeseli* co-infected by *P. minutus* and *D. roeselum* had the same pattern of antitoxic responses than *D. roeselum*-infected females) are in line with those of Haine et al. [13], as if most of the effects of *P. minutus* were cancelled by the presence of the vertically-transmitted microsporidia. We can hypothesize that *D. roeselum* could sabotage the influence of *P. minutus* on defence capacities of *G. roeseli*, that which could reduce the horizontally-transmitted parasite to a kind of "silent parasite". In a

previous study, we have shown that *P. minutus* in single infection accumulate cadmium after the exposure of its *G. roeseli* host [48]. This accumulation causes cell damage in the parasite, a result confirmed in the present study. However, we found here that the exposure to cadmium did not increased the MDA level in *P. minutus* when its host is already infected with *D. roeselum*. The acanthocephalan therefore suffers less cell damage in this condition. The interference between the two parasites could be due to *D. roeselum* reducing the exchanges between *P. minutus* and the host (e.g. nutriments exchange), reducing cadmium accumulation in *P. minutus* and thus, reduce cell damage. A paradox nevertheless appear here since the result of the interaction between the two parasites clearly increased the cell damage in the host (relative to single infections), which could be interpreted as an increase of virulence due to multiple infection.

In conclusion, this work is the first study investigating the influence of a multi-parasitism on the energy reserves and antitoxic defences of the host, in a contamination context. Together, and only under the pollutant additional stress, the two co-occurring parasites imposed a higher cell stress and a lower glycogen content in the host than single infections. These two cumulative effects could be seen as a higher virulence imposed by the double infection and could accentuate the fitness reduction of the host in a contamination context. Nevertheless, these negative effects of bi-infection are not always cumulative, as showed for the responses of antitoxic defences. For these traits, the pattern of bi-infection host reaction to pollutant stress followed the pattern of microsporidian-infected hosts, i.e. most of the time decreasing the antitoxic response (carotenoids, GSH concentrations and GCL activity), but also, depending on the cadmium dose, increasing this response (MT concentration at low cadmium dose). This pattern indicates that the host physiology (and perhaps also the acanthocephalan physiology, as suggested by our results) can be controlled to some extend by the microsporidia under stressful conditions, a result in line with sabotage effect this parasite induced on acanthocephalan behavioural modification [13]. Globally, however, since microsporidia often decrease the host antitoxic defences, and therefore the host capacity to cope with the pollutant stress, this microsporidian control is not advantageous for the host in contamination context. Such a global negative effect of multiple parasitism on the host condition should of course be tested on more biological models. As noted by Jones et al. [49] in a theoretical model, competition between parasites critically depends on life history trade-offs the two parasites face, which may be highly specific, especially when considering horizontally-transmitted and vertically-transmitted parasites.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Sampling collection, maintenance and cadmium exposure

G. roeseli females uninfected and infected by *P. minutus* were collected in April 2011 by pond net in the French Nied River (Rémilly, North-eastern France, 49° 00′ N and 6° 23′ E), where cadmium concentrations were less than 0.2 µg.L^{-1} (LADROME laboratory, Valence, France). *P. minutus* were easily identified in the field since the cystacanth stage appears as an intense orange dot through the cuticle, while microsporidian parasites *D. roeselum* are mainly localized in the gonadal tissues and are therefore "hidden" for observers. Experiments were therefore made in blind for *D. roeselum* infection whose detection was carried out afterward (see 2.3 for methods). We sampled 600 females infected with *P. minutus* and 600 females uninfected with this parasite. Female gammarids were sorted in field thanks to the sexual dimorphism on gnathopod size. Animals were transferred to the laboratory in large containers filled with river water, acclimated 5 days at 15°C in EDTA-free Elendt M4 solution, and fed *ad libitum* with alder leaves.

Test solutions were prepared using EDTA-free Elendt M4 solution with addition of $CdCl_2$ to obtain three cadmium conditions: 0, 2 and 8 µg Cd.L^{-1} (respectively control, C1 and C2 treatments). These concentrations were defined according to Gismondi et al. [6]. The two sets of females (infected or not by *P. minutus*) were divided in three sub-sets, each exposed at 15°C for 96hrs at one cadmium concentration in aquaria previously saturated during 5 days to avoid cadmium adsorption. After the exposure, gonadal tissue of each individual was dissected and stored at -80°C awaiting DNA extraction. In addition, in series infected with *P. minutus*, the acanthocephalan was removed and stored at -80°C awaiting markers analysis. All gammarid bodies were individually frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C awaiting the biomarkers analysis.

4.2. Determination of D. roeselum presence

After the DNA extraction from the gonads, the microsporidian status of each *G. roeseli* individual (i.e. presence or absence of *D. roeselum*) was determined using a PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method, as described in Haine et al. [29]. The PCR products were digested by the restriction enzyme *Bst1107I* following the manufacturer's instructions (MBI Fermentas) in order to identify specifically the presence of *D. roeselum*. Four different groups (thereafter called infection status) were then established:

(i) uninfected females (U females), (ii) *P. minutus*-infected females (*Pm* females), (iii) *D. roeselum*-infected females (*Dr* females) and (iv) co-infected females (*Pm*/*Dr* females). A few females were found infected by another vertically-transmitted microsporidia (*Dictyocoela muelleri*, see Gismondi et al. [6]). Since the sample size was too small to allow a statistical analysis of biomarker results (n = 21 among females infected with *P. minutus* and n = 48 among uninfected females), they were removed from further analyses.

4.3. Biomarker measurement in G. roeseli

Assaying antitoxic defences is impossible to perform on individual gammarids, a minimum number of six gammarids being necessary to have enough tissues to analyse. The number of replicates was therefore calculated from the minimal sample size obtained for a given infection status. The lower sample size obtained was n = 40 for *Dr* females in the C2 treatment. Therefore, for each exposure condition, 6 replicates of 6 individuals with the same infection status were made to measure energy reserves and antitoxic defences as described below. For series with large sample size (e.g. uninfected females) the 36 animals used for these measures were taken at random.

4.3.1. Sample preparation

Each replicate was homogenized with a manual Potter Elvejhem tissue grinder in 50 mM phosphate buffer KH_2PO_4/K_2HPO_4 (pH 7.6) supplemented with 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) and 1 mM L-serine-borate mixture as proteases inhibitors, and 5 mM phenylglyoxal as a γ-glutamyl transpeptidase inhibitor. The homogenization buffer was adjusted at a volume two-fold the wet weight of the sample pool (e.g. 200 µL of homogenization buffer for 100 mg of wet weight tissue). The total homogenate was divided into seven parts to measure the different parameters. For each replicate, two independent measures were made for each biomarker.

4.3.2. Energy reserves

The measurement of total lipid and glycogen contents was adapted from Plaistow et al. [49]. Twenty microlitre of 2% sodium sulphate (w/v) and 540 µL of chloroform/methanol 1:2 (v/v) were added to 40 µL of the total homogenate. After 1hr on ice, the samples were

centrifuged at 3,000 x g for 5 min at 4°C. The resulting supernatant and the pellet were used to determine the total lipid and glycogen contents, respectively.

One hundred microlitre of the supernatant were transferred into culture tubes and placed in a dry bath at 95°C to evaporate the solvent. Then, 200 µL of 95% sulphuric acid were added in each tube and left for 10 min. The culture tubes were cooled in ice and then 4.8 mL of phosphovanillin reagent were added. After a 10-min reaction, the optical density was measured at 535 nm. Commercial cholesterol was used as a standard and total lipid contents were expressed in $mg.mL^{-1}$.

Total dissolution of the pellet was performed in 400 µL of deionized water for 10 minutes in an ultrasonic bath. One hundred microlitre of each sample were placed into culture tubes and 4.9 mL of Anthrone reagent were added. The mixture was placed in a dry bath at 95°C for 17 min and then cooled on ice. Optical density was measured at 625 nm. Glucose was used as a standard and concentrations were expressed in $µg.mg^{-1}$ tissue.

The total protein content of each sample was quantified according to Bradford [50] with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Results were expressed in $mg.mL^{-1}$.

4.3.3. Antitoxic defence capacities

4.3.3.1. GSH concentration and GCL activity

Reduced glutathione (GSH) concentration was adapted from Leroy et al. [51] using High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) separation. The proteins of 40 µL of the total homogenate were precipitated with 10% perchloric acid (v/v). After a 10-min centrifugation at 20,000 x g at 4°C, the resulting supernatant was diluted 40-fold in 0.1 M HCl. Commercial GSH diluted in 0.1 M HCl was used as a standard and GSH concentrations were expressed in nmol $GSH.mg^{-1}$ protein.

GCL activity was assayed using an HPLC method adapted from Parmentier et al. [52]. Measurements were carried out on the S12000 fraction obtained after centrifuging 40 µL of the total homogenate for 15 min at 500 x *g* and then centrifuging the resulting supernatant at 12,000 x g and 4°C for 30 min. The resulting S12000 fraction was diluted 20-fold in the homogenization buffer and 40 µL of this diluted solution were added to 112 µL of incubation cocktail (0.5 M Tris-HCl, 200 mM $MgCl_2,6H_2O$, 500 mM KCl, 45 mM glutamic acid, 90 mM cysteine, 1 mM DTT, 90 mM ATP, 0.5 mM phenylglyoxal, pH 8.25) to initiate the reaction. After a 20 min-incubation period at 25°C, the reaction was stopped by a four-fold

dilution with 0.1 M HCl. Commercial glutamylcysteine (GC) solution prepared in 0.1 M HCl was used as a standard and GCL activity was expressed in nmol GC.min^{-1}.mg^{-1}protein.

4.3.3.2. Metallothionein assay

Metallothionein (MT) concentrations were determined with an HPLC method adapted from Alhama et al. [53]. Forty microlitre of the total homogenate were centrifuged at 3,500 x g for 10 min. The resulting supernatant was centrifuged at 22,000 x g for 30 min and 4°C to obtain the S22000 fraction. A ten-fold dilution of the S22000 fraction was prepared in 100 mM Tris buffer (pH 9.5) supplemented with 1 mM DTT and 100 mM PMSF as a protease inhibitor. To reduce and denature the protein, 125 µL of diluted sample were added to 108 µL of incubation cocktail (230 mM Tris pH 9.5, 300 mM DTT, 100 mM EDTA and 10% sodium dodecyl sulfate) in a water bath at 70°C for 20 min. Then, the incubation mixture was supplemented with 17 µL of 180 mM monobromobimane (mBBr) and incubated in the dark at room temperature for 15 min, to mark MTs. Commercial rabbit-liver MT I solution prepared in 230 mM Tris, pH 9.5, was used as a standard and MT concentrations were expressed in nmol MT.mg^{-1} protein.

4.3.3.3. Carotenoïds concentrations

Carotenoïds concentrations were measured by spectrophotometry method adapted from Rauque and Semenas [54]. Fifty microlitre of the total homogenate were diluted in 450 µL of ethanol 96% and kept 6 hrs in the dark at 4°C, before being centrifuged 10 min at 3,500 x g. Optical density of the resulting supernatant was measured at 422, 448 and 476 nm using a commercial mixture of carotenoïds as a standard. Carotenoïds concentrations were expressed in ng carotenoïds.mg^{-1} lipid.

4.3.3.4. Biomarker of toxic effect

Malondialdehyde (MDA) levels were measured using an HPLC method adapted from Behrens and Madère [55] with UV detection at 267 nm. Seventy microlitre of the total homogenate were diluted four-fold with 95% ethanol (HPLC grade) and cooled on ice for 1.5 hrs to deproteinize them. The mixture was then centrifuged at 18,000 x g for 30 min at 4°C. One hundred microlitre of the resulting supernatant were injected into the HPLC separation system. MDA levels were expressed in ng MDA.mg^{-1} lipid.

For the MDA measurement in *P. minutus*, four replicates of 5 cystacanths of *P. minutus* were pooled according to the infection status of their respective hosts (e.g. single or double parasitism), for each cadmium conditions. Each replicate were crushed in 350 µL of ethanol 95% and kept 1.5 hrs on ice. The measurement was then performed as described above.

4.4. Integrated Biomarker Response

To enable a global view of the effect of the interaction parasite/cadmium, an Integrated Biomarkers Response was estimated according to the method of Beliaeff and Burgeot [56]. Only antitoxic defence responses were taken into account in the IBR estimation. The IBR estimation was briefly described here. The mean (m) and the standard deviation (s) of each biomarker were calculated for all exposure conditions; then, data were standardized for each exposure condition: $Y = (X-m)/s$, where Y represented the standardized value and X is the mean of each biomarker for each exposure conditions. Standardized values allow estimating Z which is equal at $+Y$ when biomarker was increased and $-Y$ in the case of a decrease. Then, the minimum value for all exposure condition of each biomarker was obtained, and was added to Z, to obtained the score S: $S = Z + |\min|$. Finally, the IBR value for each exposure condition was determined, thanks to the following formula, where n represented the number of biomarkers:

$$IBR = ½ \sin(2\pi/n) \times S_1 \times S_2 + \ldots + ½ \sin(2\pi/n) \times S_{n-1} \times S_n$$

4.5. Statistical analysis

Our data meet the normality and the variance homogeneity conditions. Comparisons were performed by using an ANOVA test, followed by post-hoc HSD Tukey test.

All tests were performed using R 2.9.0 and were two-tailed with significant differences considered at the level of p-values < 0.05.

***Acknowledgments**: This study was supported by the French Ministry of Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) we sincerely thanks here. The present work takes part of the research program EC2CO (ECosphère COntinentale et CÔtière).*

REFERENCES

1. Vasseur P, Leguille C (2004) Defense systems of benthic invertebrates in response to environmental stressors. Environ Toxicol 19: 433–436. DOI:10.1002/tox.20024.

2. Allan IJ, Vrana B, Greenwood R, Mills GA, Roig B, et al. (2006) A "toolbox" for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. Talanta 69: 302–322. DOI:10.1016/j.talanta.2005.09.043.

3. Sures B (2004) Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. Trends in Parasitology 20: 170–177. DOI:10.1016/j.pt.2004.01.014.

4. Marcogliese DJ, Pietrock M (2011) Combined effects of parasites and contaminants on animal health: parasites do matter. Trends in Parasitology 27: 123–130. DOI: 10.1016/j.pt.2010.11.002.

5. Marcogliese DJ, Brambilla LG, Gagn F, Gendron AD (2005) Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch *Perca flavescens*. Dis Aquat Org 63: 77–84. DOI:10.3354/dao063077.

6. Minguez L, Meyer A, Molloy DP, Giambérini L (2009) Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Importance in ecotoxicological studies. Environ Res 109: 843–850. DOI: 10.1016/j.envres.2009.07.012.

7. Gismondi E, Rigaud T, Beisel J-N, Cossu-Leguille C (2012) Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a gammarid. Environ Pollut 160: 17–23. DOI:10.1016/j.envpol.2011.09.021.

8. Pedersen AB, Fenton A (2007) Emphasizing the ecology in parasite community ecology. Trends in Ecology & Evolution 22: 133–139. DOI:10.1016/j.tree.2006.11.005.

9. Rigaud T, Perrot-Minnot M-J, Brown MJF (2010) Parasite and host assemblages: embracing the reality will improve our knowledge of parasite transmission and virulence. P Roy Soc Lond B Bio 277: 3693 – 3702. DOI:10.1098/rspb.2010.1163.

10. Brown SP, Hochberg ME, Grenfell BT (2002) Does multiple infection select for raised virulence? Trends in Microbiology 10: 401–405.

11. Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. P Natl Acad Sci-Biol 100: 1803 –1807. DOI:10.1073/pnas.0335320100.

12. Kunz PY, Kienle C, Gerhardt A (2010) *Gammarus* spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: toward integrated multilevel tests. In: Whitacre DM, editor. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 205. New York, NY: Springer New York, Vol. 205. pp. 1–76. Available:http://www.springerlink.com.gate1.inist.fr/content/u745tl5221455g70/. Accessed 28 October 2011.

13. Cezilly F, Gregoire A, Bertin A (2000) Conflict between co-occurring manipulative parasites? An experimental study of the joint influence of two acanthocephalan parasites on the behaviour of *Gammarus pulex*. Parasitology 120: 625–630.

14. Haine ER, Boucansaud K, Rigaud T (2005) Conflict between parasites with different transmission strategies infecting an amphipod host. P Roy Soc Lond B Biol 272: 2505 –2510. DOI:10.1098/rspb.2005.3244.

15. Bauer A, Trouvé S, Grégoire A, Bollache L, Cézilly F (2000) Differential influence of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) on the behaviour of native and invader gammarid species. Int J Parasitol 30: 1453–1457. DOI: 10.1016/S0020-7519(00)00138-7.

16. Hynes HBN, Nicholas WL (1963) The importance of the acanthocephalan *Polymorphus minutus* as a parasite of domestic ducks in the United Kingdom. J Helminthol 37: 185–198. DOI:10.1017/S0022149X00003771.

17. Kennedy CR (2006) Ecology of the Acanthocephala. Cambridge Univ Pr. p.249

18. Lagrue C, Kaldonski N, Perrot-Minnot MJ, Motreuil S, Bollache L (2007) Modification of hosts' behavior by a parasite: field evidence for adaptive manipulation. Ecology 88: 2839–2847.

19. Cezilly F, Gregoire A, Bertin A (2000) Conflict between co-occurring manipulative parasites? An experimental study of the joint influence of two acanthocephalan parasites on the behaviour of *Gammarus pulex*. Parasitology 120: 625–630.

20. Perrot-Minnot M-J (2004) Larval morphology, genetic divergence, and contrasting levels of host manipulation between forms of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). Int J Parasitol 34: 45–54. DOI:10.1016/j.ijpara.2003.10.005.

21. Médoc V, Bollache L, Beisel J-N (2006) Host manipulation of a freshwater crustacean (*Gammarus roeseli*) by an acanthocephalan parasite (*Polymorphus minutus*) in a biological invasion context. Int J Parasitol 36: 1351–1358. DOI: 10.1016/j.ijpara.2006.07.001.

22. McCahon CP, Maund SJ, Poulton MJ (1991) The effect of the acanthocephalan parasite (*Pomphorhynchus laevis*) on the drift of its intermediate host (*Gammarus pulex*). Freshwater Biol 25: 507–513.

23. Maynard B, Wellnitz T, Zanini N, Wright W, Dezfuli B (1998) Parasite-altered behavior in a crustacean intermediate host: field and laboratory studies. J Parasitol 84: 1102–1106.

24. Dezfuli BS, Giari L, Arrighi S, Domeneghini C, Bosi G (2003) Influence of enteric helminths on the distribution of intestinal endocrine cells belonging to the diffuse endocrine system in brown trout, *Salmo trutta* L. J Fish Dis 26: 155–166.

25. Médoc V, Rigaud T, Bollache L, Beisel J-N (2009) A manipulative parasite increasing an antipredator response decreases its vulnerability to a nonhost predator. Anim Behav 77: 1235–1241. DOI: 10.1016/j.anbehav.2009.01.029.

26. Beisel J-N, Médoc V (2010) Bird and amphipod parasites illustrate a gradient from adaptation to exaptation in complex life cycle. Etho Ecol Evol 22: 265–270. DOI:10.1080/03949370.2010.502321.

27. Dianne L, Perrot-Minnot M, Bauer A, Gaillard M, Léger E, et al. (2011) Protection first then facilitation: a manipulative parasite modulates the vulnerability to predation of its intermediate host according to its own developmental stage. Evolution 65: 2692–2698. DOI:10.1111/j.1558-5646.2011.01330.x.

28. Gismondi E, Cossu-Leguille C, Beisel J-N Does the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* modify the energy reserves and antitoxic defences of its intermediate host *Gammarus roeseli*? Parasitology. In press.

29. Bollache L, Rigaud T, Cézilly F (2002) Effects of two acanthocephalan parasites on the fecundity and pairing status of female *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). J Invertebr Pathol 79: 102–110. DOI: 10.1016/S0022-2011(02)00027-7.

30. Haine ER, Brondani E, Hume KD, Perrot-Minnot M-J, Gaillard M, et al. (2004) Coexistence of three microsporidia parasites in populations of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli*: evidence for vertical transmission and positive effect on reproduction. Int J Parasitol 34: 1137–1146. DOI:10.1016/j.ijpara.2004.06.006.

31. Rigaud T, Haine ER (2005) Conflict between co-occurring parasites as a confounding factor in manipulation studies? Behav processes 68: 259–262.

32. Jones E, White A, Boots M (2007) Interference and the persistence of vertically transmitted parasites. J Theoretical Biol 246: 10–17.

33. Bigot A, Minguez L, Giambérini L, Rodius F (2011) Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: Transcriptional and histochemical studies. Environ Toxicol 26: 623–632. DOI:10.1002/tox.20599.

34. Roesijadi G (1992) Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Aquat Toxicol 22: 81–113. DOI:16/0166-445X(92)90026-J.

35. Gilchrist BM, Lee WL (1972) Carotenoid pigments and their possible role in reproduction in the sand crab, *Emerita analoga* (Stimpson, 1857). Comp Biochem Phys B 42: 263–294. DOI:10.1016/0305-0491(72)90273-8.

36. Palozza P, Krinsky NI (1992) Antioxidant effects of carotenoids in Vivo and in Vitro: An overview. Carotenoids Part A: Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation. Academic Press, Vol. Volume 213. pp. 403–420. Available:http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799213142K.

37. Sparkes TC, Keogh DP, Pary RA (1996) Energetic costs of mate guarding behavior in male stream-dwelling isopods. Oecologia 106: 166–171. DOI:10.1007/BF00328595.

38. 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. DOI:10.1111/j.1365-2427.1985.tb00215.x.

39. Baudrimont M, de Montaudouin X (2007) Evidence of an altered protective effect of metallothioneins after cadmium exposure in the digenean parasite-infected cockle (*Cerastoderma edule*). Parasitology 134: 237–245. DOI:10.1017/S0031182006001375.

40. Sures B, Radszuweit H (2007) Pollution-induced heat shock protein expression in the amphipod *Gammarus roeseli* is affected by larvae of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). J Helminthol 81: 191–197. DOI:10.1017/S0022149X07751465.

41. Lohr JN, Yin M, Wolinska J (2010) Prior residency does not always pay off–co-infections in *Daphnia*. Parasitology 137: 1493–1500. DOI:1017/S0031182010000296.

42. Ben-ami F, Rigaud T, Ebert D (2011) The expression of virulence during double infections by different parasites with conflicting host exploitation and transmission strategies. J Evolution Biol 24: 1307–1316. DOI:10.1111/j.1420-9101.2011.02264.x.

43. Thomas MB, Watson EL, Valverde-Garcia P (2003) Mixed infections and insect–pathogen interactions. Ecol Lett 6: 183–188. DOI:10.1046/j.1461-0248.2003.00414.x.

44. Hughes WOH, Boomsma JJ (2004) Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. P Roy Soc Lond B Bio 271: S104–S106. DOI:10.1098/rsbl.2003.0115.

45. Haine ER (2008) Symbiont-mediated protection. P Roy Soc Lond B Bio 275: 353 –361. DOI:10.1098/rspb.2007.1211.

46. Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, et al. (2009) A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. Cell 139: 1268–1278. DOI:10.1016/j.cell.2009.11.042.

47. Médoc V, Beisel J-N (2009) Field evidence for non-host predator avoidance in a manipulated amphipod. Naturwissenschaften 96: 513–523. DOI:10.1007/s00114-008-0503-8.

48. Gismondi E, Cossu-Leguille C, Beisel J-N Acanthocephalan parasites: help or burden in Gammarid amphipods exposed to cadmium? Ecotoxicology. In press.

49. Jones EO, White A, Boots M (2010) The evolutionary implications of conflict between parasites with different transmission modes. Evolution 64: 2408–2416. DOI:10.1111/j.1558-5646.2010.00992.x.

50. Plaistow SJ, Troussard J-P, Cézilly F (2001) The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. Int J Parasitol 31: 346–351. DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00115-1.

51. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

52. Leroy P, Nicolas A, Wellmann M, Michelet F, Oster T, et al. (1993) Evaluation of *o*-phthalaldehyde as bifunctional fluorogenic post-column reagent for glutathione in LC. Chromatographia 36: 130–134. DOI:10.1007/BF02263849.

53. Parmentier C, Leroy P, Wellman M, Nicolas A (1998) Determination of cellular thiols and glutathione-related enzyme activities: versatility of high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetric detection. J Chromatogr B 719: 37–46. DOI: 10.1016/S0378-4347(98)00414-9.

54. Alhama J, Romero-Ruiz A, Lopez-Barea J (2006) Metallothionein quantification in clams by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization. J Chromatogr A 1107: 52–58. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.11.057.

55. Rauque CA, Semenas L (2009) Effects of two acanthocephalan species on the reproduction of *Hyalella patagonica* (Amphipoda, Hyalellidae) in an Andean Patagonian Lake (Argentina). J Invertebr Pathol 100: 35–39. DOI: 10.1016/j.jip.2008.10.001.

56. Behrens W, Madère R (1991) Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography. Lipids 26: 232–236. DOI: 10.1007/BF02543977.

57. Beliaeff B, Burgeot T (2002) Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. Environ Toxicol Chem 21: 1316–1322. DOI:10.1002/etc.5620210629.

CHAPITRE IV

DISCUSSION GENERALE

L'objectif général de notre étude consistait à appréhender l'impact de la présence de parasites sur les réponses des défenses antitoxiques et des réserves énergétiques du gammare, hôte intermédiaire ou définitif selon le parasite, soumis ou non à un stress chimique. Cette démarche avait pour but de mieux comprendre l'interaction hôte-parasite lors de stress environnementaux. Les travaux ont porté sur l'étude d'éléments de la défense antitoxique tels que le glutathion réduit, les métallothionéines ou encore les caroténoïdes, mais aussi par l'étude des réserves énergétiques (lipides, glycogène et protéines), indispensables pour tout fonctionnement du métabolisme, chez l'amphipode *Gammarus roeseli* parasité par un acanthocéphale *Polymorphus minutus* $^{et}/_{ou}$ des microsporidies, exposés ou non au cadmium.

Une différence interspécifique de l'impact du parasite sur les réponses physiologiques de *G. roeseli* a été observée au travers de nos différentes expérimentations en absence de stress chimique. Nos résultats mettent en évidence que l'espèce *Polymorphus minutus*, transmis horizontalement, induit une diminution des capacités de défenses antitoxiques, des réserves énergétiques (à l'exception du taux de glycogène qui est augmenté) et des dommages cellulaires. En revanche, la présence des microsporidies *Dictyocoela roeselum* ou *D. muelleri*, dont le mode de transmission est vertical, n'induisent aucune modification des différents paramètres étudiés. Il apparait clairement ici, que le mode de transmission du parasite, en lien avec sa virulence, n'a pas la même influence sur les capacités de défenses antitoxiques de l'hôte.

Polymorphus minutus utilise *G. roeseli* comme hôte intermédiaire afin d'être transmis à son hôte final, un oiseau d'eau (Hynes et Nicholas, 1963). Ce parasite est connu pour exercer une forte virulence sur *G. roeseli* chez qui il induit des changements comportementaux qui aboutissent à une surexposition de l'hôte parasité à l'hôte définitif (Médoc *et al.*, 2006; 2009). En effet, en diminuant le géotactisme de *G. roeseli*, *P. minutus* s'assure que le gammare nage majoritairement à la surface de l'eau, favorisant ainsi sa transmission par voie trophique vers son hôte définitif. Il a également été démontré par Plaistow *et al.* (2001) que cet acanthocéphale modifiait les réserves énergétiques de *G. roeseli* en diminuant les teneurs en lipides et en augmentant les niveaux de glycogène. Ceci rejoint les résultats obtenus au cours de nos expérimentations. L'absorption des réserves énergétiques par *P. minutus* lui permet de se développer et de maintenir son métabolisme au sein de l'hémocoele de *G. roeseli* (Taraschewski, 2000). Cependant, ce phénomène aboutit à une diminution des réserves énergétiques de *G. roeseli*, ce qui pourrait alors avoir des

conséquences sur son métabolisme et sa survie. Nos résultats suggèrent que la diminution des réserves énergétiques observée chez *G. roeseli* infectés par *P. minutus* pourrait être la cause d'une diminution de synthèse du glutathion réduit, aboutissant à une concentration plus faible du tripeptide. En effet, la synthèse du GSH, réalisée par la γ-glutamylcystéine ligase, est coûteuse en énergie, du fait de l'intervention de deux réactions enzymatiques successives ATP-dépendantes (Meister and Anderson, 1983). Une diminution des réserves énergétiques, par la présence de *P. minutus*, conduirait *G. roeseli* à allouer moins d'énergie aux défenses antitoxiques, ce qui le rendrait potentiellement plus sensible aux stress environnementaux. Cependant, cela semble être en contradiction avec le besoin du parasite de garder son hôte en vie pour sa propre survie mais aussi afin d'être transmis. D'autres études ont démontré une diminution de certaines défenses antitoxiques chez des organismes parasités. Par exemple, Cornet *et al.* (2009) ont mesuré une plus faible activité prophénoloxydase (reflétant le système immunitaire d'un crustacé) chez *Gammarus pulex* infectés par l'un des trois acanthocéphales suivant: *Pomphorhynchus laevis*, *P. tereticollis* ou *Polymorphus minutus*. De même Minguez *et al.* (2009) ont mis en évidence une diminution de la quantité de lysosomes chez le bivalve *Dreissena polymorpha* parasités par des bactéries, des ciliés ou des trématodes. Nos résultats et ces études souligneraient donc que la présence de parasites aurait un effet négatif sur les défenses antitoxiques de l'hôte, et que sa sensibilité à une contamination serait alors modifiée. Ceci pourrait donc aboutir à une conséquence néfaste sur la population et donc sur l'écosystème et son fonctionnement. Toutefois, nous avons également révélé que la présence de *P. minutus* diminuait les dommages cellulaires de *G. roeseli* laissant ainsi suggérer que le parasite, bien qu'il réduise les réserves énergétiques et les capacités de défenses de *G. roeseli*, pourrait avoir un effet « bénéfique » vis-à-vis de son hôte, et ce, quel que soit le sexe.

Contrairement aux individus sains, où une différence inter-sexe a pu être observée sur les niveaux de bases des biomarqueurs étudiés, nous avons mis en évidence une homogénéité des concentrations des défenses antitoxiques et des réserves énergétiques entre *G. roeseli* mâles et femelles parasités par *P. minutus*. En effet, lors de notre suivi saisonnier, nous avons démontré chez des individus sains que les femelles avaient de plus fortes concentrations en GSH ainsi que de plus fortes teneurs en lipides et glycogène que les mâles, quel que soit le mois d'échantillonnage. Ce résultat est en accord avec une précédente étude menée au laboratoire, où les auteurs avaient mesuré de plus fortes activités glutathion-peroxydase sélénium dépendante et de plus fortes concentrations en lipides et glycogène chez *G. roeseli* femelles, quelle que soit la saison (Sroda et Cossu-Leguille, 2011b). Toutefois, la présence de

P. minutus semble réduire les différences entre mâles et femelles, au niveau des réserves énergétiques et des capacités de défenses, quel que soit le mois d'étude. Ceci pourrait être expliqué par la castration des femelles provoquée par la présence de *P. minutus* (Bollache *et al.*, 2002), qui conduirait à une réorganisation de l'allocation énergétique, et notamment à un besoin moindre en énergie pour la reproduction. Il est à noter toutefois que nos mesures n'ont été réalisées que sur une courte période, à savoir mai, juin et août, correspondant à la période de fortes prévalences de *P. minutus* chez *G. roeseli* (0.08 en mai et 0.13 en août - Médoc et Beisel, 2009). Cette homogénéité des niveaux de défenses antitoxiques de *G. roeseli* en présence du parasite acanthocéphale laisserait présager une sensibilité identique entre les mâles et les femelles lors d'un stress environnemental, contrairement à la différence de sensibilité inter-sexe observée chez les individus non-parasités notamment, dans le cas de notre étude, lors d'un stress cadmié. En effet, en absence de *P. minutus*, nous avons démontré que les femelles exposées au cadmium avaient une $CL_{50\text{-}96h}$ supérieure à celle des mâles, traduisant une plus faible sensibilité des femelles. Les fortes capacités de défenses antitoxiques mesurées au cours de notre suivi saisonnier et les activités élevées d'enzymes antioxydantes mesurées par Sroda et Cossu-Leguille (2011) chez *G. roeseli* femelles non-parasitées expliqueraient une meilleure défense de ces dernières et donc une plus grande tolérance au cadmium que les mâles non-parasités. Toutefois, en présence de *P. minutus*, les $CL_{50\text{-}96h}$ mesurées chez les individus parasités exposés au cadmium ont également mis en évidence une différence inter-sexe, réfutant ainsi notre hypothèse d'une sensibilité identique. En effet, la $CL_{50\text{-}96h}$ des mâles parasités était plus élevée que celle des femelles, témoignant d'une moindre sensibilité des mâles parasités au cadmium. Ainsi, les seuls niveaux de capacités de défenses et des réserves énergétiques ne suffisent pas à prédire et/ou expliquer les différences de sensibilités à un stress selon le sexe des individus. La présence de *P. minutus* modifie donc la résistance de l'hôte face à un stress environnemental, comme cela a été démontré par McCahon *et al.* (1988) et Brown et Pascoe (1989), où des individus *Gammarus pulex* infectés par un autre parasite acanthocéphale *Pomphorhynchus laevis*, étaient moins résistants que les individus non-parasités, lors d'une exposition au cadmium. Toutefois, la séparation des sexes n'ayant pas été effectuée, aucune information n'est disponible sur une éventuelle différence de sensibilité entre mâles et femelles dans cette association hôte-parasite.

Le résultat obtenu chez *G. roeseli* mâles dans notre étude souligne un effet « bénéfique » de la présence de *P. minutus* et suggérerait un effet « protecteur » de ce dernier. L'acanthocéphale serait donc capable d'aider son hôte à faire face à un stress

environnemental afin de permettre la survie de celui-ci ce qui favoriserait sa transmission à l'hôte final. A l'inverse, chez les femelles, *P. minutus* accentuerait l'effet toxique du polluant. Cependant, les femelles étant également l'hôte de microsporidies, la différence observée ici pourrait s'expliquer par une co-infection. Cette hypothèse n'a toutefois pas pu être vérifiée lors de la détermination de la $CL_{50\text{-}96h}$, puisque la fragilité des tissus après la mort du gammare ne permettait pas le prélèvement des gonades.

La bioaccumulation du cadmium par *G. roeseli* et *P. minutus* pourrait expliquer les différences de sensibilité observées. De nombreuses études ont démontré l'accumulation de cadmium par les amphipodes, notamment chez *Gammarus pulex* (Stuhlbacher et Maltby, 1992; Felten et al., 2008; Vellinger et al., 2012), *Gammarus locustra* (Clason et Zauke, 2000), ou encore *Gammarus oceanicus* (Zauke et al., 2003). Nos résultats ont révélé une accumulation de cadmium plus faible chez les gammares parasités mâles et femelles en comparaison aux gammares non-parasités, traduit par un plus faible facteur de bioaccumulation. Ceci pourrait expliquer la faible mortalité des mâles parasités par rapport aux mâles non-parasités, et le phénomène « protecteur » de *P. minutus*. Une plus faible concentration de cadmium dans l'organisme engendre moins de dommages cellulaires et donc une meilleure survie de l'individu. Cependant, les femelles parasitées, même si elles bioaccumulent moins le cadmium que les femelles saines, sont plus sensibles à ce stress. Les plus faibles concentrations de cadmium mesurées chez *G. roeseli* mâles et femelles parasités par rapport aux individus sains ont été attribuées à l'accumulation de ce métal par *P. minutus*, directement dans l'hémocoele du gammare. Néanmoins, la différence entre la concentration de cadmium mesurée chez les gammares sains et celle retrouvée chez les gammares parasités (après retrait du parasite) ne correspond pas à la concentration de cadmium mesurée chez *P. minutus*, ce qui suggère que le parasite n'a pas pris en charge la totalité du cadmium. *P. minutus* pourrait donc modifier le processus d'osmorégulation du gammare, comme cela a été démontré chez *G. pulex* infectés par *P. minutus* (Brooks et Mills, 2011), aboutissant à une altération des échanges entre le milieu extérieur et l'organisme au niveau des branchies. Par ailleurs, la différence de bioaccumulation et de sensibilité des individus parasités pourrait être la conséquence d'une modification de la mobilisation des défenses antitoxiques de l'hôte par la présence du parasite.

A l'inverse de l'acanthocéphale *P. minutus*, les microsporidies *D. roeselum* et *D. muelleri* ont un cycle monoxène et sont transmises de la mère aux juvéniles (Terry *et al.*, 2004), ce qui les rend totalement dépendantes de la survie et de la reproduction de leur hôte.

Cette double dépendance amène les microsporidies à avoir une faible virulence envers *G. roeseli*, mise en évidence dans notre étude par une absence d'effets sur les concentrations des différents biomarqueurs de défenses antitoxiques et des réserves énergétiques mesurées. L'absence d'effet permettrait alors une meilleure survie de *G. roeseli* et garantirait ainsi une meilleure transmission des microsporidies (Dunn *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 2003; Smith, 2009). Toutefois, ce résultat reste surprenante si nous tenons compte du fait qu'un parasite ne peut se développer et vivre qu'en utilisant une partie des réserves énergétiques de son hôte. Les microsporidies, dépourvues de mitochondries, sont totalement dépendantes du métabolisme de leur hôte (Wittner et Weiss, 1999). Il a été démontré que les microsporidies infectant le crustacé *Carcinus mediterraneus* et celles infectant quatre poissons marins et d'eaux douces possédaient des lipides membranaires identiques à leurs hôtes respectifs (Vivarès *et al.*, 1980 ; Biderre *et al.*, 2000) laissant présager l'utilisation des lipides de l'hôte par le parasite pour son métabolisme. De plus, Méténier et Vivarès (2001) ont mis en évidence chez des spores de l'espèce *Nosema*, l'existence de cinq enzymes actives et fonctionnelles du processus de la glycolyse. Ces éléments vont à l'encontre de l'absence d'effets des microsporidies sur les réserves énergétiques de leur hôte, aussi nous pensons que les microsporidies utilisent les réserves énergétiques de *G. roeseli*, mais que celui-ci est capable de compenser ce coût parasitaire, en absence de stress, par exemple en augmentant son taux d'alimentation ou en limitant son activité locomotrice. Le coût énergétique induit par les microsporidies ne peut cependant pas toujours être compensé par l'hôte, et parait être fonction du mode de transmission des microsporidies. En effet, Rivero *et al.* (2007) ont observé une diminution des taux de lipides et glycogène chez la larve du moustique *Aedes aegypti* infectée par *Vavraia culicis*, microsporidie à transmission horizontale. Au vue de nos résultats en absence de stress, nous ne pouvons conclure quant à une éventuelle augmentation ou diminution de la sensibilité de *G. roeseli* lors de contaminations environnementales. L'absence de modifications des réserves énergétiques et des capacités de défenses antitoxiques de *G. roeseli* nous conduirait à émettre l'hypothèse que les individus parasités par ces microsporidies auraient une capacité de défense potentiellement identique à celle des individus non-infectés. En revanche, contrairement à l'influence de *P. minutus* qui a pu être étudiée à la fois chez *G. roeseli* mâles et femelles, l'impact des microsporidies à transmission verticale n'a pu être mesuré que chez les femelles, car aucun des mâles prélevés sur notre site d'échantillonnage, ne présentaient d'infection microsporidienne, quelle que soit la saison. Il ne nous a donc pas été permis de conclure quant à l'effet des microsporidies en fonction du sexe de l'hôte.

L'absence de microsporidies à transmission verticale chez *G. roeseli* mâles de notre site d'échantillonnage rejoint les résultats obtenus par Haine *et al.* (2004) sur deux populations de *G. roeseli* prélevées dans l'Ouche et le Thille, deux rivières de Côte d'Or (France). Sur ces deux sites de prélèvement, seulement 2 à 4% des mâles échantillonnés ont été retrouvés parasités par *D. roeselum* ou *D. muelleri*, contrairement aux femelles dont 30 à 55% sont infectées par l'une ou l'autre de ces espèces. Nos résultats de prévalence ainsi que ceux de Haine *et al.* (2004) corroborent donc une modification du sex-ratio de la population de gammares par les microsporidies à transmission verticale (Haine *et al.*, 2004; 2007). Les microsporidies sont transmises à la descendance par le cytoplasme des gamètes, cependant celui des gamètes mâles n'entre que très peu dans la transmission à la génération suivante, contrairement à celui des gamètes femelles (Dunn et Smith, 2001). Un phénomène de féminisation des mâles permet donc aux microsporidies d'augmenter la proportion de femelles dans la population de gammares et donc d'augmenter leur chance de transmission. Le mécanisme de différenciation sexuelle des amphipodes étant sous le contrôle des hormones de la glande androgène (Charniaux-Cotton et Payen, 1985), une suppression, par les microsporidies, du développement de cette glande chez les juvéniles amènerait à supprimer les hormones responsables du développement des mâles en faveur du développement de femelles (Rigaud *et al.*, 1997; Rodgers-Gray *et al.*, 2004).

Nous avons démontré au cours de nos expérimentations que les réponses des biomarqueurs de défenses antitoxiques de *G. roeseli* femelles étaient influencées par la présence des trois parasites étudiés: *P. minutus*, *D. roeselum* et *D. muelleri*.

Les réponses des biomarqueurs mesurés chez des individus exposés au cadmium sont différentes selon le statut parasitaire de l'hôte (**tableau IV-1**) et dépendent de l'espèce de parasite.

Tableau IV-1: ***Récapitulatif des réponses des biomarqueurs énergétiques, de défenses ou de toxicité après une exposition 96h à deux concentrations de cadmium chez G. roeseli femelles non-parasités, ou parasités par l'un des trois parasites: Polymorphus minutus, Dictyocoela roeselum ou D. muelleri****. GSH : glutathion réduit, GCL : γ-glutamylcystéine ligase, MT : métallothionéines, MDA : malondialdéhyde, - : diminution, -- : forte diminution, --- : très forte diminution, + : augmentation, ++ : forte augmentation, +++ : très forte augmentation, = : inchangé, ND : non déterminé*

		Non-parasités		***P. minutus***		***D. roeselum***		***D. muelleri***	
	Cadmium (µg/L)	2	8	2	8	2	8	2	8
Biomarqueurs énergétiques	Protéines (mg/mL)	=	=	=	=	=	=	--	--
	Lipides (mg/mL)	-	---	--	--	---	-	---	=
	Glycogène (µg/mg tissu)	=	=	--	--	-	--	-	-
Biomarqueurs de défenses	GSH (nmol/mg prot.)	+	+	+	+++	=	=	=	=
	GCL (nmol GC/min/mg prot.)	++	+	=	+	=	+	++	+++
	MT (nmol/mg prot.)	+	++	+	++	+	++	ND	ND
	Caroténoïdes (ng/mg lipides)	-	--	-	-	-	--	ND	ND
Biomarqueurs d'effet toxique	MDA (ng/mg lipides)	+	++	++	+++	++	++	++	++

Les réponses des réserves énergétiques mesurées traduisent une mobilisation énergétique plus importante chez les gammares parasités que chez les individus non-parasités. En absence de parasite, seuls les lipides ont été impactés par l'exposition au cadmium, alors qu'en présence de parasite, les lipides et le glycogène ont été utilisés. Cette diminution énergétique peut s'expliquer par le fait que *G. roeseli* ait besoin d'énergie à allouer à ses systèmes de défenses antitoxiques, notamment pour la synthèse d'éléments antioxydants comme le glutathion, mais aussi pour les activités d'enzymes antioxydantes tels que la catalase ou les glutathion peroxydases (Sroda et Cossu-Leguille, 2011b). Une diminution plus forte en présence de parasites pourrait être due à l'utilisation des réserves énergétiques à la fois par l'hôte et le parasite. Le parasite pourrait utiliser davantage d'énergie pour son propre métabolisme. En effet, il a été observé au cours de nos expériences que *P. minutus* absorbait du cadmium, conduisant à des dommages cellulaires. Cependant, l'étude de Sures et Radszuweit (2007) a démontré que *P. minutus* pouvait synthétiser des protéines de choc thermique lors d'une perturbation thermique ou d'une exposition au palladium, mettant en évidence que le parasite possèderait son propre système de défense nécessitant de l'énergie pour être activé, et donc une utilisation accrue des réserves énergétiques de *G. roeseli*.

Concernant les microsporidies, il n'existe, à notre connaissance, aucune étude mettant en évidence l'existence de systèmes de défenses chez ces parasites. Toutefois, Keeling et Fast (2002) ont démontré que la germination des microsporidies était induite par divers stimuli telles qu'une variation de pH, ou une exposition à des peroxydes. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le cadmium induirait la germination des microsporidies, conduisant ainsi les nouveaux mérontes à se développer en spores, qui est la forme résistante. Ce développement exigerait alors de l'énergie, qui proviendrait des réserves énergétiques de l'hôte.

Cette mobilisation accrue des réserves énergétiques de l'hôte en présence de parasite laisserait penser que lors d'un stress, *G. roeseli* ne serait plus à même d'avoir des capacités de défenses antitoxiques suffisantes, conduisant à une plus forte sensibilité. Cette hypothèse a été vérifiée par la mesure de taux de MDA plus importants chez les femelles parasitées que chez les femelles saines, traduisant des dommages cellulaires plus importants et ce, quelle que soit l'espèce de parasite. Ce résultat reste néanmoins surprenant puisque nous avons déterminé en parallèle, des capacités de défenses antitoxiques plus importantes chez les femelles parasitées.

L'influence du parasitisme sur les défenses antitoxiques de l'hôte exposé au cadmium apparait comme dépendante de l'espèce de parasite. En présence de *P. minutus*, la concentration en glutathion a été fortement augmentée, probablement dû à une augmentation de l'activité de synthèse (*i.e.* activité GCL). En présence de microsporidies, l'activité de synthèse a été augmentée et la concentration de glutathion inchangée. Parmi les défenses antitoxiques mesurées, les métallothionéines et les caroténoïdes semblent être les moins impactés par la présence de parasites, contrairement au glutathion et sa synthèse. Le glutathion étant un élément central dans les systèmes de défenses des organismes, notamment comme substrat d'enzymes antioxydantes, une modification de sa synthèse et de sa concentration, due à la présence de parasites, pourrait conduire à une altération d'autres activités de défenses telles que l'activité des glutathion peroxydases ou de la glutathion-S-transférase. Par ailleurs, il est possible que les modifications observées au niveau de la concentration et de la synthèse du glutathion soit un effet indirect du parasitisme. En effet, nous pouvons supposer que la présence de parasite influencerait les activités enzymatiques glutathion-dépendantes, qui utiliseraient alors moins ou davantage de glutathion, et provoqueraient par conséquent une modification de l'activité de synthèse et de la concentration de ce substrat.

Les écosystèmes aquatiques sont les habitats de nombreuses espèces biologiques, et la présence de multi-parasitisme n'est pas rare (Pedersen et Fenton, 2007; Rigaud *et al.*, 2010); c'est pourquoi, nous nous sommes également intéressés à l'influence d'une co-infection de *G. roeseli* par *P. minutus* et *D. roeselum*.

Haine *et al.* (2005) ont démontré que les microsporidies à transmission verticale pouvaient induire un effet de sabotage de la manipulation comportementale de *P. minutus*. Ainsi, chez *G. roeseli*, la co-infection par *P. minutus* et *D. roeselum* pourrait soit augmenter la sensibilité de l'hôte au cadmium et donc augmenter sa toxicité, soit conduire à une absence d'effet synergétique en cas de sabotage de l'influence de *P. minutus* par *D. roeselum*.

L'«*Integrated Biomarker Response*» (IBR) représenté sur la **figure IV-1** intègre les réponses des biomarqueurs de défenses mesurées chez *G. roeseli* femelles en fonction du statut d'infection et des conditions d'expositions[††]. Cet indice permet de faciliter l'analyse et la comparaison des résultats. Plus la valeur de l'IBR est grande, plus l'effet toxique subit par l'hôte est important. Les différents diagrammes en radar (Annexe 5) mettent en évidence que le glutathion réduit, l'activité GCL et les caroténoïdes sont les biomarqueurs les plus impactés lors d'une exposition au cadmium des femelles saines. Lors d'une mono-infection par *P. minutus*, le glutathion réduit et l'activité GCL sont les plus influencés; tandis que lors d'une mono-infection par *D. roeselum* ou d'une co-infection, l'influence parasitaire est plus remarquée sur les concentrations en glutathion, en métallothionéines et en caroténoïdes.

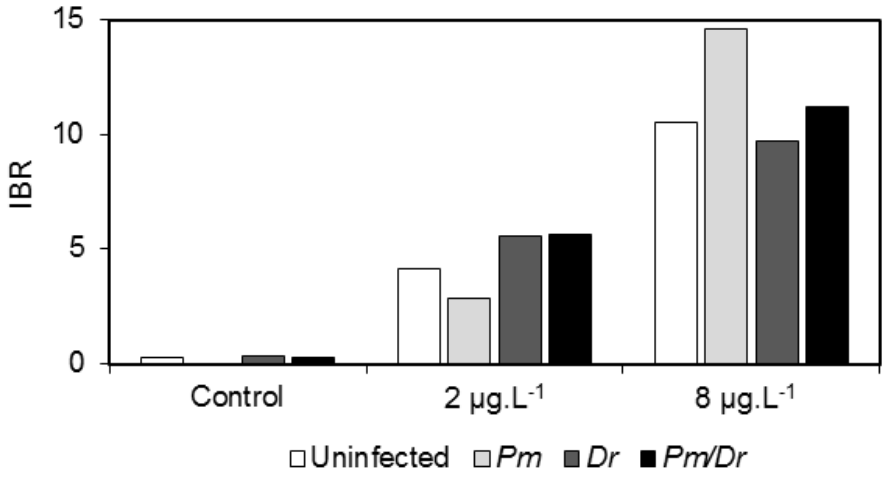


Figure IV-1: Valeur de l'«Integrated Biomarker Response» (IBR) calculée pour chaque condition parasitaire et d'exposition au cadmium. *Uninfected : G. roeseli femelles non-infectées, Pm : G. roeseli femelles infectées par P. minutus seul, Dr : G. roeseli femelles infectées par D. roeselum seule, Pm/Dr : G. roeseli femelles infectées par P. minutus et D. roeselum.*

[††] Cet indice n'intégre pas les réserves énergétiques pouvant être influencées par le status physiologique du gammare. Cependant, le résultat est similaire lors de leur prise en compte dans le calcul de l'IBR.

Il apparait que le cadmium a un effet toxique sur *G. roeseli* selon une relation dose-réponse, quel que soit le statut parasitaire. A la plus faible concentration de cadmium, les femelles infectées par *P. minutus* subissent le moins de stress (*i.e.* faibles variations des biomarqueurs de défenses et des réserves énergétiques par rapport aux femelles non-infectées) par comparaison aux femelles parasitées par *D. roeselum* ou co-infectées, qui étaient les plus stressées (*i.e.* fortes variations des défenses antitoxiques et des réserves énergétiques). A l'inverse, à la plus forte concentration de cadmium, les femelles infectées par *P. minutus* étaient plus stressées que les femelles infectées par *D. roeselum* ou co-infectées. Ces résultats démontrent donc qu'une co-infection de *G. roeseli* femelles par *P. minutus* et *D. roeselum* n'aboutit pas à un effet toxique supérieur à celui mesuré lors d'une mono-infection, bien que les résultats aient démontré de plus forts taux de dommages cellulaires chez les femelles co-infectées exposées à 8 µg Cd/L. Il semblerait alors qu'un conflit entre les deux parasites n'ayant pas le même destin pour leur hôte ait lieu en présence de cadmium, rejoignant ainsi le phénomène de sabotage lié à la présence de *D. roeselum* décrit par Haine et *al.* (2005)

Dans le cas de notre association hôte-parasite, *P. minutus* induit une castration totale des femelles (Bollache *et al.*, 2002), laissant présager qu'aucune transmission verticale des microsporidies n'est possible. L'effet de sabotage permettrait donc aux microsporidies de diminuer ou d'annuler l'influence de l'acanthocéphale sur leur hôte commun. Nous pouvons alors émettre comme hypothèse que l'effet de sabotage de *D. roeselum* sur *P. minutus* conduirait le parasite acanthocéphale à devenir une sorte de parasite «avirulent». Cette hypothèse est supportée par l'absence de dommages cellulaires observée chez *P. minutus* provenant de *G. roeseli* femelles co-infectées et exposées au cadmium. En effet, nous avons démontré qu'en absence de *D. roeselum*, *P. minutus* subissait des dommages membranaires dus à l'absorption de cadmium dans l'hémocoele de l'hôte. Cependant, en présence de *D. roeselum*, aucun n'effet toxique n'a été mesuré chez *P. minutus,* probablement en lien avec une absence d'absorption de cadmium. Ce résultat pourrait alors être expliqué par une absence d'interaction entre *G. roeseli* et *P. minutus,* et donc une absence de virulence de l'acanthocéphale envers son hôte, résultant du phénomène de sabotage induit par *D. roeselum.*

L'absence de manipulation comportementale, observée par Haine *et al.* (2005), a été attribuée à une altération par les microsporidies, de l'effet induit par l'acanthocéphale sur le système sérotonergique du gammare (Helluy et Holmes, 1990). De plus, Rodgers-Gray *et al.*

(2004) ont mis en évidence que les microsporidies pouvaient également perturber la production d'hormones sexuelles circulantes. Au vue de nos résultats et de ces études, nous pouvons supposer que les microsporidies seraient à même de pouvoir perturber les processus physiologiques de leur hôte, mais aussi de l'acanthocéphale présent dans l'hémocoele de leur hôte. La compétition parasitaire, dans un hôte commun, a également été soulignée dans d'autres études. Par exemple, la microsporidie *Octospora bayeri*, après transmission verticale, est capable de résister à la virulence de la bactérie *Pasteuria ramosa* chez *Daphnia magna*, alors que cette dernière réduit le développement de la microsporidie lors d'une infection simultanée de l'hôte (Ben-Ami *et al.*, 2011). Bien que ces précédentes études démontrent des conflits entre parasites ayant des modes de transmission différents, d'autres études les ont mis en évidence lors de co-infection par des parasites possédant le même mode de transmission. Dans leur étude, Thomas *et al.* (2003) ont montré qu'un entomopathogène fongique avirulent pouvait altérer la virulence et la reproduction d'un autre champignon entomopathogène de la même espèce chez le criquet pèlerin, en fonction de l'ordre d'infection. De même, Hughes et Boomsma (2004) ont démontré que le champignon *Aspergillus flavus*, avirulent pour la fourmi hôte, avait une meilleure sporulation en présence de *Metarhizum anisoplia*, champignon virulent.

Enfin, l'analyse de l'IBR nous a également permis de mettre en évidence que l'influence parasitaire est dépendante de la concentration de polluant. En effet, si chez les femelles co-infectées, l'effet toxique mesuré était toujours supérieur à celui des individus sains, il n'en est pas de même pour les infections simples. A la plus faible concentration de cadmium, la présence de *P. minutus* a diminué l'effet toxique subit par l'hôte, alors que la présence de *D. roeselum* l'a augmenté. A l'inverse, à la plus forte concentration, la présence de l'acanthocéphale a provoqué une plus forte toxicité, contrairement à la présence de la microsporidie qui l'a diminué. Il apparait donc que *P. minutus* serait plus à même « d'aider » son hôte face à un stress de faible concentration, contrairement à *D. roeselum*, qui le serait à plus forte concentration.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail doctoral était d'étudier l'interaction hôte-parasite dans un contexte de contaminations environnementales et notamment l'influence de la présence de parasites sur les réponses de biomarqueurs de défenses et énergétiques. Pour cela, nous avons utilisé comme modèle biologique l'amphipode *Gammarus roeseli* et étudié l'influence de deux types de parasites naturellement présents au sein de la population étudiée: l'acanthocéphale *Polymorphus minutus*, transmis horizontalement et les microsporidies *Dictyocoela roeselum* et *D. muelleri*, transmises verticalement. Les différents biomarqueurs de défenses analysés étaient le glutathion réduit ainsi que sa synthèse par l'activité γ-glutamylcystéine ligase, les métallothionéines et les caroténoïdes. Les biomarqueurs énergétiques (*i.e.* protéines, lipides et glycogène) et le malondialdéhyde, biomarqueur de toxicité, ont également été étudiés.

La première partie de ces travaux a été dévolue à l'étude de l'influence de parasites sur les différents biomarqueurs en absence de stress environnemental. Il a été démontré que cet effet **dépendait de l'espèce de parasite en cause,** avec des différences contrastées entre l'acanthocéphale et les microsporidies. En effet, en absence de stress, la présence de l'acanthocéphale *P. minutus* diminuait chez son hôte les réserves énergétiques, la concentration en glutathion réduit et l'activité γ-glutamylcystéine ligase, alors que la présence de microsporidies n'influence pas ces biomarqueurs. Cette différence d'effet est probablement liée au mode de transmission et à la pathogénicité du parasite considéré. *P. minutus*, du fait de sa transmission horizontale, est relativement virulent envers *G. roeseli* (*e.g.* une modification de comportement, castration des femelles). Nous avons démontré que cette virulence impacte les réponses physiologiques de l'hôte, le rendant plus sensible lors d'une contamination environnementale au cadmium. A l'inverse, les microsporidies étant transmises verticalement, dépendent entièrement de leur hôte et sont par conséquent très peu virulentes envers ce dernier, ce qui a été vérifié par une absence d'effets en conditions non stressantes. Cette partie de l'étude a également permis de mettre en évidence l'**importance du sexe de l'hôte** puisque, bien que *P. minutus* soit présent à la fois chez les mâles et femelles de la population de *G. roeseli* étudiée, les microsporidies étudiées, quant à elles, ne sont présentes que chez les femelles. L'importance du sexe de l'individu a aussi été observée lors de l'étude de la variation saisonnière du glutathion, appuyant ainsi le fait que la physiologie de l'organisme est un critère indispensable à prendre en compte lors d'études écotoxicologiques.

La seconde partie dédiée à l'étude de l'influence de parasites en conditions de stress chimique au cadmium a permis de mettre en avant **le caractère confondant de la présence de parasites dans des études écotoxicologiques**. En effet, bien qu'il soit aisé d'écarter les gammares parasités par *P. minutus* lors de campagnes d'échantillonnages en vue d'études écotoxicologiques puisque le parasite est visible sous la cuticule, la présence de microsporidies reste problématique, car indétectable à l'œil nu. De plus, bien que les microsporidies n'aient pas d'effets sur les réponses biologiques de leur hôte en conditions non stressantes, lors d'une exposition au cadmium, ces parasites modifient les capacités de défenses antitoxiques de *G. roeseli* et augmentent les effets toxiques. Cette observation met en évidence que la présence de microsporidies chez des organismes échantillonnés et exposés pourrait biaiser les réponses des biomarqueurs, et ainsi conduire à des interprétations erronées des résultats obtenus. La prévalence de ces parasites étant relativement stable tout au long de l'année (*i.e.* 50% des femelles), il est impossible d'établir une période d'échantillonnage adéquate afin de s'affranchir de leur présence. Il serait donc souhaitable d'examiner leur présence potentielle lors de l'utilisation d'organismes pour évaluer de la qualité des milieux, bien que cette étape supplémentaire soit coûteuse du fait de l'utilisation de techniques de biologie moléculaire. Il est toutefois possible d'utiliser une technique histologique afin de mettre en évidence la présence de microsporidies chez le gammare, mais ce procédé requiert l'utilisation de coupes en paraffine de l'organisme, conduisant ainsi à restreindre le choix des marqueurs de défenses étudiés.

Enfin, la dernière partie de ces travaux de thèse concernait l'influence d'une co-infection parasitaire sur les biomarqueurs de *G. roeseli*. Il a été souligné qu'une co-infection de *G. roeseli* par *P. minutus* et *D. roeselum* lors d'une exposition au cadmium aboutissait à des effets toxiques subit par l'hôte plus importants, pouvant accentuer une réduction de l'aptitude phénotypique (*fitness*) de *G. roeseli* dans un contexte de contamination. Cependant, la mesure des différents biomarqueurs ont mis en évidence un **effet de sabotage** de *P. minutus* par *D. roeselum*. Il existerait un conflit entre ces deux parasites, probablement dû à leur mode de transmission; l'un amenant son hôte vers la mort (transmission horizontale) et l'autre souhaitant maintenir son hôte en vie (transmission verticale). Cette étude a également été la première à examiner l'influence d'un multi-parasitisme sur les défenses antitoxiques de l'hôte en conditions de stress. Cependant, il serait intéressant d'étudier l'effet d'un parasitisme multiple sur différents modèles biologiques puisque la compétition parasitaire est

dépendante des traits d'histoire de vie de chaque parasite, qui peuvent être très spécifiques, surtout lorsque l'on considère des parasites transmis horizontalement et verticalement.

Ce travail de thèse laisse entrevoir de nombreuses perspectives de recherche dans les domaines de l'écotoxicologie et de la parasitologie environnementale.

Dans un premier temps, il serait intéressant de compléter ce travail en étudiant l'influence de *P. minutus* sur *G. roeseli* mâles, mais aussi en étudiant l'influence des premiers stades de développement de *P. minutus*. En effet, avant d'atteindre le stade cystacanthe, *P. minutus* atteint deux stades juvéniles différents, nommés acanthor et acanthella, qui pourrait mobiliser davantage de réserves énergétiques afin de se développer, et donc diminuer davantage les réserves énergétiques du gammare. Pour mener cette étude, il faudrait maitriser le cycle de développement de *P. minutus* en laboratoire afin de permettre l'étude d'un stade larvaire donné (*i.e.* ensemble de larves avec nombre de jours de développement identique). De plus, la maitrise du cycle de vie de *P. minutus* permettrait également d'étudier l'influence de ce parasite selon la charge parasitaire, puisqu'il est possible d'observer dans un même hôte plusieurs cystacanthes de *P. minutus*.

Dans un second temps, nous avons défini la présence de microsporidies comme étant un facteur confondant lors d'études d'impacts de contaminants. Toutefois, notre étude n'a été conduite que sur le cadmium. Il serait intéressant d'étudier l'influence de ces parasites dans différents contexte de contamination, en laboratoire et *in situ*, afin d'observer le profil des réponses antitoxiques des hôtes. Cette démarche permettrait à la fois (i) de valider la nature confondante des microsporidies, mais aussi (ii) d'appréhender l'influence de ces parasites selon la nature du contaminant. Une des hypothèses soulevées dans notre étude était que l'exposition au cadmium conduirait à une germination des spores de microsporidies, induisant ainsi un stress supplémentaire pour l'organisme. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en utilisant la technique de PCR en temps réel, qui permet de mesurer la quantité initiale d'ADN dans un échantillon. L'utilisation de cette technique de biologie moléculaire permettrait également d'étudier l'influence des microsporidies selon l'intensité parasitaire. Cependant, aucune amorce spécifique à *D. roeselum* ou *D. muelleri* n'a été définie. Les amorces utilisées dans notre étude étant spécifiques au genre Microsporidia et amplifiant une séquence d'ADN d'environ 500 pb, cette technique nécessiterait des étapes d'optimisation afin de créer les amorces spécifiques à chaque parasite, et permettant d'amplifier de petites séquences d'ADN (100-200 pb).

Enfin, l'étude du parasitisme chez le gammare a très souvent démontré une interaction entre le parasite et son hôte. Les parasites acanthocéphales influencent le comportement et les réponses physiologiques de leur hôte; tandis que les microsporidies à transmission verticale les féminisent et modifient la virulence de l'acanthocéphale lors d'une co-infection. Toutefois, bien que l'effet manipulateur de l'acanthocéphale ait été démontré en lien avec le système sérotoninergique de l'hôte, les mécanismes impliqués dans les interactions hôtes-parasites restent pour la plupart méconnus. Une approche par des techniques omics permettrait d'apporter des premiers éléments de réponses à ces interrogations. L'utilisation de la protéomique couplée à la spectrométrie de masse permettrait d'identifier les principales protéines influencées par la présence de parasites, mais pourrait également avoir l'avantage de mettre en évidence des protéines provenant du parasite lui-même. Nos travaux ayant soulevé l'hypothèse d'un système de défense antitoxique chez le parasite, la protéomique permettrait d'en identifier les principaux acteurs (*e.g.* Hsp70 chez *P. minutus* – Sures et Radszuweit, 2007) largement encore méconnus. De plus, une comparaison des profils protéiques définis chez l'hôte et le parasite serait en mesure de souligner les éventuelles similarités protéiques et donc un potentiel échange de protéines entre les deux organismes. Enfin, une seconde approche transcriptomique (*e.g.* puce à ADN) permettrait d'étudier (i) l'intégralité des ARN messagers de l'organisme en présence ou non du parasite, (ii) de savoir quels gènes ne sont pas impactés, et donc (iii) de développer des biomarqueurs répondant uniquement à la présence de contaminants. Cette perspective serait notamment intéressante afin de s'affranchir de la détection des microsporidies, mais présente toutefois l'inconvénient de devoir connaitre l'intégralité du génome de l'organisme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

~ A ~

Abel, T. et Barlocher, F. (1988). Uptake of cadmium by *Gammarus fossarum* (Amphipoda) from food and water. *Journal of Applied Ecology, 25*, 223-231.

Abele, L. et Gilchrist, S. (1977). Homosexual rape and sexual selection in acanthocephalan worms. *Science, 197*, 81 -83.

Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A et Bourdineaud, J.P. (2004). Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic Toxicology, 67*, 347-357.

Adam, O., Degiorgi, F., Crini, G. et Badot, P.M. (2010). High sensitivity of *Gammarus* sp. juveniles to deltamethrin: Outcomes for risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 73*, 1402-1407.

Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley Jr, M.S., Jimenez, B.D., Ryon, M.G., Shugart, L.R., McCarthy, J.F. et Hinton, D.E. (1989). The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research, 28*, 459-464.

Albrecht, H., Ehlers, U. et Boussetta, H. (1997). Syncytial organization of acanthors of *Polymorphus minutus* (Palaeacanthocephala), Neoechinorhynchusrutili (Eoacanthocephala), and *Moniliformis moniliformis* (Archiacanthocephala) (Acanthocephala). *Parasitology Research, 83*, 326-338.

Alibert, P., Bollache, L., Corberant, D., Guesdon, V. et Cézilly, F. (2002). Parasitic infection and developmental stability: Fluctuating asymmetry in *Gammarus pulex* infected with two acanthocephalan species. *The Journal of Parasitology, 88*, 47-54.

Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills G.A., Roig, B. et Gonzalez, C. (2006). A « toolbox » for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta, 69*, 302-322.

Alonso, Á., De Lange, H.J. et Peeters, E.T.H.M. (2009). Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *G. fossarum*. *Ecotoxicology, 19*, 133-140.

Andrews, G.K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical pharmacology, 59*, 95–104.

~ B ~

Bakker, T.C.M., Mazzi, D. et Zala, S. (1997). Parasite-induced changes in behavior and color make *Gammarus pulex* more prone to fish predation. *Ecology, 78*, 1098-1104.

Baldauf, S.A., Thünken, T., Frommen, G.J., Bakker, T.C.M., Heupel, O. et Kullmann, H. (2007). Infection with an acanthocephalan manipulates an amphipod's reaction to a fish predator's odours. *International Journal for Parasitology, 37*, 61-65.

Baudrimont, M., Lemaire-Gony, S., Ribeyre, F., Métivaud, J. et Boudou, A. (1997). Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 118*, 361–367.

Baudrimont, M., de Montaudouin, X. et Palvadeau, A. (2006). Impact of digenean parasite infection on metallothionein synthesis by the cockle (*Cerastoderma edule*): A multivariate field monitoring. *Marine Pollution Bulletin, 52,* 494-502.

Bauer, A., Haine, E.R., Perrot-Minnot, M.J. et Rigaud, T. (2005). The acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* alters the geotactic and clinging behaviours of two sympatric amphipod hosts: the native *Gammarus pulex* and the invasive *Gammarus roeseli*. *Journal of Zoology, 267*, 39-43.

Baumgärtner, D., Koch, U. et 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.

Barnard, J.L. et Barnard, C.M. (1983). Freshwater Amphipoda of the world- I. Evolutionary patterns Hayfield associates (ed.), Virginia, 357pp.

Bebianno, M., Cravo, A., Miguel, C. et Morais, S. (2003). Metallothionein concentrations in a population of *Patella aspera*: variation with size. *Science of The Total Environment, 301*, 151-161.

Ben-Ami, F., Rigaud, T. et Ebert, D. (2011). The expression of virulence during double infections by different parasites with conflicting host exploitation and transmission strategies. *Journal of Evolutionary Biology, 24*, 1307-1316.

Bethel, W.M. et Holmes, J.C. (1973). Altered evasive behavior and responses to light in amphipods harboring acanthocephalan cystacanths. *The Journal of Parasitology, 59*, 945-956.

Bethel, W.M. et Holmes, J.C. (1974). Correlation of development of altered evasive behavior in *Gammarus lacustris* (Amphipoda) harboring cystacanths of *Polymorphus paradoxus* (Acanthocephala) with the infectivity to the definitive host. *The Journal of Parasitology, 60*, 272-274.

Beznoussenko, G.V., Dolgikh, V.V., Seliverstova, E.V., Semenov, P.B., Tokarev, Y.S., Truccol, A., Micaroni1, M., Di Giandomenico1, D., Auinger, P., Senderskiy, I.V., Skarlato, S.O., Snigirevskaya, E.S., Komissarchik, Y.Y., Pavelka, M., De Matteis, M.A., Luini, A., Yuliya Ya. Sokolova, Y.Y. et Alexander A. Mironov, A.A. (2007). Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and avesicular mechanisms of function. *Journal of Cell Science, 120*, 1288 -1298.

Biderre, C., Babin, F. et Vivarès, C.P. (2000). Fatty acid composition of four microsporidian species compared to that of their host fishes. *Journal of Eukaryotic Microbiology, 47,* 7-10.

Bierkens, J., Maes, J. et Plaetse, F.V. (1998). Dose-dependent induction of heat shock protein 70 synthesis in *Raphidocelis subcapitata* following exposure to different classes of environmental pollutants. *Environmental pollution, 101*, 91–97.

Biesinger, K.E. et 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.

Bigot, A., Minguez, L., Giambérini, L. et Rodius, F. (2011). Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: Transcriptional and histochemical studies. *Environmental Toxicology, 26*, 623-632.

Blockwell, S., Pascoe, D. et Taylor, E. (1996). Effects of lindane on the growth of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Chemosphere, 32*, 1795–1803.

Bollache, L. (2001). Sélection sexuelle, parasitisme et patterns d'appariement chez le crustacé amphipode *Gammarus pulex*. Université Claude Bernard de Lyon, 204pp.

Bollache, L., Gambade, G. et Cézilly, F. (2001). The effects of two acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus* , on pairing success in male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Behavioral Ecology and Sociobiology, 49*, 296-303.

Bollache, L., Rigaud, T. et Cézilly, F. (2002). Effects of two acanthocephalan parasites on the fecundity and pairing status of female *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Invertebrate Pathology, 79*, 102-110.

Bollache, L., Kaldonski, N., Troussard, J.P., Lagrue, C. et Rigaud, T. (2006). Spines and behaviour as defences against fish predators in an invasive freshwater amphipod. *Animal Behaviour, 72*, 627-633.

Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal, 9*, 1551 -1558.

Brooks, S.J. et Lloyd Mills, C. (2003). The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 135*, 527-537.

Brooks, S.J. et Lloyd Mills, C. (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 & Integrative Physiology, 144*, 24-32.

Brooks, S.J. et Mills, C.L. (2011). Parasitic infection manipulates sodium regulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, 159*, 247-252.

Brown, A.F. et 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.

Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B. et Depledge, M.H. (2004). Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology, 66*, 267-278.

Burk, R.F., Nishiki, K., Lawrence, R.A. et Chance, B. (1978). Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free perfused rat liver. *Journal of Biological Chemistry, 253,* 43-46.

Bush, A.O. (2001). Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites, Cambridge Univ Pr.

Butterworth, P. (1969). Studies on the physiology and development of *Polymorphus minutus*. University of Cambridge.

~ C ~

Calow, P. (1991). Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology, 100,* 3-6.

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

Chabot, F., Mitchell, J.A., Gutteridge, J.M.C. et Evans T.W. (1998). Reactive oxygen species in acute lung injury. *European Respiratory Journal, 11,* 745-757.

Chang, E. et O'Connor, J. (1983). Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. in**:** Mantel, L.H. (Ed.). The biology of Crustacea: 5. Internal anatomy and physiological regulation. The biology of Crustacea, 263-287.

Chang, C.F., Lee, F.Y. et Huang, Y.S. (1993). Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 105,* 409-414.

Charissou, A.M., Cossu-Leguille, C. et Vasseur, P. (2004). Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-2′-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Science of The Total Environment, 322,* 109-122.

Charniaux-Cotton, H. et Payen, G. (1985). Sexual differentiation. The biology of Crustacea, 9, 217–299.

Clason, B. et Zauke, G.P. (2000). Bioaccumulation of trace metals in marine and estuarine amphipods: evaluation and verification of toxicokinetic models. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 57,* 1410-1422.

Coffinet, S., Cossu-Leguille, C., Rodius, F. et Vasseur, P. (2008). Glutamate cysteine ligase (GCL) in the freshwater bivalve *Unio tumidus*: Impact of storage conditions and seasons on activity and identification of partial coding sequence of the catalytic subunit. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 151,* 88-95.

Combes C., 2001. *L'art d'être parasite. Les associations du vivant*. Flammarion, Paris, France.

Conn, P.F., Lambert, C., Land, E.J., Schalch, W et Truscott, T.G. (1992). Carotene-oxygen radical interactions. *Free Radical Research Communications, 16,* 401-408.

Cornet, S., Biard, C. et Moret, Y. (2007). Is there a role for antioxidant carotenoids in limiting self-harming immune response in invertebrates? *Biology Letters, 3,* 284 -288.

Cornet, S., Franceschi, N., Bauer, A., Rigaud, T. et Moret, Y. (2009). Immune depression induced by acanthocephalan parasites in their intermediate crustacean host: Consequences for the risk of super-infection and links with host behavioural manipulation. *International Journal for Parasitology, 39,* 221-229.

Correia, A.D., Livingstone, D.R. et Costa, M.H. (2002). Effects of water-borne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod *Gammarus locusta*. *Marine Environmental Research, 54,* 357-360.

Correia, A., Sousa, A., Costa, M.H., Moura, I. et Livingston, D.R. (2004). Quantification of metallothionein in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda) using differential pulse polarography. *Toxicological & Environmental Chemistry, 86,* 23–36.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A. et Vasseur, P. (1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 38,* 122-131.

Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S. et Chaumot, A. (2011). *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research, 19,* 6417-6429.

Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C. et Rofe, A.M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences, 59,* 627–647.

Crane, M., Delaney, P., Watson, S., Parker, P. et Walter C. (1995). The effect of malathion 60 on *Gammarus pulex* (L.) below watercress beds. *Environmental Toxicology and Chemistry, 14,* 1181-1188.

Crompton, D.W.T. et Whitfield, P.J. (1968). The course of infection and egg production of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala) in domestic ducks. *Parasitology, 58,* 231-246.

~ D ~

Dangles, O. et Guérold, F. (2001). Linking shredders and leaf litter processing: insights from an acidic stream study. *International Review of Hydrobiology, 86,* 395–406.

Dautremepuits, C., Betoulle, S. et Vernet, G. (2002). Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1573,* 4-8.

Dautremepuits, C., Betoulle, S. et Vernet, G. (2003). Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Fish & Shellfish Immunology, 15*, 467-471.

Dawkins R., 1982. *The extended Phenotype*. Oxford University Press, Oxford, UK.

De Coen, WM et Janssen, CR (1997). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: A new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, 6*, 43–55.

Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, O. et Geffard, A. (2009). Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An in situ experiment. *Chemosphere, 77*, 1569–1576.

de Graaf, D.C., Raes, H. et Jacobs, F.J. (1994). Spore dimorphism in *Nosema apis* (Microsporida, Nosematidae) developmental cycle. *Journal of invertebrate pathology, 63*, 92–94.

de Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P. et Chan, H.M. (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology, 50*, 51-71.

De Lange, H., Noordoven, W., Murk, A.J., Lürling, M. et 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., Peeters, E.T.H.M. et 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, 15*, 111–120.

DeLeve, L.D. et Kaplowitz, N. (1991). Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics, 52*, 287-305.

Del Rio, D., Stewart, A.J. et Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases, 15*, 316–328.

Dembitsky, V.M. et Rezanka, T. (1996). Comparative study of the endemic freshwater fauna of Lake Baikal-VII. Carotenoid composition of the deep-water amphipod crustacean *Acanthogammarus* (*Brachyuropus*) *grewingkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 114*, 383–387.

de Meeûs, T. et Renaud, F. (2002). Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends in Parasitology, 18*, 247–251.

Depledge, M.H. et Fossi, M.C. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology, 3*, 161-172.

Dezfuli, B.S. et Giari, L. (1999). Amphipod intermediate host of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala), parasite of water birds, with notes on ultrastructure of host-parasite interface. *Folia parasitologica, 46*, 117–122.

Dezfuli, B.S., Lui, A., Giovinazzo, G. et Giari, L. (2008). Effect of Acanthocephala infection on the reproductive potential of crustacean intermediate hosts. *Journal of Invertebrate Pathology, 98*, 116-119.

de Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N.M. et Vermeulen, N.P.E. (1999). Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine, 26*, 202-226.

Dianne, L., Perrot-Minnot, M.J., Bauer, A., Gaillard, M., Léger, E. et Rigaud, T. (2011). Protection first then facilitation: A manipulative parasite modulates the vulnerability to predation of its intermediate host according to its own developmental stage. *Evolution, 65*, 2692-2698.

Dick, J.T.A., Armstrong, M., Clarke, H.C., Farnsworth, K.D., Hatcher, M.J., Ennis, M., Kelly, A. et Dunn, A.M. (2010). Parasitism may enhance rather than reduce the predatory impact of an invader. *Biology Letters, 6*, 636-638.

Dissanaike, A.S. et Canning, E.U. (1957). The mode of emergence of the sporoplasm in microsporidia and its relation to the structure of the spore. *Parasitology, 47*, 92-99.

Dunn, A.M., Adams, J. et Smith, J.E. (1993). Transovarial transmission and sex ratio distortion by a microsporidian parasite in a shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology, 61*, 248-252.

Dunn, A.M., Hatcher, M.J., Terry, R.S. et Tofts, C. (1995). Evolutionary ecology of vertically Transmitted parasites: transovarial transmission of a microsporidian sex ratio distorter in *Gammarus duebeni*. *Parasitology, 111*, S91-S109.

Dunn, A.M. et Rigaud, T. (1998). Horizontal transfer of parasitic sex ratio distorters between crustacean hosts. *Parasitology, 117*, 15-19.

Dunn, A.M. et Smith, J.E. (2001). Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. *Microbes and Infection, 3*, 381-388.

Dunn, A.M., Terry, R.S. et Smith, J.E. (2001). Transovarial transmission in the microsporidia. *Advances in Parasitology, 48*, 57–100.

Durou, C., Mouneyrac, C., Pellerin, J. et Péry, A. (2008). Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. Dans Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Paris: Lavoisier, p. 273-289.

Dutra, B.K., Castiglioni, D.S., Santos, R.B., Bond-Buckup, G. et Oliveira, G.T. (2007). Seasonal variations of the energy metabolism of two sympatric species of *Hyalella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in the southern Brazilian highlands. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, 148*, 239-247.

~ E ~

Ebert, D. et Herre, E.A. (1996). The evolution of parasitic diseases. *Parasitology Today, 12*, 96-101.

Eckwert, H., Alberti, G. et Kohler, H.R. (1997). The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. *Ecotoxicology, 6*, 249–262.

Esterbauer, H., Schaur, R.J. et Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine, 11*, 81-128.

Eufemia, N.A. et Epel, D. (1998). The multixenobiotic defense mechanism in mussels is induced by substrates and non-substrates: Implications for a general stress response. *Marine Environmental Research, 46*, 401-405.

~ F ~

Fahey, R.C. et Sundquist, A.R. (1991). Evolution of Glutathione Metabolism. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 64*, 1-53.

Falfushynska, H.I., Gnatyshyna, L.L., Priydun, C.V., Stoliar, O.B et Nam, Y.K. (2010). Variability of responses in the crucian carp *Carassius carassius* from two Ukrainian ponds determined by multi-marker approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 73*, 1896-1906.

Felten, V. (2003). Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophysiologie de *Gammarus fossarum* Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda): Approche intégrée à différents niveaux d'organisation. Université Paul Verlaine de Metz. 339pp.

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

Fielding, N.J., MacNeil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., Riddell, G.E. et Dunn, A.M. (2003). Effects of the acanthocephalan parasite *Echinorhynchus truttae* on the feeding ecology of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Zoology, 261*, 321-325.

Fouré-Seelig, G., Simondsen, R.P. et Meister, A. (1984). Reversible dissociation of γ-glutamylcysteine synthetase into two subunits. *Journal of Biological Chemistry, 259*, 9345 - 9347.

Ford, A.T., Fernandes, T.F., Rider, S.A., Read, P.A., Robinson, C.D. et Davies, I.M. (2004). Endocrine disruption in a marine amphipod? Field observations of intersexuality and de-masculinisation. *Marine Environmental Research, 58*, 169-173.

Forrow, D.M. et 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.

Franceschi, N., Rigaud, T., Moret, Y., Hervant, F. et Bollache, L. (2007). Behavioural and physiological effects of the trophically transmitted cestode parasite, *Cyathocephalus truncatus*, on its intermediate host, *Gammarus pulex*. *Parasitology, 134*, 1839-1847.

Fraser, J.A., Saunders, R.D.C. et McLellan, L.I. (2002). Drosophila melanogaster glutamate-cysteine ligase activity is regulated by a modifier subunit with a mechanism of action similar to that of the mammalian form. *Journal of Biological Chemistry, 277*, 1158 - 1165.

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

Frenzilli, G., Falleni, A., Scarcelli, V., Del Barga, I., Pellegrini, S., Savarino, G., Mariotti, V., Benedetti, M., Fattorini, D., Regoli, F. et Nigro, M. (2008). Cellular responses in the cyprinid *Leuciscus cephalus* from a contaminated freshwater ecosystem. *Aquatic Toxicology, 89*, 188-196.

Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry, 44*, 147-159.

Frixione, E., Ruiz, L., Santillan, M., de Vargas, L.V., Tejero, J.M. et Undeen, A.H. (1992). Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell Motility and the Cytoskeleton, 22*, 38-50.

~ G ~

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

Gaillard, M., Juillet, C., Cézilly, F., Perrot-Minnot, M.J. (2004). Carotenoids of two freshwater amphipod species (*Gammarus pulex* and *G. roeseli*) and their common acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 139*, 129-136.

Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Depledge, M.H. et Jones, M.B. (2006). The ECOMAN project: A novel approach to defining sustainable ecosystem function. *Marine Pollution Bulletin, 53*, 186-194.

Geffard, A., Amiard, J. et Amiard-Triquet, C. (2002a). Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers, 7*, 123–137.

Geffard, A., Geffard, O., His, E. et Amiard, Jean-Claude (2002b). Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Marine Ecology Progress Series, 233*, 131–142.

Geffard, A., Amiard-Triquet, C. et Amiard, J.C. (2005). Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? *Ecotoxicology and environmental safety, 61*, 209–220.

Geffard, A., Quéau, H., Dedourge, O., Biagianti-Risbourg, S. et Geffard, O. (2007). Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 145, 632-640.

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

Geffard, O., Xuereb, B., Chaumont, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G. et Charmantier-Daures, M. (2010). Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry, 29*, 2249-2259.

Giambérini, L. et Cajaraville, M.P. (2005). Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. *Environmental Research, 98*, 210-214.

Gilchrist, B.M. et Lee, W.L. (1972). Carotenoid pigments and their possible role in reproduction in the sand crab, *Emerita analoga* (Stimpson, 1857). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 42*, 263-294.

Green, J. et Koslova, T. (1992). Carotenoids, photoprotection and food web links in Lake Baikal. *Freshwater Biology, 28*, 49-58.

Griffith, O.W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine, 27*, 922-935.

Griffith, O.W. et Mulcahy, R.T. (1999). The enzymes of glutathione synthesis: γ-glutamylcysteine synthetase, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology: Mechanism of Enzyme Action, Part A, 73*, 209-267.

Gruszecki, W.I. (2004). Carotenoids in Membranes. *Advances in Photosynthesis and Respiration, 8*, 363-379.

Güven, K., Özbay, C., Ünlü, E. et Satar, A. (1999). Acute lethal toxicity and accumulation of copper in *Gammarus pulex* (L.)(Amphipoda). *Turkish Journal of Biology, 23*, 513–521.

~ H ~

Haine, E.R., Brondani, E., Hume, K.D., Perrot-Minnot, M.J., Gaillard, M. et Rigaud, T. (2004). Coexistence of three microsporidia parasites in populations of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli*: evidence for vertical transmission and positive effect on reproduction. *International Journal for Parasitology, 34*, 1137-1146.

Haine, E.R., Motreuil, S. et Rigaud, T. (2007). Infection by a vertically-transmitted microsporidian parasite is associated with a female-biased sex ratio and survival advantage in the amphipod *Gammarus roeseli*. *Parasitology, 134*, 1363-1367.

Halliwell, B. et Gutteridge, J.M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal, 219*, 1-14.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. et Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 119,* 598-620.

Halliwell, B. et Gutteridge, J.M. (1998). Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford Science Publications.

Hamza-Chaffai, A., Amiard, J.C., Pellerin, J., Loux, L. et Berthet, B. (2000). The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 127,* 185-197.

Hansson, L.A. et Hylander, S. (2009). Effects of ultraviolet radiation on pigmentation, photoenzymatic repair, behavior, and community ecology of zooplankton. *Photochemical & Photobiological Sciences, 8,* 1266–1275.

Hatcher, M.J., Hogg, J.C. et Dunn, A.M. (2005). Local adaptation and enhanced virulence of *Nosema granulosis* artificially introduced into novel populations of its crustacean host, *Gammarus duebeni*. *International Journal for Parasitology, 35,* 265-274.

Heit, M. et Fingerman, M. (1977). The influences of size, sex and temperature on the toxicity of mercury to two species of crayfishes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 18,* 572-580.

Helluy, S. et Holmes, J.C. (1990). Serotonin, octopamine, and the clinging behavior induced by the parasite *Polymorphus paradoxus* (Acanthocephala) in *Gammarus lacustris* (Crustacea). *Canadian Journal of Zoology, 68,* 1214-1220.

Helluy, S. et Thomas, F. (2003). Effects of *Microphallus papillorobustus* (Platyhelminthes: Trematoda) on serotonergic immunoreactivity and neuronal architecture in the brain of *Gammarus insensibilis* (Crustacea: Amphipoda). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270,* 563 -568.

Helluy, S. et Thomas, F. (2010). Parasitic manipulation and neuroinflammation: Evidence from the system *Microphallus papillorobustus* (Trematoda)-*Gammarus* (Crustacea). *Parasites & Vectors, 3,* 38-49.

Henry, K.S. et Danielopol, D.L. (1998). Oxygen dependent habitat selection in surface and hyporheic environments by *Gammarus roeseli* Gervais (Crustacea, Amphipoda): experimental evidence. *Hydrobiologia, 390,* 51–60.

Hernández-Moreno, D., Soler, F., Miguez, M.P. et Perez-Lopez, M. (2010). Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. *Science of The Total Environment, 408,* 4976-4983.

Hogg, J.C., Ironside, J.E., Sharpe, R.G., Hatcher, M.J., Smith, J.E. et Dunn, A.M. (2003). Infection of *Gammarus duebeni* populations by two vertically transmitted microsporidia; parasite detection and discrimination by PCR–RFLP. *Parasitology, 125,* 59-63.

Hogstrand, C., Galvez, F. et Wood, C.M. (1996). Toxicity, silver accumulation and metallothionein induction in freshwater rainbow trout during exposure to different silver salts. *Environmental Toxicology and Chemistry, 15*, 1102-1108.

Hughes, W.O.H. et Boomsma, J.J. (2004). Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 271*, S104-S106.

Hynes, H.B.N. et Nicholas, W.L. (1963). The importance of the acanthocephalan *Polymorphus minutus* as a parasite of domestic ducks in the United Kingdom. *Journal of Helminthology, 37*, 185-198.

~ I ~

Iles, K.E. et Liu, R.M. (2005). Mechanisms of glutamate cysteine ligase (GCL) induction by 4-hydroxynonenal. *Free Radical Biology and Medicine, 38*, 547-556.

Ironside, J.E., Smith, J.E., Hatcher, M.J., Sharpe, R.G., Rollinson, D. et Dunn, A.M. (2003). Two species of feminizing microsporidian parasite coexist in populations of *Gammarus duebeni*. *Journal of Evolutionary Biology, 1*, 467-473.

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

~ J ~

Jacob, C., Maret, W. et Vallee, B.L. (1998). Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 95*, 3489 -3494.

Jażdżewski, K. (1980). Range extensions of xome Gammaridean species in European inland waters caused by human activity. *Crustaceana. Supplement*, 84-107.

Jażdżewski, K. et Roux, A.L. (1988). Biogéographie de *Gammarus roeseli* Gervais en Europe, en particulier répartition en France et en Pologne. *Crustaceana. Supplement*, 272-277.

Johnston, M.A. et Davies, P.S. (1972). Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 41*, 433–443.

Jörgensen, K. et Skibsted, L.H. (1993). Carotenoid scavenging of radicals. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 196*, 423-429.

~ K ~

Kaldonski, N., Perrot-Minnot, M.J., Motreuil, S. et Cézilly, F. (2008). Infection with acanthocephalans increases the vulnerability of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to non-host invertebrate predators. *Parasitology, 135*, 627-632.

Kalyanaraman, B., Karoui, H., Singh, R.J. et Felix, C.C. (1996). Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of Thiols - A high resolution ESR spin-trapping study at q-band (35 GHz). *Analytical Biochemistry, 241*, 75-81.

Kamal-Eldin, A. et Appelqvist, L.Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids, 31*, 671-701.

Karaman, G. et Pinkster, S. (1977). Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea, Amphipoda). II. *Gammarus roeseli*-group and related species. *Bijdr Dierk, 47*, 148–159.

Keeling, P.J. et Fast, N.M. (2002). MICROSPORIDIA: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology, 56*, 93-116.

Kelly D.W., Dick J.T.A. et Montgomery W.I. (2002). The functional role of *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? *Hydrobiologia, 485*, 199-203.

Kelly, A., Hatcher, M.J. et Dunn, A.M. (2003). The impact of a vertically transmitted microsporidian, *Nosema granulosis* on the fitness of its *Gammarus duebeni* host under stressful environmental conditions. *Parasitology, 126*, 119-124.

Kennedy, C.R. (1993). Acanthocephala. Reproductive biology of invertebrates, AD Adiyodi, and KG Adiyodi (eds.). IBH, New Delhi, India, 279, p.295.

Kennedy, C.R. (2006). Ecology of the Acanthocephala, Cambridge University Press, New York, 249pp.

Ketterer, B., Coles, B. et Meyer, D.J. (1983). The role of glutathione in detoxication. *Environmental Health Perspectives, 49*, 59-69.

Khan, F.R., Bury, N.R. et Hogstrand, C. (2010). Cadmium bound to metal rich granules and exoskeleton from *Gammarus pulex* causes increased gut lipid peroxidation in zebrafish following single dietary exposure. *Aquatic Toxicology, 96*, 124-129.

Krebes, L., Blank, M., Frankowski, J. et Bastrop, R. (2010). Molecular characterisation of the Microsporidia of the amphipod *Gammarus duebeni* across its natural range revealed hidden diversity, wide-ranging prevalence and potential for co-evolution. *Infection, Genetics and Evolution, 10*, 1027-1038.

Krinsky, N. et Deneke, S. (1982). Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *Journal of the National Cancer Institute, 69*, 205-10.

Krinsky, N.I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology & Medicine, 7*, 617-635.

Kucharski, L.C.R. et Da Silva, R.S.M. (1991a). Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 99*, 215–218.

Kucharski, L.C.R. et Da Silva, R.S.M. (1991b). Seasonal variation in the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 100*, 599–602.

Kuhn, K. et Streit, B. (1994). Detecting sublethal effects of organophosphates by measuring acetylcholinesterase activity in *Gammarus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology, 53*, 398–404.

~ L ~

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

Lacaze, E., Geffard, O., Goyet, D., Bony, S. et Devaux, A. (2010b). Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. *Environmental Research, 111*, 626-634.

Lagadic, L., Caquet, T. et Amiard, J. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions. Dans Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson, p. 1-9.

Lagadic, L. (2002). Biomarkers: useful tools for the monitoring of aquatic environments. *Revue de Médecine Vétérinaire, 153*, 581–588.

Lagrue, C., Kaldonski, N., Perrot-Minnot, M.J., Motreuil, S. et Bollache, L. (2007). Modification of hosts' behavior by a parasite: Field evidence for adaptive manipulation. *Ecology, 88*, 2839-2847.

Lawrence, J.A. et Poulter, C. (1998). Development of a sub-lethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*. *Water Research, 32*, 569-578.

Lazrak, T., Milon, A., Wolff, G., Albrecht, A.M., Miehé, M., Ourisson, G. et Nakatami, Y. (1987). Comparison of the effects of inserted C_{40}-and C_{50}-terminally dihydroxylated carotenoids on the mechanical properties of various phospholipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 903*, 132–141.

Lemcke, H. et Lampert, W. (1975). Changes in weight and chemical composition of *Daphnia pulex* during starvation. *Archiv fur Hydrobiologie Supplement, 48*, 108–137.

Levri, E. et Fisher, L. (2000). The effect of a trematode parasite (*Microphallus* sp.) on the response of the freshwater snail *Potamopyrgus antipodarum* to light and gravity. *Behaviour, 137*, 1141–1151.

Li, X., Palmer, R., Trout, J.M. et Fayer, R. (2003). Infectivity of microsporidia spores stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology, 89*, 185-188.

Liñán-Cabello, M., Paniagua-Michel, J. et Hopkins, P. (2002). Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition, 8*, 299–309.

Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L.D., Porte, C., Fitzpatrick, P.J., Fôrlin, L., Nasci, C., Fossato, V., Wootton, N. et Goldfarb, P. (1995). Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy: Biochemical studies. *Marine Environmental Research, 39*, 235-240.

Livingstone, D.R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin, 42*, 656-666.

Livingstone, D.R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire, 154*, 427–430.

Lockwood, A.P. et Inman, C.B. (1973). Changes in the apparent permeability to water at moult in the amphipod *Gammarus duebeni* and the isopod *Idotea linearis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 44*, 943-952.

Lockwood, A.P.M. (1976). Effects of pollutants on aquatic organisms, Cambridge University Press, New York.

Lüersen, K., Müller, S., Hussein, A., Liebau, E et Walter, R.D. (2000). The γ-glutamylcysteine synthetase of *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology, 111*, 243–251.

Lukančič, S., Žibrat, U., Mezek, T., Jerebic, A., Simčič, T. et Brancelj, A. (2010a). A new method for early assessment of effects of exposing two non-target crustacean species, *Asellus aquaticus* and *Gammarus fossarum*, to pesticides, a laboratory study. *Toxicology and Industrial Health, 26*, 217–228.

Lukančič, S., Žibrat, U., Mezek, T., Jerebic, A., Simčič, T. et Brancelj, A. (2010b). Effects of exposing two non-target crustacean species, *Asellus aquaticus* L., and *Gammarus fossarum* Koch., to atrazine and imidacloprid. *Bulletin of environmental contamination and toxicology, 84*, 85–90.

Luperchio, S., Tamir, S. et Tannenbaum, S.R. (1996). No-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. *Free Radical Biology and Medicine, 21*, 513-519.

Lykkesfeldt, J. (2007). Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica chimica acta, 380*, 50–58.

~ M ~

MacNeil, C., Dick, J.T.A. et Elwood, R.W. (1999). The dynamics of predation on *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda). *Biological Reviews, 74*, 375-395.

MacNeil, C, Elwood, R.W. et Dick, J.A.T. (2000). Factors influencing the importance of *Gammarus* spp. (Crustacea:Amphipoda) in riverine salmonid diets. *Archiv für Hydrobiologia, 149*, 87-107.

MacNeil, C., Hatcher, M.J. et Dunn, A.M. (2003). Differential drift and parasitism in invading and native *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda). *Ecography, 26*, 467-473.

Maltby, L., Naylor, C. et Calow, P. (1990). Effect of stress on a freshwater benthic detritivore: scope for growth in *Gammarus pulex*. *Ecotoxicology and environmental safety, 19*, 285–291.

Maltby, L. (1992). The use of the physiological energetics of *Gammarus pulex* to assess toxicity: a study using artificial streams. *Environmental toxicology and chemistry, 11*, 79–85.

Maltby, L. (1994). Stress, shredders and streams: using Gammarus energetics to assess water quality. In: Sutcliffe, D.W. (ed.) Water quality & stress indicators in marine and freshwater systems: linking levels of organisation. Ambleside, UK, Freshwater Biological Association, p. 98-110.

Maltby, L., Clayton, S.A., Wood, R.M. et McLoughlin, N. (2002). Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance. *Environmental Toxicology and Chemistry, 21*, 361-368.

Marigómez, I., Izagirre, U. et Lekube, X. (2005). Lysosomal enlargement in digestive cells of mussels exposed to cadmium, benzo[a]pyrene and their combination. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 141*, 188-193.

Marnett, L.J. (1999a). Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC Scientific Publications, 150*, 17-27.

Marnett, L.J. (1999b). Lipid peroxidation–DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 424*, 83–95.

McCahon, C.P. et Pascoe, D. (1988). Cadmium toxicity to the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) during the moult cycle. *Freshwater Biology, 19*, 197-203.

McCahon, C.P., Brown, A.F. et Pascoe, D. (1988). The effect of the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis* (Müller 1776) on the acute toxicity of cadmium to its intermediate host, the amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 17*, 239-243.

McCahon, C.P., Maund, S.J. et Poulton, M.J. (1991). The effect of the acanthocephalan parasite (*Pomphorhynchus laevis*) on the drift of its intermediate host (*Gammarus pulex*). *Freshwater Biology, 25*, 507-513.

McCord, J.M. et Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry, 244*, 6049 -6055.

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

Médoc, V., Bollache, L. et Beisel, J.N. (2006). Host manipulation of a freshwater crustacean (*Gammarus roeseli*) by an acanthocephalan parasite (*Polymorphus minutus*) in a biological invasion context. *International Journal for Parasitology, 36*, 1351-1358.

Médoc, V. et Beisel, J. (2008). An acanthocephalan parasite boosts the escape performance of its intermediate host facing non-host predators. *Parasitology, 135*, 977–984.

Médoc, V. et Beisel, J.N. (2009). Field evidence for non-host predator avoidance in a manipulated amphipod. *Naturwissenschaften, 96*, 513-523.

Médoc, V., Rigaud, T., Bollache, L. et Beisel, J.N. (2009). A manipulative parasite increasing an antipredator response decreases its vulnerability to a non-host predator. *Animal Behaviour, 77*, 1235-1241.

Médoc, V. et Beisel, J.N. (2011). When trophically-transmitted parasites combine predation enhancement with predation suppression to optimize their transmission. *Oikos, 120*, 1452-1458.

Médoc, V., Piscart, C., Maazouzi, C., Simon, L. et Beisel, J.N. (2011). Parasite-induced changes in the diet of a freshwater amphipod: field and laboratory evidence. *Parasitology, 138*, 537-546.

Meister, A. et Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry, 52*, 711-760.

Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *The Journal of Biological Chemistry, 263*, 17205–17208.

Meister, A. (1994). Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Research, 54*, 1969s -1975s.

Méténier, G. et Vivarès, C.P. (2001). Molecular characteristics and physiology of microsporidia. *Microbes and Infection, 3*, 407-415.

Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry, 63*, 141–146.

Mills, G.C. (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal of Biological Chemistry, 229*, 189-97.

Milne, D.J. et Ellis, R.A. (1973). The effect of salinity acclimation on the ultrastructure of the gills of *Gammarus oceanicus* (Segerstråle, 1947)(Crustacea: Amphipoda). *Cell and Tissue Research, 139*, 311–318.

Minguez, L., Meyer, A., Molloy, D.P. et Giambérini, L. (2009). Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Importance in ecotoxicological studies. *Environmental Research, 109*, 843-850.

Montenegro, M.A., Nazareno, M.A., Duranti, E.N. et Borsarelli, C.D. (2002). Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse-micelle membrane mimetic system. *Photochemistry and Photobiology, 75*, 353-361.

Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W. et Paul Leonard, D.R. (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 552*, 247-268.

Muskó, I.B., Meinel, W., Krause, R. et Barlas, M. (1990). The impact of Cd and different pH on the amphipod *Gammarus fossarum* Koch (Crustacea: Amphipoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 96*, 11-16.

~ N ~

Naegeli, K. (1857). Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot Ztg, 15*, 760–761.

Nanko-Drees, J., Walscheck, S. et Liess, M. (1999). Ecotoxicological evaluation of agricultural insecticide contamination in natural mesocosms. (Ecotoxicology: Ecosystematic evaluations and methods). *Oekotoxikologie: Oekosystemare Ansaetze und Methoden*, p.171–175.

Naylor, C., Maltby, L. et Calow, P. (1989). Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore. *Hydrobiologia, 188*, 517–523.

Nègre-Sadargues, G., Castillo, R. et Segonzac, M. (2000). Carotenoid pigments and trophic behaviour of deep-sea shrimps (Crustacea, Decapoda, Alvinocarididae) from a hydrothermal area of the Mid-Atlantic Ridge. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, 127*, 293-300.

Noci-Charissou, A.M. (2002). Etude des dommages oxydatifs chez *Unio tumidus* pour le biomonitoring des eaux douces et des relations entre la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine et le malondialdéhyde. Université Paul Verlaine, Metz, 185pp.

Nordberg, J. et Arnér, E.S.J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine, 31*, 1287-1312.

~ O ~

O'Connor, J.D. et Gilbert, L.I. (1968). Aspects of Lipid Metabolism in Crustaceans. *American Zoologist, 8*, 529 -539.

Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Kucharski, L.C. et Da Silva, R.S.M. (2004). Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 137*, 383–390.

Oliveira, G., Fernandes, F.A., Buena, A.AP. et Bond-Buckup, G. (2007). Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Aegla platensis* (Crustacea, Aeglidae). *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 147*, 600–606.

Outreman, Y., Bollache, L., Plaistow, S. et Cézilly, F. (2002). Patterns of intermediate host use and levels of association between two conflicting manipulative parasites. *International Journal for Parasitology, 32*, 15-20.

Overnell, J. et Trewhella, E. (1979). Evidence for the natural occurance of (cadmium, copper)-metallothionein in the crab *Cancer pagurus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, *64*, 69-76.

~ P ~

Palozza, P. et Krinsky, N.I. (1992). Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: An overview. *Methods in Enzyomology*, *213*, 403-420.

Pantani, C., Pannunzio, G., De Cristofaro, M., Novelli, A.A. et Salvatori, M. (1997). Comparative acute toxicity of some pesticides, metals, and surfactants to *Gammarus italicus* Goedm. and *Echinogammarus tibaldii* Pink. and Stock (Crustacea: Amphipoda). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *59*, 963–967.

Parvathy, K. (1971). Glycogen storage in relation to the moult cycle in the two crustaceansEmerita asiatica andLigia exotica. *Marine Biology*, *10*, 82-86.

Pascoe, D., Wenzel, A., Janssen, C., Girling, A.E., Jüttner, I., Fliedner, A., Blockwell, S.J., Maund, S.J., taylor, E.J., Diedrich, M., Persoone, G., Verhelst, P., Stephenson, R.R, Crossland, N.O., Mitchell, G.C., Pearson, N., tattersfield, L., Lay, J.P., Peither, A., Neumeier, B. et Velletti, A.R. (2000). The development of toxicity tests for freshwater pollutants and their validation in stream and pond mesocosms. *Water Research*, *34*, 2323-2329.

Peakall, D.B. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology*, *3*, 157–160.

Pedersen, A.B. et Fenton, A. (2007). Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, *22*, 133-139.

Péqueux, A. (1995). Osmotic Regulation in Crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, *15*, 1-60.

Perrot-Minnot, M.J., Kaldonski, N. et Cézilly, F. (2007). Increased susceptibility to predation and altered anti-predator behaviour in an acanthocephalan-infected amphipod. *International Journal for Parasitology*, *37*, 645-651.

Perrot-Minnot, M.J., Gaillard, M., Dodet, R. et Cézilly, F. (2011). Interspecific differences in carotenoid content and sensitivity to UVB radiation in three acanthocephalan parasites exploiting a common intermediate host. *International Journal for Parasitology*, *41*, 173-181.

Pestana, J.L.T., Ré, A., Nogueira, A.J.A. et Soares, A.M.V.M. (2007). Effects of cadmium and zinc on the feeding behaviour of two freshwater crustaceans: *Atyaephyra desmarestii* (Decapoda) and *Echinogammarus meridionalis* (Amphipoda). *Chemosphere*, *68*, 1556-1562.

Petit, H., Nègre-Sadargues, G., Castillo, R. et Trilles, J.P. (1997). The effects of dietary astaxanthin on growth and moulting cycle of postlarval stages of the prawn, *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology–Part A: Physiology*, *117*, 539–544.

Piano, A., Valbonesi, P. et Fabbri, E. (2004). Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress & Chaperones, 9*, 134-142.

Pilz, J., Meineke, I. et Gleiter, C.H. (2000). Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivative. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 742*, 315–325.

Piscart, C., Webb, D. et Beisel, J.N. (2007). An acanthocephalan parasite increases the salinity tolerance of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli* (Crustacea: Gammaridae). *Naturwissenschaften, 94*, 741-747.

Plaistow, S.J., Troussard, J.P. et Cézilly, F. (2001). The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *International Journal for Parasitology, 31*, 346-351.

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

Pöckl, M. (1995). Laboratory studies on growth, feeding, moulting and mortality in the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. *Archiv fur Hydrobiologia, 134*, 223-253.

Pöckl, M., Webb, B.W. et Sutcliffe, D.W. (2003). Life history and reproductive capacity of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda) under naturally fluctuating water temperatures: a simulation study. *Freshwater Biology, 48*, 53-66.

Poulin, R. et Morand, S. (2000). Testes size, body size and male–male competition in acanthocephalan parasites. *Journal of Zoology, 250*, p 51–558.

Power, A. et Sheehan, D. (1996). Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 114*, 99-103.

~ R ~

Rauque, C.A. et Semenas, L. (2009). Effects of two acanthocephalan species on the reproduction of *Hyalella patagonica* (Amphipoda, Hyalellidae) in an Andean Patagonian Lake (Argentina). *Journal of Invertebrate Pathology, 100*, 35-39.

Richman, P. et Meister, A. (1975). Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *Journal of Biological Chemistry, 250*, 1422-1426.

Rigaud, T., Juchault, P. et Mocquard, J. (1997). The evolution of sex determination in isopod crustaceans. *BioEssays, 19*, 409-416.

Rigaud, T., Perrot-Minnot, M.J. et Brown, M.J.F. (2010). Parasite and host assemblages: embracing the reality will improve our knowledge of parasite transmission and virulence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 277*, 3693 -3702.

Rinderhagen, M., Ritterhoff, J. et Zauke, G.P. (2000). Crustaceans as bioindicators. Dans Biomonitoring of Polluted Water-Reviews on Actual Topics. Trans Tech Publications-Scitech Publications, *Environmental Research Forum*. 161–194.

Rivero, A., Agnew, P., Bedhomme, S., Sidobre, C. et Michalakis Y. (2007). Resource depletion in *Aedes aegypti* mosquitoes infected by the microsporidia *Vavraia culicis*. *Parasitology, 134,* 1355-1362.

Rodgers-Gray, T.P., Smith, J.E., Ashcroft, A.E., Isaac, R.E. et Dunn, A.M. (2004). Mechanisms of parasite-induced sex reversal in *Gammarus duebeni*. *International Journal for Parasitology, 34,* 747-753.

Roesijadi, G. (1981). The significance of low molecular weight, metallothionein-like proteins in marine invertebrates: Current status. *Marine Environmental Research, 4*, 167-179.

Roesijadi, G., Drum, A.S. Thomas, J.M. et Fellingham, G.W. (1982). Enhanced mercury tolerance in marine mussels and relationship to low molecular weight, mercury-binding proteins. *Marine Pollution Bulletin, 13,* 250-253.

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

Rombough, P.J. et Garside, E.T. (1982). Cadmium toxicity and accumulation in eggs and alevins of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Canadian Journal of Zoology, 60,* 2006-2014.

Roméo, M., Gharbi-Bouraoui, S., Gnassia-Barelli, M., Dellali, M. et Aïssa, P. (2006). Responses of *Hexaplex* (Murex) trunculus to selected pollutants. *Science of The Total Environment, 359,* 135-144.

Rosa, R. et Nunes, M.L. (2002). Changes in organ indices and lipid dynamics during the reproductive cycle of *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris*, and *Nephrops norvegicus* (Decapoda) from the portuguese south coast. *Crustaceana, 75,* 1095–1105.

Rosa, R. et Nunes, M.L. (2003). Biochemical composition of deep-sea decapod crustaceans with two different benthic life strategies off the Portuguese south coast. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 50,* 119–130.

Rousseau, E.J., Davison, A.J. et Dunn, B. (1992). Protection by β-carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: Implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine, 13*, 407-433.

Rumpus, A.E. et Kennedy, C.R. (1974). The effect of the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis* upon the respiration of its intermediate host, *Gammarus pulex*. *Parasitology, 68*, 271-284.

~ S ~

Schill, R.O., Görlitz, H. et 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.

Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebskorn, R. et Köhler, H.R. (2005). Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations. *Archives of environmental contamination and toxicology, 49,* 53–61.

Schlenk, D. (1999). Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin, 39,* 48-53.

Schludermann, C., Konecny, R., Laimgruber, J., Lewis, W., Schiemer, F., Chovanec, A. et Sures, B. (2003). Fish macroparasites as indicators of heavy metal pollution in river sites in Austria. *Parasitology, 126,* S61-S69.

Serafim, M., Company, R.M., Bebianno, M.J. et Langston, W.J. (2002). Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Marine Environmental Research, 54,* 361-365.

Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English, 25,* 1058-1071.

Sies, H. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine, 91,* S31-S38.

Smith, J.E., Moore, K. et Board, P.G. (1980). Regulation of γ-glutamylcysteine utilization in erythrocytes. *Enzyme, 25,* 236-240.

Smith, J.E. et Dunn, A.M. (1991). Transovarial transmission. *Parasitology Today, 7,* 146-148.

Smith, J.E. (2009). The Ecology and Evolution of Microsporidian Parasites. *Parasitology, 136,* 1901-1914.

Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W. et Blust, R. (2004). Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution, 129,* 99–112.

Soegianto, A., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.P. et Charmantier, G. (1999). Impact of cadmium on the structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicas* (Crustacea: Decapoda). *Aquatic Living Resources, 12,* 57-70.

Sornom, P., Felten, V., Médoc, V., Sroda, S., Rousselle, P. et Beisel, J.N. (2010). Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environmental Pollution, 158,* 1288-1295.

Sparkes, T.C., Keogh, D.P. et Pary, R.A. (1996). Energetic costs of mate guarding behavior in male stream-dwelling isopods. *Oecologia, 106,* 166-171.

Spencer, L.T. (1974). Parasitism of *Gammarus lacustris* (Crustacea: Amphipoda) by *Polymorphus minutus* (Acanthocephala) in Colorado. *American Midland Naturalist, 91*, 505-509.

Spicer, J.I. et McMahon, B.R. (1994). Gill function in the amphipod *Megalorchestia* (Orchestoidea) *californiana* (Brandt, 1851) (Crustacea). *Canadian Journal of Zoology, 72*, 1155-1158.

Sprague, V., Becnel, J.J. et Hazard, E.I. (1992). Taxonomy of phylum Microspora. *Critical Reviews in Microbiology, 18*, 285 - 395.

Sroda, S. et Cossu-Leguille, C. (2011a). Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor? *Ecotoxicology, 20*, 264-273.

Sroda, S. et Cossu-Leguille, C. (2011b). Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere, 83*, 538-544.

Stahl, W., Ale-Agha, N. et Polidori, M.C. (2002). Non-antioxidant properties of carotenoids. *Biological Chemistry, 383*, 553-558.

Staniek, K. et Nohl, H. (2000). Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1460*, 268-275.

Stark, G.T.C. (1965). Diplocotyle (Eucestoda), a parasite of *Gammarus zaddachi* in the estuary of the Yorkshire Esk, Britain. *Parasitology, 55*, 415-420.

Starling, J. (1985). Feeding, nutrition and metabolism. Biology of the Acanthocephala, Cambridge University Press, 125–212.

Starry, O., Wanzenböck, J. et 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.

Stegeman, J.J. et Kloepper-Sams, P.J. (1987). Cytochrome P-450 isozymes and monooxygenase activity in aquatic animals. *Environmental Health Perspectives, 71*, 87-95.

Stillman, M.J. (1995). Metallothioneins. *Coordination chemistry reviews, 144*, 461–511.

Stoeckmann, A.M. et Garton, D.W. (2001). Flexible energy allocation in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in response to different environmental conditions. *Journal of the North American Benthological Society, 20*, 486-500.

Stuhlbacher, A. et Maltby, L. (1992). Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 22*, 319-324.

Subczynski, W.K., Markowska, E., Gruszecki, W.I. et Sielewiesiuk, J. (1992). Effects of polar carotenoids on dimyristoylphosphatidylcholine membranes: a spin-label study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1105*, 97-108.

Sundelin, B. (1983). Effects of cadmium on *Pontoporeia affinis* (Crustacea: Amphipoda) in laboratory soft-bottom microcosms. *Marine Biology, 74*, 203–212.

Sures, B., Taraschewski, H. et Jackwerth, E. (1994a). Lead accumulation in *Pomphorhynchus laevis* and its host. *The Journal of Parasitology, 80*, 355-357.

Sures, B., Taraschewski, H. et Jackwerth, E. (1994b). Comparative study of lead accumulation in different organs of perch (*Perca fluviatilis*) and its intestinal parasite *Acanthocephalus lucii*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 52*, 269-273.

Sures, B. et Taraschewski, H. (1995). Cadmium concentrations in two adult acanthocephalans, *Pomphorhynchus laevis* and *Acanthocephalus lucii*, as compared with their fish hosts and cadmium and lead levels in larvae of *A. lucii* as compared with their crustacean host. *Parasitology Research, 81*, 494-497.

Sures, B., Taraschewski, H. et Siddall, R. (1997a). Heavy metal concentrations in adult acanthocephalans and cestodes compared to their fish hosts and to established free-living bioindicators. *Parassitologia, 39*, 213-218.

Sures, B., Taraschewski, H. et Rydlo, M. (1997b). Intestinal fish parasites as heavy metal bioindicators: a comparison between *Acanthocephalus lucii* (Palaeacanthocephala) and the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology, 59*, 14–21.

Sures, B. et Siddall, R. (1999). *Pomphorhynchus laevis*: The intestinal acanthocephalan as a lead sink for its fish host, chub (*Leuciscus cephalus*). *Experimental Parasitology, 93*, 66-72.

Sures, B. (2002). Competition for minerals between *Acanthocephalus lucii* and its definitive host perch (*Perca fluviatilis*). *International Journal for Parasitology, 32*, 1117-1122.

Sures, B., Thielen, F., Baska, F., Messershmidt, J. et von Bohlen, A. (2005). The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* as a sensitive accumulation indicator for the platinum group metals Pt, Pd, and Rh. *Environmental Research, 98*, 83-88.

Sures, B. (2006). How parasitism and pollution affect the physiological homeostasis of aquatic hosts. *Journal of Helminthology, 80*, 151-157.

Sures, B. et Radszuweit, H. (2007). Pollution-induced heat shock protein expression in the Amphipod *Gammarus roeseli* is affected by larvae of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). *Journal of Helminthology, 81*, 191-197.

Sures, B. (2007). Host-parasite interactions from an ecotoxicological perspective. *Parassitologia, 49*, 173.

Sures, B. (2008). Host–parasite interactions in polluted environments. *Journal of Fish Biology, 73*, 2133-2142.

Sutcliffe, D.W. (1992). Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): basic processes. *Freshwater Forum, 2*, 102-128.

Sutcliffe, D.W. (1993). Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) female strategies. *Freshwater Forum, 3*, 26-64.

~ T ~

Tain, L., Perrot-Minnot, M.J. et Cezilly, F. (2006). Altered host behaviour and brain serotonergic activity caused by acanthocephalans: evidence for specificity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 273*, 3039-3045.

Tankoua, O.F., Buffet, P.E., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Mouneyrac, C. et Berthet, B. (2011). Potential influence of confounding factors (size, salinity) on biomarkers in the sentinel species *Scrobicularia plana* used in programmes monitoring estuarine quality. *Environmental Science and Pollution Research, 18*, 1–11.

Taraschewski, H. (2000). Host-parasite interactions in Acanthocephala: A morphological approach. *Advances in Parasitology, 46*, 1–179.

Taylor, D. (1983). The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 7*, 33-42.

Taylor, E., Maund, S. et Pascoe, D. (1991). Toxicity of four common pollutants to the freshwater macroinvertebrates *Chironomus riparius* Meigen (Insecta: Diptera) and *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea: Amphipoda). *Archives of environmental contamination and toxicology, 21*, 371–376.

Taylor, E.J., Maund, S.J., Bennett, D. et Pascoe, D. (1994). Effects of 3,4-dichloroaniline on the growth of two freshwater macroinvertebrates in a stream mesocosm. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 29*, 80-85.

Terry, R.S., Dunn, A.M. et Smith, J.E. (1997). Cellular distribution of a feminizing microsporidian parasite: a strategy for transovarial transmission. *Parasitology, 115*, 157–163.

Terry, R.S., Smith, J.E., Sharpe, R.G., Rigaud, T., Littlewood, D.T.J., Ironside, J.E., Rollinson, D., Bouchon, D., MacNeil, C., Dick, J.T.A. et Dunn, A.M. (2004). Widespread vertical transmission and associated host sex–ratio distortion within the eukaryotic phylum Microspora. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 271*, 1783-1789.

Thielen, F., Zimmermann, S, Baska, F., Taraschewski, H. et Sures, B. (2004). The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) from barbel as a bioindicator for metal pollution in the Danube River near Budapest, Hungary. *Environmental Pollution, 129*, 421-429.

Thomas, F., Guldner, E. et Renaud, F. (2000). Differential parasite (Trematoda) encapsulation in *Gammarus aequicauda* (Amphipoda). *Journal of Parasitology, 86*, 650-654.

Thomas, M.B., Watson, E.L. et Valverde-Garcia, P. (2003). Mixed infections and insect–pathogen interactions. *Ecology Letters, 6*, 183–188.

Thünken, T., Baldauf, S.A., Bersau, N., Bakker, T.C.M., Kullmann, H. et Frommen, J.G. (2010). Impact of olfactory non-host predator cues on aggregation behaviour and activity in *Polymorphus minutus* infected *Gammarus pulex*. *Hydrobiologia, 654*, 137-145.

Timofeyev, M.A., Shatilina, Z.M., Bedulina, D.S., Protopopova, M.V., Pavlichenko, V.V., Grabelnych, O.I. et Kolesnichenko, A.V. (2008). Evaluation of biochemical responses in Palearctic and Lake Baikal endemic amphipod species exposed to $CdCl_2$. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 70*, 99-105.

Tokeson, J.P.E. et Holmes, J.C. (1982). The effects of temperature and oxygen on the development of *Polymorphus marilis* (Acanthocephala) in *Gammarus lacustris* (Amphipoda). *The Journal of Parasitology, 68*, 112-119.

Toudal, K. et 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 ~

Undeen, A.H. et Epsky, N.D. (1990). *In vitro* and *in vivo* germination of *Nosema locustae* (Microspora: Nosematidae) spores. *Journal of Invertebrate Pathology, 56*, 371-379.

~ V ~

Valenzuela, A. (1991). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sciences, 48*, 301-309.

van der Oost, R., Beyer, J. et Vermeulen, N.P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology, 13*, 57-149.

Vasák, M. (1991). Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. *Methods in Enzymology, 205*, 452-458.

Vasseur, P. et Cossu-Leguille, C. (2003). Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International, 28*, 711-717.

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

Ventura-Lima, J., de Castro, M.R., Acosta, D., Fattorini, D., Regoli, F., Machado de Carvalho, L., Bohrer, D., Geracitano, L.A., Barros, D.M., Marins, L.F.F., da Silva, R.S., Bonan, C.D., Reis Bono, M. et Monserrat, J.M. (2009). Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 149*, 538–543.

Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E. et Blasco, J. (1999). Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 277*, R1612 -R1619.

Vivarès, C.P., Martin, B.J. et Ceccaldi, H.J. (1980). Acides gras de trois microsporidies (Protozoa) et de leur hôte *Carcinus mediterraneus* (Crustacea), sain et parasité par *Thelohania maenadis*. *Parasitology Research, 61*, p.99-107.

Voets, J., Talloen, W., de Tender, T., van Dongen, S., Covaci, A., Blust, R. et Bervoets, L. (2006). Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. *Aquatic toxicology, 79*, 213–225.

~ W ~

Wade, C.R. et van Rij, A. (1985). *In vivo* lipid peroxidation in man as measured by the respiratory excretion of ethane, pentane, and other low-molecular-weight hydrocarbons. *Analytical Biochemistry, 150*, 1-7.

Wallace, R.A., Walker, S.L. et Hauschka, P.V. (1967). Crustacean lipovitellin. isolation and characterization of the major high-density lipoprotein from the eggs of decapods. *Biochemistry, 6*, 1582-1590.

Wallace, W. et 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.

Wang, D., Couillard, Y., Campbelle, G.C. et Jolicoeur, P. (1999). Changes in subcellular metal partitioning in the gills of freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*) living along an environmental cadmium gradient. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 56*, 774-784.

Weedall, R.T., Robinson, M., Smith, J.E. et Dunn, A.M. (2006). Targeting of host cell lineages by vertically transmitted, feminising microsporidia. *International Journal for Parasitology, 36*, 749-756.

Whitfield, P.J. (1970). The egg sorting function of the uterine bell of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). *Parasitology, 61*, 111-126.

Wilkinson, T.J., Rock, J., Whiteley, N.M., Ovcharenko, M.O. et Ironside, J.E. (2011). Genetic diversity of the feminising microsporidian parasite *Dictyocoela*: New insights into host-specificity, sex and phylogeography. *International Journal for Parasitology, 41*, 959-966.

Wittner, M. et Weiss, L.M. (1999). *The microsporidia and microsporidiosis*, Washington: American Society for Microbiology Press. p. 580.

Wright, D. (1980). Cadmium and calcium interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Freshwater Biology, 10*, 123–133.

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

~ X ~

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

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. et 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. et 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.

Xuereb, B., Bezin, L., Chaumot, A., Budzinski, H., Augagneur, S., Tutundjian, R., Garric, J. et Geffard, O. (2011). Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization in females and potential for use as an endocrine disruption biomarker in males. *Ecotoxicology, 20,* 1–14.

~ Y ~

Yang, G., Kille, P. et Ford, A.T. (2008). Infertility in a marine crustacean: Have we been ignoring pollution impacts on male invertebrates? *Aquatic Toxicology, 88,* 81–87.

Yehezkel, G., Chayoth, R., Abdu, U., Khalaila, I. et Sagi, A. (2000). High-density lipoprotein associated with secondary vitellogenesis in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 127,* 411–421.

~ Z ~

Zanders, I.P. et Rojas, W.E. (1992). Cadmium accumulation, LC 50 and oxygen consumption in the tropical marine amphipod *Elasmopus rapax*. *Marine Biology, 113,* 409–413.

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

Zimmermann, S., von Bohlen, A., Messerschmidt, J. et Sures, B. (2005). Accumulation of the precious metals platinum, palladium and rhodium from automobile catalytic converters in *Paratenuisentis ambiguus* as compared with its fish host, *Anguilla anguilla*. *Journal of Helminthology, 79,* 85-89.

Zimmermann, S., Sures, B. et Taraschewski, H. (1999). Experimental studies on lead accumulation in the eel-specific endoparasites *Anguillicola crassus* (Nematoda) and *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala) as compared with their host, *Anguilla anguilla*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 37,* 190-195.

ANNEXES

ANNEXE 1

Analyses physico-chimiques de l'eau superficielle et du sédiment de la Nied française à Laquenexy et Rémilly

		Eau superficielle	
		Rémilly	**Laquenexy**
Métaux (µg/L)	**Aluminium**	164	143
	Fer total	170	125
	Manganèse	55	109
	Mercure	< 0,1	< 0,1
	Zinc	3	3
	Arsenic	5,9	6,1
	Cadmium	< 0,2	< 0,2
	Chrome total	0,2	0,2
	Cobalt	0,2	0,3
	Cuivre	3,2	3,2
	Nickel	1	1,3
	Plomb	0,3	0,3
HAP (µg/L)	**Benzo(a)pyrène**	0,002	0,004
	Benzo(ghi)perylène	0,005	0,008
	Fluoranthène	-	0,02
	Phénanthrène	-	0,01
	Pyrène	-	0,01
PCBs (µg/L)	**PCB28**	< 0,005	< 0,005
	PCB52	< 0,005	< 0,005
	PCB101	< 0,005	< 0,005
	PCB118	< 0,005	< 0,005
	PCB138	< 0,005	< 0,005
	PCB153	< 0,005	< 0,005
	PCB180	< 0,005	< 0,005

		Sédiments	
		Rémilly	**Laquenexy**
	Matières sèches totales (%)	65.9	71,2
Métaux (mg/kg MS*)	**Aluminium**	19109	44254
	Fer total	26336	37509
	Manganèse	1721,5	779,2
	Mercure	< 0,02	0,05
	Zinc	51,8	87,8
	Arsenic	20,6	22,3
	Cadmium	0,2	0,3
	Chrome total	41,6	73,0
	Cobalt	10,4	16,1
	Cuivre	11,1	27,4
	Nickel	19,5	39,3
	Plomb	16,9	34,2
HAPs (µg/kg MS)	**Anthracène**	53	21
	Benzo(a)anthracène	382	204
	Benzo(a)pyrène	444	292
	Benzo(b)fluoranthène	366	278
	Benzo(ghi)perylène	371	294
	Benzo(k)fluoranthène	245	164
	Chrysène	440	284
	Dibenzo(a,h)anthracène	85	97
	Fluoranthène	762	589
	Indéno(1,2,3-cd)pyrène	363	260
	Méthyl 2 fluoranthène	65	< 50
	Phénanthrène	226	124
	Pyrène	659	392
PCBs (µg/kg MS)	**PCB28**	< 5	< 5
	PCB52	< 5	< 5
	PCB101	< 5	< 5
	PCB118	< 5	< 5
	PCB138	< 5	< 5
	PCB153	< 5	< 5
	PCB180	< 5	< 5

ANNEXE 2

Composition chimique du milieu M4 Elendt modifié

Solution(s) mère(s) I (substance unique)	**Concentration initiale dans l'eau ultrapure (mg/L)**	**Concentration (en fonction du milieu M4)**	**Pour préparer la solution mère II, ajouter à l'eau ultra pure le volume suivant de solution mère I (mL/L)**
H_3BO_3	57190	20000 fois	1,0
$MnCl_2$, $4H_2O$	7210	20000 fois	1,0
LiCl	6120	20000 fois	1,0
RbCl	1420	20000 fois	1,0
$SrCl_2$, $6H_2O$	3040	20000 fois	1,0
NaBr	320	20000 fois	1,0
Na_2MoO_4, $2H_20$	1260	20000 fois	1,0
$CuCl_2$ $2H_2O$	335	20000 fois	1,0
$ZnCl_2$	260	20000 fois	1,0
$CoCl_2$, $6H_2O$	200	20000 fois	1,0
Ki	65	20000 fois	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20000 fois	1,0
NH_4VO_3	11,5	20000 fois	1,0

Solutions mères de macronutriments (Substance unique)	**Concentration initiale dans l'eau ultra pure (mg/L)**	**Concentration (en fonction du milieu M4)**	**Volume de solution mère aouté pour préparer le milieu M4 (mL/L)**
Solution mère II	-	-	50,0
$CaCl_2$, $2H_2O$	293800	1000 fois	1,0
$MgSO_4$, $7H_2O$	246600	2000 fois	0,5
KCl	58000	10000 fois	0,1
$NaHCO_3$	64800	1000 fois	1,0
Na_2SiO_3, $5H_2O$	50000	5000 fois	0,4
$NaNO_3$	2740	10000 fois	0,1
KH_2PO_4	1430	10000 fois	0,1
K_2HPO_4	1840	10000 fois	0,1
Solution mère de vitamine	-	10000 fois	0,1

Solution mère de vitamines	**Concentration initiale (mg/L)**	**Concentration (en fonction du milieu M4)**
Chlorhydrate de thiamine	750	10000 fois
Cyanocobalamine (B_{12})	10	10000 fois
Biotine	7,5	10000 fois

ANNEXE 3

Composition chimique pour 1L de liquide de Ringer crustacés (Van Harreveld, 1936)

Substances	**Concentration finale (mM)**
NaCl	205,3
KCl	5,37
CaCl2	13,55
MgCl2	2,61
NaHCO3	2,38

La solution est autoclavée à 121°C, puis filtrée sur une membrane de 0,2 µm.

ANNEXE 4

Méthode de calcul de l' «*Integrate Biomarker Response*» (IBR) (Beliaeff et Burgeot, 2002)

Les différentes étapes du calcul de l'IBR sont les suivantes :

1- Pour chacun des n biomarqueurs (avec $n \geq 3$), calcul des valeurs moyennes X_i (i = 1 à n) par lot expérimental (par exemple : GSH pour les mâles parasités par *P. minutus* exposés à la concentration 2µg Cd/L)

2- Calcul de la moyenne générale « *m* » et de l'écart-type « *s* » de l'ensemble des X_i

3- Standardisation les X_i à l'aide de la formule suivante :

$$Y_i = (X_i - m) / s$$

4- Définition de la réponse de chaque biomarqueur individuel

$Z_i = Y_i$ dans le cas d'une augmentation du paramètre

ou $Z_i = - Y_i$ dans le cas d'une diminution du paramètre

5- Calcul des scores individuels Si des biomarqueurs à l'aide de la formule suivante :

$S_i = Z_i + |Z_{i\text{-}min}|$, où $|Z_{i\text{-}min}|$ représente la valeur absolue du Zi minimal parmi tous les lots

6- Calculs des aires individuelles A_i selon la formule :

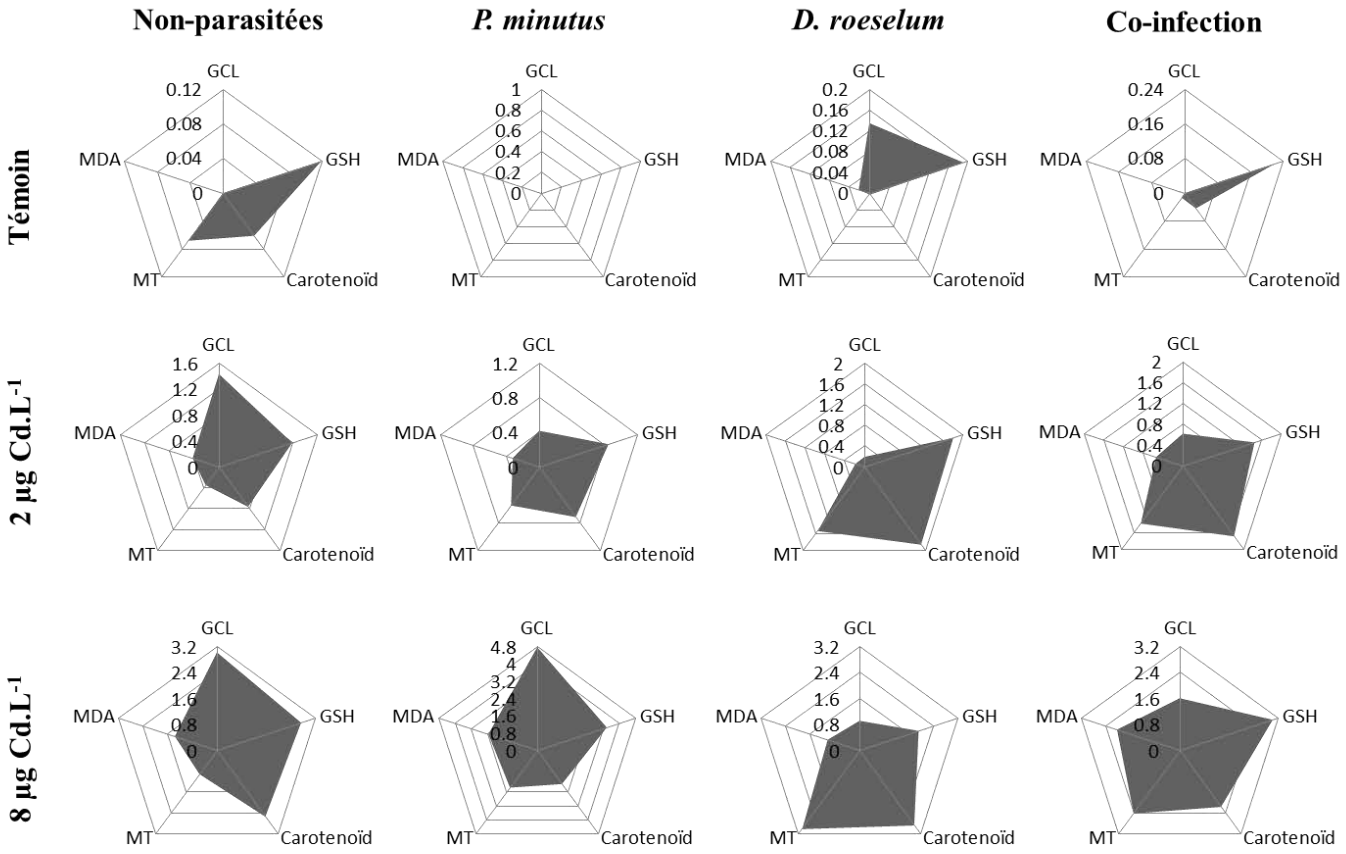
$$Ai = ½ \sin (2\pi/ n) . S_1 . S_2$$

7- Calcul de l'IBR selon la formule :

$$IBR_{lot} = \sum_{(i = 1 \text{ à } n)} A_i$$

ANNEXE 5

Diagrammes en radar obtenu à l'aide de l'«*Integrate Biomarker Response*» (IBR)



Résumé

Pour faire face à des perturbations environnementales, les organismes ont développé des défenses antitoxiques couramment utilisés comme biomarqueurs dans l'évaluation de la qualité des milieux. Cependant, de nombreux facteurs confondants comme la température ou le genre, influencent la réponse de ces biomarqueurs. Il est ainsi nécessaire de connaitre les effets de ces facteurs afin d'imputer correctement la réponse biologique mesurée à la présence de polluants. Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier l'influence d'un parasite acanthocéphale, *Polymorphus minutus*, transmis horizontalement et de microsporidies à transmission verticale, sur les réponses physiologiques de leur hôte, *Gammarus roeseli*, un crustacé amphipode d'eau douce d'intérêt écotoxicologique. Pour cela, nous avons choisi d'étudier le glutathion, tripeptide jouant un rôle central dans les systèmes antitoxiques, sa synthèse (*i.e.* activité γ-glutamylcystéine ligase), les réserves énergétiques (*i.e.* lipides, glycogène, protéines) et un biomarqueur d'effets toxiques, le malondialdéhyde. L'influence du parasitisme a été appréhendé dans différents cas d'études: (i) chez *G. roeseli* infecté par *P. minutus*, (ii) chez *G. roeseli* infecté par des microsporidies (*Dictyocoela roeselum* essentiellement) et (iii) chez *G. roeseli* co-infecté par ces deux types de parasite. Chaque cas d'étude a été réalisé en absence de stress et lors d'une exposition au cadmium.

Nous avons mis en évidence qu'en absence de contamination, la présence de *P. minutus* et une co-infection par *P. minutus* et *D. roeselum* affectent les biomarqueurs de *G. roeseli*. Après exposition au cadmium, la présence de parasites (*i.e.* infection simple ou co-infection) modifie la mobilisation des défenses antitoxiques et accentue les effets toxiques subits par l'hôte. Les résultats obtenus au cours de ce travail mettent en avant le caractère confondant du parasitisme en écotoxicologie et souligne l'importance de prendre en compte ce paramètre lors de l'évaluation de la qualité des milieux.

Mots-clés: *Amphipode, Gammarus roeseli, parasites, Polymorphus minutus, microsporidies, co-infection, biomarqueurs, facteur confondant, défenses antitoxiques, réserves énergétiques.*

Abstract

To cope with environmental disturbances, organisms have developed antitoxic defences commonly used as biomarkers in environmental risk assessment. However, many confounding factors such as temperature and gender could influence biomarker responses. It seems hence necessary to investigate their effects, in order to attribute biological responses only to pollutants. In this context, we investigated the influence of parasitism by studying the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus*, horizontally transmitted, and microsporidia parasites, vertically transmitted, on the physiological responses of their common host, the freshwater amphipod *Gammarus roeseli*, a classical model used in ecotoxicology. We investigated the glutathione, a tripeptide having a key role in antitoxic systems, its synthesis (i.e. γ-glutamylcysteine ligase activity), energy reserves (i.e. lipids, glycogen, proteins) and a toxicity biomarker, the malondialdehyde. The influence of parasitism was considered in different studies: (i) in *G. roeseli* infected by *P. minutus* only, (ii) in *G. roeseli* infected by microsporidia (mainly *Dictyocoela roeselum*) and (iii) in *G. roeseli* co-infected by both parasites. Each study was carried out in absence of pollutants and under cadmium stress.

We highlighted that, in the absence of contamination, only *P. minutus* and the co-infection affect the *G. roeseli* biomarker assessments. After cadmium exposure, the presence of parasites (i.e. single infection or co-infection) influences the mobilization of antitoxic defences, and accentuates toxic effects in their hosts. Our results underline the confounding nature of parasitism in ecotoxicology and thus, highlight the importance to take into account this parameter in the environmental risk assessment.

Key-words: *Amphipod, Gammarus roeseli, parasites, Polymorphus minutus, Microsporidia, co-infection, biomarkers, confounding factors, antitoxic defence, energy reserves.*