

Utilisation des enzymes digestives comme biomarqueurs chez le gammare

Odile Dedourge-Geffard¹, Laetitia Charron¹, Alain Geffard^{1*}, Arnaud Chaumot², Adeline François², Romain Coulaud², Lise Fechner³, Ali Jaffal¹, Jérémie Lebrun³, Didier Pont³, Hervé Quéau, Evelyne Tales³, Olivier Geffard²

¹ Université Reims Champagne-Ardenne, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Unité Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques, UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH Moulin de la Housse BP 1039, 51687 Reims

² IRSTEA, Unité de Recherche Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions (MAEP), Laboratoire d'écotoxicologie, 5 rue de la Doua, CS70077, 69626 Villeurbanne

³ IRSTEA, Unité de Recherche Hydrosystèmes et bioprocédés (HBAN), 1 rue Pierre Gilles de Gennes, CS 10030, 92761 Antony

* personne à contacter : alain.geffard@univ-reims.fr

Sommaire

1	Introduction	2
2	Matériels et méthodes.....	3
2.1	Stabulation des organismes	3
2.2	Expérimentations en conditions contrôlées	3
2.2.1	<i>Effets température et conductivité</i>	3
2.2.2	<i>Effets de la reproduction/cycle de mue chez la femelle</i>	3
2.2.3	<i>Effets d'un jeûne</i>	3
2.3	Expérimentations in situ	4
2.4	Mesures des paramètres biologiques	5
2.4.1	<i>Enzymes digestives et énergie disponible</i>	5
2.4.3	<i>Mesures de la fertilité et fécondité</i>	5
3	Résultats et discussion.....	6
3.1	Influence des paramètres abiotiques et biotiques sur l'activité des enzymes digestives	6
3.1.1	<i>Effets de la température et de la conductivité</i>	6
3.1.2	<i>Effets du cycle de reproduction</i>	6
3.1.3	<i>Effets de la quantité de nourriture</i>	8
3.2	Lien entre les réponses des enzymes digestives et la reproduction	9
3.3	Applications terrain	10
4	Conclusion.....	11
6	Références bibliographiques.....	12

1 Introduction

La surveillance de la qualité des milieux aquatiques, sur la base des textes réglementaires européens, implique des analyses chimiques dans différents compartiments et des approches de bioindication. Ces dernières sont basées sur des mesures de la structure des communautés en place utilisant les invertébrés, les poissons ou encore les algues. Si ces réponses sont très pertinentes d'un point de vue écologique, pour l'évaluation du bon état de santé des milieux aquatiques, à ce stade de l'observation la dégradation est installée. Ces réponses présentent un faible pouvoir prédictif et apparaissent peu efficaces pour identifier les causes de cette perturbation. Depuis les années 90, un développement important a été mené autour de réponses biologiques mesurées au niveau infra-individuel et individuel, regroupées sous le terme générique de biomarqueurs. Différentes classifications des biomarqueurs ont été proposées, notamment la distinction des biomarqueurs de défenses (métallothionéines, enzymes de biotransformation...) et de dommage (AChE, intégrité de l'ADN...) (De Lafontaine et al., 2000). Dans une optique d'évaluation des risques écotoxicologiques, les biomarqueurs représentent un intérêt particulier vis-à-vis de la précocité de leur réponse. Cependant leur utilisation dans les programmes de surveillance est encore assez réduite ce qui peut être lié à deux points :

(i) la réponse des biomarqueurs est sujette à l'influence de paramètres environnementaux (biotiques et abiotiques) non toxiques, représentant autant de facteur de confusion vis-à-vis de l'interprétation des résultats (Geffard et al., 2001, 2002). Il apparaît donc nécessaire de déterminer les sources de variation, l'amplitude des modulations de réponse liée à ces facteurs de confusion par rapport aux facteurs de contamination (Cairns, 1992) et de préciser les conditions de mesure de ces biomarqueurs au niveau des supports biologiques choisis ;

(ii) la pertinence des biomarqueurs sera d'autant plus importante si la précocité de leur réponse peut permettre non seulement de renseigner sur l'exposition d'un organisme à une ou plusieurs molécules mais surtout de suggérer un risque potentiel pour le maintien de l'individu voire de sa population (Amiard-Triquet et al., 2012). Afin d'améliorer la valeur écologique des biomarqueurs, tout en s'adressant à des mesures au niveau infra-individuel et individuel, il est proposé de s'intéresser à des processus, notamment en lien avec la reproduction, dont les perturbations ont les plus fortes chances d'avoir des conséquences en cascade sur les niveaux d'organisation biologique supra-individuels (Amiard-Triquet et al., 2012). Parmi ces processus, le métabolisme énergétique apparaît comme particulièrement pertinent pour y rechercher le/les biomarqueurs permettant d'établir le lien entre ces différents niveaux (De Coen et Janssen, 2003). De nombreux paramètres sont mesurés en relation avec le métabolisme énergétique (réserves énergétiques, métabolisme cellulaire...) (Mouneyrac et al., 2012). Durant ces dernières années, nous avons porté une attention particulière sur des réponses situées en amont du processus énergétique et concernant la capacité digestive des organismes. Plusieurs familles de contaminants ont montré des effets toxiques sur l'activité d'enzymes digestives suggérant des conséquences possibles sur l'acquisition de l'énergie, à partir de la nourriture ingérée, et des répercussions éventuelles sur des traits de vie de l'organisme (Dedourge-Geffard et al., 2012, Lebrun et al., 2012).

L'utilisation des biomarqueurs passe également par le choix d'organismes comme support de leur analyse. En milieu continental, les crustacés amphipodes du genre *Gammarus* représentent des espèces sentinelles d'intérêt. Les travaux portant sur les enzymes digestives ont tout particulièrement concerné *Gammarus fossarum*. Cet organisme, largement utilisé en écotoxicologie, présente plusieurs avantages en tant qu'espèce sentinelle (large répartition géographique, rôle clef dans la redistribution de la matière et de l'énergie dans les réseaux trophiques aquatiques).

L'objectif des différentes actions menées durant la phase 6 du PIREN a été de valider l'utilisation potentielle d'enzymes digestives chez le gammare comme biomarqueurs de la qualité des milieux aquatiques. La démarche mise en place a visé d'une part à caractériser la cinétique de réponses des enzymes digestives vis-à-vis de paramètres environnementaux et physiologiques afin de mieux connaître l'amplitude de réponse liée à des paramètres pouvant apparaître comme confondant dans l'interprétation des résultats

obtenus *in situ*. Ces premières actions ont permis de préciser les conditions de mesures des enzymes digestives chez le gammare afin de les interpréter comme biomarqueur. D'autre part, des actions ont été menées afin de préciser les conséquences éventuelles d'une perturbation de la capacité digestive des gammarus sur leur fitness (reproduction). La précision des liens potentiels entre les réponses mesurées au niveau infra-individuel et individuel, contribue à une meilleure interprétation des mesures de ces biomarqueurs dans un cadre d'évaluation du risque écotoxique.

2 Matériels et méthodes

2.1 Stabulation des organismes

Dans le cadre des expérimentations, les gammarus ont été collectés sur un site situé en amont du bassin de «La Bourbre» au niveau de la commune de «La Tour du Pin». Ce site a été retenu pour (i) son faible niveau de contamination; (ii) l'abondance de *Gammarus fossarum*; (iii) ses caractéristiques hydrologiques permettant d'effectuer des prélèvements tout au long de l'année.

Les organismes adultes sont sélectionnés par un tamis de maille 2 et 2,5mm, et sont stockés dans des récipients avec de l'eau de la rivière. Au laboratoire les organismes sont gardés 15 jours à $12 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selon un cycle de 16h/8h (jour/nuit). Les gammarus sont nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulnes (*Alnus glutinosa*) récoltées dans une zone faiblement anthropisée, et préalablement placées pendant 6 jours, à température ambiante, dans les aquariums de stabulation. Des vers lyophilisés (*Tubifex* sp.) sont également distribués deux fois par semaine.

2.2 Expérimentations en conditions contrôlées

2.2.1 Effets température et conductivité

L'influence de la température et de la conductivité de l'eau sur les activités d'enzymes digestives a été étudiée en exposant des gammarus mâles à 3 températures (7; 12 and 16°C) et trois conductivités (200, 500 and $800 \mu\text{S cm}^{-1}$). Vingt-quatre heures avant le lancement de l'expérience, les gammarus sont acclimatés à chaque traitement (Coulaud et al. 2011). Trois répliqués de trois organismes sont analysés pour chacune des 9 conditions. Les individus ont été nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulne et une photopériode 10/14h a été appliquée. Après 20 jours d'exposition, les gammarus sont comptés, pesés, mis dans l'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'aux analyses.

2.2.2 Effets de la reproduction/cycle de mue chez la femelle

Chez les crustacés, et en particulier chez *G. fossarum*, le cycle de mue est étroitement associé au cycle de reproduction. La détermination des stades de mue a été effectuée d'après Geffard et al. (2010). Des gammarus mâles et des femelles à chaque stade du cycle de mue (AB, C1, C2, D1 et D2) ont ainsi été prélevés dans les bacs de stabulation après 15 jours d'acclimatation dans les conditions décrites au paragraphe 2.1. A chaque prélèvement, les organismes sont pesés, plongés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'aux analyses.

2.2.3 Effets d'un jeûne

Afin d'évaluer l'influence de la quantité de nourriture disponible sur le niveau d'activité des enzymes digestives, des gammarus ont été nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) durant 7, 2 ou 1 jours par semaine sur deux cycles de reproduction (Figure 1). Le deuxième cycle est particulièrement associé à une seconde question visant à établir d'éventuelles relations entre une perturbation des capacités digestives et les conséquences sur l'allocation de l'énergie et la fonction de reproduction. Les enzymes digestives ont été mesurées chez les organismes mâles et femelles après 15 et 23 jours d'exposition (cycle 1). En complément chez les femelles, ont été mesurés à 15 jours l'énergie disponible

(lipides+glucides+protéines) puis à 23 jours et 43 jours des paramètres en lien respectivement avec la fertilité (nombre d'ovocytes) et la fécondité (nombre d'embryons issus de la fécondation du cycle 1)

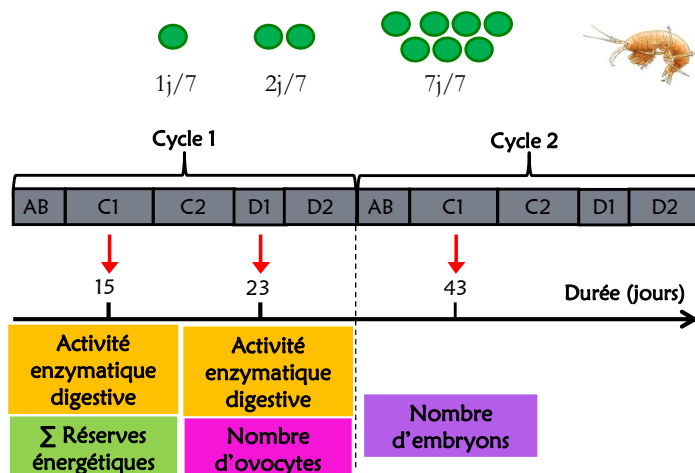


Figure 1 : Plan expérimental mis en place afin d'étudier les conséquences d'une perturbation de la capacité digestive (action d'un jeûne) chez des femelles *Gammarus fossarum* sur les réserves disponibles et sur des paramètres de fertilité et fécondité (Geffard et al., 2010).

2.3 Expérimentations *in situ*

A l'issue des actions menées en conditions contrôlées une méthodologie a été établie pour les études *in situ* d'évaluation de la qualité des eaux. La stratégie adoptée est celle d'une approche active à l'aide de la transplantation d'organismes. Cette dernière permet, sur la base d'organismes les plus homogènes possibles, de limiter au maximum l'influence de paramètres biotiques et environnementaux pouvant être confondant vis à vis de l'interprétation des résultats. Ainsi pour l'étude à grande échelle, des gammarus mâles, de taille similaire et provenant tous d'une même population ont été transplantés 15 jours sur 20 sites sur le bassin versant de la Seine (Figure 2). Ces travaux se déroulent dans le cadre du projet Biomarqu'Indic (Porteur : D. Pont, Irstea Antony) financé par l'AESN. A la fin de l'exposition, les gammarus sont pesés, plongés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C en vue de la mesure des activités digestives.

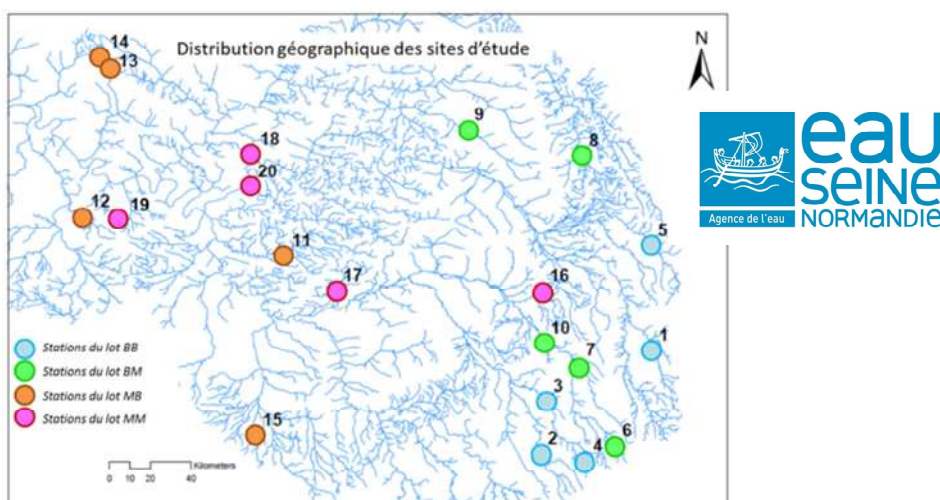


Figure 2 : Carte des sites d'étude sur le bassin versant de la Seine. En bleu, les sites de bonne qualité chimique et physico-chimique. En vert, orange et rouge les sites présentant une perturbation chimique et/ou physico-chimique.

2.4 Mesures des paramètres biologiques

2.4.1 Enzymes digestives et énergie disponible

La préparation des échantillons pour la mesure des enzymes digestives et réserves énergétique se réalise de façon différente. Pour les enzymes digestives et les protéines totales, six pools de 3 gammars sont préparés par condition. Le broyage des échantillons s'effectue dans un tampon Tris-HCl de 0,01M à pH 7. Le volume de tampon est ajusté en fonction de la masse de tissus frais, à raison de 50 mg de tissus par mL de tampon utilisé. Pour broyer l'échantillon, trois billes en inox de 3 mm de diamètre sont placées dans chaque échantillon, qui est ensuite positionné dans un broyeur (Retsch) pour 2 minutes de broyage à une fréquence de 30 Hz. Les billes sont retirées et l'homogénat est vortexé avant de prélever les 20 µL nécessaires au dosage des protéines totales. L'homogénat est ensuite centrifugé à 10 000 g durant 10 minutes à 4 °C puis le surnageant obtenu est divisé pour le dosage des différentes enzymes digestives.

Pour le dosage des réserves (lipides, glycogène et sucres libres), 6 individus sont traités individuellement par condition. Les gammars sont broyés dans 800µL de méthanol avec 3 billes (broyeur Retsch, 2 min à 30 Hz). L'homogénat est ensuite divisé pour la mesure respective des lipides d'une part et des sucres libres et glycogène d'autre part. Les dosages des réserves énergétiques (lipides, glycogène, sucres libres) sont réalisés à partir du protocole mis au point par Van Handel (1985a et 1985b) et Plaistow et al. (2003). Les teneurs en protéines sont définies selon la méthode de Bradford (1976). A partir des mesures de réserves, la charge énergétique disponible (Ea) est calculée en multipliant, puis sommant, les données de lipides, de sucres libres, du glycogène et des protéines totales par leur enthalpie de combustion (17,5 kJ/g pour les carbohydrates, 39,5 kJ/g pour les lipides et 24 kJ/g pour les protéines totales).

La mesure des activités des enzymes digestives sur le surnageant a été effectuée selon le protocole décrit par Palais et al. (2010) avec respectivement de l'amidon (1%) et de la carboxyméthylcellulose (2%) comme substrat pour l'amylase et la cellulase. L'activité de la trypsine est déterminée selon le protocole décrit par Garcia-Carreño et Haard (1993), en utilisant comme substrat le N-Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA, 3 mM). Chaque activité enzymatique est exprimée par µg de produit produit/min/mg de protéine.

La quantité de protéines dans le surnageant est déterminée selon Bradford (1976) en utilisant le BSA (Bovine Serum Albumin) comme protéine standard.

2.4.3 Mesures de la fertilité et fécondité

Estimation de la fertilité : le nombre d'ovocytes secondaires dans chaque ovaire est compté *in vivo* par transparence en observant les femelles sous une loupe binoculaire (grossissement x 30) (Geffard et al., 2010).

Estimation de la fécondité : les embryons des femelles sont retirés du marsupium, déposés dans une goutte d'eau sur une lame de verre et comptés sous une loupe binoculaire (grossissement x 80). Le stade de développement embryonnaire est déterminé sur la base des critères définis chez *Gammarus pulex* (McCahon et Pascoe, 1988) et adaptés chez *Gammarus fossarum* par Geffard et al. (2010).

3 Résultats et discussion

3.1 Influence des paramètres abiotiques et biotiques sur l'activité des enzymes digestives

3.1.1 Effets de la température et de la conductivité

L'activité amylase n'est pas influencée par la conductivité de l'eau ($p > 0,05$; résultats non montrés). En revanche, cette activité est significativement plus faible (réduction de 21%) chez les gammarès maintenus à 7°C comparativement aux organismes à 12°C ($p=0,013$) et 16°C ($p=0,029$ for 16°C).

En ce qui concerne l'activité cellulase, l'analyse statistique a montré un effet important ($p < 0,001$) de la température et un effet faible de la conductivité ($p < 0,05$), sans interaction significative. Ainsi, des activités cellulase significativement plus faibles sont observées à 7°C par rapport à 12°C et 16°C ($p < 0,0001$).

Quant à l'activité trypsine, nous n'avons pas observé d'effet température et/ou de conductivité chez les gammarès exposés.

L'influence des facteurs confondants diffère selon l'enzyme considérée. Toutefois, de façon globale, les résultats montrent un faible effet de la conductivité sur les enzymes digestives et un effet significatif de la température mais uniquement à la plus faible valeur (7°C). Ces résultats indiquent que la conductivité n'est pas un paramètre clé influençant les activités d'enzymes digestives lors de bioessais à court terme. A l'inverse, la température doit être prise en compte pour une interprétation fiable des données *in situ*, notamment dans des milieux à températures inférieures à 12°C.

Pour ces deux facteurs abiotiques, des variations similaires ont été observées pour l'alimentation chez *G. fossarum* (Coulaud et al. 2011).

3.1.2 Effets du cycle de reproduction

Chez les femelles

Les activités amylase, cellulase et trypsine (Figure 3) chez les femelles, diminuent significativement ($p < 0,05$) durant le cycle de reproduction. Dans tous les cas, les activités digestives les plus élevées sont détectées au cours des stades AB et C1, comparativement aux autres stades (D1 à D2). Le second stade d'intermue (C2) est considéré comme un stade intermédiaire. Le pourcentage de diminution diffère selon les enzymes considérées. Les activités amylase, cellulase et trypsine décroissent ainsi de 51%, 31%, et 61% respectivement, par rapport aux niveaux les plus élevés (AB or C1).

Cette baisse d'activité peut suggérer une réallocation de l'énergie au niveau des processus de reproduction, au détriment des processus digestifs. Ces résultats peuvent également traduire une modification comportementale des individus femelles qui, durant cette phase de prémue, sont en précopulat ce qui limite voire empêche ces dernières d'accéder à la nourriture. Ainsi, il peut être énergétiquement pertinent pour la femelle de ne pas maintenir un niveau élevé d'activité des enzymes digestives si elle ne peut pas accéder à la nourriture. Chez *Callinectes arcuatus*, Vega-Villasante et al. (1999) ont également suggéré que les différences d'activités d'enzymes digestives étaient liées aux besoins spécifiques en énergie des stades de mue. Ainsi, les activités d'enzymes digestives apparaissent comme des réponses physiologiques adaptées aux besoins énergétiques.

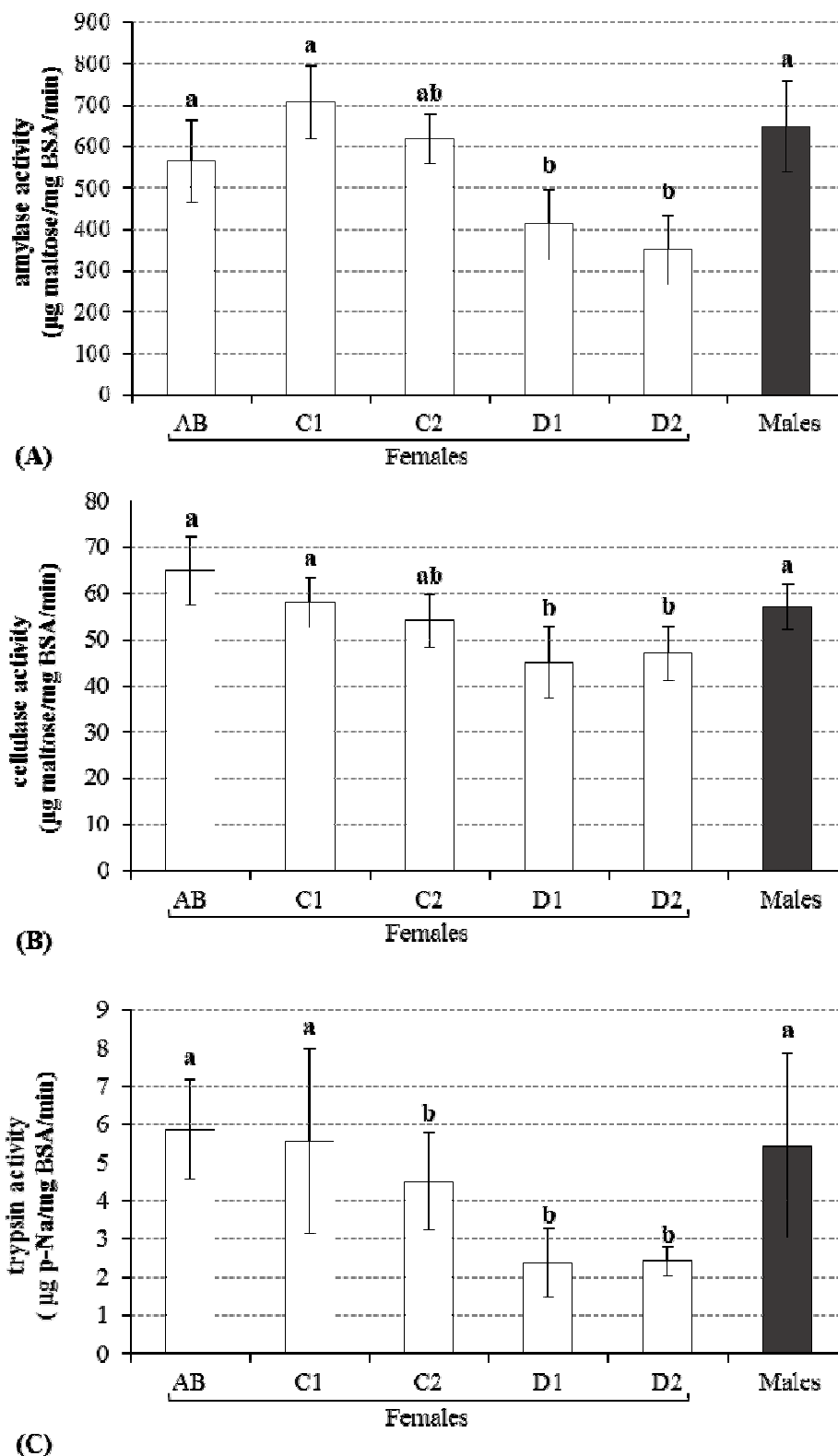


Figure 3: Activités amylase (A), cellulase (B), et trypsine (C) lors de chaque stade du cycle de reproduction chez les femelles et chez les mâles (n = 6). Les histogrammes avec la même lettre ne sont pas statistiquement différents ($p < 0,05$).

Durant le cycle de mue et de reproduction, les réserves (glycogène, lipides et protéines) ont augmenté jusqu'au dernier stade d'intermue (C2) (résultats non montrés). Durant la première partie du cycle de reproduction, l'accumulation d'énergie chez les femelles est nécessaire à la croissance des oocytes et à la préparation de la mue, événements extrêmement coûteux en énergie.

Chez les mâles

Les mâles ont été échantillonnés durant l'amplexus. Leurs niveaux d'activités digestives (Figure 3) et de réserves (résultats non montrés) sont similaires à ceux des femelles des stades AB ou C1. Ces résultats suggèrent que les organismes mâles ont la capacité de se nourrir durant les stades de précopulat ce qui est en accord avec Becker et al. (2013).

3.1.3 Effets de la quantité de nourriture

L'application d'un stress trophique en nourrissant *ad libitum* des gammarus femelles et mâles durant 7, 2 ou 1 jours par semaine sur un cycle complet de reproduction (Figure 1) modifie le niveau d'activité de l'amylase (Figure 4). Cette diminution de l'activité amylase en fonction du stress trophique, est observée aussi bien chez les femelles que les mâles et pour les deux temps de mesure (15 et 23 jours). Contrairement au mâle, des activités plus faibles sont observées chez la femelle au cours du temps (23 jours vs 15 jours). Ces résultats sont tout à fait cohérents avec ceux observés précédemment sur l'effet de la reproduction (Figure 3). En effet entre 15 et 23 jours les femelles passent respectivement du stade C au stade D de leur cycle de mue (Figure 3) avec une diminution du niveau d'activité. A l'inverse, l'absence de variation temporelle chez le mâle (Figure 4), suggère une plus faible influence du processus de reproduction sur les activités enzymatiques digestives.

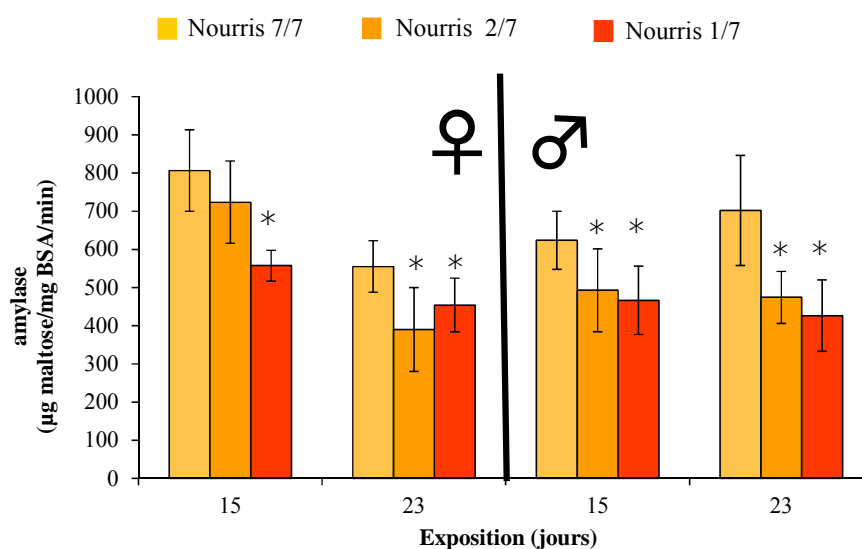


Figure 4 : Activité amylase mesurée chez *Gammarus fossarum* femelle (♀) et mâle (♂) après 15 et 23 jours de nutrition *ad libitum* durant 7, 2 ou 1 jours par semaine. L'étoile indique une différence significative entre la condition 7/7 et 2/7 ou 1/7 ($p < 0,05$).

Contrairement à l'amylase, l'activité trypsine (Figure 5) n'est pas affectée par le stress nutritionnel qu'il s'agisse de la femelle ou du mâle. Ceci pourrait s'expliquer par un apport exclusif de feuilles durant l'exposition au contraire de la période de stabulation pendant laquelle des vers sont également apportés. En revanche, comme pour l'amylase, nous retrouvons chez la femelle uniquement, une diminution d'activité trypsine entre 15 et 23 jours, reflétant l'effet majeur de la reproduction chez les femelles comparativement aux mâles.

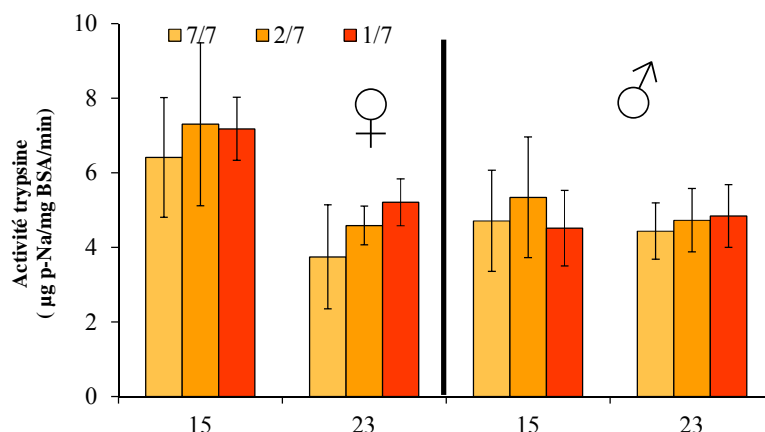


Figure 5 : Activité trypsine mesurée chez *Gammarus fossarum* femelle (♀) et mâle (♂) après 15 et 23 jours de nutrition ad libitum durant 7, 2 ou 1 jours par semaine. L'étoile indique une différence significative entre la condition 7/7 et 2/7 ou 1/7 ($p < 0,05$).

3.2 Lien entre les réponses des enzymes digestives et la reproduction

En parallèle des mesures effectuées sur l'activité des enzymes digestives (Figures 4 et 5), les réserves énergétiques (à 15 jours) et des réponses en lien avec la fertilité (nombre d'ovocytes à 23 jours) et la fécondité (nombre d'embryons à 43 jours) chez les femelles, ont été quantifiées (Figure 6). L'effet du jeûne a montré précédemment, une inhibition, après 15 jours d'exposition, de l'activité amylase aussi bien chez les mâles que chez les femelles. De façon concomitante, après 15 jours d'exposition, une baisse de l'énergie disponible (lipides + glycogènes + protéines) est observée chez les organismes femelles (Figure 6).

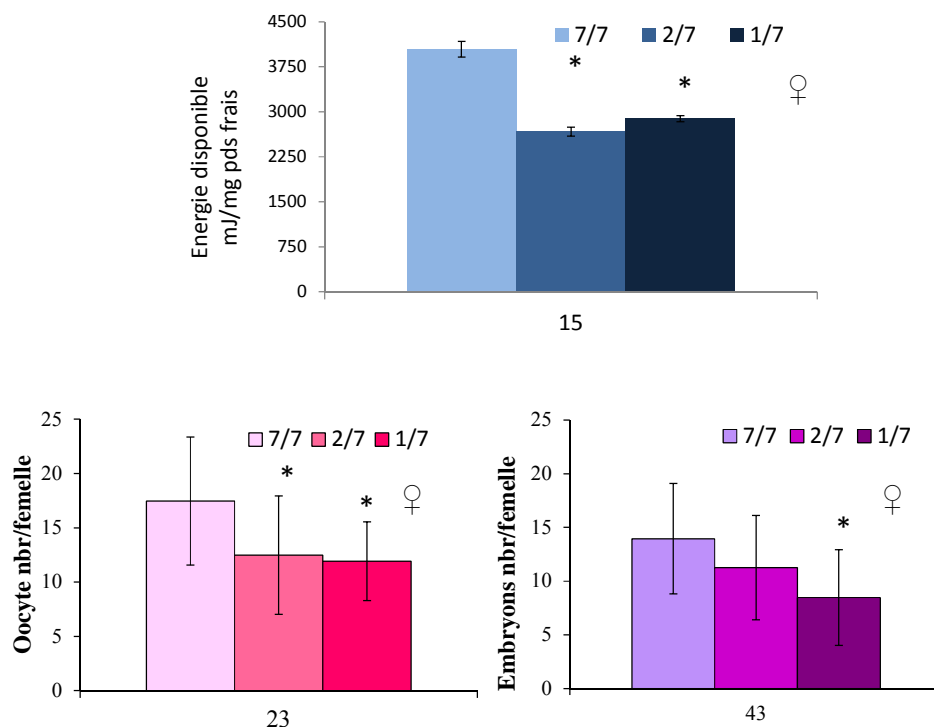


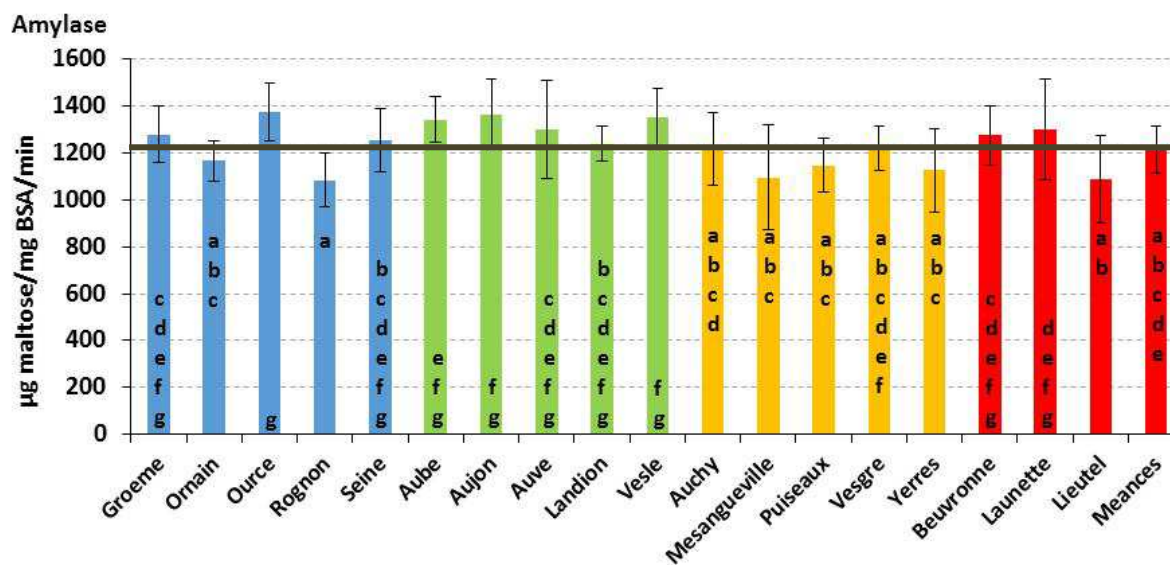
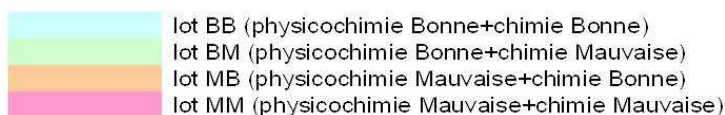
Figure 6 : Charge en énergie disponible à 15 jours, fertilité (nombre d'ovocytes) à 23 jours et fécondité (nombre d'embryons) à 43 jours d'exposition, mesurées chez des femelles *Gammarus fossarum* soumises à différentes rations de nourriture (nourries ad libitum 7, 2 ou 1 jours par semaine). L'étoile indique une différence significative entre la condition 7/7 et 2/7 ou 1/7 ($p < 0,05$).

Après 23 et 43 jours, il est observé une diminution de la fertilité et de la fécondité des organismes femelles soumises à un jeûne (Figure 6).

Ainsi, il peut être suggéré que la perturbation de la capacité digestive des organismes animaux puisse, après 15 jours d'exposition à un stress, traduire un risque de diminution de l'énergie disponible pour la reproduction avec des conséquences sur la fitness des individus. Dans le cas d'une exposition à des contaminants chimiques, en plus d'une perturbation de la capacité digestive des organismes, il est à noter que l'individu doit allouer une part de son énergie à sa défense, potentiellement au détriment de la reproduction.

3.3 Applications terrain

La mesure de l'amylase et de la trypsine (Figure 7) chez les organismes exposés 15 jours ne permet pas de discriminer significativement les sites selon les 4 conditions physicochimiques et chimiques du milieu. Toutefois, si l'on positionne la valeur moyenne d'activités enzymatiques des sites du lot BB, certains sites sont mis en évidence avec des activités amylases mais surtout trypsine plus faibles, en particulier pour le lot MB. Nous constatons également que les organismes encagés sur le site Rognon du lot BB présentent des valeurs plus faibles d'activités digestives.



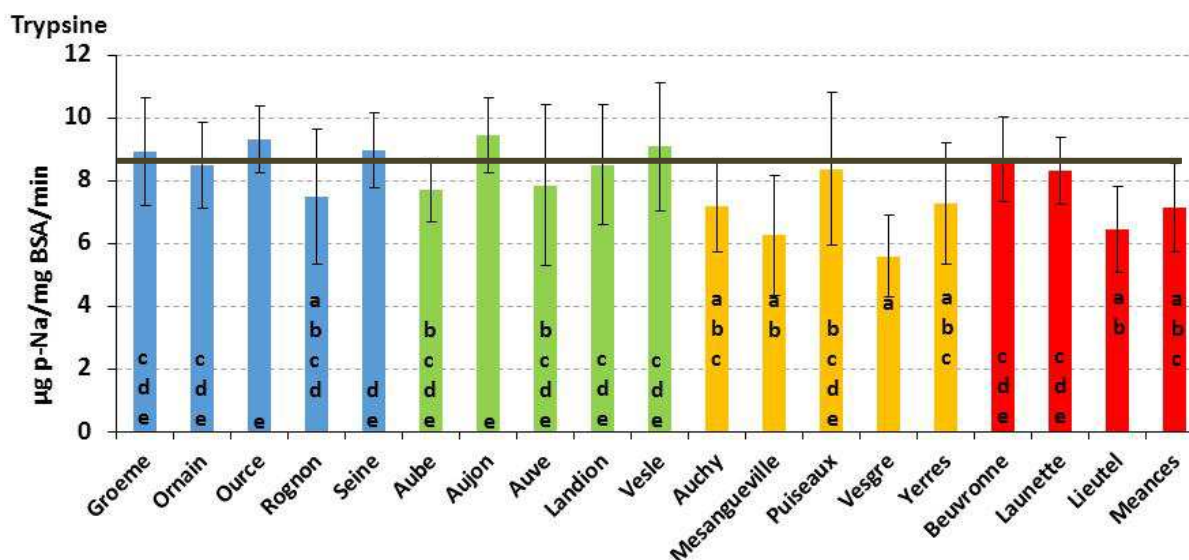


Figure 7 : Activités amylase et trypsine chez des gammarès mâles transplantés 15 jours sur 20 sites du bassin versant de la Seine (projet Biomarqu'Indic). Les histogrammes avec la même lettre ne sont pas statistiquement différents ($p < 0,05$). La ligne horizontale représente la valeur moyenne des 5 sites du lot BB.

Durant le projet Biomarqu'Indic, des informations seront également disponibles sur la reproduction des organismes femelles exposées sur les différents sites. Ceci nous permettra de vérifier si la relation entre la perturbation de l'activité enzymatique et celle de la fertilité peut également s'observer en conditions *in situ* et venir ainsi renforcer l'intérêt des enzymes digestives comme biomarqueur.

4 Conclusion

Les biomarqueurs du métabolisme énergétique apparaissent comme des réponses plus généralistes qui rendent compte globalement de la qualité du milieu mais qui peuvent être modulées par un grand nombre de contaminants chimiques. Leur possible capacité à préciser le lien entre les inhibitions d'activités enzymatiques et l'état de santé de l'organisme, pouvant impliquer le maintien de la population, leur confère une pertinence écologique intéressante. Ainsi le couplage des mesures effectuées *in situ* selon un protocole précis avec les connaissances acquises en conditions contrôlées permettant i) de préciser le lien possible entre les réponses mesurées à différents niveaux d'organisation et ii) d'intercalibrer les réponses entre mâles et femelles, doivent permettre d'améliorer l'apport de la mesure de biomarqueurs (ex : enzymes digestives) pour une évaluation du risque associé à une dégradation de la qualité du milieu (Figure 8). Cependant, dans un contexte de surveillance des milieux, l'identification de l'origine d'une dégradation est un élément important et ce tout particulièrement dans l'objectif de mise en place de mesures pour améliorer la qualité du milieu. Ainsi, dans une approche multi marqueurs, et en considérant les précautions méthodologiques nécessaires, le couplage aux biomarqueurs plus généralistes de biomarqueurs plus ou moins spécifiques, visant essentiellement à indiquer une exposition et/ou un mode d'action d'un contaminant ou d'une famille de contaminants, peut représenter une approche complémentaire pertinente.

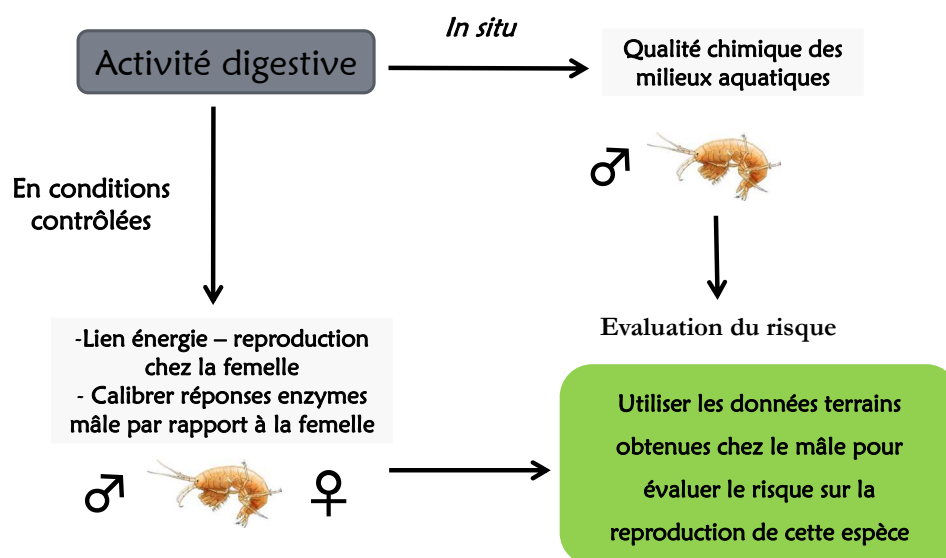


Figure 8 : Apport couplé de mesures d'activités digestives en conditions contrôlées et in situ pour une évaluation du risque écotoxicologique.

6 Références bibliographiques

- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S., 2012. Ecological biomarkers, indicators of Ecotoxicological effects. CRC Press, Boca Raton.
- Becker, J., Ortmann, C., Wetzel, M.A., Winkelmann, C., Koop, J.H.E., 2013. Mate guarding in relation to seasonal changes in the energy reserves of two freshwater amphipods (*Gammarus fossarum* and *G. pulex*). *Freshw Biol* 58: 372-381.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Cairns, J.Jr., 1992. The threshold problem in ecotoxicology. *Ecotoxicol.* 1: 3-16.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S., Chaumot, A., 2011. In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Res.* 45, 6417-6429.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 2003. The missing biomarker link : relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population. *Environ Toxicol Chem.* 22: 1632-1641.
- Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Geffard, A., Amiard-Triquet, C., 2012. Origin of Energy Metabolism Impairments. In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S. (Eds.), *Ecological Biomarkers – Indicators of Ecotoxicological Effects*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 279-306.
- de Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicol.* 50 : 51-71.
- García-Carreño, F.L., Haard, N., 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* 17, 97-113.
- Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Mouneyrac, C., 2001. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters *Crassostrea gigas* from a clean and a metal-rich sites. *Biomarkers.* 6: 91-107.
- Geffard, A., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., 2002. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker : seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers.* 7: 123-137.
- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noel, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmentier, G., Charmentier-Daures, M., 2010. *Gammarus fossarum* as a freshwater test for evaluation of reprotoxic chemicals. *Environ Toxicol Chem.* 29(10), 2249-2259.

Lebrun, J.D., Perret, M., Geffard, A., Gourlay-Francé, C., 2012. Modelling copper bioaccumulation in *Gammarus pulex* and alterations of digestive metabolism. *Ecotoxicology* 7, 2022–2030.

McCahon, C., Pascoe, D., 1988. Culture techniques for three freshwater macroinvertebrate species and their use in toxicity tests. *Chemosphere* 17(12): 2471-2480.

Mouneyrac C, Durin C, Péry A, 2012. Consequences of energy metabolism impairments. In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S. (Eds.), *Ecological Biomarkers – Indicators of Ecotoxicological Effects*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp 280-294.

Palais, F., Jubeaux, G., Dedourge-Geffard, O., Biagiante-Risbourg, S., Geffard, A., 2010. Amylolytic and cellulolytic activities in the crystalline style and the digestive diverticulae of the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771). *Molluscan Res.* 30, 29–36.

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

Van Handel, E., 1985a. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 1(3): 299-301.

Van Handel, E., 1985b. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 1(3): 302-304.

Vega-Villasante, F., Fernández, I., Preciado, R.M., Oliva, M., Tovar, D., Nolasco, H., 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Ordway, 1863 (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Bull Mar Sci* 65: 1-9.