



**HAL**  
open science

## Les marqueurs biochimiques utilisés chez *Gammarus fossarum* au laboratoire d'écotoxicologie d'INRAE

Patrice Noury

► **To cite this version:**

Patrice Noury. Les marqueurs biochimiques utilisés chez *Gammarus fossarum* au laboratoire d'écotoxicologie d'INRAE. 2022. hal-03778756

**HAL Id: hal-03778756**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03778756v1>**

Submitted on 16 Sep 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Les marqueurs biochimiques utilisés chez *Gammarus fossarum* au laboratoire d'écotoxicologie d'INRAE**

**Synthèse de données bibliographiques  
comme support à l'interprétation et à la définition de valeurs seuils**

**Patrice Noury, Unité RIVERLY**

**Laboratoire d'Ecotoxicologie**

**Mai 2020**

## SOMMAIRE

<b>1. CONTEXTE ET OBJECTIFS</b> .....	2
<b>2. GAMMARE ET BIOMARQUEURS A INRAE</b> .....	2
<b>3. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	4
3.1. Démarche .....	4
3.2. Traitement de l'échantillon et matrices d'intérêt .....	4
3.2. Acétylcholinestérase (AChE) .....	5
3.3. Carboxylestérase (CE) .....	8
3.4. Phénol oxydase (PO) .....	9
3.5. Glutathion-S-Transférase (GST) .....	11
3.6. Lipopéroxydation (TBARS) .....	14
3.7. Statut Anti Oxydant (TAS) .....	17
3.8. Lipides totaux .....	19
3.9. Glycogène .....	22
3.10. Protéines totales.....	24
<b>4. CONCLUSION</b> .....	25
Références bibliographiques .....	28

## 1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Au laboratoire d'écotoxicologie d'INRAE, une batterie de biomarqueurs sur invertébrés s'est constituée au fil des sujets d'études et de recherches, initiés par les étudiants et chercheurs autour d'un objectif commun, celui de la mise au point de méthodes de bio-surveillance des milieux aquatiques. La diversité des projets et des expérimentations s'intègre néanmoins dans une cohérence d'ensemble qui vise, grâce aux outils biochimiques, à l'expertise de notre laboratoire face à des situations toxiques dans les milieux aquatiques d'eau douces. Aujourd'hui la validité de ces outils passe par l'établissement de valeurs de références, relatives ou absolues, à l'aune desquelles nos résultats d'expériences seront interprétés. Connaître l'amplitude, le sens et les causes de variations, naturelles ou artificielles, de chaque marqueur est indispensable. Ce double objectif peut être atteint grâce au suivi chronologique d'une population de référence accompagné d'une synthèse bibliographique de l'utilisation de nos biomarqueurs en écotoxicologie aquatique sur invertébrés.

## 2. GAMMARE ET BIOMARQUEURS A INRAE

Pour ses expérimentations, le laboratoire d'écotoxicologie d'INRAE du centre Centre Lyon-Grenoble Auvergne-Rhône-Alpes à Villeurbanne, utilise des gammare (*Gammarus fossarum*) issus d'une population se développant naturellement dans une ancienne cressonnière, située dans le département de l'Ain. L'accès et la gestion du site s'effectuent en collaboration avec la société BIOMAE spécialisée dans la bio-surveillance active. La cressonnière, alimentée par des eaux de sources tempérées, est relativement abritée des pollutions si bien qu'elle permet toute l'année de disposer d'une population de gammare de référence pour notre laboratoire.

Dans nos expériences de terrain ou de laboratoire, la discrimination d'une condition toxique s'effectue en général par comparaison avec une condition témoin simultanée ou par rapport à un état initial. Cependant, face aux fluctuations des valeurs témoins d'une étude à l'autre, on s'interroge sur la variabilité naturelle de nos biomarqueurs et sur la possibilité de disposer de niveaux de références absolus ou saisonniers qui servirait de base à des interprétations plus pertinentes de nos résultats.

Evaluer les variations naturelles (saisonniers) de chaque marqueur d'une part et estimer la répétabilité méthodologique d'autre part sont les buts poursuivis dans le cadre du suivi au long cours de notre population de gammare de référence. Un suivi mensuel de la population de gammare de la cressonnière sur une batterie de neuf biomarqueurs nous a paru opportun pour cela.

Dans nos dispositifs expérimentaux de laboratoire et de terrain, le dimensionnement, la durée d'exposition, l'échantillonnage et le traitement des gammare pour les analyses biochimiques ont été prévus à l'origine pour la mesure de l'activité acétylcholinestérase (AChE), premier de nos marqueurs sur invertébrés (Noury 2016). La fraction cytosolique obtenue après broyage à l'aide de billes d'acier et centrifugation à 9000 g (S9) et utilisée pour la mesure de ce biomarqueur, a depuis servi de matrice pour l'ensemble des biomarqueurs développés par la suite.

Parmi les activités enzymatiques étudiées en écotoxicologie, l'AChE et la Glutathion-S-transférase (GST) constituent des mesures très répandues chez tous les organismes y compris le gammare. L'AChE signe l'effet de substances neurotoxiques alors que la GST,

participe au phénomène de détoxification de phase II dont le rôle est la conjugaison et l'excrétion des xénobiotiques organiques. Depuis quelques années l'accent a été mis sur deux autres marqueurs enzymatiques assez peu étudiés chez le gammare: la phénol oxydase (PO) et la carboxylestérase (CE). Le premier est lié au système immunitaire et le second est une enzyme aspécifique participant à la défense précoce de l'organisme à l'égard de certaines molécules organiques possédant un groupement ester (les pesticides notamment).

Les marqueurs du stress oxydants les plus pratiqués au laboratoire sont d'une part, le malondialdéhyde (MDA) issu de la peroxydation lipidique et révélé par le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), et d'autre part la mesure du statut en antioxydants (TAS) selon la mesure du TEAC (Trolox Equivalence Antioxidant Capacity) qui est représentatif des molécules antioxydantes non enzymatiques (Glutathion réduit, pigments, vitamines...). Ce sont respectivement un marqueur d'effet (dommages cellulaires) et un marqueur de protection vis-à-vis du stress oxydatif.

En complément, des marqueurs de réserves énergétiques sont pris en compte depuis peu dans nos études. Il s'agit des protéines totales, du glycogène et des lipides totaux. Ceux-ci visent principalement à rendre compte de l'état physiologique des individus étudiés vis-à-vis de conditions toxiques ou environnementales.

Tous ces paramètres forment une batterie de neuf biomarqueurs analysés systématiquement pour le suivi mensuel de notre population de référence (gammare de la cressonnière) et pour certaines de nos études écotoxicologiques menées à partir de ces mêmes gammare. Parmi les autres mesures biochimiques historiquement pratiquées sur le gammare dans notre laboratoire on peut citer le dosage des pigments (mélanine et caroténoïdes), de la catalase (CAT) ou de la super oxyde dismutase (SOD). Ces marqueurs peuvent être pris en compte au cas par cas selon la problématique abordée.

**Tableau I : Batterie de biomarqueurs utilisée au laboratoire**

Nom	Groupe	Signification de la mesure
AChE (Acétylcholinestérase)	activités enzymatiques	Activité de régulation de la neurotransmission
CE (Carboxylestérase)		Activité de défense vs xénobiotiques
GST (Glutathion-S-tranférase)		Activité de détoxification vs xénobiotiques
PO (Phénol oxydase)		Activité clé du système immunitaire
TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)	Stress Oxydant	Produits d'oxydations membranaires
TEAC (Trolox Equivalence Antioxidant Capacity)		Molécules antioxydantes non enzymatiques
Protéines totales	Réserves énergétiques	Biomasse , énergie
Glycogène		Stockage énergie
Lipides totaux		Stockage énergie

## 3. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 3.1. Démarche

Pour chaque biomarqueur sélectionné, cette revue bibliographique compare tout d'abord les différentes méthodes de mesure existantes, puis détaille les résultats obtenus au cours d'études de laboratoire ou de terrain et éventuellement les interprétations qui en ont été faites par les auteurs. La recherche bibliographique s'est focalisée sur les biomarqueurs appliqués au genre *Gammarus* puis a été élargie si nécessaire aux études sur amphipodes, crustacés, voire aux invertébrés dans leur ensemble. On note que les articles de référence méthodologique sont pour la plupart antérieurs à l'année 2000 et la quasi-totalité des études écotoxicologiques retenues comprises entre 1998 et 2020.

Une attention particulière a été menée sur les études visant le suivi d'une population d'invertébrés aquatiques sur une période d'au moins un an. Celles-ci sont peu nombreuses (Dutra, Santos et al. 2008, Palais, Mouneyrac et al. 2011, Sroda and Cossu-Leguille 2011, Gismondi, Beisel et al. 2012, Gelinas, Lajeunesse et al. 2013) et aucune ne réunit autant de biomarqueurs que le suivi des gammars de la cressonnière. La littérature montre que lors de ces suivis, les paramètres les plus étudiés sont particulièrement les lipides, puis viennent deux biomarqueurs d'effet non enzymatique du stress oxydant : le taux de peroxydation lipidique (MDA) et la concentration en glutathion réduit (GSH). La teneur en protéines totales est également systématiquement mesurée, considérée comme une réserve énergétique secondaire mais servant également à normaliser d'autres marqueurs. Parmi les biomarqueurs enzymatiques, certains associés aux stress oxydants (SOD, CAT, GPX) sont les plus mentionnés par les auteurs. Toutefois, ils ne font pas partie de notre batterie, bien que la super oxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) aient déjà été mesurées dans notre laboratoire dans le cadre de certaines études toxicologiques, visant notamment l'effet oxydant des nanoparticules.

### 3.2. Traitement de l'échantillon et matrices d'intérêt

Dans la littérature, l'outil de broyage est en général un « Potter », un « Ultra Turrax » ou un broyeur à bille d'acier. Pour le tampon, les homogénats sont réalisés soit à partir de tampon phosphate, soit un tampon TRIS-HCl (Charron, Geffard et al. 2014).

Le tampon phosphate est généralement supplémenté en anti protéase avec un mélange à 1 mM de phénylméthyl sulphonylfluoride (PMSF) et 1 mM de L-serine-borate. Dans notre cas, le tampon phosphate ne contient pas d'additif de conservation mais un tensio-actif (Triton) pour faciliter l'extraction. Le rapport volume de tampon /biomasse est de 10/1 pour les échantillons de gammare étudiés dans notre laboratoire, il est de 2/1 (2,5/1) chez plusieurs auteurs (Sroda and Cossu-Leguille 2011), (Gismondi, Beisel et al. 2012).

Dans la littérature l'extrait cytosolique est obtenu en général après la centrifugation de l'homogénat à une vitesse d'environ 10000 g pendant une durée de 10 à 30 min mais certains auteurs utilise en plus l'ultracentrifugation à 100 000 g pour travailler sur la fraction microsomale (Baker, Fabrick et al. 1998, Boily, Sarrasin et al. 2013). L'extrait obtenu est ensuite utilisé pour le dosage des activités enzymatiques et parfois du glutathion réduit (GSH) et du malondialdéhyde (MDA). Dans notre laboratoire la fraction cytosolique (9000g, 15 min) sert en plus à la détermination des paramètres de réserves énergétiques.

A noter cependant qu'une majorité d'auteurs dose les lipides ainsi que le MDA dans l'homogénéat brut et le glycogène dans un culot de centrifugation issu d'une précipitation au sulfate de sodium (Plaistow, Troussard et al. 2001, Gismondi, Beisel et al. 2012).

Notre laboratoire propose l'utilisation d'un tensio actif dans le tampon de broyage afin de renforcer l'extraction des lipides dans la phase aqueuse de l'homogénéat sous forme de micro gouttelette lipidique en suspension. Après centrifugation, ces lipides sont ensuite séparés du S9 par une classique extraction en phase organique (Folch, Lees et al. 1957).

### 3.2. Acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase est une enzyme localisée au niveau des synapses, qui dégrade le neurotransmetteur acétylcholine en choline + acétate afin de permettre au neurone de revenir à l'état de repos après l'influx nerveux. La mesure de l'activité cholinestérasique est le marqueur de neurotoxicité le plus étudié et le plus utilisé en toxicologie environnementale des milieux aquatiques. Elle permet de diagnostiquer l'exposition des organismes aquatiques à des inhibiteurs tels que les pesticides neurotoxiques (organophosphorés et carbamates). L'inhibition provoquée par ces substances classe les cholinestérases dans les estérases de type B contrairement aux estérase de type A que sont les carboxylestérases qui présentent un pouvoir d'hydrolyse vis-à-vis des xénobiotiques.

La méthode de dosage est basée sur un dosage colorimétrique en cuve (Ellman, Courtney et al. 1961) adaptée sur microplaque. Elle mesure, la capacité de l'AChE à dégrader l'acétylthiocholine (ATCi) en thiocholine qui réagit avec l'ion dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former un complexe de coloration jaune. L'intensité de la coloration est mesurée au spectrophotomètre à 405 nm, toutes les 20 à 30 secondes à partir du début de la réaction. L'activité peut être exprimée en nmol/min dans un cadre opératoire répété à l'identique. Cependant la pondération du résultat par un équivalent poids frais, par la teneur en protéines de l'échantillon (S9) ou par un étalon commercial d'acétylcholinestérase permet de calibrer le mode d'expression.

Au laboratoire d'écotoxicologie d'Inrae, l'activité enzymatique AChE est historiquement le premier biomarqueur mesuré chez le gammare. L'échantillonnage des organismes pour la mesure de cette activité a déterminé les conditions de préparation et d'extraction pour les marqueurs développés ultérieurement. L'AChE est mesurée sur la fraction post-mitochondriale (S9) d'un homogénéat de 5 gammares mâles dont le poids total est compris entre 80 et 100 mg frais, ceci afin de limiter l'influence d'un biais physiologique corrélant l'AChE à la taille de l'animal. Une relation inverse entre AChE et taille (âge) s'observe tant chez les poissons (Flammarion, Noury et al. 2002) que chez les crustacés et peut être interprétée comme une dilution du tissu synaptique au cours de la croissance d'un individu. Cette relation s'observe tant sur l'activité enzymatique rapportée au poids frais que sur celle rapportée à la teneur en protéines de l'échantillon. Nous avons établi que cinq échantillons de ce type (25 gammares en tout) suffisent à caractériser une condition expérimentale au regard de la variabilité inter-réplicats (qui intègre variabilité individuelle, la reproductibilité de l'extraction et la répétabilité du dosage).

L'activité AChE chez le gammare se montre par ailleurs insensible aux facteurs abiotiques que sont la température de l'eau et la conductivité et plus largement au facteur saison (Xuereb, Chaumot et al. 2009). Un milieu hypoxique ne semble pas affecter le niveau de référence comme le montre une étude sur l'amphipode *Monoporeia affinis* (Gorokhova, Lof

et al. 2010). Des différences liées au sexe sont cependant observées, notamment entre femelles à des stades de développement embryonnaire différents.

Les inhibitions de l'AChE sont de nature et d'intensité très variées. Si les insecticides carbamates et organophosphorés demeurent les xénobiotiques les plus neurotoxiques, d'autres molécules moins puissantes tels que les métaux, les médicaments, les hydrocarbures surfactants ainsi que d'autres pesticides peuvent moduler à la baisse l'activité de l'enzyme. A noter la distinction entre l'inhibition irréversible provoquée principalement par les organophosphorés et l'inhibition transitoire engendrée par la plupart des autres substances. Les inhibiteurs spécifiques des cholinestérases sont non seulement certains insecticides mais aussi des produits pharmaceutiques tel que la Rivastigmine et la Galantamine dont le mode d'action est réversible ainsi que d'autres agents thérapeutiques comme le Diisopropyl fluorophosphate et l'écothiopate qui entraînent des inhibitions permanente (Colovic, Krstic et al. 2013).

L'altération de l'activité AChE se manifeste parfois par une surexpression (induction), comme ce qui est observé avec les insecticide néonicotinoïdes. C'est le cas par exemple pour l'insecte *Apis mellifera* en présence de clothianidine à partir e 2,45 ng par individu (Boily, Sarrasin et al. 2013). Par ailleurs, chez *Hyalella azteca* exposée à l'antibiotique sulfaméthoxazole à 400 µM, l'AChE augmente d'un facteur de 1.5 (mâle) à 2 (femelle) en même temps que le taux de TBARS, marqueur d'effet du stress oxydant (Yu, Yin et al. 2019). Un autre anti bactérien, le triclocarban, entraîne une induction de l'AChE chez *Gammarus locusta* qui devient significative (x2) à la concentration d'exposition de 2,5 µg/L pendant 60 jours (Barros, Montes et al. 2017). Parmi les métaux, on note que le cadmium entre 0,1 et 1 µg/L entraîne des augmentations chez *Daphnia magna* d'un facteur de 1.3 (Jemec, Tisler et al. 2008).

Vis à vis des pesticides neurotoxiques, il a été observé, chez la daphnie, que l'inhibition de AChE intervient de manière conjointe ou différée à une diminution de l'activité carboxylestérasique, qui est généralement la première impactée et donc la plus sensible en raison de son rôle métabolique protecteur (Barata, Solayan et al. 2004).

La sensibilité de *gammarus pulex* au regard des organophosphorés se manifeste pour le pyrimiphos-méthyl par des inhibitions significatives dès les concentrations de 1,92 et 0,77 µg/l après 24 et 48h d'exposition respectivement, avec une baisse de 87 % à la plus forte concentration testée de 11,2 µg/L (McLoughlin, Yin et al. 2000). Le Chlorpyriphos sur *Gammarus pulex* engendre quant à lui une inhibition significative dès 0,36 nMol (0,13 µg/L) et forte (86%) à 2,86 nM (Xuereb, Noury et al. 2007). L'azinphos méthyl occasionne quant à lui des inhibitions chez *Hyalella curvispina* à des concentrations de 12,5 et 2,5 µg/l à 24 et 48h respectivement (Anguiano, Castro et al. 2014). Par ailleurs, les concentrations inhibant 50% de l'activité ont été déterminées pour le dichlorvos, le parathion, et l'aldicarbe : elles sont respectivement 0,17, 0,61, et 95 µg/L chez *Daphnia magna* and 6,2, 2,9, and 27 µg/L chez *Chironomus riparius* (Sturm and Hansen 1999).

A signaler que les molécules spécifiquement neurotoxiques que sont les organophosphorés n'engendrent pas toujours les résultats attendus. L'azinphosmethyl et fenitrothion à des concentrations inférieures ou égale à 5 µg/l sont insuffisantes pour engendrer une inhibition de l'AChE sur deux espèces d'insecte (*Ephemerella sp.*, *Hydropsyche spp.*) tandis que le plécoptère *Claassenia sp.* exposé au fénitrothion (1 à 10 µg/l) montre une nette augmentation de l'activité à 24h avant d'afficher une diminution au-delà (Day and Scott 1990).



Parmi les pesticides non spécifiquement neurotoxiques, on constate un effet du glyphosate sur *Gammarus pulex* se caractérisant par des inhibitions croissantes de 23 à 53 % pour des concentrations de 10 à 40 µg/L lors d'exposition de 24 à 96h (Pala 2019). L'AChE varie alors dans le même sens que la teneur en glutathion réduit (GSH) et la catalase (CAT) et inversement à une augmentation du taux de MDA.

Les surfactants sont des produits pouvant entrainer des inhibitions de l'AChE à des concentrations relativement élevées au regard des teneurs environnementales. *Daphnia magna*, en réponse à plusieurs concentrations de substances tels que le dodécyl benzyl sulfonate (DBS) et le sodium dodécyl sulfate (SDS), montre une diminution progressive de l'AChE jusqu'à moins 30 % du niveau basal aux concentrations maximales d'exposition, respectivement de 10 et 40 mg/l (Guilhermino, Lacerda et al. 2000).

Les métaux qui agissent également de manière non ciblée sur l'AChE entraînent des inhibitions à des teneurs élevées. Le dichromate de sodium et le molybdate de sodium agissent ainsi sur l'AChE de *Daphnia magna* à des concentrations de 0,15 et 1500 mg/l, ayant CI 50 de 1,29 et 2847 mg/l respectivement (Diamantino, Guilhermino et al. 2000). Toujours, chez *Daphnia magna*, l'action du zinc inhibe l'activité AChE des néonates à une concentration de 0,55 mg/l après 48h d'exposition, valeur proche de la CI 50 estimée à 0,8 mg/l (Diamantino, Almeida et al. 2003). Le cuivre et le zinc testés sur l'amphipode *Echinogammarus meridionalis* et le décapode *Atyaephyra desmarestii* n'engendrent en revanche aucune affectation de l'activité AChE jusqu'à des concentrations respectives de 50 et 200 µg/l pour le cuivre et jusqu'à 3 mg/l pour le zinc et pour les deux espèces (Quintaneiro, Monteiro et al. 2014). Une étude menée sur le chrome et le cadmium vis-à-vis de *Daphnia magna* durant 21 jours montre respectivement une inhibition significative à la plus forte concentration d'exposition (35 µg/L) et une induction dès 0,082 µg/L et ce jusqu'à 1,31 µg/L (concentration maximum testée) (Jemec, Tisler et al. 2008).

Parmi les substances sans effet sur l'AChE, on note par exemple le perfluorooctane sulfonate (PFOS) vis-à-vis *Gammarus insensibilis* jusqu'à des concentrations de 3,1 mg/l pendant 4 jours alors que d'autres paramètres tels que la SOD ou les MDA sont nettement affectés (Touaylia, Khazri et al. 2019). On note également que l'atrazine (herbicide) jusqu'à 150 µg/L n'engendre pas de modification de l'AChE chez le *Chironomus tentans*, alors qu'il induit le cytochrome P450 qui assure sa biotransformation (Rakotondravelo, Anderson et al. 2006).

L'importance physiologique de l'activité AChE et sa spécificité en font un marqueur de choix pour les études de biosurveillance environnementale, tant en milieu marin qu'en eau douce. Au laboratoire d'écotoxicologie d'INRAE, cette démarche a été initiée à la fin des années 2000 avec l'amphipode *Gammarus fossarum* au cours d'un travail de thèse (Xuereb 2009). Depuis, la biosurveillance dite « passive » qui investigate les populations sauvages, est devenue « active », c'est-à-dire qu'elle vise l'encagement contrôlé d'organismes de référence sur les sites d'étude. Dans cet objectif, ont été étudiés les prérequis que sont la maîtrise de la variabilité intrinsèque de l'AChE et la définition de valeurs de référence (Xuereb, Chaumot et al. 2009). Une étude complémentaire a également mis en évidence les relations entre ce biomarqueur et les altérations du comportement telles que la locomotion et l'alimentation (Xuereb, Lefevre et al. 2009). L'encagement de gammares dans le cadre d'études ciblant les pollutions agricoles a mis en évidence des inhibitions de l'AChE lors de certaines fenêtres d'expositions correspondant peu ou prou aux calendriers culturels d'épandage (IRSTEA, Laboratoire de chimie des Milieux Aquatiques et al. 2015)

Concernant les études en milieu marin, on peut noter que *Monoporeia affinis* exposé à une dizaine de sédiments diversement contaminés par des métaux et des produits

organiques, présente des inhibitions de l'AChE qui se corrént avec le paramètre ORAC caractérisant le statut en antioxydants (Lof, Sundelin et al. 2016).

Toujours à propos de matrices complexes, le biomarqueur AChE peut être sensible à des effluents domestiques ou industriels. On note par exemple que l'exposition d'*Hydropsyche peristerica* et de *Gammarus pulex* à des effluents de moulin à huile et de moulin à agrumes entraîne des inhibitions de l'ordre de 25% lorsque la proportion d'effluent dans le milieu atteint respectivement 4 et 17-25% (Karaouzas, Cotou et al. 2011). En revanche l'exposition *ex-situ* de *Gammarus fossarum* à des effluents urbains issus d'un pilote de traitement à l'ozone n'engendre pas de variation significative de l'AChE (Wigh, Geffard et al. 2017).

### 3.3. Carboxylestérase (CE)

La famille des carboxylestérases (CE) regroupe des protéines de type hydrolase dont fait partie l'acétylcholinestérase (AChE). La nomenclature distingue les *beta*-estérases qui sont inhibées par les organophosphorés et les *alpha*-estérases qui ont une action hydrolysante sur ces substances. Plus généralement les insecticides (carbamates, organophosphorés et pyréthrinoides de synthèse) étant des esters, les carboxylestérases jouent un grand rôle dans leur métabolisation ou leur séquestration, engendrant un effet respectivement détoxifiant et protecteur de l'acétylcholinestérase. L'induction ou l'inhibition de ces enzymes peuvent ainsi être utiles en tant que marqueur de biosurveillance de l'environnement.

A noter que ces enzymes sont aussi reconnues pour leur rôle dans la métabolisation de drogues et substances pharmaceutiques : lovastatine (anti cholestérol), osseltamivir (anti viral), cocaïne, héroïne.

En tant que biomarqueur, la mesure apparaît sous des abréviations diverses tel que CE, CbE ou GE pour Général Estérase. Néanmoins, l'activité Carboxylestérase est encore peu utilisée pour la biosurveillance en écotoxicologie aquatique (Wheelock, Phillips et al. 2008). Il n'existe pas encore d'étude sur les variations naturelles de ce paramètre, mais le suivi mensuel en cours sur la population de *Gammarus fossarum* de notre site d'élevage devrait apporter quelques réponses à ce sujet.

Les méthodes de dosages de l'activité carboxylestérase diffèrent par les substrats employés et par le solvant organique utilisé pour le dissoudre. Selon la méthode, le métabolite issu de la réaction avec l'enzyme est mesuré par absorbance dans le visible ou dans l'UV (Mastropaolo and Yourno 1981). Dans notre laboratoire nous utilisons une méthode (Ljungquist and Augustinsson 1971) adaptée à la microplaque et qui utilise comme substrat le 4-Nitrophenyl acétate (CAS : 830-03-5) dont le métabolite jaune est mesuré à 405 nm. Les enzymes sont contenues dans la fraction cytosolique S9 (9000 g) ce qui nécessite comme pour les autres marqueurs enzymatiques un broyage de l'échantillon en tampon phosphate (pH 7,8) additionné de Triton, suivi d'une centrifugation. L'activité peut être exprimée en nmol/min/mg frais, en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protéines voire en U/g frais après calibration vis-à-vis d'une gamme d'estérase de foie de porc (CAS : 9016-18-6)

La mesure de la CE prend une place encore assez modeste dans les études écotoxicologiques sur les pesticides mais prometteuse car plus précoce et sensible que le marqueur plus classique que constitue l'AChE.

Une étude sur l'effet de l'azinphos méthyl (organophosphoré) chez l'amphipode *Hyalella curvipina* (Anguiano, Castro et al. 2014) montre qu'au terme de 48h la CE est inhibée dès la concentration de 12,5  $\mu\text{g}/\text{l}$  alors que l'AChE ne l'est pas, signant ainsi l'effet protecteur (séquestrant) de l'activité carboxylestérasique vis-à-vis du pesticide. Le même auteur montre par ailleurs la tendance d'un niveau de base relativement élevé de l'activité carboxylestérase

chez certaines populations de larves du diptère *Simulium spp* soumises régulièrement à une pression toxique dans leur milieu (Anguiano, Ferrari et al. 2008). Une autre étude a considéré trois sous populations de *Hyaella curvispina* plus ou moins résistantes au carbaryl (carbamate) en raison de leur degré d'exposition dans leur milieu d'origine. Les mesures d'AChE et de CE sur ces populations après une exposition à 10 µg/l montrent d'une part une forte baisse de la CE et une stabilité de l'AChE chez les populations pré exposées naturellement et d'autre part, avec une sensibilité proche, une inhibition conjointe de la CE et de l'AChE chez la population de référence (Anguiano, Vacca et al. 2017). En résumé, une population d'amphipodes tolérante, c'est-à-dire dont l'exposition chronique aux pesticides est associée à une modification de la sensibilité des organismes, se caractérise par un niveau de base plus élevé, une grande sensibilité à la présence de pesticides, ainsi qu'une forte réactivité (inhibition importante) en cas de surexposition.

La complémentarité et la sensibilité des marqueurs AChE et CE ont également été évaluée chez *Daphnia magna*, la CE se révélant également plus sensible que l'AChE vis-à-vis des organophosphorés (chlorpyrifos, malathion), mais de sensibilité égale vis-à-vis des carbamates (carbofuran) (Barata, Solayan et al. 2004). Au cours de cette étude, le temps de récupération des organismes survivants variait de 24 à 96h avec les organophosphorés et de 12h seulement avec le carbaryl.

Par ailleurs, vis-à-vis de l'insecte *Chironomus tentans*, il a été noté une absence d'effet de l'atrazine (30 et 50 µg/l) et du DDT (0,01 et 0,05 µg/l) sur l'activité carboxylestérase alors que le chlorpyrifos en revanche, réduit l'activité CE de 17% dès 0,02 µg/l avec le substrat b-naphtyl acétate et de 30,7 et 48,8 %, à 0,10 µg/l avec les substrats a-naphtyl acétate et b-naphtyl acétate respectivement. Pour l'AChE, une inhibition significative n'étant constatée qu'à partir de 0,1 µg/l, c'est l'activité CE qui se montre à nouveau plus sensible entre les deux marqueurs (Rakotondravelo, Anderson et al. 2006).

D'un point de vue général, si la sensibilité de la CE apparait plus élevée que l'AChE chez les crustacés et les insectes cela est parfois l'inverse chez les mollusques. Chez le gastéropode *Chilina gibbosa*, l'AChE est très sensible à l'azynphos méthyl (CI 50% = 0,002 µg/l) alors que la CE l'est beaucoup moins (CI 50% = 1000 µg/l) (Bianco, Yusseppone et al. 2013). Pareillement, la comparaison des deux activités enzymatiques chez *Mytilus edulis* vis-à-vis d'exposition à de l'ésérine (carbamate) et du Paraoxon (organophosphoré) à des concentrations entre 0,05 à 0,5 mM, montre une plus grande sensibilité et réactivité de l'AChE, surtout envers le carbamate (Galloway, Millward et al. 2002).

D'après les études précitées, l'activité basale dépend en particulier du modèle biologique, de la fraction biologique et du mode d'expression utilisé. Chez *Hyaella curvispina*, les valeurs témoins d'une expérimentation *in vitro* se situent autour de 100 U/mg protéines alors que par ailleurs, pour la même espèce, la comparaison d'une population sensible et une résistante aux pesticide abouti à des activités basales respectives de 0,27 µmol/min/mg et de 0,14 µmol/min/mg protéines. Chez le diptère *Simulium spp*. la même comparaison fourni les valeurs 2,17 et 0,86 µmol/min/mg protéines respectivement.

### 3.4. Phénol oxydase (PO)

Les invertébrés n'ont pas d'immunité acquise. Ils ont un système immunitaire inné, qui s'appuie sur une mélanisation entraînant un processus de coagulation, phagocytose, encapsulation des corps étrangers. La phénol oxydase est l'enzyme terminale d'une cascade de réaction conduisant à cette mélanisation. Chez les crustacés cet enzyme est particulièrement présente dans l'hémolymphe (hémocytes) et dans la cuticule. Chez le gammare, pour des raisons pratiques liées à nos expérimentations, nous mesurons son

activité dans l'extrait cytosolique issu d'une homogénéisation de corps entiers à l'instar de ce qui est pratiqué sur larve de zygoptère (Janssens and Stoks 2014).

La méthode, adaptée pour la microplaque utilise le 3,4-Dihydroxy-L-Phénylalanine (L-DOPA) comme substrat. La réaction conduit à la formation de dopachrome de couleur rouge dont l'absorbance est lue à 490 nm et à 30°C toutes les 30 secondes. L'activité est calculée sur la partie linéaire de la cinétique et exprimée en nmol de produit formé par minute et par mg d'équivalent matière fraîche. L'ajout préalable de chymotrypsine permet de doser la phénol oxydase « Totale » en transformant la part de pro-enzyme (Pro-PO) de l'échantillon en enzyme active.

Ainsi, la mesure de l'activité phénol oxydase peut être utilisée en tant que marqueur biochimique du système immunitaire chez le gammare. Chez ce crustacé, s'il n'est pas encore utilisé en routine en écotoxicologie, ce biomarqueur a néanmoins fait l'objet de plusieurs études.

D'un point de vue fondamental, douze populations de *Gammarus pulex* ont été comparées à partir de mesure de PO dans l'hémolymphe (Cornet, Biard et al. 2009). Il apparaît que l'activité est variable entre ces populations mais aussi sur une même population au cours du temps, entre deux échantillonnages. Les auteurs n'ont pas montré de modulation de l'activité liées à l'absence de nourriture contrairement à ce qui a été observé chez des larves de l'insecte *Ischnura elegans* (Janssens, Dinh Van et al. 2014). Le lien connu avec les réserves énergétiques de cours terme (glycogène) n'a pas non plus été établi. En revanche une légère influence de la conductivité est démontrée, la PO étant plus élevée aux plus faibles conductivités. Si *in vitro* la présence d'extrait bactérien n'impacte pas la PO des hémocytes, le parasitisme entraîne *in vivo* une moindre activité phénol oxydase des gammars concernés comme ce qui est montré par les mêmes auteurs dans une autres étude (Cornet, Franceschi et al. 2009). Agissant pour leur maintien dans l'organisme hôte (*Gammarus pulex*), des parasites du genre *Pomphorhynchus* (acanthocéphale) entraîne une forte baisse de la PO (jusqu'à plus de 50%) comme cela a été également observée par notre laboratoire sur plusieurs populations de *Gammarus fossarum* (Perrot Minnot, Chaumot et al. 2018). L'espèce invasive *Gammarus roeselli* est en revanche moins sensible à l'espèce local d'acanthocéphale, *P. laevis* : l'activité PO n'est pas significativement plus faible chez les individus infectés ; elle apparaît même plus élevée chez les femelles. (Rigaud and Moret 2003). On note par ailleurs que d'autres parasites ne provoquent pas du tout de baisse de la phénol oxydase, comme c'est le cas le cas du plathelminthe *Cyathocephalus truncatus* vis-à-vis de *Gammarus pulex* (Franceschi, Rigaud et al. 2007).

Le cycle de mue peut être un facteur de modulation de l'activité phénol oxydase. Lors de la phase critique d'ecdysis, dans un milieu riche en microorganisme, *Gammarus pulex* tend à renforcer ses défenses immunitaires ce qui se traduit par une augmentation de la PO (Moret, Rigaud et al. 2010). Le phénomène n'est en revanche pas observé dans un milieu propre une baisse étant même constatée. Hors période de mue, l'hypothèse d'une adaptation du système immunitaire et donc de la PO aux conditions septique du milieu n'a cependant pas été observée lors d'une étude comparant des gammars (*Gammarus fossarum*) exposés à un effluent urbain secondaire, avant et après traitement tertiaire par ozonation (Wigh, Geffard et al. 2017). Néanmoins, la présence d'antibiotiques dans le milieu, en diminuant le nombre de bactéries au niveau de l'hépatopancréas, peut entraîner une diminution de l'activité PO. Si cela a été observé chez l'isopode *Asellus aquaticus*, ce n'est pas le cas pour l'amphipode *Gammarus pulex* que son régime alimentaire à base de feuilles mortes fortement colonisé en microorganismes maintien en permanence dans des conditions septiques (Zimmer and Bartholme 2003).

Du côté des insectes, les larves de demoiselles (*Ischnura elegans*) présentent une activité phénol oxydase naturellement plus élevée chez les populations de plus hautes latitudes (3

pop. de Suède vs 3 pop. de France) et la présence de pesticides (exposition *in situ*) fait baisser le niveau chez les deux types de populations, tout comme un stress thermique (température élevée) ou une privation de nourritures (Janssens, Dinh Van et al. 2014). On constate alors que la baisse de PO en présence de pesticides est plus forte chez les adultes que chez les larves. Par ailleurs, le mollusque gastéropode *Lymnaea stagnalis* exposé à un effluent urbain ne montre qu'une faible modulation de l'activité PO des hémocytes se traduisant par une légère tendance à l'augmentation (Boisseaux, Noury et al. 2018).

En résumé l'activité phénol oxydase est un marqueur qui peut varier à la hausse comme à la baisse selon quelques critères identifiés mais également selon des facteurs encore mal maîtrisés.

### 3.5. Glutathion-S-Transférase (GST)

La Glutathion-s-transférase est une enzyme de conjugaison aspécifique qui joue un rôle dans le processus de détoxification des xénobiotiques hydrophobes (HAP, pesticides, PCB). A noter que le glutathion, impliqué dans la réaction enzymatique, agit par ailleurs comme molécule antioxydante non-enzymatique dans le métabolisme cellulaire. Marqueur d'une exposition aux contaminants, l'activité GST est généralement induite mais elle peut aussi être inhibée en cas d'effet toxique prononcé de ces substances.

La mesure est en général réalisée selon une méthodologie qui suit la cinétique de conjugaison du glutathion réduit (GSH) et d'un substrat, le 1 chloro 2,4 dinitrobenzène (CDNB) via l'enzyme de phase II la Glutathion-S-Transférase contenu dans un échantillon (Habig, Pabst et al. 1976). Une mesure régulière d'absorbance à 340 nm détecte l'accumulation du métabolite dans le milieu réactionnel mais, le plus souvent selon littérature, ce dosage n'est pas étalonné. Une GST de foie de cheval commerciale existe cependant mais n'a pas été encore testé par notre laboratoire. La répétabilité de la mesure entre session de dosage est ainsi estimée au moyen d'un cytosol de référence, aliquote de S9 issue de l'homogénéisation d'un nombre conséquent de gammarès. Le résultat de ce calibrant n'intervient pas dans le calcul d'activité de l'échantillon mais permet de le valider s'il demeure dans une certaine fourchette de variabilité.

L'activité GST qui siège principalement dans le foie chez les vertébrés, est généralement mesurée dans un extrait cytosolique de corps entier chez les petits invertébrés aquatiques utilisés en écotoxicologie. Rarement mesurée seule, elle intègre souvent une batterie de biomarqueurs. Son induction ne signe pas l'effet délétère d'un xénobiotique mais plutôt le degré de mise en œuvre du système de détoxification de l'organisme.

Le niveau de base varie selon les espèces, les populations et les facteurs environnementaux. Par exemple selon 5 auteurs, les activités basales chez le cladocère *Daphnia magna* varient entre de 87 à 350 nmol/min/mg protéines (Jemec, Drobne et al. 2010). Par ailleurs chez le diptère *Chironomus riparius* elle peut varier d'un facteur deux entre 13 sites lotiques du sud de l'Angleterre (Domingues, Agra et al. 2010). A propos de l'effet des variables environnementales sur l'activité GST, on note que chez l'espèce euryhaline *Gammarus lacustris* la GST augmente avec la température de l'eau d'acclimatation (7 vs 15°C) pour une population d'eau douce et inversement pour une population d'eau saumâtre. On note par ailleurs qu'un choc thermique à 30 °C augmente l'activité chez la population d'eau douce après 1 à 3 heures mais pas chez celle d'eau saumâtre qui semble plus résiliente au changement de température (Vereshchagina, Lubyaga et al. 2016). Pour une même température il est par ailleurs noté que l'activité basale est plus élevée pour les gammarès de milieu salin. Corrélativement à l'effet température, il existe un effet saisonnier sur le niveau basal avec des valeurs minimales au printemps et une activité maximale en été comme ce qui est constaté sur l'isopode, *Asellus aquaticus*, sur des populations de Slovénie (Jemec, Skufca

et al. 2017). Cette même étude montre également une plus faible activité chez les populations cavernicoles par rapport à celles de surface. A noter que pour *Gammarus dulensi*, d'une rivière de Serbie, l'activité GST est peu corrélée aux températures avec une valeur maximale en automne, minimale en été et intermédiaire en hiver (Vrankovic, Zivic et al. 2018). Parmi les autres facteurs abiotiques, le biomarqueur ne semble pas être sensible à l'hypoxie comme le montre une étude sur l'amphipode *Monoporeia affinis* (Gorokhova, Lof et al. 2010), ni à l'augmentation de la teneur en dioxyde de carbone comme l'indique une étude sur des effets multigénérationnelle chez *Gammarus locusta*. (Lopes, Borges et al. 2019).

La présence de cyanophycées dans le milieu peut engendrer un niveau de GST plus élevé que chez des individus témoins car l'enzyme contribue chez les amphipodes à la métabolisation des cyanotoxines. (Gelinias, Lajeunesse et al. 2013). Une exposition de *gammarus oceanicus* pendant 96h à de la cyanotoxine nodularine (NOD) entraîne ainsi une induction de l'activité GST, induction modulée à la hausse comme à la baisse par la présence conjointe d'une concentration plus ou moins forte de benzo-a-pyrène. La plus forte induction est ainsi observée dans le mélange associant les concentrations en NOD et BaP les plus faibles, respectivement 5 et 3 µg/l.

La GST a été mesurée chez *Hyallolella curvispina* après une exposition allant jusqu'à 48h à du pétrole brut et des concentrations comprises entre 1,4 et 350 µg/l (Del Brio, Lares et al. 2019). Les résultats ne montrent cependant pas l'induction attendue et seulement une légère inhibition après 48h à la plus faible concentration. Cette étude révèle cependant l'induction d'autres marqueurs tels que GSH, CAT et P450. Une suspension de pétrole dans laquelle ont été identifiés 26 HAPs manque également à induire la GST de *Gammarus oceanicus* après 7 jours d'exposition à des teneurs de 1,5 à 750 µg/l alors qu'une induction est observée chez *Mytilus trossulus* (branchie uniquement) pour la même exposition (Turja, Sanni et al. 2020). Dans ces deux études il est probable, selon les auteurs, que le niveau de stress oxydant produit par des ROS issue du pétrole entraîne une inhibition de la détoxification des HAPs. Cet effet supposé du stress oxydant sur la GST est aussi évoqué dans une étude chez *Gammarus pulex* portant sur l'effet d'un effluent contenant du vert de malachite décoloré où l'on peut observer une baisse du niveau de GST, conjointement à celui du MDA du CYP1A1 et à l'augmentation de la Catalase et de la GSH (Yildirim, Tanyol et al. 2018). Dans une autre étude le même auteur signale en revanche une augmentation de l'activité à 24 h en présence de méthyl orange à des concentrations entre 108 et 434 ppm (Yildirim and Yaman 2019) .

Selon les cas, on peut donc constater que ce biomarqueur est interprété comme subissant le stress oxydant via une inhibition ou bien luttant contre celui-ci par des niveaux d'activité élevés. Une forte activité GST est aussi naturellement interprétée comme une induction visant à la détoxification de phase II comme l'indique des études sur une grande diversité de substances.

Autant les exemples précités illustrent l'inhibition engendrée par un stress oxydant trop élevé, autant le rôle anti oxydant indirect de la GST est montré lorsque par exemple ses valeurs élevées limitent le taux de peroxydation lipidique (LPO). C'est le cas dans une étude sur l'effet de la multi-contamination, principalement métallique, des sédiments de plusieurs sites de la baie d'Ushaïa (Argentine) vis-à-vis d'un gammaridé local, *Parmorea sp.* (Schvezov and Amin 2011).

Par ailleurs *Gammarus kischineffensis* exposé durant 96h à de l'atrazine seule ou en mélange avec de l'endosulfan, du thiamethoxam et de l'indoxacarbe montre une activité GST augmentée d'un maximum de 130 % en exposition simple et de 180 % en mélange (Demirci, Guven et al. 2018).

Les produits bromés font aussi partie des substances inductrices de l'activité GST. On note par exemple que les BDE-47 et le BDE-99 à la concentration de 0,1 µg/l pendant 96h entraînent une augmentation de la GST de 33 et 53 % chez des gammares mâles (*Gammarus pulex*). Chez les femelles en revanche, il est constaté une inhibition de l'activité de 16 % avec le BDE-99.

Les pollutions métalliques sont également susceptibles d'induire la GST comme le montre des expositions chronique (21 jours) de *Daphnia magna* à du cadmium jusqu'à 1,3 µg/l et du chrome (VI) jusqu'à 36 µg/l (Jemec, Tisler et al. 2008). Les activités sont alors de l'ordre de +20% par rapport au témoin et sont exprimées en unité enzymatique par individu pour ne pas dépendre, selon l'auteur, du taux de protéines qui diminue conjointement à l'exposition.

Utilisé en biosurveillance passive sur une rivière de Serbie, le niveau de l'activité GST chez *Gammarus dulensis* montre des variations à la hausse lors des 3 saisons entre l'amont et les avals d'une pisciculture (Vrankovic, Zivic et al. 2018). En été, automne et hiver l'augmentation maximale à l'aval immédiat est ainsi d'environ 25, 50 et 100 % respectivement. La GST varie alors conjointement à la Glutathion peroxydase (GPx) et à la Glutathion réductase (GR).

La GST est prise en compte pour l'évaluation de la toxicité d'effluents organiques tel que ceux produits par les moulins à huile d'olive et d'agrumes (Karaouzas, Cotou et al. 2011). Chez *Gammarus pulex* soumis à des concentrations maximums de 4% de chaque effluent pendant 24 h, on note des inductions d'environ 40% de l'activité GST, dont le niveau basal est de 2,5 nmol/min/mg protéines. A noter que pour la même étude, un résultat similaire est alors observé chez le trichoptère *Hydropsyche peristerica*. En revanche, l'effluent principalement organique issu d'un traitement secondaire comme tertiaire d'une station d'épuration urbaine n'engendre pas de modulation significative de l'activité GST chez *Gammarus fossarum* (Wigh, Geffard et al. 2017).

Parmi les matières organiques pouvant influencer la GST, il est curieux de constater qu'une préparation à base de litière de feuille d'Aulne (*Alnus glutinosa*), alimentation de choix pour les populations de gammares, peut s'avérer toxique pour les larves du moustique *Aedes aegypti* chez qui elle entraîne une perturbation de l'épithélium intestinal. Des inductions importantes (3 à 4) de l'activité GST sont alors observées (Boyer, David et al. 2006). En revanche, dans cette même étude le Teméphos, insecticide organophosphoré, n'induit pas le biomarqueur chez l'insecte après une exposition de 24 et 48 h à des concentrations de 5 et 20 µg/l.

L'absence d'effet sur la GST avec des organophosphorés est par ailleurs constatée. Le Pirimiphos méthyl inclus dans la nourriture (0, 5, 10, et 50 ng/g) durant 48 ou 96 h, n'entraîne pas d'induction notable de l'activité GST chez *Chironomus riparius* alors qu'une baisse du poids, de la fécondité et de l'ACHé est constatée (Crane, Sildanchandra et al. 2002). Les variations de l'activité GST oscillent entre 15 et 40 µM/min/mg mais ne sont pas en relation avec l'exposition au pesticide. On note en outre que *Gammarus pulex* exposé à du diméthoate pendant 96h à des concentrations de 20 à 120 µg/l ne montre pas non plus d'induction de la GST (Serdar 2019). Elle serait plutôt inhibée tout comme la catalase, la SOD et la GSH alors que le taux de MDA augmente fortement

Sur les insecticides organochlorés et pyréthrinoïdes en revanche, des inductions significatives sont constatées. Chez *Gammarus pulex* dont l'activité basale est d'environ 0,2 nmol/min/µg protéines, on note un effet significatif après 48h d'exposition à la perméthrine et au lindane pour des concentrations d'exposition de 0,12 et 6,14 µg/l respectivement (McLoughlin, Yin et al. 2000). Aux plus fortes concentrations d'insecticides testées, 0,45 et 49 µg/l respectivement, les inductions atteignent 39 et 127 % respectivement. On note en revanche que le lindane n'a aucun effet sur l'activité GST chez la larve de l'insecte *Chironomus riparius* exposé à des concentrations jusqu'à 1 ppm pendant 48h (Hirthe, Fisher et al. 2001). L'activité GST de *Chironomus riparius* est néanmoins sensible à l'antiparasitaire Fenbendazole qui entraîne des inductions croissantes en fonction des concentrations d'exposition, de 1, 10 et 30 µg/L pendant 96h (Park, Bang et al. 2009). De même, *Aedes aegypti* répond par des inductions modérée et forte à l'exposition respective pendant 72h à du Benzo-a-pyrène et du Propoxur (insecticide carbamate) (Riaz, Poupardin et al. 2009). Durant cette étude, aucun effet n'est en revanche enregistré avec le Glyphosate, l'Imidacloprid et la perméthrine.

On notera au final que chez les invertébrés, l'utilisation du marqueur GST en biosurveillance ne peut s'envisager qu'au sein d'une batterie de paramètres comprenant notamment le TBARS afin de pouvoir expliquer certain cas d'inhibition de l'enzyme engendré par le stress oxydatif.

### 3.6. Lipopéroxydation (TBARS)

La lipopéroxydation (LPO) des membranes cellulaires est un des effets du stress oxydant. Il intervient lorsque sont débordés ou carencés les systèmes de défense enzymatiques (SOD, CAT, GPx) et non enzymatiques (GSH, pigments, vitamines). La mesure du taux de Malondialdéhyde (MDA) qui en est le marqueur, constitue donc un paramètre de choix dans les études écotoxicologiques.

L'analyse du MDA chez le gammare et plus largement chez les amphipodes est réalisée à partir d'un homogénat d'organismes entiers dans une solution tampon. Selon les auteurs, le dosage est réalisé sur un aliquote de l'homogénat brut déprotéiné ou d'un surnageant de centrifugation (fraction cytosolique). Hormis l'utilisation sporadique de kit ELISA (CAYMAN), les méthodes d'analyse se partagent principalement entre techniques d'HPLC et réactivité avec l'acide Thiobarbiturique (TBA). C'est cette seconde méthode appelée TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) (Buege and Aust 1978) qui est utilisée par notre laboratoire pour l'analyse du MDA.

Notre méthode, adaptée à la microplaque, s'inspire de plusieurs travaux dont principalement ceux de Camejo et al. (Camejo, Wallin et al. 1998). L'absence d'interférence liée à l'utilisation d'un tensio actif dans le tampon d'extraction est vérifiée (CAYMAN-chemicals 2014). Le principe du dosage repose sur la réaction en milieu acide et à chaud entre une molécule de MDA et deux molécules de TBA qui aboutit à la formation d'un pigment fluorescent (ex.532 nm/em.553 nm). Moins sensible que par fluorimétrie, ce pigment peut être aussi mesuré par photométrie (532 nm) après centrifugation du milieu réactionnel et élimination du précipité protéique. Afin d'éviter la formation artefactuelle de MDA durant la procédure, un antioxydant (BHT) est ajouté au milieu réactionnel. Un étalonnage est réalisé au moyen d'une gamme de MDA fabriqué extemporanément par hydrolyse acide d'une solution de TMP (1,1,3,3-Tetramethoxypropane). Le mode d'expression de ce biomarqueur varie d'une publication à l'autre. Les valeurs de MDA sont exprimées en nmol (pmol) ou en ng, pondérées soit par le taux de protéines, soit de lipides ou bien par le poids frais. Comme de l'unité employée dépend l'interprétation des résultats, certains auteurs présentent deux modes de pondération, protéines et lipides.

L'interprétation du taux de MDA dans un organisme exposé à une condition toxique s'effectue à partir de valeurs de référence en principe plus faible. Cependant l'accumulation de peroxyde lipidique dans un organisme peut résulter de facteurs naturels liés à l'âge, au sexe, à l'alimentation, la saison, etc. Sur deux espèces de *Hyaella* (*H. pleoacuta* et *H. castro*), lors du suivi mensuel d'une population de référence, on observe un pic de MDA en automne puis une baisse jusqu'à la fin de l'hiver, suivi d'une stabilité (Dutra, Castiglioni et al. 2007). A noter que ce pic, qui est de 4 à 5 fois les valeurs minimales (env. 10 nmol/mg prot.), arrive après à la période estivale (activité reproductrice) ou les réserves lipidiques sont minimales. Chez *H. curvispina*, le même auteur note cette fois un pic en été pour les deux sexes et un autre en hiver pour les mâles, les valeurs des femelles étant toujours les plus basses (Dutra, Santos et al. 2008). Pour cette espèce un rapport de 5 à 10 est alors observé entre les minima et le maxima.

Concernant les amphipodes européens, les teneurs en MDA sont modulées par la saison. Chez *Gammarus roeselii* on note de fortes valeurs en été surtout chez les males (3 à 4x plus) suivi d'une baisse en automne, puis des valeurs stables le restant de l'année (Sroda



and Cossu-Leguille 2011). Pour les mâles, le niveau varie, selon le mode de pondération, de 14 à 74 (moy.=30 pmol/mg protéines) ou de 35 à 89 (moy. = 159 pmol/mg lipide). A noter qu'un autre suivi mensuel sur la même espèce montre une évolution annuelle plus irrégulière avec toujours des valeurs plus élevées chez les mâles mais seulement de février à mai (Gismondi, Cossu-Leguille et al. 2013). La différence liée au sexe est également observée en élevage de laboratoire sur une espèce marine (*Gammarus locusta*) avec des valeurs 1,3 fois plus élevées chez les mâles. Les juvéniles et les sub adultes présentent quant à eux un niveau équivalent à celui des femelles (33±5 nmol/g frais) (Correia, Costa et al. 2003). A noter que des organismes parasités, notamment *Gammarus roeselli* infesté par *P. minutus*, présenteront des taux de MDA inférieurs aux non parasités (Gismondi, Beisel et al. 2012).

L'influence du régime alimentaire sur le taux de peroxydation lipidique a été mis en évidence chez *Hyalella bonariensis* au moyen d'une alimentation à base de macrophytes plus ou moins supplémentée avec de la nourriture commerciale protéinée (Castiglioni, Dutra et al. 2010). Il a été observé que les régimes les plus protéinés engendrent des concentrations en MDA jusqu'à 2,8 et 2,5 fois plus faibles chez les mâles et les femelles respectivement. Les valeurs varient alors de 3,2 à 9,1 et de 2,7 à 6,9 nmol/mg prot. Outre la qualité alimentaire, la pénurie voire l'absence de nourritures a probablement un impact fort sur le taux de peroxydation lipidique. Cependant, aucune étude ne vient confirmer ou infirmer cette hypothèse chez les amphipodes, les quelques travaux autour du jeûne n'intégrant pas le dosage du MDA. Reste que l'on constate parfois une valeur élevée de témoins de fin de bio essai n'incluant pas de nourrissage dans le protocole. Toujours à propos des facteurs biotiques influençant le marqueur TBARs, on note que *Gammarus roeselli* en présence d'un risque de prédation (effluent de poisson) présente cinq fois plus de la peroxydation lipidique que les gammares témoins (Sornom, Gismondi et al. 2012).

En tant que facteur abiotique, l'effet de l'hypoxie a été étudié chez un amphipode du sédiment marin, *Monoporeia affinis*. Comparées à des conditions de saturation d'un sédiment témoin (65-75%), sont étudiées une condition normoxique (87-99%) et une condition hypoxique (30-34%). (Gorokhova, Lof et al. 2010). Les résultats montrent alors une augmentation des teneurs en MDA de 15 et 33 % aux jours 5 et 9 de l'expérience. La même expérience réalisée avec un sédiment multicontaminé (HAP, PCP, métaux) montre respectivement des augmentations de 33 et 120% du taux de MDA. Ainsi, la présence de substances toxique ajoutée à l'hypoxie augmente, l'effet sur la teneur en peroxyde lipidique.

Toujours chez *Gammarus roeseli* on constate que les individus infestés par l'acanthocéphale *P. minutus* et exposés au cadmium à 2 et 8 µg/l présente des taux MDA respectivement 1,8 à 2,6 supérieurs aux individus témoins alors que les gammares non infestés ne montrent qu'un écart de 1,5 fois entre le groupe exposé au cadmium et le groupe témoin. (Gismondi, Beisel et al. 2012). L'ion cadmium, métal non essentiel possédant un fort potentiel toxique et oxydatif est utilisé par ailleurs comme molécule modèle dans de nombreux travaux. Des expositions de 24 et 96 h à plusieurs concentrations comprises entre 4 et 32 µg/l montrent que l'effet sur la peroxydation lipidique est lié à la concentration et la durée d'exposition (Duman and Kar 2015). Ainsi, en comparaison à un témoin stable autour de 2,5 µM/g frais, les concentrations en MDA s'échelonnent de 5 µM/g frais (x2) pour la condition 4 µg/l-24h à 15 µM/g frais (x6) pour la condition 32 µg/l-96h. Par ailleurs, après une exposition courte de 4 min à une forte teneur en cadmium (500 µg/l), il a été observé des teneurs en MDA dépassant d'un facteur 4 les valeurs témoins (0,9 ng/mg lipide) (Sornom, Gismondi et al. 2012).

Chez *G. pulex*, le cadmium a été étudié seul et en mélange avec l'arsenic (Vellinger, Gismondi et al. 2013). Après dix jours d'exposition à deux concentrations pour chacun de ces éléments, les taux de MDA atteignent 2 et 3 fois les valeurs témoins (1,5 ng/mg lipide) pour le cadmium (6µg/l) et l'arsenic (374 µg/l) respectivement. A noter qu'en mélanges, selon plusieurs proportions, les deux toxiques n'engendrent jamais plus de MDA que testés séparément.

Quoiqu'essentiel à l'organisme, le cuivre se révèle toxique pour la faune aquatique lorsque les concentrations dans l'eau sont anormalement élevées. *Gammarus roeseli* a été exposé à 20 µg/l pendant 6, 12, 24 et 48h (Sroda and Cossu-Leguille 2011). Les résultats montrent des concentrations en MDA plus élevées chez les mâles, avec un pic à 6h (300 pmol/mg lipides), suivi d'une décroissance y compris chez les témoins, le rapport entre les deux conditions étant au maximum de X2 (12h). En revanche, chez les femelles exposées, les valeurs demeurent stables autour de 120 pmol/mg lipides alors que chez les femelles témoins les teneurs tendent à diminuer. Au cours de la même étude, une expérience similaire chez *Dikerogammarus villosus* montre une différence liée au sexe encore plus accentuée : 2 fois plus de MDA chez les femelles à toutes conditions.

Avec des matrices complexes, tels que des sédiments contaminés, la toxicité des métaux engendre une augmentation du taux de peroxyde lipidique comme le montre une étude sur l'effet de sédiments de plusieurs sites de la baie d'Ushuaïa (Argentine) sur *Parmorea sp.*, un gammaridé local (Schvezov and Amin 2011).

Outre les métaux, les contaminants organiques sont susceptibles de générer du stress oxydant aboutissant à la formation de peroxydes lipidiques. Le bisphénol A (BPA) à des concentrations entre 6 et 25 µg/l pendant 24 et 96 h engendre chez *G. pulex* une réponse temps et concentration dépendante (Tatar and Turkmenoglu 2020). Les teneurs en MDA varient de 6 µM à la condition 6,25 µg/l-24h à 12 µM à la condition 25 µg/l-96h pour une valeur témoin de 2 µM.

Parmi les insecticides organophosphorés, le diméthoate à des concentrations d'exposition de 20 à 40 µg/l (=LC50/4) pendant 24 et 96h entraîne chez *G. pulex* des teneurs en MDA jusqu'à 4 fois les valeurs témoins qui sont de 190 nmol/g tissus (Serdar 2019).

Les contaminants perfluorés, que sont les PFOS, ont été testés sur *Gammarus insensibilis*, une espèce marine de la lagune de Bizerte (Tunisie) (Touaylia, Khazri et al. 2019). Les résultats montrent que pour des concentrations d'exposition non environnementale de 1 à 3,1 mg/L pendant 24 à 96h, on observe un effet concentration dépendant avec des teneurs en MDA de 6 à 9 fois plus élevées que la valeur du témoin qui est de 2,5 nmol/ mg protéines. Toujours en eau salée, l'espèce boréale *Gammarus wilkitzki*, exposée à du pétrole brut montre une augmentation modérée (x1.2) de la peroxydation lipidique à la concentration d'exposition la plus faible, alors qu'à la plus élevée, la teneur en MDA n'est pas différente du témoins (20,4 nmol/g frais) (Hatlen, Camus et al. 2009). Par ailleurs, une molécule d'hydrocarbure, le p-xylène, testés pendant 36 jours sur un autre amphipode marin, *G. locusta*, n'entraîne une augmentation significative des peroxydes que pour les deux plus fortes concentrations d'exposition: 75 µg/l et 300 µg/l (Neuparth, Capela et al. 2014). Les teneurs en TBA sont alors respectivement de 0,081 et 0,083 nmol/mg-protéines, soit 1,3 fois plus élevées que la valeur témoin de 0,062 nmol/mg-protéines.

L'antibiotique sulfaméthoxazole testé sur *H. azteca* pendant 35 jours sur une large gamme de concentrations, allant de 0,04 à 400 µM, engendre une augmentation des teneurs en MDA quasiment à toutes les conditions selon un facteur de 1,5 à 3,0 par rapport au témoin (Yu, Yin et al. 2019). Une exposition chronique de 60 jours de *Gammarus locusta* à du Triclocarban (TCC), un anti bactérien et anti fongique, entraîne une augmentation significative de la peroxydation lipidique aux concentrations 100 et 500 ng/L, mais pas à 2500 ng/L (Barros, Montes et al. 2017).

Avec l'acide *p*-diméthylamino-azobenzène-sulfonique (Héliantine ou méthyl orange) utilisé dans l'industrie du textile, des concentrations de 108 à 434 ppm entraînent chez *G. pulex* des teneurs en MDA de 5,5 à 7 µM pour des valeurs témoins de 2,5 µM (24h) et 4,2 µM (96h). Le facteur d'augmentations est alors de 1,2 sauf à la condition intermédiaire (24h) où il s'élève à 2,8 (Yildirim and Yaman 2019).

La réponse du biomarqueur de lipéroxydation vis-à-vis de matrices complexes telle que des effluents de station d'épuration pourrait se montrer intéressant dans le cadre d'une bio surveillance active. Au regard d'un effluent secondaire d'origine urbaine, on note que *G. pulex*

présente une augmentation non significative de 30% (x1,3) de sa teneur en MDA à 24 h et une diminution à 96h, les valeurs témoins étant respectivement de 310 et 390 nmol/g frais (Tatar, Yildirim et al. 2018).

Les effluents traités (electro coagulation) et non traité d'une usine d'équarrissage ont été testés aux dilutions de 1/10 et 1/20 chez *G. pulex* (Yildirim, Tanyol et al. 2019). Les gammares soumis à l'effluent traité présentent des teneurs en MDA 4 à 5 fois moins élevées que ceux exposés à l'effluent brut, mais également à ceux de la condition témoin dont les valeurs sont curieusement élevées. Par ailleurs, le traitement par électrocoagulation d'un lixiviat de décharge entraîne chez *G. pulex* exposé à des dilutions de 1/10 et 1/20 une baisse des concentrations en MDA à 24h de l'ordre de 30 %, les valeurs témoins se situant autour de 265 nmol/g frais (Serdar, Yildirim et al. 2018).

En résumé on constate que le marqueur Tbars varient naturellement selon un nombre conséquent de facteurs biotiques et abiotiques qu'il est utile de connaître pour établir des niveaux de références qui seront spécifiques à chaque saisons, populations ou condition d'oxygénation entre autres. A partir de ces références relatives on peut mesurer l'effet sur ce marqueur d'un grand nombre de substances organiques et minéral qui cependant ne sont pas plus élevée en amplitude que certaines variations naturelles.

### 3.7. Statut Anti Oxydant (TAS)

La mesure du statut total en antioxydant (TAS) est une approche globale du pouvoir antioxydant non enzymatique d'un échantillon. Ce pouvoir antioxydant est lié à la quantité et la qualité des substances participant à la gestion du stress oxydatif au sein d'un organisme. Ces substances, de nature essentiellement non protéiques, sont représentées pour une large part par le glutathion accompagné des pigments, des vitamines ( $\beta$ -carotène (provitamines A), acide ascorbique (vitamine C), tocophérol (vitamine E)) et polyphénols. Cette mesure est beaucoup utilisée d'une part en agro-alimentaire pour déterminer le pouvoir antioxydant des aliments et d'autre part en biologie humaine ou vétérinaire sur du sérum sanguin. En revanche son usage dans le domaine de l'écotoxicologie est encore récent et relativement discret.

Plusieurs méthodes permettent de doser le TAS (Total Anti Oxydant Statut) parmi lesquelles on citera l'ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), le FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), le CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity), le TAC (Total Antioxidant Capacity) et le TEAC (Trolox Equivalence Antioxidant Capacity). Ce dernier se divisant en deux variantes, une méthode dite à la metmyoglobine et l'autre dite au persulfate. Cette dernière méthode du TEAC est utilisée par notre laboratoire et se fonde sur la capacité antioxydante d'un échantillon à réduire un radical cationique de l'acide 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS+), entraînant ainsi une décoloration du milieu réactionnel mesurée par photométrie à 734 nm (Re, Pellegrini et al. 1999). La quantité d'antioxydants est exprimée en  $\mu$ mol d'équivalent Trolox (analogue de la vitamine E) selon une gamme réalisée extemporanément. Au laboratoire d'écotoxicologie d'INRAE, l'analyse est réalisée sur des échantillons cytosoliques (S9) de corps entiers d'invertébrés aquatiques. Pour des échantillons riches en protéines (foie), il est conseillé de déprotéiner au préalable à l'acide Trichloracétique le cytosol pour éviter des interférences.

L'application de la mesure du TAS est encore peu répandue dans les études environnementales qui prennent plutôt en compte le dosage du glutathion (GSH) car il constitue la fraction largement majoritaire des molécules anti oxydantes non enzymatiques. Outre le GSH, la mesure du TAS englobe toutes les autres (Miller, Riceevans et al. 1993), mais peut s'interpréter selon les mêmes critères de représentativité.

Il y a peu d'information sur les causes de variation naturelle du TAS. Tout juste peut-on noter que de faibles teneurs en oxygène du milieu affectent à la baisse le test ORAC sur *Monoporeia affinis* mais qu'une hausse de 23%, par rapport à la valeur de référence, est constatée après le retour à la normale des conditions oxygènes (Gorokhova, Lof et al. 2013). Parmi les exemple d'utilisation du TEAC on peut signaler les mesures réalisées sur des extraits de *Mytilus galloprovincialis* pour discriminer une zone côtière propre d'une autre, notablement contaminée au cuivre et au zinc (Gorinstein, Arancibia-Avila et al. 2006). On constate alors des valeurs plus élevées chez les animaux vivant en milieux pollués.

Parmi les premières études recensées en écotoxicologie sur le TAS, le lien entre GSH et TEAC est établi à partir d'échantillons de foie de truite arc en ciel exposées successivement et conjointement à du cadmium (1,5 µg/l) et du Zinc (150 µg/l) (Ait-Aissa, Ausseil et al. 2003). L'étude, qui inclus également des expositions et co-exposition à du 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB77, 1 mg/kg) et du 17-β-estradiol (E2, 0,5 mg/kg) montre que le TEAC et le GSH sont induit par le cadmium mais pas par le zinc, qu'ils sont inhibés par le 17-β -estradiol, et que le TEAC est le seul marqueur à réagir (induction) face à une exposition au PCB77. Après une co-exposition à l'oestradiol et un mélange métallique, les effets inducteur et inhibiteur des substances s'annulent conduisant à observer une activité basale. La co-exposition avec le PCB entraîne quant à elle un effet légèrement additif sur les teneurs en GSH.

Souvent pratiqués ensemble le test de la capacité anti oxydante (GSH ou TAS) et la mesure d'un marqueur d'effet du stress oxydant (TBars) peuvent conduire à des interprétations diverses selon le sens des variations de chaque paramètre. Par exemple, une baisse conjointes des valeurs d'ORAC et de la teneur en MDA (TBars) est observée chez l'amphipode *Gammarus sp.* après une exposition au propranolol à 100 et 1000 µg/L, en microcosme (Ek, Garbaras et al. 2019). A l'opposé, l'effet du diméthoate (insecticide organophosphoré) chez *Gammarus pulex* après 96h d'exposition entraîne une forte baisse de la capacité antioxydante (GSH), mais une hausse du taux de MDA (TBars) (Serdar 2019). Enfin chez *Gammarus roeselli*, à la suite d'une exposition au cadmium (2 et 8 µg/L) durant 96h, c'est une hausse simultanée des deux marqueurs (TBars et GSH) qui est constatée (Gismondi, Beisel et al. 2012). La même chose est observée sur *Gammarus pulex* après des expositions à ce métal (3,4 et 6 µg/l) pendant une durée largement supérieure de 240 h (Vellinger, Gismondi et al. 2013). Dans cette même étude, des hausses sensibles de GSH et de TBars ont aussi été constatées avec l'arsenic (376 et 604 µg/L) seul et en mélange avec le cadmium (effet en partie additif).

Les profils d'évolution apparaissent moins univoques chez *Gammarus pulex* après 24 et 96h d'exposition à trois conditions de bisphénol A. Après 24h d'exposition on constate une hausse des deux paramètre GSH et TBARS à toutes les concertations. Cependant à 96h, si des fortes valeurs sont toujours constatées aux faibles concentrations, les valeurs de TBars diminuent aux plus fortes teneurs (Tatar and Turkmenoglu 2020). Par ailleurs, dans une autre étude du même auteur, on note aucune évolution significative du GSH après une exposition de *Gammarus pulex* pendant 24 et 96h à des effluents secondaires de station d'épuration, alors que les Tbars augmentent légèrement à 24h (Tatar, Yildirim et al. 2018).

Le paramètre ORAC mesuré sur l'amphipode marin *monoporeia affinis* en réponse à des expositions à une dizaine de sédiments contaminés de la mer baltique montre des corrélations positives avec les concentrations en métaux et en HAPs, mais une corrélation négative avec la présence de PCBs et congénères (Lof, Sundelin et al. 2016). Dans cette étude, il est singulier que les statuts antioxydants se corrélaient positivement au paramètre AChE et à l'occurrence de femelles portant des embryons malformés. Un autre amphipode

marin, *Gammarus locusta*, fait l'objet de mesure de TAS via le marqueur TAC dans le cadre d'une étude transgénérationnelle sur l'effet d'une augmentation de dioxyde de carbone dans leur milieu (Lopes, Borges et al. 2019). Des augmentations du TAC ont alors été observées chez des individus exposés, et des individus témoins issus de parents exposés à de forte teneur en CO<sub>2</sub>.

L'effet de l'antibiotique sulfaméthoxazole sur le TAS est illustré dans une étude comportant des expositions de *Hyalella azteca* à des concentrations de 0,04 à 400 µM pendant 35 jours (Yu, Yin et al. 2019). Le paramètre ORAC présente alors une augmentation sensible dès 0,4 µM jusqu'à un maximum de 4 µM, particulièrement chez les mâles avec des valeurs 4,7 fois plus élevées que celles des témoins, contre 1,9 fois pour les femelles. A noter que parallèlement à cette évolution, une augmentation de la peroxydation lipidique (TBars) et de l'AChE aux plus fortes concentrations a été observée.

En résumé, en réponse à une exposition toxique, les variations des niveaux de TAS sont souvent observées à la hausse. Les molécules mises en cause dans ces inductions apparaissent de nature variée avec au premier plan les métaux qui entraînent des inductions dès les premières journées d'expositions, ces inductions diminuant ensuite en fonction du temps d'exposition. Les molécules organiques apparaissent quant à elle tantôt inductrices (HAPs, PCB77, Bisphénol a, sulfaméthoxazole), tantôt inhibitrices (oestradiol, PCBs, Propranolol, Diméthoate). L'interprétation de ces variations se fait toujours au regard d'autres biomarqueurs, principalement les Tbars qui signent l'effet du stress oxydant sur les membranes lipidiques. L'effet protecteur des antioxydants non enzymatique empêchant, ou retardant la peroxydation lipidique, leur stock basal ou leur potentiel d'induction peut marquer le niveau de vulnérabilité des organismes étudiés.

### 3.8. Lipides totaux

L'analyse des réserves énergétiques comprend le dosage des trois ressources constitutives de la matière vivante : les protéines, les glucides et les lipides. Au laboratoire d'INRAE, les lipides sont extraits d'un aliquote de S9 (cytosol) issu du broyage de 5 gammarès. L'extraction a lieu selon le protocole de Folch (Folch, Lees et al. 1957) au moyen d'un mélange de solvants organiques (chloroforme/méthanol) puis le dosage est réalisé selon la méthode de Van Handel (Vanhandel 1985) : après extraction et évaporation du solvant, les lipides sont hydrolysés en milieu acide et les acides gras formés réagissent avec la vanilline pour former un composé coloré rose dont l'absorbance est mesurée à 490 nm. Les résultats sont exprimés en équivalent cholestérol (mg/g frais) au regard d'une gamme étalon traitée selon la même procédure. A noter que la méthode au réactif phosphovanillique est la plus répandue dans la littérature mais des auteurs (Arts, Ferguson et al. 1995) utilisent une méthode gravimétrique tandis que d'autres (Hervant, Mathieu et al. 1999) utilisent une méthode enzymatique. A noter que la somme des acides gras analysés séparément par HPLC sert également à évaluer les lipides totaux (Correia, Costa et al. 2003). Alors que la substance étalon est généralement le cholestérol et parfois l'huile d'olive, les modes d'expression des lipides sont très variés : mg/g frais, mg/ml, mg/g sec, mJ/mg frais, µmol/g sec, mg/individu et % de poids sec.

Chez le gammare, les variations naturelles des lipides, tant en quantité qu'en qualité, dépendent de plusieurs facteurs qui doivent être pris en compte dans l'interprétation des données d'expérimentations écotoxicologiques. Nombres d'amphipodes comme le gammare étant détritivore, l'accumulation de réserves énergétiques et notamment de lipides est réalisée en période de nourriture abondante et d'activité reproductrice au repos. Dans les rivières européennes, c'est logiquement du début de l'automne à la fin de l'hiver que les gammarès

reconstituent leur stock de lipides grâce à l'abondante litière issue de la chute des feuilles. Cette évolution a été montrée chez *Gammarus fossarum* et *Gammarus pulex* à partir d'analyse mensuelles des triglycérides (Becker, Ortmann et al. 2013). Le pic hivernal diminue ensuite pour les deux espèces jusqu'à la fin de l'été avec un facteur 5 (de 92 à 16 mg/ g sec). *Gammarus roeselli*, présente une teneur maximum en lipides totaux en hiver (février) puis une diminution qui cesse au début de l'été, au mois de juin (Sroda and Cossu-Leguille 2011). L'amplitude de variations saisonnières pour les mâles et les femelles est respectivement 3 et 6 avec des valeurs maximums de 8,6 (Nov.) et 11,5 (Jan.) mg/ml. Sur la même espèce et la même région, une autre étude (Gismondi, Beisel et al. 2012) montre la même évolution avec des minima en septembre et des maxima en février. Les valeurs pour les mâles et les femelles varient alors respectivement de 1,5 à 4,9 et de 2,9 à 8,4 mg/ml

Tant chez le gammare que chez la hyalelle, tous les auteurs mentionnent une nette différence entre les deux sexes, les femelles accumulant plus de lipides que les mâles dans un rapport d'environ 1,5. A noter que chez *Hyalella castroi* du Rio Grande do Sul (Brésil), le rapport entre les maxima des deux sexes est de 2,0 avec des variations saisonnières d'un facteur 13 à 27 pour les femelles et les mâles respectivement (Dutra, Castiglioni et al. 2007). Chez *Hyalella azteca* et *Gammarus lacustris* des lacs canadiens (Arts, Ferguson et al. 1995), le stock de lipides est également plus élevé chez les femelles et l'évolution saisonnière pour les deux sexes montre un pic au printemps pour les deux espèces puis un deuxième en août/septembre pour *G. lacustris*.

Quelle que soit l'espèce d'amphipode considérée, la nécessité d'un stockage dédié à l'élaboration des ovocytes explique les teneurs en lipides plus élevées chez les femelles.

La teneur en lipides varie non seulement avec le sexe mais également avec l'âge. Une étude menée sur l'espèce marine *Gammarus locusta* élevée au laboratoire montre qu'une augmentation très significative de la concentration en acides gras intervient après le stade sub-adulte, mais sans variation qualitative (Correia, Costa et al. 2003). Les adultes présentent alors 35 % de lipides de plus que les juvéniles. Chez les adultes femelles notamment, le taux de lipides varie périodiquement avec le stade de mue. Chez *Gammarus fossarum* le maximum est observé au stade C2 avec un écart de 40 % avec la plus faible valeurs du cycle (Charron, Geffard et al. 2014)

Dans le milieu naturel, les réserves lipidiques sont soumises aux périodes de jeûne qu'elles soient subies en cas de pénurie alimentaire ou bien intégrées au cycle de vie de l'animal comme chez le gammare mâle en période de précopulat. Dans ce cas une réserve lipidique conséquente est un avantage compétitif, ceci d'après une étude qui montre que les gammares mâles (*pulex*) en couple contenait 30 % de plus de lipides que les mâles seuls (Plaiستow, Bollache et al. 2003).

L'expérimentation en écotoxicologie nécessite parfois la privation de nourriture des animaux le temps de l'expérience ce qui peut être un facteur de confusion pour l'interprétation des biomarqueurs. Par exemple, *Gammarus fossarum* soumis à un jeûne de 28 jours consomme 25% de ses réserves lipidiques qu'il reconstitue en une semaine après la reprise de nourriture (Hervant, Mathieu et al. 1999). Comparativement, selon le même auteur deux espèces d'amphipode hyporhéique du genre *Niphargus* supportent un jeûne de 180 jours avec une baisse de 30 à 50% de leur stock de lipides, suivi d'une reconstitution plus lente que chez *Gammarus*.

De manière moins drastique *Gammarus fossarum* a été soumis à des privations partielles de nourriture durant deux cycles de reproduction, soit 60 jours à raison d'une alimentation de 2 jours sur 7, 1 jour sur 7 et tous les jours pour les témoins (Charron, Geffard et al. 2015). Aux 11<sup>ème</sup> et 43<sup>ème</sup> jours de l'expérience, les réserves énergétiques converties puis exprimées en énergie (mJ) montrent qu'en condition de nourriture limitée, les mâles

maintiennent un niveau constant alors que les femelles subissent une diminution de 30% puis 20% de leur énergie après le premier puis le deuxième cycle d'embryogénèse.

Outre la quantité, la qualité de la nourriture constitue un facteur de variation du niveau des réserves lipidiques. Pour *Gammarus fossarum*, les feuilles de sycomore apparaissent plus riches en lipides que les feuilles d'aulnes au regard des concentrations dans les organismes qui sont respectivement de 120 et 70 µg/g frais pour les deux régimes de feuilles (Arce-Funck, Crenier et al. 2016). En outre, selon cette même étude, une supplémentation des feuilles en phosphore favoriserait l'assimilation des lipides et une meilleure résistance à un stress chimique.

Les variations de température constituent un facteur abiotique majeur dans le métabolisme des lipides. Le cycle des saisons en est la conséquence et le réchauffement climatique impose une adaptation et une migration de populations. Cinq populations de *Gammarus pulex* originaires du nord et du sud du fleuve Rhône ont été chacune soumise pendant 10 jours à 5 températures entre 18 et 30 °C (Foucreau, Cottin et al. 2014). Les résultats montrent une meilleure tolérance des gammars méridionaux aux fluctuations thermiques avec des concentrations de triglycérides variant de 21 à 43 mg/g sec pour les populations du nord et de 36 à 74 mg/g sec pour les populations du sud. Néanmoins, quelle que soit la population, la teneur en lipides des femelles demeurent globalement supérieure à celles des mâles avec cependant une décroissance selon l'augmentation de la température, alors que les mâles montrent des variations irrégulières voire une augmentation pour les populations du sud.

Parmi les facteurs biotiques susceptibles d'impacter le taux de lipides, le parasitisme figure en bonne place car il est par nature mobilisateur des ressources énergétiques de l'hôte. Il a été montré notamment que des femelles gravides parasitées par l'acanthocéphale *P. laevis*, présentaient un déficit de 8% en lipides comparé aux individus non parasités (Plastow, Troussard et al. 2001). De même en présence d'un stress toxique au cadmium, les femelles de *Gammarus roeseli* infestées par l'acanthocéphale *P. minutus* présentent, à la plus faible concentration d'exposition (2 µg/l), un taux de lipides diminué de 30% comparées aux individus non parasités (Gismondi, Beisel et al. 2012).

Le métabolisme des lipides, peut également être altéré par certains xénobiotiques d'origine anthropique comme le montre plusieurs études. On note par exemple que *Gammarus pulex* exposé 10 jours à l'arsenic et au cadmium présente des réserves lipidiques diminuées respectivement de moitié et du tiers par rapport à la condition témoin (Vellinger, Gismondi et al. 2013). Testées en mélange à différente proportion, les deux substances ne montrent pas d'effet additif mais une prévalence de l'élément le plus abondant. Le cuivre à 20 µg/l testé durant 48h chez *Gammarus roeseli* et *Dikerogammarus villosus* ne montre en revanche pas d'effet quelle que soit la durée d'exposition (Sroda and Cossu-Leguille 2011). De même, le fénoxycarbe, un insecticide mimétique de l'hormone juvénile de croissance, ne montre pas d'effet significatif sur les teneurs en lipides des femelles *Gammarus fossarum* exposées à 50 µg/l, ni celles de leur descendance au stade nouveaux nés (Arambourou, Fuertes et al. 2018). Pareillement, le thiaclopride, un autre néonicotinoïde qui a été expérimenté sur la même espèce, n'entraîne pas d'impact sur les réserves lipidiques (Zubrod, Englert et al. 2017).

A propos des insecticides carbamates, une exposition de *Hyaella castroi* à 1 et 10 µg/L durant 7 jours au carbofurane entraîne une diminution drastique des réserves lipidiques : les concentrations en lipides totaux varient ainsi de 3,2 pour les mâles et 3,8 pour les femelles à 0,5 mg/g pour les deux sexes et au deux concentration (Dutra, Fernandes et al. 2009). A noter que cet impact s'observe aussi sur les taux de cholestérol et de triglycérides, ainsi qu'au cours de trois autres expériences répliquées au long de l'année.

### 3.9. Glycogène

Le glycogène, stocké dans les muscles et l'hépatopancreas chez les crustacés, est la réserve énergétique la plus rapidement mobilisable par les organismes. Elle est, de ce fait, disposée à répondre à des demandes urgentes en lien avec la défense de l'organisme (locomotion, détoxification, stress oxydant) mais aussi à des pics d'activité physiologique telle que la reproduction. Il est la principale forme de stockage des glucides et son dosage englobe toutes les autres formes d'oside sous l'appellation sucre totaux.

Au laboratoire d'Ecotoxicologie d'INRAE, le dosage des sucres totaux s'inspire de la méthode de Masuko (Masuko, Minami et al. 2005). L'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, la déshydratation des osides et des polyosides (glycogène). Les composés formés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés orangés. L'intensité de la coloration est mesurée en microplaque à 490 nm et les résultats en mg/g frais sont exprimés en équivalent glucose au regard d'une gamme étalon réalisée parallèlement. L'analyse est réalisée sur un aliquote de la fraction cytosolique (S9) contrairement à certains auteurs qui prennent en compte le culot de centrifugation d'une extraction organique de l'homogénat (Plaistow, Troussard et al. 2001).

La littérature montre que les méthodes de dosage du glycogène passent quoiqu'il en soit par une phase d'hydrolyse acide ou enzymatique puis, par l'utilisation d'une substance aromatique, phénol ou anthrone pour révéler le glucose formé. La réaction colorée est toujours étalonnée selon une gamme de glucose et les résultats peuvent être exprimés soit mg/g frais ou sec, en mmol/g voire en mJ/mg.

Comme pour les lipides, les concentrations de glycogène dans les amphipodes sont susceptibles de varier naturellement en réponse à de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. Dans une étude du cycle saisonnier de *Gammarus fossarum* et *Gammarus pulex* provenant d'une rivière d'Allemagne, des échantillons mensuels et bimensuels montrent un pic de concentration en hiver, diminuant ensuite jusqu'à la fin de l'été pour les deux espèces (Becker, Ortmann et al. 2013). On observe alors, qu'annuellement, chez les individus mâles, les valeurs varient de 16,2 à 41,8  $\mu\text{mol/g}$  frais chez *G. fossarum* et de 19,0 à 26,4  $\mu\text{mol/g}$  frais chez *G. pulex*. La dynamique est donc plus élevée chez la première espèce (x2,6) que chez la seconde (x1,4). *Gammarus roeseli* d'une rivière française ne montre en revanche pas d'évolution saisonnière très marquée avec néanmoins un maximum de concentration en décembre pour les deux sexes et une dynamique de variation importante : de 0,8 à 7,0  $\mu\text{g/mg}$  frais pour les mâles et de 2,6 à 7,5  $\mu\text{g/mg}$  frais pour les femelles (Gismondi, Beisel et al. 2012). Au cours de l'année, les réserves en glycogène des femelles dépassent alors celle des mâles de mars à juin.

Par ailleurs, dans l'hémisphère Sud, l'étude saisonnière de deux espèces de Hylalelles (*H. pleoacuta* et *H. castroi*) montre un maximum en automne avec une forte dynamique annuelle (jusqu'à un facteur 20) toujours plus accentué chez les mâles que chez les femelles (Dutra, Castiglioni et al. 2007). Dans une autre étude, le même auteur observe chez une autre espèce de hylalle (*H. curvispina*) des niveaux maximums de glycogène en été suivi d'une décroissance de 3,5 à 5,4 fois en automne chez les femelles et les mâles respectivement (Dutra, Santos et al. 2008).

Comme pour les lipides, les réserves glucidiques, souvent plus élevées chez les femelles, s'expliquent par la physiologie de reproduction. Parmi les mâles, l'abondance de glycogène peut néanmoins constituer un avantage compétitif en période de reproduction car on observe que les mâles en couple chez *G. pulex* sont plus riches en glucide proportionnellement à leur poids que les mâles seuls (Plaistow, Bollache et al. 2003). Cet atout permet ainsi de mieux supporter le jeûne durant la période précopulatoire.

Le jeûne, qui peut également survenir naturellement en cas de carence alimentaire a été étudié à maintes reprises chez les amphipodes. Chez *G. fossarum*, les réserves en



glycogène diminuent graduellement de 110 à 30  $\mu\text{mol/g sec}$  en 28 jours tandis qu'elles baissent proportionnellement moins chez deux espèces de *Niphargus* hyporhéiques lors d'un jeûne de 180 jours (Hervant, Mathieu et al. 1999). En revanche, après la reprise de nourriture, la reconstitution des réserves est beaucoup plus rapide chez le gammare (1 semaine). Un jeûne partiel (2 jours de prise alimentaire par semaine) chez cette même espèce de gammare pendant 60 jours, ne montre pas de variation chez le mâle tandis que les femelles présentent une baisse notable de leurs réserves au cours de l'expérience qui correspond à deux cycles reproduction (Charron, Geffard et al. 2014). Au cours d'un cycle de reproduction le taux de glycogène chez la femelle gammare varie au cours du cycle de mue. On constate une augmentation des teneurs de 30% jusqu'au stade D1 (7,2 mg/g) suivi d'une diminution. Néanmoins, les valeurs demeurent quoi qu'il en soit plus élevées que celles des mâles.

Outre la quantité, la qualité nutritive de l'alimentation influence grandement le métabolisme du glycogène. Pour exemple, *G. fossarum* nourri avec un régime de feuilles de sycomore présentera deux fois plus de réserves glucidiques qu'avec un régime de feuille d'aulnes (Arce-Funck, Crenier et al. 2016). Selon la même étude une supplémentation de la nourriture en phosphore apporte un gain métabolique entraînant une hausse supplémentaire du stock de glycogène d'environ 25 %.

L'effet du parasitisme peut se manifester sur les réserves glucidiques. Deux auteurs constatent curieusement des teneurs en glycogène plus élevées chez des individus de *G. roeselli* et *G. pulex* infestés par l'acanthocéphale que chez les gammares témoins non infestés avec un écart d'environ 20% (Plaistow, Troussard et al. 2001) (Gismondi, Beisel et al. 2012).

Les variations de températures (stress thermique) de court ou/et de long terme (réchauffement global) peuvent engendrer une surconsommation d'énergie et donc de glycogène. Pour le montrer, des échantillons de 5 populations de *G. pulex* originaires du nord et du sud du fleuve Rhône ont été soumis à 5 niveaux de température entre 18 et 30 °C (Foucreau, Cottin et al. 2014). Alors que les trois populations du Rhône Sud présentent une augmentation de leur taux de glycogène jusqu'à 21°C suivi d'une baisse, les gammares du nord présente une baisse au-delà de 18°C, signant ainsi leur moins grande adaptabilité au changement climatique en cours. Lors de cette expérience les valeurs des gammares du sud augmentent de 75 à 200  $\mu\text{mol/g sec}$  avant de diminuer à 125  $\mu\text{mol/g sec}$  alors que les valeurs des gammares du nord décroissent avec la température de 150 à 40  $\mu\text{mol/g sec}$ .

Parmi les facteurs abiotiques, les stress chimiques d'origine anthropique peuvent agir sur le métabolisme énergétique et particulièrement sur le glycogène, ressource mobilisable rapidement pour les activités de détoxification. Cependant, loin d'observer une baisse des réserves, on constate en revanche parfois une augmentation (induction ?) des teneurs en glycogène comme le montre une étude où *G. pulex* est exposé à de l'arsenic et du cadmium pendant 10 jours. Les valeurs augmentent ainsi de 40 et 122 % respectivement, les témoins se situant à 1,7  $\mu\text{g/mg}$  frais (Vellinger, Gismondi et al. 2013). Une autre étude sur des expositions au cadmium à 2 et 8  $\mu\text{g/l}$  montre des résultats mitigés avec une absence d'effet chez les mâles et une baisse chez les femelles d'au maximum 30 % (Gismondi, Beisel et al. 2012). Insecticides de la famille des carbamates, le carbofurane entraîne quant à lui une baisse drastique d'un facteur 4 à 5 des concentrations en glycogène chez *Hyalella castroi* exposé à 1 et 10  $\mu\text{g/l}$  pendant 7 jours (Dutra, Fernandes et al. 2009). Par ailleurs, une exposition *ex situ* de *G. fossarum* à une eau de rivière contaminée aux pesticides en mélange avec une eau usée domestique durant 2, 4 et 6 semaines entraîne une baisse des réserves glucidiques à la durée maximale d'exposition et à la plus forte concentration en effluent 100% (Zubrod, Englert et al. 2017).

### 3.10. Protéines totales

Les protéines ont avant tout un rôle constitutif, métabolique et ne sont utilisées par les organismes que secondairement comme réserve énergétique ou en cas de stress important. Leur capacité énergétique est supérieure à celle du glycogène mais inférieure à celle des lipides.

Pour le dosage, un broyage efficace des tissus d'intérêt suffit à libérer dans la phase aqueuse le contenu protéique des cellules. La manière de déterminer la concentration en protéines totales d'un surnageant (S9 ou autre) issu d'un homogénat, se résume à deux méthodes: celle de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951) au réactif de Folin et celle de Bradford (Bradford 1976) au bleu de Coomassie. Dans notre laboratoire la méthode de Lowry a été durablement utilisée mais est complètement remplacée depuis plusieurs années par la méthode de Bradford, plus rapide. Cependant une brève comparaison entre les deux méthodes (non publiée) montre que la méthode de Bradford présente une moindre sensibilité en raison d'un blanc d'absorbance élevée et d'une zone de linéarité plus faible. Ces défauts n'ont cependant pas d'incidence sur l'analyse d'échantillons de gammare dont la concentration en protéines impose une prédilution. En outre, selon la littérature, la méthode de Bradford est très majoritairement utilisée, du moins en écotoxicologie. Les résultats sont souvent exprimés en mg/g frais ou en mg/ml d'extrait, plus rarement en mg/g sec. Dans la méthode de Bradford, le bleu de Coomassie réagit avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés. L'intensité de la coloration bleue est mesurée à 595 nm et étalonnée au moyen d'une courbe étalon d'albumine sérique de bovin.

En milieu naturel, chez les amphipodes, le métabolisme des protéines est susceptible de varier selon les saisons, le cycle de mue, et de reproduction. Chez une population française de *G. roeseli*, à l'instar des lipides et des glucides, une étude montre que les concentrations les plus élevées apparaissent en hiver et les plus basses en été, avec une amplitude de variation de 30% pour les femelle et 50% pour les mâles (Sroda and Cossu-Leguille 2011). Au Brésil, chez *H. pleoacuta*, une baisse de 50 % des concentrations est constatée en automne alors que pour *H. Castroi* on observe une évolution plus irrégulière avec un minima au printemps pour les femelles et un autre en été pour les mâles (Dutra, Fernandes et al. 2009). Le même auteur, chez *H. curvispina*, montre des évolutions différenciées pour chacun des deux sexes : pour les femelles, les concentrations suivent une évolution croissante jusqu'en hiver alors que les mâles présentent un pic au printemps, suivi d'une décroissance (Dutra, Santos et al. 2008). Les variations selon le stade de mue, comme pour les autres réserves, ne concernent que les femelles chez *G. fossarum*, avec une teneur maximale en D1. Les concentrations varient tout au long du cycle entre 58 et 80 mg/g, les mâles demeurant stable autour de 52 mg/g (Charron, Geffard et al. 2014). A noter que la concentration plus basse observée chez les mâles dans cette étude l'est également chez un autre auteur (Sroda and Cossu-Leguille 2011).

L'influence du jeûne sur les concentrations en protéines ne se conçoit logiquement qu'après la mobilisation des réserves glucidique et lipidique. Pour *Gammarus* et *Niphargus*, après une privation de nourriture pendant 28 et 180 jours respectivement, on constate une baisse de 20 % de la réserve protéique avec des teneurs variant globalement de 0,60 à 0,45 g/g sec (Hervant, Mathieu et al. 1999). Ensuite, contrairement aux deux autres réserves énergétiques la reconstitution de la réserve après rupture du jeûne apparait plus rapide pour *Niphargus* que pour *Gammarus*.

L'impact des substances toxiques sur le métabolisme protéique peut emprunter plusieurs voies comme la production de molécules de défense (enzymes, anticorps, métallothionéine etc.) ou l'altération de la réserve structurelle. Cependant, le dosage des protéines totales nous renseigne d'une manière globale sur ces variations. Le cadmium et

l'arsenic, à des concentrations d'exposition de 3,4 à 6,0 et de 376 à 604 µg/l respectivement pendant 10 jours, occasionnent une baisse d'au moins 50 % des concentrations en protéines chez *G. pulex* (Vellinger, Gismondi et al. 2013). En revanche, le cadmium aux concentrations de 2 et 8 µg/l durant 96h n'engendre pas d'effet marquant sur les protéines totales chez *G. roeseli*. De même, le cuivre à 20 et 30 µg/l durant 6 à 48h entraîne peu de variations chez *G. roeseli* et *D. villosus* (Sroda and Cossu-Leguille 2011). Par ailleurs l'exposition de *G. fossarum* en microcosme contenant un mélange d'eau de rivière contaminée aux pesticides et d'effluent urbain ne montre pas d'effet significatif quoique les concentrations en protéines sont en moyenne légèrement plus basses chez les organisme exposés que chez les témoins (Zubrod, Englert et al. 2017).

En résumé, étant donné la stabilité toute relative de la concentration en protéines totales chez les amphipodes, l'utilisation de ce paramètre comme facteur de pondération d'autres biomarqueurs implique d'en connaître les causes de variation pour les intégrer dans l'interprétation finale des résultats ainsi pondérés. Le poids frais ou sec du tissu, s'il est connu et précis, est à privilégier comme constante biologique pour cette pondération.

## 4. CONCLUSION

Ce travail de bibliographie a permis de mesurer la diversité des approches utilisant les biomarqueurs de notre batterie. C'est tout d'abord d'un point de vue méthodologique que les auteurs divergent les uns des autres. Cela concerne : la matrice prise en compte, le choix des réactifs, voire la méthode de détection du composé final. Ces différences méthodologiques conditionnent le résultat dont la diversité des modes d'expression ajoute à l'hétérogénéité de l'ensemble. D'un point de vue écotoxicologique, les problématiques rencontrées dans la littérature s'écartent souvent de de celles de notre laboratoire, le bio-monitoring actif principalement, mais ne se montrent pas moins pertinentes pour notre propos. Cependant, on note que certains biomarqueurs sont encore peu pratiqués chez le gammare voire même en ecotoxicologie.

Parmi les biomarqueurs étudiés, l'acétylcholinestérase (AChE) se caractérise par sa robustesse et l'universalité de la méthode d'analyse. Sa relative spécificité en fait un outil plutôt facile à interpréter qui nécessite cependant de tenir compte du lien inverse existant entre l'activité enzymatique et la taille des individus. Il est en revanche peu sensible et l'inhibition de l'AChE devient létale à partir d'un certain seuil.

L'activité carboxylestérase (CE) est une estérase impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques, jouant entre autres un rôle protecteur de l'AChE. Pour les crustacés, elle apparaît ainsi plus sensible et précoce que cette dernière en réponse à une exposition à des pesticides. Elle varie à la baisse avec une amplitude maximale de 50%. On a également constaté que l'activité basale et la réactivité était plus élevée chez des populations tolérantes dans leur milieu naturel à une exposition chronique aux pesticides. Toutes ces observations contribuent à faire de l'activité carboxylestérase un marqueur de choix de notre batterie.

L'utilisation des biomarqueurs GST et TBARS est très répandue mais leur interprétation peut s'avérer délicate en raison de variations naturelles importantes liées principalement à la saison (température), à l'âge, au sexe ou à l'alimentation. Dans les études écotoxicologiques, les conditions toxiques sont cependant comparées le plus souvent à des groupes d'individus témoins traités simultanément et non à des références absolues. Notre

ambition restant néanmoins de définir des valeurs seuils pour nos marqueurs, les études mettant en évidence les effets de ces facteurs confondant sont riches d'enseignement. Par ailleurs, la bibliographie a montré la complémentarité de ces deux marqueurs lorsque qu'une absence d'induction de la GST s'explique par l'inhibition qu'occasionne un fort stress oxydant que révèle le paramètre TBars.

A propos de la phénol oxydase (PO), des auteurs mesurent l'activité *in vivo* sur hémocytes tandis que d'autres la mesure *in vitro* sur cytosol. Quoiqu'il en soit c'est un paramètre qui varie naturellement peu avec les facteurs abiotiques mais qui dépendra beaucoup de facteurs biotiques tel que le stade de mue, l'infestation d'un parasite ou la richesse du milieu en microorganisme. La mise en œuvre d'étude écotoxicologiques ou/et la détermination de valeurs de référence doit donc en tenir compte, soit en intégrant, soit en tentant d'écartier la variabilité inhérente à ces facteurs.

Le statut en antioxydants (TAS) que représente le TEAC est peu utilisé en écotoxicologie où l'on préfère souvent le dosage du glutathion (GSH), plus spécifique mais moins intégratif de la totalité des antioxydants non enzymatiques présents dans une matrice. Comme les exemples d'applications sont encore assez rares, les variations naturelles de ce marqueur demeurent peu connues. On peut suspecter néanmoins qu'il évolue avec la teneur en oxygène du milieu, la qualité de l'alimentation et peut être l'âge des individus. En présence d'une situation toxique ce biomarqueur peut varier à la hausse ou à la baisse et se retrouve souvent corrélé ou inversement corrélé au paramètre TBARS.

Les lipides totaux et le glycogène, dont les méthodes de dosages et les modes d'expression varient largement, sont très répandus comme marqueurs de réserves énergétiques en écotoxicologie, en écologie ou en physiologie. Une part importante des études s'attache aux nombreuses causes de variations biotiques et abiotiques mais les tendances qui s'en dégagent ne sont pas toutes concordantes. Plusieurs auteurs s'accordent cependant à observer des minimas en été/automne et des maximas en hiver/printemps ainsi que des concentrations plus élevées chez les femelles que chez les mâles. La température, le sexe, l'alimentation, l'âge, le statut reproducteur et le parasitisme constituent quoi qu'il en soit des facteurs de confusion dont il faut tenir compte en écotoxicologie. Une fourchette de valeurs seuils intégrant toute cette variabilité serait faiblement discriminante si bien qu'une comparaison relative à un groupe témoin garde toute son importance. En présence d'une condition toxique le taux de glycogène, assez réactif, peut varier à la hausse comme à la baisse selon le contaminant considéré alors que la concentration en lipides, moins sensible, tend généralement vers une diminution.

Déterminer la concentration en protéines totale se résume principalement aux méthodes de Lowry et de Bradford avec une forte prévalence de cette dernière. Le taux de protéines est, avec le glycogène et les lipides, un marqueur de réserve énergétique mais également un indicateur structurel de biomasse, si bien qu'il joue souvent le rôle de pondérateur des autres biomarqueurs. Selon nous, ce mode d'expression n'est pas à privilégier si le poids de matière fraîche dans notre échantillon est connu. Des résultats d'analyses biochimiques rapportés à un équivalent mg (ou g) frais est plus judicieux car on évite ainsi les biais d'interprétation en s'affranchissant de la variabilité du paramètre Protéines. Les causes de variation naturelles de la concentration en protéines chez les amphipodes sont le sexe, la saison, le cycle de mue, et la reproduction. Cependant les variations ne sont jamais drastiques, avec des écarts de 50% au maximum entre deux groupes d'individus d'une même étude. Selon un même ordre de grandeur, un impact toxique, induit par des métaux particulièrement, peut conduire à changer la concentration en protéines dans le sens d'une diminution. Cependant beaucoup d'études écotoxicologiques ne montrent pas de variation significative de ce paramètre.

Globalement, pour une interprétation optimale de nos biomarqueurs il apparaît nécessaire de bien connaître la population ou la sous population prise en compte dans les expérimentations. Pour cela le suivi biochimique des gammars de notre lieu d'élevage (cressonnière de St Maurice-de-Remens, dans l'Ain) entrepris depuis 2019, commence à apporter de précieuses informations. La détermination de seuils de référence est le but poursuivi mais elle n'est pour l'instant réalisée que sur la sous-population des mâles de 16 à 20 mg, groupe privilégié pour l'analyse de l'AChE. Cependant, la diversité des marqueurs et des problématiques actuelles permet d'envisager un changement de paradigme.

## Références bibliographiques

- Ait-Aissa, S., O. Ausseil, O. Palluel, E. Vindimian, J. Garnier-Laplace and J. M. Porcher (2003). "Biomarker responses in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after single and combined exposure to low doses of cadmium, zinc, PCB77 and 17 beta-oestradiol." *Biomarkers* **8**(6): 491-508.
- Anguiano, O. L., C. Castro, A. Venturino and A. Ferrari (2014). "Acute Toxicity and Biochemical Effects of Azinphos Methyl in the Amphipod *Hyalella curvispina*." *Environmental Toxicology* **29**(9): 1043-1053.
- Anguiano, O. L., A. Ferrari, J. Soleno, M. C. Martinez, A. Venturino, A. M. P. De D'Angelo and C. M. Montagna (2008). "Enhanced esterase activity and resistance to azinphosmethyl in target and nontarget organisms." *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**(10): 2117-2123.
- Anguiano, O. L., M. Vacca, M. E. R. Araujo, M. Montagna, A. Venturino and A. Ferrari (2017). "Acute toxicity and esterase response to carbaryl exposure in two different populations of amphipods *Hyalella curvispina*." *Aquatic Toxicology* **188**: 72-79.
- Arambourou, H., I. Fuertes, E. Vulliet, G. Daniele, P. Noury, N. Delorme, K. Abbaci and C. Barata (2018). "Fenoxycarb exposure disrupted the reproductive success of the amphipod *Gammarus fossarum* with limited effects on the lipid profile." *Plos One* **13**(4): 12.
- Arce-Funck, J., C. Crenier, M. Danger, C. Cossu-Leguille, F. Guerold and V. Felten (2016). "Stoichiometric constraints modulate impacts of silver contamination on stream detritivores: an experimental test with *Gammarus fossarum*." *Freshwater Biology* **61**(12): 2075-2089.
- Arts, M. T., M. E. Ferguson, N. E. Glozier, R. D. Robarts and D. B. Donald (1995). "SPATIAL AND TEMPORAL VARIABILITY IN LIPID DYNAMICS OF COMMON AMPHIPODS - ASSESSING THE POTENTIAL FOR UPTAKE OF LIPOPHILIC CONTAMINANTS." *Ecotoxicology* **4**(2): 91-113.
- Baker, J. E., J. A. Fabrick and K. Y. Zhu (1998). "Characterization of esterases in malathion-resistant and susceptible strains of the pteromalid parasitoid *Anisopteromalus calandrae*." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**(12): 1039-1050.
- Barata, C., A. Solayan and C. Porte (2004). "Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*." *Aquatic Toxicology* **66**(2): 125-139.
- Barros, S., R. Montes, J. B. Quintana, R. Rodil, J. M. A. Oliveira, M. M. Santos and T. Neuparth (2017). "Chronic effects of triclocarban in the amphipod *Gammarus locusta*: Behavioural and biochemical impairment." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **135**: 276-283.
- Becker, J., C. Ortmann, M. A. Wetzel, C. Winkelmann and J. H. E. Koop (2013). "Mate guarding in relation to seasonal changes in the energy reserves of two freshwater amphipods (*Gammarus fossarum* and *G. pulex*)." *Freshwater Biology* **58**(2): 372-381.
- Bianco, K., M. S. Yusseppone, S. Otero, C. Luquet, M. D. R. de Molina and G. Kristoff (2013). "Cholinesterases and neurotoxicity as highly sensitive biomarkers for an organophosphate insecticide in a freshwater gastropod (*Chilina gibbosa*) with low sensitivity carboxylesterases." *Aquatic Toxicology* **144**: 26-35.
- Boily, M., B. Sarrasin, C. DeBlois, P. Aras and M. Chagnon (2013). "Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments." *Environmental Science and Pollution Research* **20**(8): 5603-5614.

- Boisseaux, P., P. Noury, N. Delorme, L. Perrier, H. Thomas-Guyon and J. Garric (2018). "Immunocompetence analysis of the aquatic snail *Lymnaea stagnalis* exposed to urban wastewaters." Environmental Science and Pollution Research **25**(17): 16720-16728.
- Boyer, S., J. P. David, D. Rey, G. Lemperiere and P. Ravanel (2006). "Response of *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) larvae to three xenobiotic exposures: Larval tolerance and detoxifying enzyme activities." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(2): 470-476.
- Bradford, M. M. (1976). "RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING." Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). "Microsomal lipid peroxidation." Methods in enzymology **52**: 302-310.
- Camejo, G., B. Wallin and M. Enojarvi (1998). "Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates." Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **108**: 377-387.
- Castiglioni, D. D., B. K. Dutra, A. Cahansky, E. Rodriguez, G. T. Oliveira and G. Bond-Buckup (2010). "Variations in biochemical composition and lipoperoxidation levels of *Hyalella bonariensis* maintained in laboratory with different diets." Animal Biology **60**(4): 349-360.
- CAYMAN-chemicals (2014). TBARS , TCA method , assay kit item N° 700870. Ann Arbor, MI, All rights reserved. Printed in U.S.A., Cayman Chemical Company.
- Charron, L., O. Geffard, A. Chaumot, R. Coulaud, A. Jaffal, V. Gaillet, O. Dedourge-Geffard and A. Geffard (2014). "Influence of Molting and Starvation on Digestive Enzyme Activities and Energy Storage in *Gammarus fossarum*." Plos One **9**(4): 9.
- Charron, L., O. Geffard, A. Chaumot, R. Coulaud, A. Jaffal, V. Gaillet, O. Dedourge-Geffard and A. Geffard (2015). "Consequences of Lower Food Intake on the Digestive Enzymes Activities, the Energy Reserves and the Reproductive Outcome in *Gammarus fossarum*." Plos One **10**(4): 14.
- Colovic, M. B., D. Z. Krstic, T. D. Lazarevic-Pasti, A. M. Bondzic and V. M. Vasic (2013). "Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology." Current Neuropharmacology **11**(3): 315-335.
- Cornet, S., C. Biard and Y. Moret (2009). "Variation in immune defence among populations of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda)." Oecologia **159**(2): 257-269.
- Cornet, S., N. Franceschi, A. Bauer, T. Rigaud and Y. Moret (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**(2): 221-229.
- Correia, A. D., M. H. Costa, O. J. Luis and D. R. Livingstone (2003). "Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea : Amphipoda)." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **289**(1): 83-101.
- Crane, M., W. Sildanchandra, R. Kheir and A. Callaghan (2002). "Relationship between biomarker activity and developmental endpoints in *Chironomus riparius* Meigen exposed to an organophosphate insecticide." Ecotoxicology and Environmental Safety **53**(3): 361-369.
- Day, K. E. and I. M. Scott (1990). "USE OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY TO DETECT SUBLETHAL TOXICITY IN STREAM INVERTEBRATES EXPOSED TO LOW CONCENTRATIONS OF ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDES." Aquatic Toxicology **18**(2): 101-114.

- Del Brio, J., B. A. Lares, L. B. Parra-Morales, V. G. Sanchez, C. M. Montagna and A. Venturino (2019). "Differential detoxifying responses to crude oil water-accommodated fraction in *Hyalalella curvispina* individuals from unpolluted and contaminated sites." Environmental Toxicology and Pharmacology **70**: 7.
- Demirci, O., K. Guven, D. Asma, S. Ogut and P. Ugurlu (2018). "Effects of endosulfan, thiamethoxam, and indoxacarb in combination with atrazine on multi-biomarkers in *Gammarus kischineffensis*." Ecotoxicology and Environmental Safety **147**: 749-758.
- Diamantino, T. C., E. Almeida, A. Soares and L. Guilhermino (2003). "Characterization of cholinesterases from *Daphnia magna* straus and their inhibition by zinc." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **71**(2): 219-225.
- Diamantino, T. C., L. Guilhermino, E. Almeida and A. Soares (2000). "Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute, chronic, and acetylcholinesterase inhibition tests." Ecotoxicology and Environmental Safety **45**(3): 253-259.
- Domingues, I., A. R. Agra, K. Monaghan, A. Soares and A. J. A. Nogueira (2010). "CHOLINESTERASE AND GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE ACTIVITIES IN FRESHWATER INVERTEBRATES AS BIOMARKERS TO ASSESS PESTICIDE CONTAMINATION." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(1): 5-18.
- Duman, F. and M. Kar (2015). "Evaluation of effects of exposure conditions on the biological responses of *Gammarus pulex* exposed to cadmium." International Journal of Environmental Science and Technology **12**(2): 437-444.
- Dutra, B. K., D. S. Castiglioni, R. B. Santos, G. Bond-Buckup and G. T. Oliveira (2007). "Seasonal variations of the energy metabolism of two sympatric species of *Hyalalella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in the southern Brazilian highlands." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **148**(1): 239-247.
- Dutra, B. K., F. A. Fernandes, A. L. Lauffer and G. T. Oliveira (2009). "Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyalalella castroi* (Crustacea, Amphipoda)." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **149**(4): 640-646.
- Dutra, B. K., R. B. Santos, A. A. P. Bueno and G. T. Oliveira (2008). "Seasonal variations in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyalalella curvispina* (Crustacea, Amphipoda)." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **151**(3): 322-328.
- Ek, C., A. Garbaras, Z. Y. Yu, H. Oskarsson, A. K. E. Wiklund, L. Kumblad and E. Gorokhova (2019). "Increase in stable isotope ratios driven by metabolic alterations in amphipods exposed to the beta-blocker propranolol." Plos One **14**(5): 17.
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres, Jr. and R. M. Feather-Stone (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." Biochemical pharmacology **7**: 88-95.
- Flammarion, P., P. Noury and J. Garric (2002). "The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored." Environmental Pollution **120**(2): 325-330.
- Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." The Journal of biological chemistry **226**(1): 497-509.
- Foucreau, N., D. Cottin, C. Piscart and F. Hervant (2014). "Physiological and metabolic responses to rising temperature in *Gammarus pulex* (Crustacea) populations living under continental or Mediterranean climates." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **168**: 69-75.



Franceschi, N., T. Rigaud, Y. Moret, F. Hervant and L. Bollache (2007). "Behavioural and physiological effects of the trophically transmitted cestode parasite, *Cyathocephalus truncatus*, on its intermediate host, *Gammarus pulex*." Parasitology **134**: 1839-1847.

Galloway, T. S., N. Millward, M. A. Browne and M. H. Depledge (2002). "Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers." Aquatic Toxicology **61**(3-4): 169-180.

Gelinas, M., A. Lajeunesse, C. Gagnon and F. Gagne (2013). "Temporal and seasonal variation in acetylcholinesterase activity and glutathione-S-transferase in amphipods collected in mats of *Lyngbya wollei* in the St-Lawrence River (Canada)." Ecotoxicology and Environmental Safety **94**: 54-59.

Gismondi, E., J. N. Beisel and C. Cossu-Leguille (2012). "Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*." Environmental Research **118**: 47-52.

Gismondi, E., J. N. Beisel and C. Cossu-Leguille (2012). "Polymorphus Minutus Affects Antitoxic Responses of *Gammarus Roeseli* Exposed to Cadmium." Plos One **7**(7): 9.

Gismondi, E., C. Cossu-Leguille and J. N. Beisel (2013). "Do male and female gammarids defend themselves differently during chemical stress?" Aquatic Toxicology **140**: 432-438.

Gorinstein, S., P. Arancibia-Avila, S. Moncheva, F. Toledo, S. Trakhtenberg, A. Gorinstein, I. Goshev and J. Namiesnik (2006). "Changes in mussel *Mytilus galloprovincialis* protein profile as a reaction of water pollution." Environment International **32**(1): 95-100.

Gorokhova, E., M. Lof, H. P. Halldorsson, U. Tjarnlund, M. Lindstrom, T. Elfving and B. Sundelin (2010). "Single and combined effects of hypoxia and contaminated sediments on the amphipod *Monoporeia affinis* in laboratory toxicity bioassays based on multiple biomarkers." Aquatic Toxicology **99**(2): 263-274.

Gorokhova, E., M. Lof, M. Reutgard, M. Lindstrom and B. Sundelin (2013). "Exposure to contaminants exacerbates oxidative stress in amphipod *Monoporeia affinis* subjected to fluctuating hypoxia." Aquatic Toxicology **127**: 46-53.

Guilhermino, L., M. N. Lacerda, A. J. A. Nogueira and A. Soares (2000). "In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring." Science of the Total Environment **247**(2-3): 137-141.

Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1976). "GLUTATHIONE S-TRANSFERASE AA FROM RAT-LIVER." Archives of Biochemistry and Biophysics **175**(2): 710-716.

Hatlen, K., L. Camus, J. Berge, G. H. Olsen and T. Baussant (2009). "Biological effects of water soluble fraction of crude oil on the Arctic sea ice amphipod *Gammarus wilkitzkii*." Chemistry and Ecology **25**(3): 151-162.

Hervant, F., J. Mathieu and H. Barre (1999). "Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipods to long-term starvation and subsequent refeeding." Journal of Experimental Biology **202**(24): 3587-3595.

Hirthe, G., T. C. Fisher, M. Crane and A. Callaghan (2001). "Short-term exposure to sub-lethal doses of lindane affects developmental parameters in *Chironomus riparius* Meigen, but has no effect on larval glutathione-S-transferase activity." Chemosphere **44**(4): 583-589.

IRSTEA, Laboratoire de chimie des Milieux Aquatiques, E. M. d. Pollutions Diffuses and E. Hydrosystèmes Anthropisés (2015). Mise en application et évaluation d'outils intégratifs chimiques et

biologiques pour mesurer l'impact des produits phytosanitaires sur les cours d'eau, IRSTEA ,  
Groupement de Lyon-Villeurbanne 5 rue de la Doua, 69626 VILLEURBANNE Cedex.

Janssens, L., K. Dinh Van and R. Stoks (2014). "Extreme temperatures in the adult stage shape delayed effects of larval pesticide stress: A comparison between latitudes." *Aquatic Toxicology* **148**: 74-82.

Jemec, A., D. Drobne, T. Tisler and K. Sepcic (2010). "Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species." *Environmental Science and Pollution Research* **17**(3): 571-581.

Jemec, A., D. Skufca, S. Prevorcnik, Z. Fiser and P. Zidar (2017). "Comparative study of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities of closely related cave and surface *Asellus aquaticus* (Isopoda: Crustacea)." *Plos One* **12**(5): 14.

Jemec, A., T. Tisler, D. Drobne, K. Sepcic, P. Jamnik and M. Ros (2008). "Biochemical biomarkers in chronically metal-stressed daphnids." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **147**(1): 61-68.

Karaouzas, I., E. Cotou, T. A. Albanis, A. Kamarianos, N. T. Skoulikidis and U. Giannakou (2011). "Bioassays and Biochemical Biomarkers for Assessing Olive Mill and Citrus Processing Wastewater Toxicity." *Environmental Toxicology* **26**(6): 669-676.

Ljungquist, A. and K. B. Augustinsson (1971). "Purification and properties of two carboxylesterases from rat-liver microsomes." *European journal of biochemistry* **23**(2): 303-313.

Lof, M., B. Sundelin, B. Liewenborg, C. Bandh, K. Broeg, S. Schatz and E. Gorokhova (2016). "Biomarker-enhanced assessment of reproductive disorders in *Monoporeia affinis* exposed to contaminated sediment in the Baltic Sea." *Ecological Indicators* **63**: 187-195.

Lopes, A. R., F. O. Borges, C. Figueiredo, E. Sampaio, M. Diniz, R. Rosa and T. F. Grilo (2019). "Transgenerational exposure to ocean acidification induces biochemical distress in a keystone amphipod species (*Gammarus locusta*)." *Environmental Research* **170**: 168-177.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *The Journal of biological chemistry* **193**(1): 265-275.

Mastropaolo, W. and J. Yourno (1981). "AN ULTRAVIOLET SPECTROPHOTOMETRIC ASSAY FOR ALPHA-NAPHTHYL ACETATE AND ALPHA-NAPHTHYL BUTYRATE ESTERASES." *Analytical Biochemistry* **115**(1): 188-193.

Masuko, T., A. Minami, N. Iwasaki, T. Majima, S. I. Nishimura and Y. C. Lee (2005). "Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format." *Analytical Biochemistry* **339**(1): 69-72.

McLoughlin, N., D. Q. Yin, L. Maltby, R. M. Wood and H. X. Yu (2000). "Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers." *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**(8): 2085-2092.

Miller, N. J., C. Riceevans, M. J. Davies, V. Gopinathan and A. Milner (1993). "A NOVEL METHOD FOR MEASURING ANTIOXIDANT CAPACITY AND ITS APPLICATION TO MONITORING THE ANTIOXIDANT STATUS IN PREMATURE NEONATES." *Clinical Science* **84**(4): 407-412.

Moret, Y., T. Rigaud, S. Motreuil, J.-P. Troussard and J. Moreau (2010). "Condition-dependent ecdysis and immunocompetence in the amphipod crustacean, *Gammarus pulex*." *Biology Letters* **6**(6): 788-791.

- Neuparth, T., R. Capela, S. P. P. Pereira, S. M. Moreira, M. M. Santos and M. A. Reis-Henriques (2014). "TOXICITY EFFECTS OF HAZARDOUS AND NOXIOUS SUBSTANCES (HNS) TO MARINE ORGANISMS: ACUTE AND CHRONIC TOXICITY OF p-XYLENE TO THE AMPHIPOD *Gammarus locusta*." Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues **77**(20): 1210-1221.
- Noury, P. (2016). Dosage en microplaque de l'activité enzymatique AChE du gammare. <https://hal.inrae.fr/hal-02602445>, INRAE: 9.
- Pala, A. (2019). "The effect of a glyphosate-based herbicide on acetylcholinesterase (AChE) activity, oxidative stress, and antioxidant status in freshwater amphipod: *Gammarus pulex* (Crustacean)." Environmental Science and Pollution Research **26**(36): 36869-36877.
- Palais, F., C. Mouneyrac, O. Dedourge-Geffard, L. Giamberini, S. Biagianti-Risbourg and A. Geffard (2011). "One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*)." Chemosphere **83**(8): 1062-1073.
- Park, K., H. W. Bang, J. Park and I. S. Kwak (2009). "Ecotoxicological multilevel-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae." Chemosphere **77**(3): 359-367.
- Perrot Minnot, M. J., A. Chaumot, G. Caillot, P. Noury, H. Quéau, N. Delorme and G. Olivier (2018). Combined effects of parasitism and anthropogenic stressors in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum*: impacts on multiple traits
- Effets combinés du parasitisme et des facteurs de stress anthropiques sur l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum* : impacts sur des traits multiples. 9th Acanthocephalan Workshop. Stará Lesná, Slovakia: 23.
- Plaistow, S. J., L. Bollache and F. Cezilly (2003). "Energetically costly precopulatory mate guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences." Animal Behaviour **65**: 683-691.
- Plaistow, S. J., J. P. Troussard and F. Cezilly (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**(4): 346-351.
- Quintaneiro, C., M. Monteiro, A. Soares, J. Ranville and A. J. A. Nogueira (2014). "Cholinesterase activity on *Echinogammarus meridionalis* (Pinkster) and *Atyaephyra desmarestii* (Millet): characterisation and in vivo effects of copper and zinc." Ecotoxicology **23**(3): 449-458.
- Rakotondravelo, M. L., T. D. Anderson, R. E. Charlton and K. Y. Zhu (2006). "Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera : Chironomidae)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **51**(3): 360-366.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." Free Radical Biology and Medicine **26**(9-10): 1231-1237.
- Riaz, M. A., R. Poupardin, S. Reynaud, C. Strode, H. Ranson and J. P. David (2009). "Impact of glyphosate and benzo a pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics." Aquatic Toxicology **93**(1): 61-69.
- Rigaud, T. and Y. Moret (2003). "Differential phenoloxidase activity between native and invasive gammarids infected by local acanthocephalans: differential immunosuppression?" Parasitology **127**: 571-577.

- Schvezov, N. and O. Amin (2011). "Biochemical response of amphipods (Gammarid: Paramorea) in a sediment laboratory exposure from Ushuaia Bay, Beagle Channel." Ecotoxicology and Environmental Safety **74**(3): 394-402.
- Serdar, O. (2019). "The effect of dimethoate pesticide on some biochemical biomarkers in Gammarus pulex." Environmental Science and Pollution Research **26**(21): 21905-21914.
- Serdar, O., N. C. Yildirim, S. Tatar, N. Yildirim and A. Ogedey (2018). "Antioxidant biomarkers in Gammarus pulex to evaluate the efficiency of electrocoagulation process in landfill leachate treatment." Environmental Science and Pollution Research **25**(13): 12538-12544.
- Sornom, P., E. Gismondi, C. Vellinger, S. Devin, J. F. Ferard and J. N. Beisel (2012). "Effects of Sublethal Cadmium Exposure on Antipredator Behavioural and Antitoxic Responses in the Invasive Amphipod Dikerogammarus villosus." Plos One **7**(8): 10.
- Sroda, S. and C. Cossu-Leguille (2011). "Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor?" Ecotoxicology **20**(1): 264-273.
- Sroda, S. and C. Cossu-Leguille (2011). "Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid Gammarus roeseli." Chemosphere **83**(4): 538-544.
- Sturm, A. and P. D. Hansen (1999). "Altered cholinesterase and monooxygenase levels in Daphnia magna and Chironomus riparius exposed to environmental pollutants." Ecotoxicology and Environmental Safety **42**(1): 9-15.
- Tatar, S. and Y. Turkmenoglu (2020). "Investigation of antioxidant responses in Gammarus pulex exposed to Bisphenol A." Environmental Science and Pollution Research: 5.
- Tatar, S., N. C. Yildirim, O. Serdar, N. Yildirim and A. Ogedey (2018). "The using of Gammarus pulex as a biomonitor in ecological risk assessment of secondary effluent from municipal wastewater treatment plant in Tunceli, Turkey." Human and Ecological Risk Assessment **24**(3): 819-829.
- Touaylia, S., A. Khazri, A. Mezni and M. Bejaoui (2019). "Effects of emerging persistent organic pollutant perfluorooctane sulfonate (PFOS) on the Crustacean Gammarus insensibilis." Human and Ecological Risk Assessment **25**(8): 2133-2141.
- Turja, R., S. Sanni, M. Stankeviciute, L. Butrimaviciene, M. H. Devier, H. Budzinski and K. K. Lehtonen (2020). "Biomarker responses and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mytilus trossulus and Gammarus oceanicus during exposure to crude oil." Environmental Science and Pollution Research: 17.
- Vanhandel, E. (1985). "RAPID-DETERMINATION OF TOTAL LIPIDS IN MOSQUITOS." Journal of the American Mosquito Control Association **1**(3): 302-304.
- Vellinger, C., E. Gismondi, V. Felten, P. Rousselle, K. Mehennaoui, M. Parant and P. Usseglio-Polatera (2013). "Single and combined effects of cadmium and arsenate in Gammarus pulex (Crustacea, Amphipoda): Understanding the links between physiological and behavioural responses." Aquatic Toxicology **140**: 106-116.
- Vereshchagina, K. P., Y. A. Lubyaga, Z. Shatilina, D. Bedulina, A. Gurkov, D. V. Axenov-Gribanov, B. Baduev, E. S. Kondrateva, M. Gubanov, E. Zadereev, I. Sokolova and M. Timofeyev (2016). "Salinity modulates thermotolerance, energy metabolism and stress response in amphipods Gammarus lacustris." Peerj **4**: 22.
- Vrankovic, J., M. Zivic, A. Radojevic, V. Peric-Mataruga, D. Todorovic, Z. Markovic and I. Zivic (2018). "Evaluation of oxidative stress biomarkers in the freshwater gammarid Gammarus dulensis exposed to trout farm outputs." Ecotoxicology and Environmental Safety **163**: 84-95.

- Wheelock, C. E., B. M. Phillips, B. S. Anderson, J. L. Miller, M. J. Miller and B. D. Hammock (2008). Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 195. D. M. Whitacre. **195**: 117-178.
- Wigh, A., O. Geffard, K. Abbaci, A. Francois, P. Noury, A. Berge, E. Vulliet, B. Domenjoud, A. Gonzalez-Ospina, S. Bony and A. Devaux (2017). "Gammarus fossarum as a sensitive tool to reveal residual toxicity of treated wastewater effluents." Science of the Total Environment **584**: 1012-1021.
- Xuereb, B. (2009). Développement de marqueurs de neurotoxicité et de perturbations endocrines chez l'amphipode d'eau douce Gammarus fossarum. Thèse, UNIVERSITE DE METZ.
- Xuereb, B., A. Chaumot, R. Mons, J. Garric and O. Geffard (2009). "Acetylcholinesterase activity in Gammarus fossarum (Crustacea Amphipoda) Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys." Aquatic Toxicology **93**(4): 225-233.
- Xuereb, B., E. Lefevre, J. Garric and O. Geffard (2009). "Acetylcholinesterase activity in Gammarus fossarum (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration." Aquatic Toxicology **94**(2): 114-122.
- Xuereb, B., P. Noury, V. Felten, J. Garric and O. Geffard (2007). "Cholinesterase activity in Gammarus pulex (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos." Toxicology **236**(3): 178-189.
- Yildirim, N. C., M. Tanyol, O. Serdar and N. Yildirim (2019). "Gammarus pulex as a Model Organism to Assess the Residual Toxicity of Slaughterhouse Wastewater Treated by Electrocoagulation Process." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **103**(3): 447-452.
- Yildirim, N. C., M. Tanyol, N. Yildirim, O. Serdar and S. Tatar (2018). "Biochemical responses of Gammarus pulex to malachite green solutions decolorized by Coriolus versicolor as a biosorbent under batch adsorption conditions optimized with response surface methodology." Ecotoxicology and Environmental Safety **156**: 41-47.
- Yildirim, N. C. and M. Yaman (2019). "The usability of oxidative stress and detoxification biomarkers in Gammarus pulex for ecological risk assessment of textile dye methyl orange." Chemistry and Ecology **35**(4): 319-329.
- Yu, Z. Y., D. Q. Yin and J. Zhang (2019). "Sex-dependent effects of sulfamethoxazole exposure on pro-/anti-oxidant status with stimulation on growth, behavior and reproduction in the amphipod Hyalella azteca." Environmental Pollution **244**: 398-404.
- Zimmer, M. and S. Bartholme (2003). "Bacterial endosymbionts in Asellus aquaticus (Isopoda) and Gammarus pulex (Amphipoda) and their contribution to digestion." Limnology and Oceanography **48**(6): 2208-2213.
- Zubrod, J. P., D. Englert, S. Luderwald, S. Poganiuch, R. Schulz and M. Bundschuh (2017). "History Matters: Pre-Exposure to Wastewater Enhances Pesticide Toxicity in Invertebrates." Environmental Science & Technology **51**(16): 9280-9287.



**INRAE**  
**5 rue de la Doua - CS 20244, 69625 Villeurbanne Cedex, France**

**Tel : +33(0)4 72 20 87 87**  
**Fax : +33(0)4 78 47 78 75**

Rejoignez-nous sur :



<https://www.inrae.fr/>



**RÉPUBLIQUE  
FRANÇAISE**

*Liberté  
Égalité  
Fraternité*

**INRAE**