

Impact de la qualité trophique du milieu sur la réponse de différents biomarqueurs chez *Dreissena polymorpha*

Christophe Felix, Antoine Le Guernic, Stéphane Betoulle, Aurélie Bigot, Elise David,
Odile Dedourge-Geffard, Alain Geffard*

Université de Reims Champagne Ardenne, Unité Interactions Animal-Environnement EA
4689

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

Sommaire

1	Introduction	2
2	Matériels et méthodes.....	3
2.1	Echantillonnage et acclimatation des dreissènes au laboratoire	3
2.2	Phase expérimentale	3
2.3	Méthodologie pour les paramètres énergétiques	4
2.4	Méthodologie pour les paramètres de l'immunité :	5
2.4.1	Préparation des hémocytes :	5
2.4.2	Mortalité cellulaire.....	5
2.4.3	Activité phagocytaire.....	5
2.4.4	Activité oxydative.....	5
2.4.5	Etude morphométrique des granulocytes	6
3	Résultats	6
3.1	Métabolisme énergétique.....	6
3.1.1	Enzymes digestives	6
3.1.2	Gènes de la chaîne respiratoire.....	6
3.1.3	Allocation énergétique cellulaire	7
3.2	Paramètres de l'immunité.....	8
3.2.1	Modulation morphométrique granulocytaire	8
3.2.2	Immunomodulation induite par le stress nutritionnel	8
3.2.3	La phagocytose	8
3.2.4	Activité oxydative.....	9
4	Discussion.....	10
5	Conclusion.....	11
6	Références	12

1 Introduction

Un des objectifs de la phase 6 du PIREN-Seine consiste à développer des réponses biologiques permettant de préciser l'impact de différentes familles de micropolluants sur les organismes du milieu aquatique. En réponse à une exposition chimique, un organisme aquatique peut mettre en place divers mécanismes biochimiques, physiologiques et/ou comportementaux afin de réduire l'exposition aux contaminants (réactions d'échappement ou d'évitement : *e.g.* diminution de l'activité de filtration ou fermeture de la coquille chez les bivalves), leur absorption (*e.g.* sursécrétion de mucus au niveau des surfaces exposées, exclusion des contaminants absorbés) ou la manifestation de leurs effets toxiques (*e.g.* neutralisation et/ou excrétion des polluants absorbés, réparation des dommages occasionnés) (Calow, 1991). De nombreuses recherches portent aujourd'hui sur des réponses biologiques mesurées à des niveaux d'organisation plus faible, de la molécule à l'individu, regroupées sous le terme générique de biomarqueurs. Il est courant de distinguer deux classes de biomarqueurs (De La fontaine et al., 2000). Les biomarqueurs de défense, incluant entre autres les métallothionéines, les enzymes de biotransformation, les défenses anti-oxydantes enzymatiques et dont la mesure va traduire une exposition des organismes à au moins un contaminant. L'autre classe concerne les biomarqueurs de dommage qui traduisent une atteinte biologique plus ou moins importante (ex : immunotoxicité, génotoxicité, neurotoxicité...). Les immunomarqueurs ont une pertinence certaine en écotoxicologie. En effet, compte tenu du rôle de la fonction immunitaire dans la défense et le maintien de l'intégrité de l'organisme, toute perturbation à son niveau est susceptible d'altérer les capacités d'adaptation et de survie des individus face aux contraintes environnementales biotiques et abiotiques qui s'exercent sur eux.

La mise en place de ces différents mécanismes se traduit par une hausse des dépenses énergétiques de l'organisme (syndrome d'adaptation général – Selye, 1976) qui, si elles ne sont pas compensées par une hausse équivalente des apports énergétiques, contraint l'organisme à sacrifier une partie de l'énergie normalement allouée aux fonctions de production (coût métabolique de la tolérance – Calow & Sibly, 1990). Une réduction de l'énergie allouée à la croissance et à la reproduction (SfG – « scope for growth » – Warren et Davies, 1967) a ainsi été observée chez diverses espèces aquatiques exposées en laboratoire ou sur le terrain, à un stress toxique (voir les synthèses de : Le Gal et al., 1997 ; Durou et al., 2008). Cette modification des processus d'allocation énergétique n'est pas sans conséquence sur la condition des individus (*e.g.* crustacés : De Coen et Janssen, 1997 ; bivalves : Smolders et al., 2004 ; annélides : Mouneyrac et al., 2010) et est d'ailleurs envisagée comme un facteur d'extinction locale des populations (Boldina-Cosquéric et al., 2010 ; Fossi Tankoua et al., 2010). Les réserves énergétiques (*e.g.* glycogène, lipides), la charge énergétique en adénylates (AEC – « adenylylate energy charge » = mesure de l'énergie métabolique disponible), l'allocation énergétique cellulaire (CEA – « cellular energy allocation » = mesure de la balance énergétique cellulaire nette) et l'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (SfG – « scope for growth » = mesure de la balance énergétique individuelle nette) constituent les principaux biomarqueurs énergétiques étudiés actuellement (Le Gal et al., 1997 ; Durou et al., 2008). L'intérêt porté à ces marqueurs résulte des relations observées entre ces derniers (CEA en particulier) et l'état des individus ou des populations étudiés (De Coen et Janssen, 2003 ; Durou et al., 2005). D'autres paramètres bioénergétiques sont néanmoins susceptibles de présenter un intérêt en biosurveillance, telles les activités enzymatiques digestives qui, en relation avec l'ingéré alimentaire, déterminent la capacité d'un organisme à exploiter les ressources alimentaires disponibles dans son environnement (Figure 1). Ces activités sont d'ailleurs sensibles à une exposition à des contaminants (Hyne & Maher, 2003 ; Dedourge-Geffard et al., 2009) et, en relation avec les autres biomarqueurs énergétiques actuellement disponibles, elles pourraient constituer des marqueurs génériques pertinents pour rendre compte de l'état des individus (et des populations ?) (Figure 1). Néanmoins, les activités enzymatiques digestives ont été jusqu'à aujourd'hui très peu étudiées dans le cadre d'approches écotoxicologiques. Dans une précédente étude *in situ* basée sur le suivi de différents biomarqueurs chez *Dreissena polymorpha* (Palais et al, 2011 et 2012) il a été observé des modulations de réponses biologiques (réserves, enzymes digestives, GST...) non seulement en lien avec la qualité chimique des sites étudiés mais aussi en relation avec différents paramètres biotiques et abiotiques (saison, cycle de reproduction...). Parmi ces paramètres la qualité trophique apparaissait comme particulièrement importante.

Afin de discerner l'impact d'une dégradation chimique d'un milieu sur la réponse de biomarqueurs, il est donc primordial de préciser l'influence des paramètres biotiques et abiotiques qui peuvent apparaître comme confondants. Cette étude vise ainsi à caractériser, en conditions contrôlées, l'influence d'un de ces paramètres, la qualité trophique du milieu, sur différents biomarqueurs du métabolisme énergétique ainsi que sur des marqueurs de l'immunité chez *Dreissena polymorpha*.

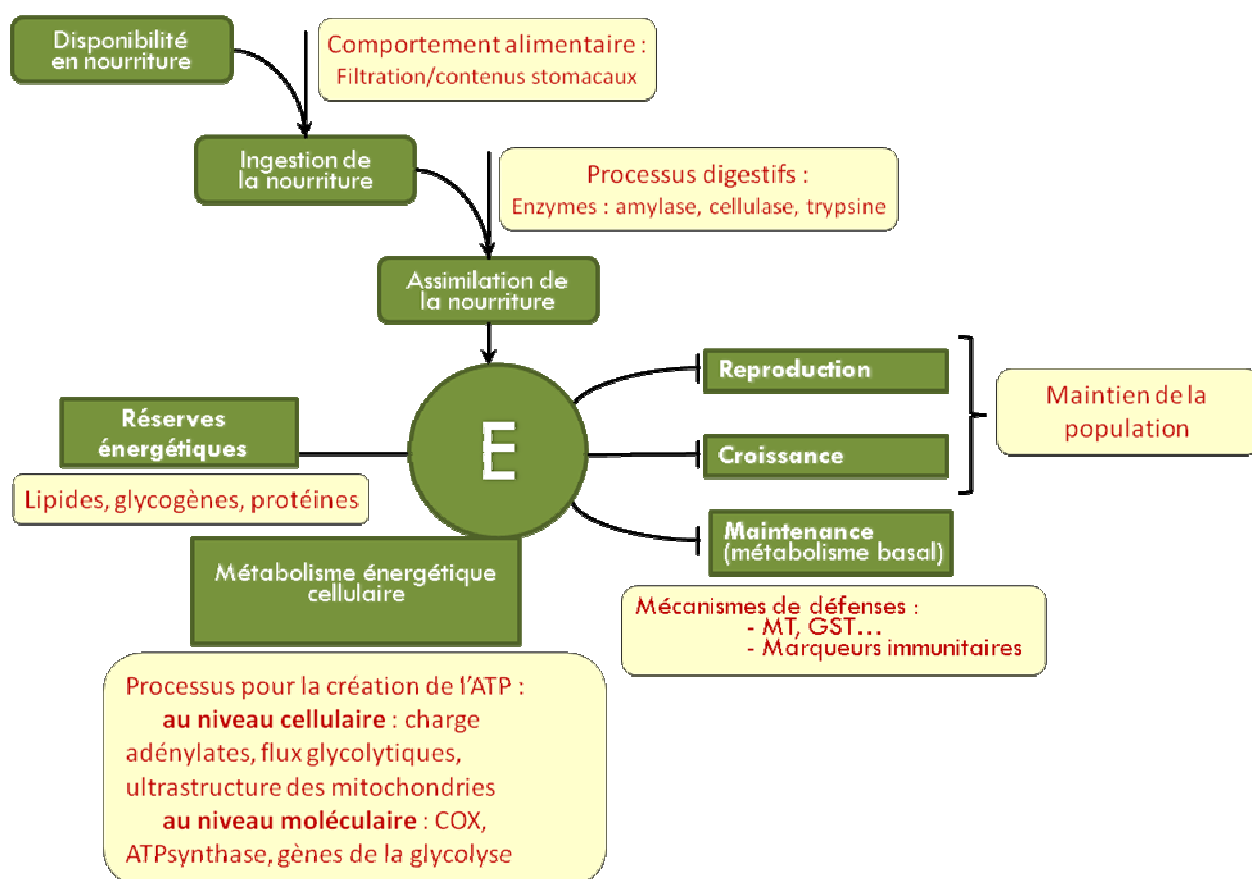


Figure 1 : Représentation schématique de différents niveaux du métabolisme énergétique en lien avec la fitness des organismes animaux.

2 Matériels et méthodes

2.1 Echantillonnage et acclimatation des dreissènes au laboratoire

Les moules sont échantillonnées dans le canal de l'Est à Commercy (milieu de référence), dans le département de la Meuse (France) le 4 janvier 2012. Au laboratoire, les individus sont nettoyés puis placés en aquariums (14°C, conductivité : $432 \pm 34 \mu\text{S/cm}$, oxygénation : $8,4 \pm 0,4 \text{ mg O}_2/\text{L}$, photopériode : 16/8, eau de source de la région) avec un remplacement d'eau 3 fois par semaine.

Les moules sont alimentées progressivement, tous les deux jours durant la phase d'acclimatation avec une culture fraîche de *Scenedesmus obliquus* et des pastilles de *Chlorella pyrenoidosa* (en quantité identique : 500.000 cellules par jour et par dreissène).

2.2 Phase expérimentale

Un tiers des dreissènes acclimatées est nourri tous les jours avec la quantité maximale d'algues, soit 1.10^6 cellules par dreissène et par jour (Kraak et al., 1997). Un autre tiers est nourri avec 10% de la quantité maximale (1.10^5 cellules par dreissène et par jour), et le dernier tiers est privé de nourriture. Les

prélèvements sont réalisés à J0, J7, J14, J21 pour les marqueurs immunitaires. Pour chaque temps, l'hémolymphe est prélevée dans le muscle adducteur postérieur grâce à une seringue de 0,5ml (aiguille : 0,33x12mm). Pour les réponses énergétiques, des prélèvements ont été effectués à J0, J1, J3, J7, J14 et J21. A chaque jour de prélèvement, les dreissènes ont été disséquées, placées dans des microtubes, plongés dans de l'azote liquide et conservés au congélateur à -80°C pour les futures analyses. Pour la quantification des réserves énergétiques et l'activité du système de transport des électrons, les individus ont été prélevés en entier. Pour l'étude de l'expression des gènes en lien avec le métabolisme énergétique (enzymes digestives et gènes de la chaîne respiratoire des mitochondries) et le dosage des activités enzymatiques, seule la glande digestive a été considérée.

2.3 Méthodologie pour les paramètres énergétiques

Les dosages des réserves énergétiques (lipides, glycogène, sucres libres) sont réalisés à partir du protocole mis au point par Van Handel (1985a et 1985b) et Plaistow et al. (2003). Les teneurs en protéines sont définies selon la méthode de Bradford (1976). La mesure de l'activité de l'ETS (système de transport des électrons) est réalisée avec la méthode où l'INT-Tetrazolium est réduit en INT-Formazan (Owens et King 1975 ; De Coen et Janssen, 1997) et est convertie en équivalent oxygène par masse dans un intervalle de temps donné (Kenner et Ahmed 1975).

A partir des mesures de réserves (E_a = glycogène, sucres libres, protéine et lipides) et de la consommation en énergie (E_c), il est possible de calculer l'allocation énergétique cellulaire (AEC) Les données des lipides, des sucres libres, du glycogène et des protéines totales sont multipliées par leur enthalpie de combustion (17,5 kJ/g pour les carbohydrates, 39,5 kJ/g pour les lipides et 24 kJ/g pour les protéines totales). L'énergie consommée (E_c) est déterminée en utilisant les résultats du taux de respiration cellulaire (ETS), qui est basé sur la relation stœchiométrique suivante : pour 1 μmol de O_2 consommée, 2 μmol de formazan sont formées. L'estimation de l'oxygène consommé est transformée en équivalent énergie par une moyenne des lipides, des sucres libres, du glycogène et des protéines totales, soit 484kJ/mol O_2 (De Coen et Janssen, 2003).

Le budget net d'allocation énergétique cellulaire (AEC) représente la différence entre les réserves énergétiques (E_a) et l'énergie consommée (E_c) : $\text{AEC (mJ.mg}^{-1}) = E_a/E_c$.

La mesure de l'activité des enzymes digestives dans les extraits de glandes digestives a été effectuée selon le protocole décrit par Palais et al (2010) avec respectivement de l'amidon (1%) et de la carboxyméthylcellulose (2%) comme substrat pour l'amylase et la cellulase.

Mesure de l'expression des gènes codant pour l'amylase, la cellulase, le cytochrome b et la cytochrome c oxydase.

Les ARN totaux ont été extraits au *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen) à partir de pools de 3 échantillons de masse égale de glande digestive. La qualité des ARN a été contrôlée par une migration sur gel d'agarose 1% dans du TBE 0,5X et la quantité et la qualité par des mesures d'absorbances à 260 et 280 nm réalisées au spectromètre. Les ARN ont été dilués pour obtenir une concentration finale de 200 ng/ μL pour chaque pool. Les dilutions ont été vérifiées par une migration sur gel d'agarose 1% dans du TBE 0,5X.

Les transcriptions inverses ont été effectuées sur 400 ng d'ARN totaux grâce au kit *Thermo scientific® Verso SYBR Green 2-Step QRT-PCR ROX Mix* suivant les instructions du fabricant et avec une amorce Anchored oligo dT. Les PCR quantitatives ont été réalisées après dilution au 1/10 à l'aide du kit *Thermo scientific® Absolute Blue QPCR SYBR Green ROX Mix*. Les amorces utilisées pour les quatre gènes étudiés ainsi que pour les deux gènes de ménage (codant pour l'actine et la protéine ribosomale S3) sont indiquées dans le tableau I. L'expression relative est calculée à l'aide de la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ prenant en compte l'efficacité de la PCR en temps réel (Livak et Schmittgen, 2001).

Tableau I : Séquences des amorces utilisées pour les PCR quantitatives.

Séquences des amorces pour les qPCR				
Gène	Abréviation	Séquence Forward (5' à 3')	Séquence Reverse (5' à 3')	Numéro d'accèsion GenBank
Cytochrome <i>b</i>	Cytb	CGC-CAC-TTT-AAA-GCG-ATT-TTT	TGG-GTC-AGC-AAA-TAG-ATC-TGG	DQ072120.1
Cytochrome <i>c</i> oxydase	CoxI	AGG-CCC-TGC-GAT-AGA-TTT-TT	AAA-GGG-ACC-CGG-TAA-AAT-TG	AAL55513.1
α -amylase	Amy	GTC-GTT-TTT-GCC-AGA-CTT-CAC	ATT-GCT-CAG-CCA-CTT-TGC-TT	JF344711
Endoglucanase	GHF	GTC-CCT-CGA-ACA-ACG-ACA-AT	CGA-CGA-AAC-CAC-CAG-TTG-TA	JF344712
Protéine ribosomale S3	S3	CAG-TGT-GAG-TCC-CTG-AGA-TAC-AAG	AAC-FTC-ATG-GAC-TTG-GCT-CTC-TG	AJS17687
Actine	Act	CCT-CAC-CCT-CAA-GTA-CCC-CAT	TTG-GCC-TTT-GGG-TTG-AGT-G	AF082863

2.4 Méthodologie pour les paramètres de l'immunité :

Les échantillons d'hémolymphe récoltés servent à évaluer les possibles conséquences du stress nutritionnel sur les fonctionnalités immunitaires des moules (Brousseau et al., 2000 ; Sauvé et al., 2002).

2.4.1 Préparation des hémocytes :

Les échantillons d'hémolymphe prélevés sur 5 dreissènes sont regroupés puis sont centrifugés (400g/10min/T° ambiante). Le culot cellulaire est remis en suspension dans une solution de tampon phosphate (PBS : Dulbecco's Phosphate sans calcium ni magnésium 0,0095M). Les cellules sont ensuite conservées dans la glace afin de limiter les phénomènes d'agrégation. Les fonctions immunitaires des hémocytes sont mesurées par cytométrie en flux (FACSCalibur®, Becton-Dickinson), et seules les réponses des cellules granulocytaires sont analysées (sous-population plus facile à discriminer par cytométrie et pas de débris cellulaire dans les résultats). Les données cytométriques sont analysées via le logiciel WINMDI 2.9.

L'évaluation des effets potentiels du stress nutritionnel sur les fonctions immunitaires se fait directement sur les échantillons d'hémolymphe natifs.

2.4.2 Mortalité cellulaire

Les cellules sont incubées 15 min avec de l'iodure de propidium (IP, Sigma-Aldrich, 0,1mg/mL). La fluorescence des cellules mortes est mesurée en FL3 (émission de fluorescence dans le rouge) sur 5000 événements.

2.4.3 Activité phagocytaire

Les suspensions cellulaires ajustées à 100.000 cellules/250 μ L sont incubées 1h avec des microbilles de latex fluorescentes (1,712 μ m, à l'obscurité, température ambiante selon un protocole établi par Hégaret et al. (2003)). La fluorescence des cellules ayant ou non ingéré des microbilles est mesurée en FL1 (émission de fluorescence dans le vert) sur 10000 événements.

2.4.4 Activité oxydative

Les suspensions cellulaires ajustées à la même concentration que pour la phagocytose sont incubées 30min avec une solution de 2'7'-dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, 5 μ M, à l'obscurité, température ambiante, selon un protocole établi par Lambert et al. (2003)). La fluorescence de l'activité oxydative dans les cellules est mesurée en FL1 (émission de fluorescence dans le vert) sur 10000 événements.

2.4.5 Etude morphométrique des granulocytes

Après cyto-centrifugation (5min, 200g), l'hémolymphe est colorée au May Grünwald-Giemsa. Les diamètres maximal et minimal des cellules granulocytaires sont mesurés grâce à un logiciel de traitement d'image (Archimède 5.6.0).

3 Résultats

3.1 Métabolisme énergétique

3.1.1 Enzymes digestives

Concernant les enzymes digestives (amylase et cellulase) aucune différence d'activité n'a été observée entre les trois conditions trophiques durant les 21 jours d'exposition (non montré). Si on considère l'expression des gènes codant pour ces deux enzymes digestives (amylase et cellulase) des niveaux d'expression supérieurs sont observés après 7 et 21 jours (Figure 2) chez les organismes nourris uniquement avec 10% de la charge algale (cellulase) ou exposés à un jeun total.

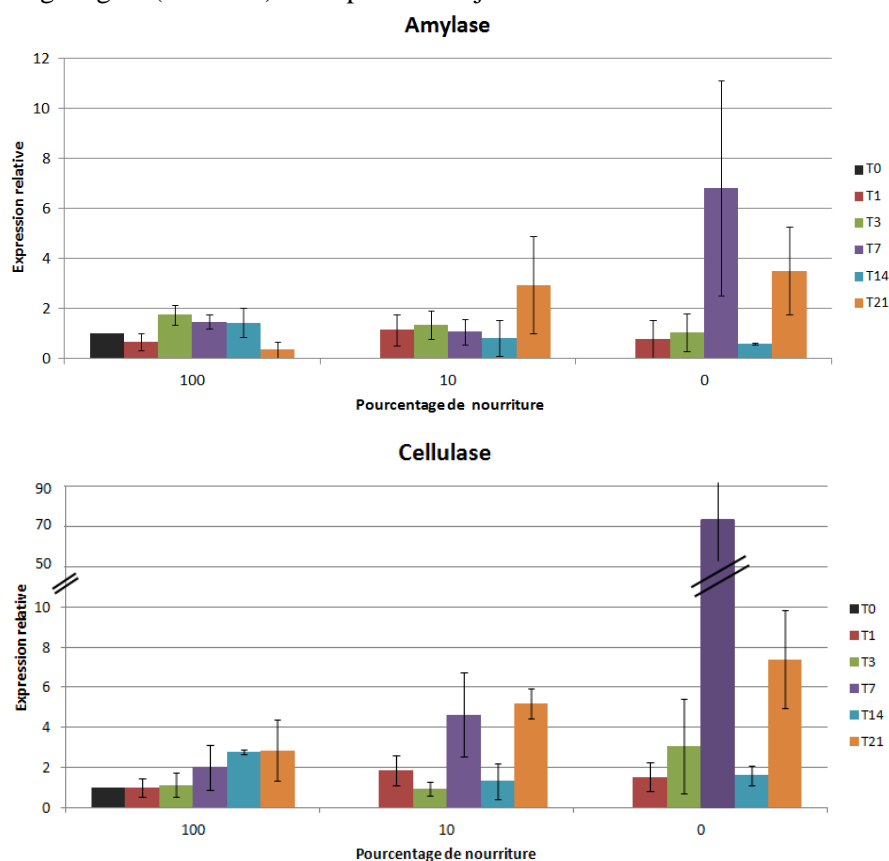


Figure 2 : Expression relative du gène codant pour l'α-amylase et la cellulase chez les organismes en fonction du stress nutritionnel et du temps d'exposition

3.1.2 Gènes de la chaîne respiratoire

Les niveaux d'expression relative des gènes codant pour la cytochrome-c-oxydase ne montrent aucune variation, ni en fonction du stress nutritionnel, ni au cours du temps d'exposition (non montré). Concernant le cytochrome b, des variations de l'expression relative du gène sont observées, notamment chez les organismes nourris à 100%, sans pour autant définir une tendance claire (Figure 3).

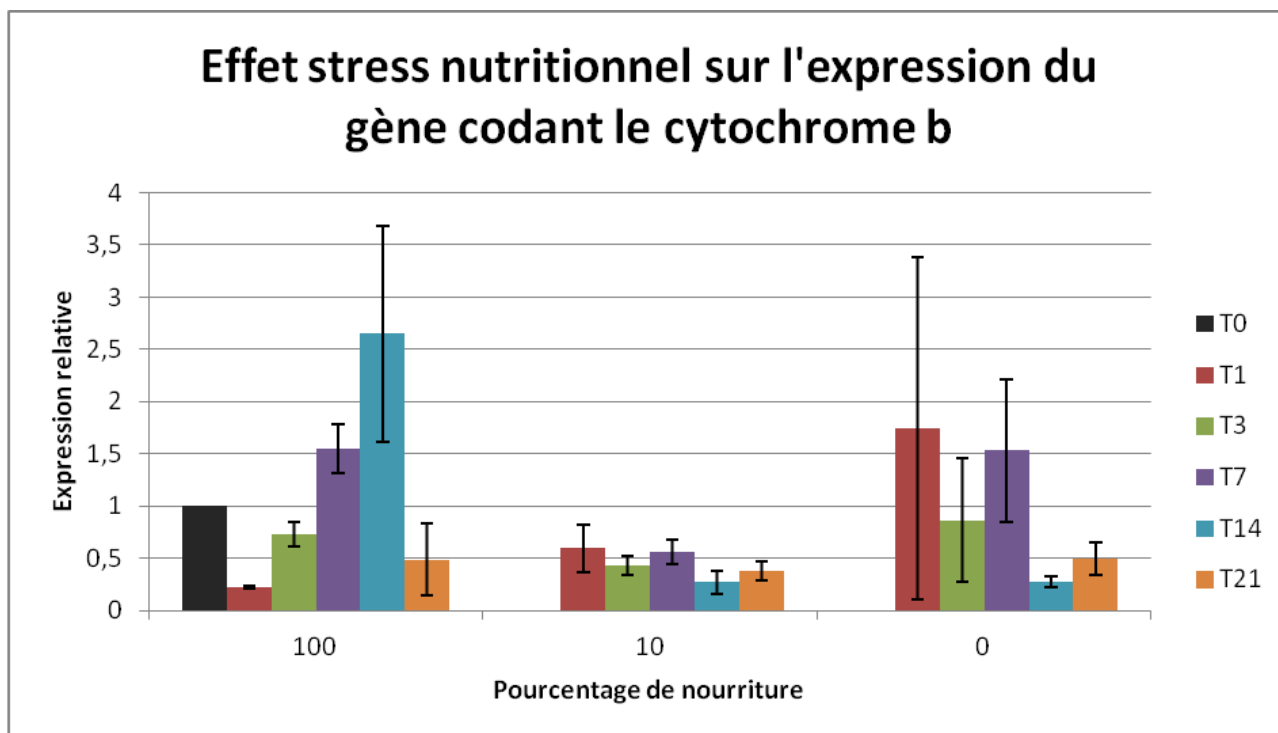


Figure 3: Expression relative du gène pour le cytochrome b chez les organismes en fonction du stress nutritionnel et du temps d'exposition

3.1.3 Allocation énergétique cellulaire

Les réserves énergétiques (lipides, glycogène, protéines) ainsi que la mesure de la consommation d'énergie (ETS) considérées de façon séparée ne présentent pas de modulation importante en fonction des conditions expérimentales, ni au cours des 21 jours d'exposition (non montré). L'ensemble de ces résultats est exprimé de façon globale au travers du calcul de l'allocation énergétique cellulaire (AEC, Figure 4). A l'exception d'une diminution de l'AEC proportionnelle au stress nutritionnel chez les dreissènes après 1J d'exposition, il n'est pas observé de variation importante de ce paramètre.

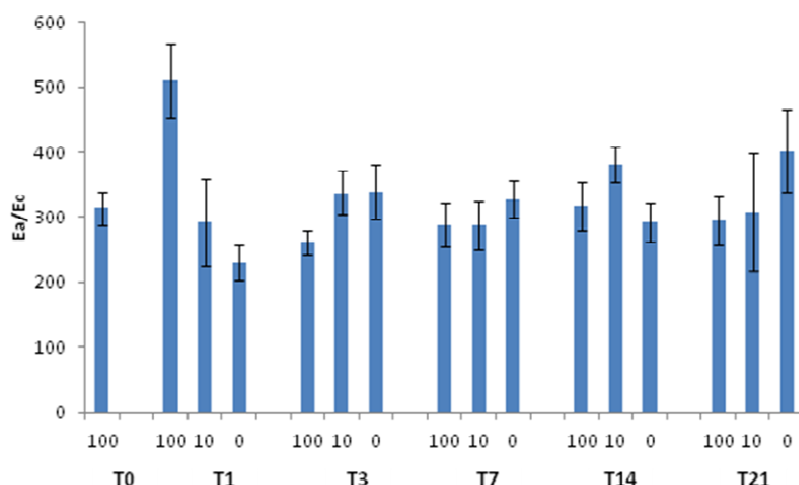


Figure 4 : Mesure de l'allocation énergétique cellulaire : $AEC = E_a/E_c$. E_a = réserves énergétiques (protéines, lipides, glycogène et sucres libres) ; E_c = consommation d'énergie (ETS).

3.2 Paramètres de l'immunité

3.2.1 Modulation morphométrique granulocytaire

Le stress nutritionnel le plus important induit une baisse significative de la taille des granulocytes, et ceci quels que soient les temps d'exposition (Tableau 2).

3.2.2 Immunomodulation induite par le stress nutritionnel

La mortalité cellulaire n'est pas influencée par le stress nutritionnel (mortalité minimale : 5,88%, mortalité maximale : 20,76%).

Tableau 2 : Taille granulocytaire en fonction du stress nutritionnel et de la méthode d'analyse.

* : $p < 0,05$ / ** : $p < 0,01$ / *** : $p < 0,001$

Dmax, Dmin : diamètres maximal et minimal des granulocytes.

Temps d'exposition	Conditions d'alimentation	Taille granulocytaire (médiane)	
		Dmax	Dmin
Jours	% de la ration maximale	μm	
T0	100	18,64	15,23
	100	19,61	15,76
T7	10	18,64	15,44
	0	15,48***	13,31***
T14	100	20,46	17,58
	10	19,53	15,67*
	0	16,27***	12,85***
T21	100	19,72	15,68
	10	20,67	15,88
	0	16,68***	14,08***

3.2.3 La phagocytose

L'activité phagocytaire (pourcentage de cellules ayant phagocyté sur l'ensemble des hémocytes) augmente au bout de 7 jours d'exposition chez les moules privées de nourriture ($p = 0,024$) (Figure 5). Cette tendance n'est plus visible pour les autres jours de prélèvement. Cette activité de phagocytose diminue, au cours du temps, chez les dreissènes dépourvues de nourriture (régime à 0%) à partir de 14 jours de stress nutritionnel ($p = 0,024$) comme après 21 jours de stress ($p = 0,024$) (Figure 5). Cette diminution est également visible, au bout de 21 jours d'exposition, chez les moules témoins a priori non soumises au stress nutritionnel ($p = 0,045$). Comme l'activité phagocytaire, le nombre moyen de billes phagocytées baisse au cours du temps, mais les différences ne sont pas significatives (Figure 6).

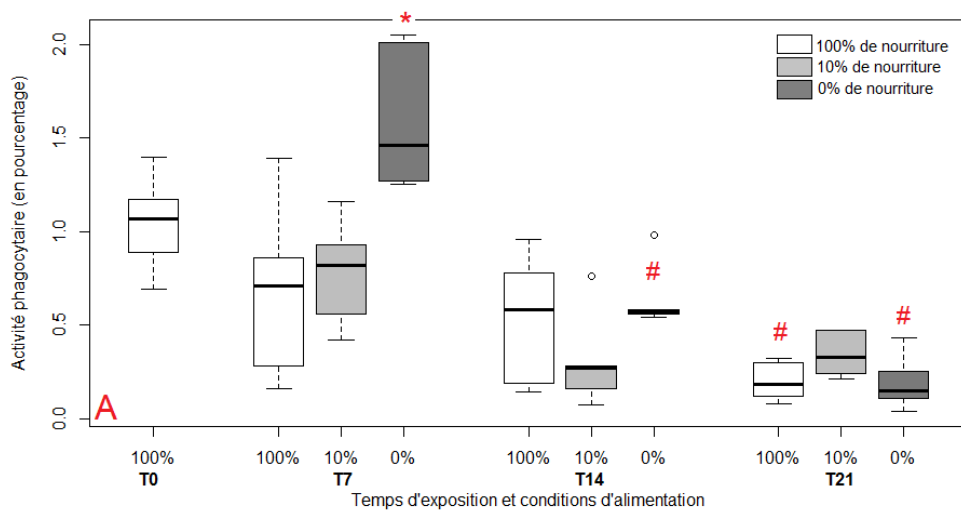


Figure 5 : Activité phagocytaire en fonction des conditions de nutrition et du temps d'exposition

3.2.4 Activité oxydative

L'activité oxydative s'accroît fortement chez les dreissènes soumises aux stress nutritionnels, au bout de 3 semaines d'exposition ($p = 0,024$ entre les régimes à 100% et 0%) (Figure 7).

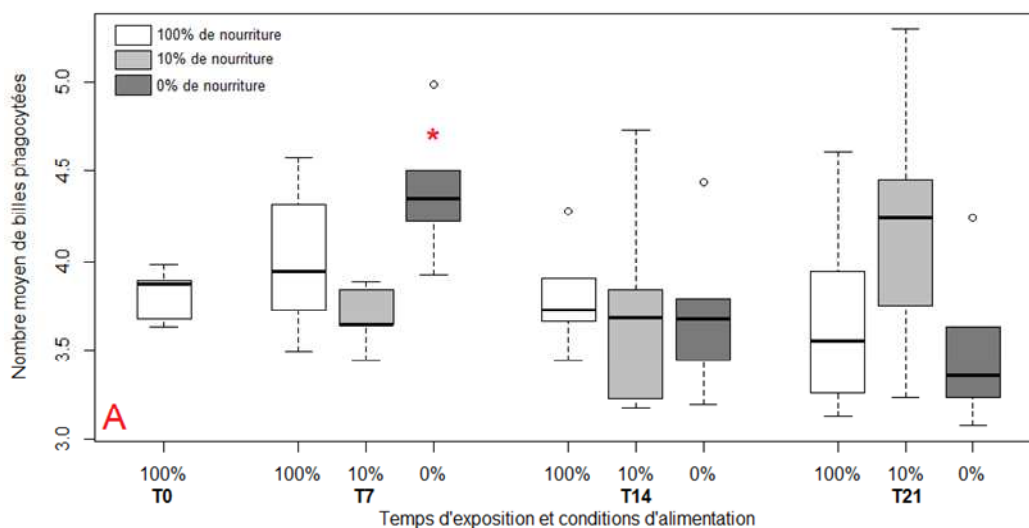


Figure 6: Nombre moyen de billes phagocytées par hémocytes en fonction du stress nutritionnel et du temps d'exposition

* : Différence entre les conditions d'alimentation du même temps d'exposition.

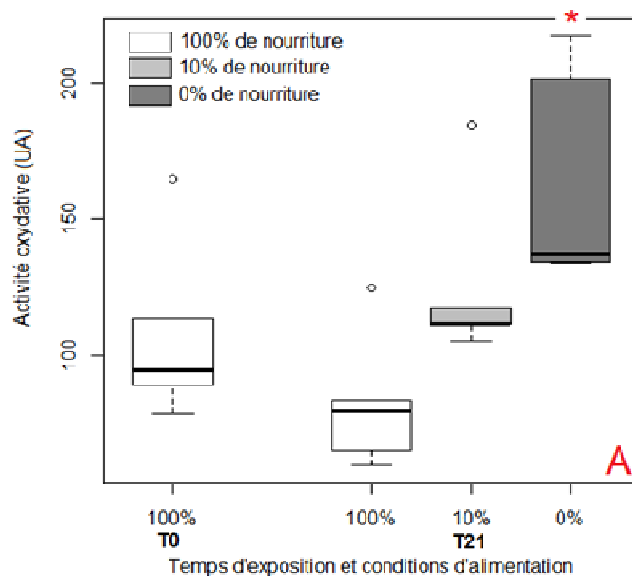


Figure 7: Activité oxydative en fonction du stress nutritionnel et du temps d'exposition.
 *: Différence entre les conditions d'alimentation du même temps d'exposition.

4 Discussion

Le traitement expérimental auquel les moules ont été exposées ne semble pas être associé à un stress nutritionnel réel des dreissènes comme le montre l'évolution des teneurs en molécules de réserves dans les individus au cours de l'expérimentation. Il est toutefois noté une augmentation de l'expression des gènes codant pour les enzymes digestives même si celle-ci n'est pas accompagnée d'une augmentation de l'activité. Il peut être suggéré que les organismes mettent en place une augmentation de la transcription de ces gènes pour permettre, en cas de retour à des conditions trophiques normales, de récupérer un maximum d'énergie de la nourriture à nouveau disponible. Aussi la mise en place de ce mécanisme peut se traduire dans un premier temps par une augmentation de la transcription (production des ARNm) puis de la traduction (production des protéines enzymatiques) pour des temps de stress plus long. Cette stratégie d'augmentation de l'efficacité digestive en réponse à un stress trophique a déjà été observée chez d'autres espèces (Hassett et Landry, 1983 ; De Coen and Janssen, 1997).

Il aurait été intéressant d'effectuer un stress nutritionnel avec une quantité maximale de nourriture plus faible. En effet, bien que plusieurs auteurs utilisent, pour des moules zébrées, des concentrations de 1.10^6 cellules algales par dreissènes et par jour (Kraak et al., 1997) ou plus (67.10^6 cellules / jour / dreissène pour Navarro et al., 2011 ; 10.10^6 cellules / jour / dreissène pour Borcharding, 1995 ; $1,7.10^6$ cellules / jour / dreissène pour Stoeckel et al., 2004), cette quantité est peut être trop élevée et donc la quantité équivalente au dixième n'est peut-être pas adéquate pour induire un stress nutritionnel. Une autre hypothèse concerne le temps d'exposition, en effet les articles traitant du stress nutritionnel chez les bivalves considèrent des périodes plus importantes : 6 mois (Delaporte et al., 2007), 3 mois (Wacker et Elert, 2003), 6 semaines (Hégaret et al., 2004), alors que dans cette étude nous avons maintenu ces conditions pendant 3 semaines. En plus de ce temps de stress qui paraît trop faible, la qualité des régimes alimentaires est à prendre en compte. Bien que la plupart des études mettent en avant des régimes alimentaires basés sur deux espèces d'algues, (Kraak et al., 1997 ; Hégaret et al., 2004 ; Bouchard et al., 2008 ; ...) d'autres utilisent des régimes avec plus d'espèces (Delaporte et al., 2007 : 4 espèces différentes). Dans notre étude, seul le paramètre quantité d'algues (*Scenedesmus obliquus* et *Chlorella pyrenoidosa*) a été considéré et non pas la valeur nutritionnelle intrinsèque. En effet, la qualité nutritive de l'algue verte *Scenedesmus obliquus* peut apparaître insuffisante pour la dreissène, car elle ne contient pas d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne (Wacker et

Elert, 2003). Il serait également intéressant de prendre en compte les différences de qualité nutritive des algues utilisées. Une autre hypothèse explicative de nos résultats est la période d'expérimentation. En effet, les dreissènes ont été prélevées en hiver, après la reconstitution de leurs réserves (automne) en vue de leur future reproduction (printemps). Il est alors possible, malgré l'augmentation de température durant l'expérimentation par rapport à celle sur le terrain, que les organismes aient, en absence de besoins, une faible activité. Ce qui se traduit par peu ou pas d'impact sur leur métabolisme énergétique. Il serait intéressant de créer un stress nutritionnel à la sortie de leur période de reproduction (fin de l'été) au moment où elles vont avoir besoin de remettre en place leurs réserves.

Concernant les réponses immunitaires il est noté des différences en fonction des conditions d'exposition. Le résultat le plus probant de cette étude est la baisse de taille des granulocytes lors du stress nutritionnel. Hégaret et al, (2004) ont mis en évidence une diminution de taille et de complexité des cellules hyalinocytaires lorsque des huîtres (*Crassostrea virginica*) sont privées de nourriture. Ce résultat est d'autant plus important quand le stress nutritionnel est associé à une augmentation de la température de l'eau. Le Foll et al. (2010), ont montré que les hyalinocytes et les éosinophiles ont des phases condensées et des phases développées, chez la moule bleue. Il est donc plus difficile de les différencier lors de ces changements morphologiques. C'est pour cela que les études microscopiques, avec des cellules fixées sur lame, ne sont pas fiables pour les discriminations des sous-populations hémocytaires. Seule la classe des granulocytes (avec granules) a donc été choisie pour nos mesures morphométriques hémocytaires. L'activité oxydative s'accroît fortement lorsque les moules subissent un fort stress nutritionnel, durant 21 jours d'exposition. Cette augmentation a aussi été observée chez l'huître *Crassostrea virginica* (Hégaret et al., 2004). Malgré une diminution au cours du temps pour les moules zébrées non stressées, l'activité phagocytaire des moules zébrées ne semble pas être modulée par leurs conditions d'alimentation. Delaporte et al. (2007) ont montré chez l'huître creuse que le stress nutritionnel n'avait pas d'influence sur la phagocytose.

Dans un contexte où le stress nutritionnel utilisé dans notre étude ne semble pas associé à des modifications réelles des teneurs en molécules de réserves, l'observation d'une diminution générale de l'activité phagocytaire aussi bien chez les dreissènes soumises au stress nutritionnel que chez les témoins pourrait révéler un stress général des individus liés à leurs conditions de stabulation au laboratoire. Bien que les niveaux de conductivités mesurés entre l'eau du site de Commercy et l'eau de stabulation des dreissènes utilisée au laboratoire soient comparables, les températures n'étaient pas les mêmes dans les aquariums d'exposition que celle mesurée sur le terrain au moment du prélèvement des dreissènes à la même époque. De la même façon d'autres variables comme la qualité de la nourriture ou la densité des dreissènes dans les bacs sont certainement différentes entre le terrain et le laboratoire.

L'altération du système immunitaire par des facteurs externes peut amener une augmentation de la sensibilité des organismes aux maladies virales, bactériennes, parasitaires ainsi qu'aux tumeurs (Colosio et al., 2005 ; Krzystyniak et al., 1995). Effectivement, Paul-Pont et al., (2010a et 2010b) ont pu mettre en évidence une forte augmentation de l'activité oxydative de deux bivalves lorsqu'il y a multicontamination associant un métal lourd (Cadmium) et un trématode parasite (*Himasthla elongata*). Aucune analyse parasitologique n'a été effectuée sur les moules de Commercy, mais à l'analyse des résultats obtenus par Paul-Pont et al., (2010a et 2010b), cela pourrait avoir une incidence notamment sur l'activité oxydative hémocytaire.

Des perspectives peuvent également découler de ces premiers résultats. Il semblerait judicieux de réaliser une expérimentation non pas en fin d'hiver ou au printemps comme dans notre étude mais plutôt en automne, saison où les dreissènes sont en situation de post-reproduction et où Palais et al. (2011) ont montré que les bivalves présentaient en milieu naturel les plus bas niveaux de réserves énergétiques. On peut penser qu'en choisissant cette saison, on ciblerait des individus présentant des niveaux de sensibilité au stress nutritionnel plus importants.

5 Conclusion

Cette expérimentation a permis de mettre en évidence une influence du stress nutritionnel sur différentes réponses biologiques en lien avec l'immunité de la dreissène. Il apparaît donc important durant des programmes de biosurveillance, sur la base de populations autochtones ou transplantées, d'évaluer la qualité trophique des milieux pour une interprétation plus précise des réponses mesurées. A l'inverse, peu d'effets du stress trophique sont observés sur les marqueurs du métabolisme énergétique, ce qui est particulièrement

intéressant dans le cadre de biosurveillance. Ceci peut s'expliquer en partie par les temps d'exposition relativement courts (21 jours) pour ce type d'expérimentation et ce tout particulièrement à la saison considérée où les organismes avaient un niveau de réserves optimal en prévision de la future période de reproduction. Il serait intéressant de conduire une expérimentation similaire, d'une part sur des temps d'exposition plus longs, et d'autre part avec des organismes prélevés en période automnale, période cruciale pour la reconstitution des réserves.

6 Références

- Boldina-Cosqueric I., Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Dedourge-Geffard O., Métails I., Mouneyrac C., Moutel B., Berthet B., 2010. Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1733-1741.
- Borcherding J., 1995. Laboratory experiments on the influence of food availability, temperature, and photoperiod on gonad development in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Malacologia* 36, 15-27.
- Bouchard B., Gagné F., Fortier M., Fournier M., 2009. An in situ study of the impact of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 150C, 132-140.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-54.
- Brousseau P., Pellerin J., Morin Y., Cyr D., Blakley B., Boermans H., Fournier M., 2000. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. *Toxicology* 142, 145-156.
- Calow P., 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 100, 3-6.
- Calow P., Sibly R.M., 1990. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Functional Ecology* 4, 283-288.
- Colosio C., Brindelli S., Corsini E., Galli C.L., Maroni M., 2005. Low level exposure to chemicals and immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology* 207, 320-328.
- De Coen W.M., Janssen C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 6, 43-55.
- De Coen W.M., Janssen C.R., 2003. The missing biomarker link: relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1632-1641.
- de Lafontaine Y., Gagné F., Blaise C., Costan G., Gagnon P., Chan H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* 50, 51-71.
- Dedourge-Geffard O., Palais F., Biagianti-Risbourg S., Geffard O., Geffard A., 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: an *in situ* experiment. *Chemosphere* 77, 1569-1576.
- Delaporte M., Soudant P., Lambert C., Jegaden M., Moal J., Pouvreau S., Dégremont L., Boudry P., Samain J.F., 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *Journal of Experimental Biology and Ecology* 353, 45-57.
- Durou C., Mouneyrac C., Pellerin J., Péry A., 2008. Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. In: Amiard J.C., Amiard-Triquet C. (Eds.), *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Editions Lavoisier – Tec & Doc, 273-294.
- Durou C., Mouneyrac C., Rainbow P., Smith B.D., Gillet P., Mouloud M., Amiard-Triquet C., 2005. Linking the physiological and population status of worms *Nereis diversicolor* from a clean and a multi-polluted estuary. In: SETAC, 15th Annual Meeting, The Reason d'être of Environmental Toxicology and Chemistry, Lille, France.

- Fossi Tankoua O., Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Berthet B., Mouneyrac C., Rainbow P., 2010. To-wards a comprehensive methodology for assessing the health status of coastal and estuarine eco-systems. ICES CM 2010/F:15, E-paper, 20 p.
- Hassett R.P., Landry M.R., 1983. Effects of food-level acclimation on digestive enzyme activities and feeding behaviour of *Calanus pacificus*. *Marine Biology* 75, 47-55.
- Hégaret H., Wikfors G.H., Soudant P., 2003. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. *Journal of experimental marine biology and ecology* 293, I : Haemocytes types and morphology, 237-248, et II : Haemocyte functions : aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst, 250-263.
- Hégaret H., Wikfors G.H., Soudant P., Delaporte M., Alix J.H., Smith B.C., Dixon M.S., Quéré C., Le Coz J.R., Paillard C., Moal J., Samain J.F., 2004. Immunological competence of eastern oysters *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. *Aquaculture* 234, 541-560.
- Hyne R.V., Maher W.A., 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 366-374.
- Kraak MHS, Ainscough C, Fernández A, van Vlaardingen PLA, Voogt P de, Admiraal WA, 1997. Short-term and chronic exposure of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to acridine: effects and metabolism. *Aquatic Toxicology* 37, 9–20.
- Kenner RA, Ahmed SI, 1975. Measurements of electron transport activities in marine phytoplankton. *Marine Biology* 33, 119-27.
- Krzystyniak K., Tryphonas H., Fournier M., 1995. Approaches to the evaluation of chemical induced immunotoxicity. *Environmental Health Perspectives* 103, 17-22
- Lambert C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunology* 15, 225–240.
- Le Foll F., Rioult D., Boussa S., Pasquier J., Dagher Z., Leboulenger F., 2010. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell timelapse motility imaging. *Fish and Shellfish Immunology* 28, 372-386.
- Le Gal Y., Lagadic L., Le Bras S., Caquet T., 1997. Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie – Aspects fondamentaux*. Masson, 241-286.
- Livak KJ., Schmittgen TD., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402-8.
- Mouneyrac C., Perrein-Ettajani H., Amiard-Triquet C., 2010. Influence of anthropogenic stress on fitness and behaviour of a key-species of estuarine ecosystems, the ragworm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution* 158, 121-128.
- Navarro A., Faria M., Barata C., Pina B., 2011. Transcriptionnal response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environmental Pollution* 159, 100-107.
- Owens TG, King FD, 1975. The measurement of respiratory electron-transport-system activity in marine zooplankton. *Marine Biology* 30, 27-36.
- Palais F., Jubeaux G., Dedourge-Geffard O., Biagianti-Risbourg S., Geffard A., 2010. Amylolytic and cellulolytic activities in the crystalline style and the digestive diverticulae of the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771). *Molluscan Research* 30, 29-36.
- Palais F., Mouneyrac C., Dedourge-Geffard O., Giambérini L., Biagianti-Risbourg S., Geffard A., 2011. One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83, 1062-1073.
- Palais F., Dedourge-Geffard O., Beaudon A., Pain-Devin S., Trapp J., Geffard O., Noury P., Gourlay-France´ C., Uher E., Mouneyrac C., Biagianti-Risbourg S., Geffard A., 2012. One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Ecotoxicology* 21, 888-905
- Paul-Pont I., Gonzalez P., Baudrimont M., Jude F., Raymond N., Bourrasseau L., Le Goïc N., Haynes F., Legeay A., Paillard C., De Montaudouin X., 2010. Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the marine bivalve *Cerastoderma edule*. *Marine Pollution Bulletin* 60, 515-252.

- Paul-Pont I., De Montaudouin X., Gonzalez P., Jude F., Raymond N., Paillard C., Baudrimont M., 2010b. Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve *Ruditapes philippinarum* in European populations. *Environmental Pollution* 158, 3401-3410.
- Plaistow S.J., Bollache L., Cézilly F., 2003. Energetically costly precopulatory mate guarding in the amphipod *Gammarus pulex* : causes and consequences. *Animal Behaviour* 65, 683-691.
- Sauvé S., Brousseau P., Pellerin J., Morin Y., Senécal L., Goudreau P., Fournier M., 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic toxicology* 58, 189-199.
- Selye H., 1976. Stress in health and disease. Butterworth Publishers, 1286 p.
- Smolders R., Bervoets L., De Coen W., Blust R., 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution* 129, 99-112.
- Stoeckel J.A., Padilla D.K., Schneider D.W., Rehmann C.R., 2004. Laboratory culture of *Dreissena polymorpha* : spawning success, adult fecundity, and larval mortality patterns. *Canadian Journal of Zoology* 82, 1436-1443.
- Van Handel E., 1985a. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 1, 299-301.
- Van Handel E., 1985b. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 1, 302-304.
- Waker A., Von Elert E., 2003. Food quality controls reproduction of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Oecologia* 135, 332-338.
- Warren G.E., Davis G.E., 1967. Laboratory studies on the feeding, bioenergetics and growth of fish. In: Gerhuy S.D. (Ed.), *The biological basis of freshwater fish production*. Blackwell Scientific Publications, 175-214.