N°d'ordre NNT : 2020LYSET002

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de

École nationale des travaux publics de l'État

En collaboration avec

Institut de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture

École Doctorale N° 206

Chimie, Procédés, Environnement

Spécialité / discipline de doctorat : Écotoxicologie

Soutenue publiquement le 23/01/2020, par :

Pauline CRIBIU

Étude des effets inter et transgénérationnels de l'exposition parentale au stress chimique chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*

Devant le jury composé de :

Adam-Guillermin, Christelle	Chercheure, IRSN	Rapporteure
Reynaud, Stéphane	Maître de conférence, Université de Grenoble	Rapporteur
Cossu-Leguille, Carole	Professeure, Université de Lorraine	Examinatrice
Say, Ludovic	Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1	Examinateur
Laroche, Jean	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Examinateur
Geffard, Olivier	Directeur de recherche, IRSTEA Lyon-Villeurbanne	Examinateur
Devaux, Alain	Ingénieur de recherche, INRA-ENTPE	Directeur de thèse
Chaumot, Arnaud	Chargé de recherche, IRSTEA Lyon-Villeurbanne	Co-encadrant de thèse

"Success is the ability to go from one failure to another with no loss of enthusiasm"

Sir Winston Churchill

Remerciements

Il y a trois ans déjà, le ministère de la transition écologique et solidaire m'offrait l'opportunité de composer cette symphonie un peu spéciale, structurée en trois mouvements au tempo de plus en plus rapide. Maintenant que le final approche, est venu le temps des remerciements de tous les instrumentistes qui ont interprété cette partition à mes côtés.

Merci à mes quatre encadrants de thèse : Arnaud, Alain, Sylvie et Olivier, avec lesquels j'ai pu partager le clavier. On connaît le piano à quatre mains, mais avec vous c'est à 10 mains que nous avons joué dans cette symphonie. Je ne vous remercierai jamais assez pour m'avoir si bien guidée tout au long de ce travail de thèse et pour tous les enseignements que vous m'avez apportés. Bien que je ne poursuive pas dans la recherche, tout ce que j'ai appris auprès de vous donnera à ma carrière une nuance toute particulière.

Arnaud, merci pour ta positive attitude qui m'a beaucoup aidée dans cette thèse très risquée ! Merci pour ta patience ces derniers mois pour répondre à toutes mes questions (et il y en avait beaucoup) parfois très idiotes. Merci de m'avoir appris, même s'il y a encore du travail à faire, à mieux problématiser les choses et à les présenter d'une manière plus positive !

Alain et Sylvie, merci de m'avoir donné la chance de faire cette thèse et d'avoir toujours été là, malgré la distance entre l'ENTPE et IRSTEA de Lyon. Merci pour votre rigueur dans la rédaction en français comme en anglais, j'ai beaucoup appris auprès de vous ! Merci également pour m'avoir permis de participer à ce congrès à Marseille si intéressant sur la toxicologie génétique. J'ai beaucoup apprécié de passer ces deux jours avec vous. Sylvie, je te remercie tout particulièrement pour avoir continué à m'épauler dans cette thèse, malgré les difficultés que tu as rencontrées ces derniers temps.

Olivier, merci pour avoir toujours répondu présent aux diverses réunions et relectures et d'avoir tant enrichi ce travail de thèse par ta vision si complète et pertinente de l'écotoxicologie !

Merci à Christelle Adam-Guillermin et à Stéphane Reynaud d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail ainsi qu'à Carole Cossu-Leguille, Ludovic Say et Jean Laroche d'avoir bien voulu examiner ce travail. Merci également aux membres du comité de pilotage de cette thèse, Emilien Luquet, Emilien Lasne et Raphaël Santos pour leurs précieux conseils.

Merci à tous les membres du laboratoire ECOTOX d'IRSTEA de Lyon-Villeurbanne et ceux du LEHNA-IPE (en espérant que vous vous souveniez encore de moi à l'ENTPE, cela fait bien longtemps que je vous ai abandonnés pour mener les manips à IRSTEA !). Je tiens notamment

à vous remercier, Yves Perrodin, pour m'avoir si gentiment aiguillée lorsque j'ai commencé à envisager de poursuivre mes études par une thèse en écotoxicologie. Merci aussi à toi, Alicia, pour m'avoir aidée de si nombreuses fois dans les démarches administratives, pour les papotages divers et variés au bureau et les moments partagés lors des cours de step ! Merci à toi, Renaud, pour les discussions du midi et d'avoir, à chaque fois qu'on se croisait ces derniers mois, demandé des nouvelles de la rédaction ! Merci également à toi, Davide, pour avoir eu cette initiative géniale d'instaurer un journal club au labo ! Enfin, Patrice, merci pour les échanges sur la course à pied, la baie de Somme et tous les voyages que tu as pu faire, tu m'as tellement donné envie de découvrir les îles éoliennes !

Un grand merci à toutes les personnes qui ont pris leurs instruments afin de m'accompagner dans la réalisation des manips.

Merci à vous, Jean-Luc Ravanat et Sylvain Caillat, pour la réalisation des dosages de méthylation, à vous, Emmanuelle Vulliet et Barbara Giroud, pour avoir doser la 3,4-dichloroaniline des milieux d'exposition et merci à toi, Maëlenn, d'avoir accepté de faire ton stage de fin d'étude en notre compagnie.

Merci à toi, Hervé, le roi de l'« arrêt repro » et des musiques super chouettes, à toi, Nicolas, le spécialiste du test alimentation et des tartelettes au citron et merci, Adeline, pour avoir affronté avec moi le froid lors des expéditions terrain. Khédidja, cuisinière hors pair et experte en dissection de gonades de gammares, merci de m'avoir si bien enseigné cet art.

Laura, merci pour toutes les heures passées ensemble à parler de tout et de rien pendant que nous comptions nos bébés gammares. Merci également pour avoir repris le flambeau des expérimentations me permettant ainsi de commencer la rédaction du manuscrit, je ne sais pas comment j'aurais fait sans toi !

Enfin, Thérèse, la maman des doctorants du LEHNA-IPE ! Merci pour ton aide précieuse tout au long de cette thèse, et notamment lors des essais-comètes et la lecture si fastidieuse des lames. J'ai énormément aimé passer du temps avec toi au labo et en dehors. Tu es vraiment quelqu'un de formidable, j'espère que nous réussirons à garder contact après mon départ de Lyon.

La mélodie de cette symphonie n'aurait pas eu la même gaieté sans mes compères compositeurs dont certains sont aujourd'hui docteurs : Toitoine, Valérian, Nathalie, Clémentine, Duarte, Alice, Aude, Natacha, Noëlle et Maxime.

Merci tout d'abord à mes acolytes de l'ENTPE : Toitoine, Valérian, Nathalie, Marine et Clémentine pour ces merveilleux moments passés ensemble, entre le week-end de ski à Tignes, les vacances au bord de l'océan à Pornic et les diverses soirées à Lyon. Toitoine, je me souviendrai toujours de

votre accueil, avec Guillaume, si chaleureux dans ce bureau légendaire, convoité de tous pour son canapé ! Je tiens à te remercier tout particulièrement de ne jamais m'avoir oubliée malgré mon absence de l'ENTPE et pour nous régaler avec ton Paris-Brest (entre autres), le meilleur de tout l'univers !

Merci également à vous tous, mes compagnons de pupitre d'IRSTEA. Duarte, nous n'avons malheureusement pas eu le temps de bien nous connaître, mais merci pour tous tes conseils. Merci à vous : Alice, Aude, Natacha, Noëlle et Maxime pour tous les fous rires, les encouragements mutuels, les coups de gueule, les potins et les discussions philosophiques ! Alice, ma chère coéquipière de fractionné ! Merci à toi pour toutes les séances de course à pied du midi à papoter sur tout plein de sujets ! Merci pour ta bonne humeur et ton rire si communicatif ! J'ai adoré partager avec toi tous ces moments merveilleux au bureau, à la SETAC à Rome et lors des soirées à Lyon. Amuse-toi bien en Amérique du Sud et merci de nous faire voyager avec toi à travers tes photos. Natacha, merci pour toutes tes histoires si drôles faites de cotons - tiges et de chats, ta magnifique tignasse en face de moi et ta célèbre phrase « tu te fais du mal Pauline » vont me manquer ! Je suis si heureuse pour le petit ange qui va bientôt arriver, tu vas assurer ;) ! Noëlle, merci pour tous les « toc toc » au bureau et pour ta joie de vivre, je n'ai jamais vu une personne qui riait autant que toi! Maxime, le rayon de soleil québécois, merci à toi pour cette bonne humeur perpétuelle et ton humour ravageur ! Tu m'impressionnes tellement par ta capacité hors du commun à faire connaissance avec les gens ! Je garde bien précieusement mon porte-monnaie citron ! Aude, ma coéquipière de rédaction de manuscrit, tu as été d'une telle efficacité pendant ces derniers mois de rush ! Je suis certaine que tu feras une superbe carrière dans la recherche, tu as le truc, je le sens ! Merci à toi pour toutes les petites pauses discussions « scientifiques » au bureau, pour ta bienveillance (c'est vrai, tu penses toujours aux autres) et pour tous les supers moments passés ensemble pendant ces trois ans au labo, à la SETAC à Rome et lors des soirées au toïtoï et autres !

Je n'aurais jamais eu la force d'avancer dans cette partition si complexe sans le soutien de mes copains et copines de longue date. Merci à vous Martin, Pauline, Mélanie, Milaydi, Odile, Marie-juju, Amélie, Alexia, Noémie, Benjamin, Titi, Marion, Anna, Thomas, Camille, Chloé, Sébastien, Vincent, Thibaud, Laurent, Justine et Pierre. Je suis désolée de vous avoir tant délaissés ces derniers mois ! On va pouvoir rattraper le temps perdu !

Un grand merci tout particulier à toi, Martin, mon meilleur ami pour la vie et si talentueux musicien qui nous a menés à la baguette au bon vieux temps des comédies musicales de TPE ! Merci pour tous ces merveilleux instants passés ensemble malgré la distance, même s'ils n'ont pas été assez nombreux ! Merci pour tous les appels de ces derniers mois, tu n'imagines pas à quel point ils m'ont requinquée ! Merci pour ta précieuse sagesse, mon cher maître Yoda et tous tes messages

d'encouragement quand le moral était au plus bas ! Maintenant que nous allons vivre dans la même ville, on va pouvoir faire des tas de musées, concerts, restos, soirées jeux de société avec Odile et Simon, j'ai tellement hâte ! Merci également à toi, Mélanie, mon acolyte doctorante TPE pour toutes ces discussions autour de sushis et lors de nos sorties cinéma ou de nos séances de course à pied ! Je t'envoie plein d'ondes positives pour les mois de rédaction à venir, tu vas tout déchirer ;) ! Enfin, merci à toi, ma popo pour votre si beau mariage avec Laurent et toutes les aventures pédestres que vous nous avez faits vivre ! Je suis tellement contente que vous ayez pu retrouver vos précieuses montagnes ! Bon, c'est dommage que cela arrive au moment où je monte sur Paris, mais cela ne nous empêchera pas de se voir, 3h de transport, ce n'est rien !

Une immense merci au chœur de cette symphonie : ma famille !

Merci à vous, mes chères cousines, pour votre joie de vivre contagieuse et votre gentillesse ! Je suis tellement contente de vous avoir retrouvées et touchée par votre intérêt pour la thèse ! Merci à mon frangin Jean jean, ma belle-sœur Christelle et mon Ianoush d'amour ! Avec mon arrivée sur Paris, on pourra se voir plus souvent ! Tu vas en avoir ras le bonbon de ta tantine Ianis !

Merci à ma belle-famille pour son accueil et les supers voyages ! Merci à toi, Corentin, pour nous avoir fait découvrir Manchester et Londres. Laurent, merci à vous pour tous les articles et livres que vous m'avez prêtés et que je vais enfin pouvoir lire ! Pascale, merci de m'avoir fait découvrir La Hulotte. En plus de votre rôle de soprane, je vous nomme officiellement première clarinette de cette symphonie (vous m'impressionnez par la vitesse à laquelle vous apprenez ce nouvel instrument !). Médéric et Anaïs, merci pour les découvertes de jeux de société et le week-end au ski !

Merci à toi, mon amour de Simon, j'ai tellement de remerciements à te faire que je ne sais pas par où commencer ! Tout d'abord, merci d'avoir été mon illustrateur personnel et d'avoir transformé tous mes schémas affreux en dessins colorés et poétiques ! J'ai hâte de voir tes premières planches de BD l'année prochaine ! Merci pour ces fabuleux week-ends passés ensemble à visiter de supers endroits et toutes ces aventures culinaires, cinématographiques, picturales et musicales qui m'ont permis de décompresser un peu ! Merci infiniment pour m'avoir soutenue à la SETAC à Rome, pour m'avoir fait répéter 10 500 fois (au moins) mon oral et m'avoir même accompagnée le jour J devant la porte du congrès. Toutes nos aventures romaines ont été tellement merveilleuses qu'il me tarde de pouvoir enfin découvrir de nouvelles contrées avec toi sur plus de 3 jours ! Un énorme merci pour m'avoir supportée pendant ces mois de rédaction ! Sincèrement, je ne sais pas comment j'aurais pu tenir sans tes encouragements et ton amour ! Merci pour les innombrables allers-retours entre Paris et Lyon les week-ends pendant lesquels les sorties étaient limitées et mon humeur pas toujours très agréable ! Merci de ta compréhension pour mes absences aux divers événements de cet été ! Après tous ces sacrifices que tu as fait pour moi, il est maintenant temps de retrouver une

vie normale ! On va pouvoir reprendre notre abonnement au cinéma, découvrir des coins merveilleux et adopter un petit toutou tout moche !

Merci à vous, papou et mamie. Bien qu'absents physiquement, votre place était grande dans mon cœur tout au long de ces trois ans. J'aurais tellement voulu pouvoir te répondre papou à cette question récurrente : Mais Pauline, tu finis quand tes études ? Je n'oublierai jamais tous ces étés à Praz à se balader dans les montagnes, à déguster ta cuisine si délicieuse, mamie, et à élever des escargots avant que ces pauvres bêtes atterrissent dans nos assiettes ! Cela vous aurait bien fait rire de savoir qu'après les escargots, des crevettes d'eau douce ont été mes modèles d'étude !

Je termine ces remerciements par vous, mes merveilleux parents ! Ces lignes ne parviendront jamais à traduire toute ma reconnaissance pour votre soutien sans faille tout au long de ces trois années et au-delà. Merci pour nos appels quotidiens, pour les séjours à Praz, pour avoir si bien géré l'annonce du départ pour le paradis des chiens de notre Athena, pour ces moments inoubliables comme la Transbaie, l'anniversaire de maman, la fête de la mer de Saint-Valéry, les observations d'oiseaux au parc du Marquenterre et les délicieux repas au Guillaume ! Merci de m'avoir recueillie cet été en baie de Somme, me permettant de rédiger au frais, réconfortée par tout votre amour, et de profiter de vos bons petits plats ! Au-delà de ces années de doctorat, je n'aurais jamais eu cet amour d'apprendre sans vous ! Entre toi, papa, génie à la culture démesurée et toi, maman, femme exceptionnelle qui a repris ses études à 30 ans pour faire le métier que tu désirais ! Grâce à vous, mes difficultés de phonétique de petite fille se sont envolées, bien qu'elles reviennent parfois sans prévenir sur des mots comme « cadmium », pas de bol, c'est l'un des contaminants choisi dans la thèse ! Merci pour m'avoir fait confiance, quand à 7 ans, je vous ai demandé si je pouvais faire de cet instrument si merveilleux qu'est le piano ! Merci d'avoir de nouveau cru en moi, quand, ado boutonneuse, l'envie m'a pris de faire en plus de la clarinette ! Enfin, merci d'avoir développé mon amour pour la musique en m'emmenant à des tas de concerts à Chilly et aux endroits où nous partions en vacances !

À l'image d'une symphonie, cette thèse est le fruit du travail et du soutien de vous tous. Je n'oublierai jamais ces trois années en votre compagnie ! Merci infiniment !

Table des matières

Remerciements v

Table des matières xi

Liste des figures et tableaux xv

Publications et communications xxi

Introduction générale 1

Chapitre I. Synthèse bibliographique 7

I.1. Les effets différés en écotoxicologie animale 9

I.1.1. Occurrence au sein des populations 9

I.1.2. Les grands mécanismes impliqués dans les effets différés 29

I.1.3. Conséquences populationnelles 37

I.2. L'épigénétique en écotoxicologie animale 41

I.2.1. L'épigénétique, un terme aux multiples définitions 41

I.2.2. Intérêt de l'épigénétique en écotoxicologie animale 43

I.2.3. Exemple de marque épigénétique : la méthylation des cytosines de l'ADN 45

I.3. *Gammarus fossarum*, une espèce d'intérêt en écotoxicologie et plus particulièrement pour l'étude des effets différés 59

I.3.1. Description de l'espèce 59

I.3.2. Le gammare, un modèle d'étude pertinent en écotoxicologie et pour l'étude des effets différés 69

I.4. Objectifs de thèse et démarche expérimentale 74

Chapitre II. Matériels et méthodes 79

II.1. Prélèvement des organismes et stabulation au laboratoire 81

II.1.1. Sites de prélèvement dans le milieu naturel 81

II.1.2. Technique de prélèvement 83

II.1.3. Stabulation au laboratoire 84

II.2. Encagement *in situ* des gammares 84

II.2.1. Sites d'encagement 84

II.2.2. Procédure d'encagement 90

II.3. Expérimentations réalisées dans le cadre de l'étude du niveau global de méthylation de l'ADN 90

II.3.1. Expositions au laboratoire 90

II.3.2. Expositions *in situ* 92

II.4. Expérimentations transgénérationnelles 92
II.4.1. Protocoles des expositions parentales 92
II.4.2. Protocoles d'élevage des générations successives au laboratoire 98
II.4.3. Mesures réalisées au cours des générations successives 99
II.5. Mesures moléculaires et physiologiques 104
II.5.1. Méthylation des cytosines de l'ADN et intégrité du génome 104
II.5.2. Viabilité des spermatozoïdes 111
II.5.3. Marqueurs de reproduction chez la femelle 112
II.5.4. Taux d'alimentation 113
II.5.5. Suivi de la croissance et de la survie des juvéniles 114
II.5.6. Suivi de la puberté 115
II.6. Modèle de dynamique de population 115

Chapitre III. Exploration de la variabilité du niveau de méthylation des cytosines de l'ADN chez *Gammarus fossarum* 119
III.1. Publication n°1: Natural variability and modulation by environmental stressors of global genomic cytosine methylation level in a freshwater crustacean, *Gammarus fossarum* 121
III.2. Note n°1 : Niveaux de méthylation de l'ADN d'une population de *Gammarus fossarum* historiquement exposée et tolérante au cadmium 131
III.3. Note n°2 : Le niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN chez *Gammarus fossarum*, un biomarqueur de stress applicable dans le suivi de la qualité des milieux ? 133

Chapitre IV. Étude transgénérationnelle d'une exposition parentale au stress chimique chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum* 137
IV.1. Publication n°2: A population dynamics point of view onto delayed life-history effects of contaminants: A case study with transgenerational effects of cadmium parental exposure over three generations in the freshwater crustacean *Gammarus* 139
IV.2. Publication n°3 : Modification des traits d'histoire de vie jusqu'à la troisième génération de descendants chez *Gammarus fossarum* suite à une exposition parentale à une concentration environnementale de 3,4-dichloroaniline 161
IV.3. Note n°3 : Résultats préliminaires d'une exposition à des cocktails de contaminants par encagement de gammares *in situ*. 175

Chapitre V. Discussion générale 183
V.1. Méthodologie d'évaluation des effets différés inter et transgénérationnels chez *Gammarus fossarum* 185
V.2. Nature et interprétation populationnelle des effets différés des expositions parentales au stress chimique chez *Gammarus fossarum* 189

V.3. Valeur prédictive des marqueurs moléculaires génotoxiques et épigénétiques dans l'évaluation des effets différés 193
V.4. Apport de l'étude des effets différés des contaminants chez une espèce « environnementale » non-modèle de laboratoire en écotoxicologie 197

Conclusion générale et perspectives 201

Références bibliographiques 205

Annexe 231
Étude de l'effet de l'encagement *in situ* sur le niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN chez *Gammarus fossarum* réalisée par Maëlenn L'Hoir lors de son stage de Master 2 231

Résumé 233

Abstract 235

Liste des figures et tableaux

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Figure I - 1 : Exposition au cours de la reproduction des organismes F0 et nature intergénérationnelle (INTER) ou transgénérationnelle (TRANS) des effets différés. 11
Figure I - 2 : Mécanisme chimique de la méthylation des cytosines 45
Figure I - 3 : Mécanisme hypothétique expliquant l'effet hypométhylant de certains toxiques. 55
Figure I - 4 : Morphologie générale des gammaridés 62
Figure I - 5 : Schéma d'une coupe transversale au niveau du mésosoma d'une femelle gammaridé 63
Figure I - 6 : Anatomie générale d'un Gammaridé 64
Figure I - 7 : Coupe transversale du système reproducteur de gammaridés mâle et femelle .. 65
Figure I - 8 : Couple de *Gammarus fossarum* en précopula. 66
Figure I - 9 : Caractérisation des stades de mue chez la femelle G. fossarum. 67
Figure I - 10 : Représentation du synchronisme entre le cycle de mue et le cycle de reproduction, incluant le cycle ovocytaire et le cycle embryonnaire 68
Figure I - 11 : Photographies d'une spermatide (A) et d'un spermatozoïde (B) observés sous microscope. 69
Figure I - 12 : Démarche expérimentale mise en œuvre dans cette thèse. 77

Tableau I - 1 : Études sur les effets différés intergénérationnels (inter) et transgénérationnels (trans). 16
Tableau I - 2 : Taxonomie de G. fossarum 60

Chapitre II : Matériels et méthodes

Figure II - 1 : Site de prélèvement de gammares à la cressonnière de St-Maurice-de-Rémens. 81
Figure II - 2 : Collecte d'organismes au troubleau et tri dans la colonne de tamis. 83
Figure II - 3 : Localisation des différents sites d'encagement..... 87
Figure II - 4 : Systèmes et caisses d'encagement.. 90
Figure II - 5 : Dispositif expérimental pour l'étude de l'effet de la température, de la privation alimentaire et du stress cadmique sur le niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN 91
Figure II - 6 : Protocoles expérimentaux utilisés pour les expositions parentales.. 93
Figure II - 7 : Dispositif expérimental pour l'exposition au cadmium 96
Figure II - 8 : Dispositif expérimental pour l'exposition à la 3,4-dichloroaniline..... 96
Figure II - 9 : Dispositif expérimental au retour des organismes du terrain pour l'ajustement des températures destiné à homogénéiser la récupération des juvéniles F1 97
Figure II - 10 : Dispositif d'élevage des organismes issus des parents exposés..... 98
Figure II - 11 : Collecte des juvéniles. 99
Figure II - 12 : Description et chronologie des mesures réalisées chez les parents F0..... 101
Figure II - 13 : Colonne d'élution..... 105
Figure II - 14 : Étapes de dissection pour la récupération des spermatozoïdes de gammares 108
Figure II - 15 : Calcul des paramètres de mesure des dommages à l'ADN basés sur l'intensité de fluorescence des brins et leur dispersion par le logiciel Comet Assay IV®. 111
Figure II - 16 : Graphe du cycle de vie de la population de *Gammarus fossarum* du laboratoire avec discrétisation en 7 classes de taille, utilisé pour la modélisation de la dynamique de population. 116

Tableau II - 1 : Populations naturelles étudiées dans le cadre de l'étude du niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN 82
Tableau II - 2 : Caractéristiques des sites d'encagement..... 88
Tableau II - 3 : Conditions des expositions réalisées au laboratoire dans le cadre des expérimentations transgénérationnelles. 95
Tableau II - 4 : Mesures réalisées le long des générations successives des parents exposés au Cd..... 102

Tableau II - 5 : Mesures réalisées le long des générations successives des parents exposés à la 3,4-DCA 102
Tableau II - 6 : Mesures réalisées le long des générations successives des parents exposés *in situ* 103
Tableau II - 7 : Composition de la solution de lyse. 109

Chapitre III

Publication n°1

Figure S 1 : Global cytosine methylation level (%) in gammarids from the Cress population directly after sampling in the field, after 14 days and 1 month of laboratory rearing at 12°C in 500 mL beakers. 130

Notes n°1 et 2

Figure III - 1 : Comparaison des niveaux de méthylation globaux des cytosines de l'ADN de gammares prélevés sur le site des Ardillats (contamination métallique) avec quatre sites non contaminés. 132
Figure III - 2 : Comparaison des niveaux globaux de méthylation des cytosines de l'ADN d'organismes encagés sur des sites aux contextes de contamination variés 135

Chapitre IV

Publication n°2

Figure 1 : Réponses des parents F0 à l'exposition. 164
Figure 2 : Réponses des organismes F1. 165
Figure 3 : Réponses des organismes F2. 166
Figure 4 : Réponses des F3. 167

Figure S 1 : Life cycle graph of Gammarus fossarum lab population with 7 size-classes, used for modelling dynamics population. 155
Figure S 2 : Feeding rate (mm^2/day/organism) of F0 parents. 155
Figure S 3 : Standardized mean secondary follicle surface per F0 female (mm^2). 155

Figure S 4 : Sperm viability in F0 male gammarids. 156
Figure S 5 : Global cytosine methylation level (%) in F0 male gammarids. 156
Figure S 6 : Survival rate of F1 juveniles (%). 156
Figure S 7 : Growth rate of F1 juveniles (mm/week). 156
Figure S 8 : Standardized oocyte number per F1 female. 157
Figure S 9 : Standardized mean secondary follicle surface per F1 female. 157
Figure S 10 : Feeding rate (mm²/day/organism) of F1. 157
Figure S 11 : Sperm viability in F1 male gammarids. Control 157
Figure S 12 : Mean tail DNA intensity (%) (comet assay) in sperm of F1 males 158
Figure S 13 : Global cytosine methylation level (%) in F1 male gammarids 158
Figure S 14 : Survival rate of F2 juveniles (%) 158
Figure S 15 : Growth rate of F2 juveniles (mm/week). 158
Figure S 16 : Standardized oocyte number per F2 female 159
Figure S 17 : Standardized embryo number per F2 female. 159
Figure S 18 : Mean tail DNA intensity (%) (comet assay) in sperm of F2 males 159

Publication n°3

Figure 1 : Réponses des parents F0 à l'exposition. 164
Figure 2 : Réponses des organismes F1. 165
Figure 3 : Réponses des organismes F2. 166
Figure 4 : Réponses des F3. 167

Figure S 1 : Viabilité des spermatozoïdes des F0 (%) 169
Figure S 2 : Niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN (%) 169
Figure S 3 : Pourcentage de femelles F0 à chaque stade de mue 170
Figure S 4 : Nombre normalisé d'ovocytes par femelle F0 170
Figure S 5 : Nombre normalisé d'embryons par femelle F0 170
Figure S 6 : Surfaces moyennes normalisées des follicules secondaires des femelles F0. 170
Figure S 7 : Taux de croissance des juvéniles F1 (mm/semaine) 171
Figure S 8 : Pourcentage de femelles F1 matures (%) 171
Figure S 9 : Taille des femelles F1 à la puberté (mm) 171
Figure S 10 : Nombre normalisé d'embryons par femelle F1 171
Figure S 11 : Surfaces moyennes normalisées des follicules secondaires des femelles F1 172

Figure S 12 : Taux de survie des juvéniles F2. 172
Figure S 13 : Taux de croissance des juvéniles F2 (mm/semaine) 172
Figure S 14 : Pourcentage de femelles F2 matures (%) 172
Figure S 15 : Taille des femelles F1 à la puberté (mm) 173
Figure S 16 : Nombre normalisé d'ovocytes par femelle F2 173
Figure S 17 : Nombre normalisé d'embryons par femelle F2 173
Figure S 18 : Taux de survie des juvéniles F3. 173

Note n°3

Figure IV - 1 : Moyenne des dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes des parents F0 177
Figure IV - 2 : Niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN (%) 177
Figure IV - 3 : Nombre normalisé d'ovocytes par femelle F0 178
Figure IV - 4 : Nombre normalisé d'embryons par femelle F0 179
Figure IV - 5 : Taux de survie des juvéniles F1 (%). 180

Tableau IV - 1 : Nombre de femelles F0 en reproduction suite à l'exposition et de descendants F1 récupérés. 179

Chapitre V

Figure V - 1 : Effets différés après exposition parentale à la 3,4-DCA : comparaison aux résultats agrégés des générations témoins. 187
Figure V - 2 : Effets différés après exposition parentale au Cd : comparaison aux résultats agrégés des générations témoins.. 188
Figure V - 3 : Effets observés sur les traits d'histoire de vie et sur l'intégrité structurelle et fonctionnelle du génome au cours de trois générations suite à l'exposition parentale au Cd 189
Figure V - 4 : Effets observés sur les traits d'histoire de vie et sur l'intégrité structurelle et fonctionnelle du génome au cours de trois générations suite à l'exposition parentale à la 3,4-DCA 190

Tableau V - 1 : Inventaire des espèces d’eau douce et estuariennes, utilisées dans les études intergénérationnelles et transgénérationnelles publiées depuis 2000. 197

Publications et communications

Publications :

Cribiu, P., Chaumot, A., Geffard, O., Ravanat, J.-L., Bastide, T., Delorme, N., Quéau, H., Caillat, S., Devaux, A., Bony, S., 2018. Natural variability and modulation by environmental stressors of global genomic cytosine methylation levels in a freshwater crustacean *Gammarus fossarum*. Aquatic toxicology *205*, 11-18.

Cribiu, P., Devaux, A., Geffard, O., Abbaci, K., Quéau, H., Delorme, N., Garnero, L., Bastide, T., Bony, S., Chaumot, A. A population dynamics point of view onto delayed life-history effects of contaminants: A case study with transgenerational effects of cadmium parental exposure over three generations in the freshwater crustacean *Gammarus fossarum* (soumis à EST).

Cribiu, P., Devaux, A., Geffard, O., Abbaci, K., Quéau, H., Delorme, N., Garnero, L., Bastide, T., Bony, S., Chaumot, A. Modification des traits d'histoire de vie jusqu'à la troisième génération de descendants chez *Gammarus fossarum* suite à une exposition parentale à une concentration environnementale de 3,4-dichloroaniline (en préparation).

Communications orales :

Cribiu, P. (2017) Étude de la méthylation des cytosines de l'ADN chez l'espèce modèle *Gammarus fossarum*. GDR écotoxicologie aquatique, Lyon, 22 juin 2017.

Cribiu, P., Devaux, A., Geffard, O., Abbaci, K., Quéau, H., Delorme, N., Garnero, L., Bony, S., Chaumot, A. (2018) Transgenerational effects of a parental exposure in the sentinel species *Gammarus fossarum*. SETAC Europe 28th annual meeting, Rome, 13-17 mai 2018.

Cribiu, P. (2018) Effets transgénérationnels d'une exposition parentale au cadmium chez l'espèce modèle *Gammarus fossarum*. GDR écotoxicologie aquatique, Antony, 4 décembre 2018.

Cribiu, P. (2019) Extrapolation des effets individuels au niveau populationnel : Étude transgénérationnelle et modélisation de la dynamique de population chez l'amphipode modèle *Gammarus fossarum*. SEFA, Lyon, 24-25 juin 2019. Prix de la meilleure communication orale.

Posters :

Cribiu, P., Chaumot, A., Geffard, O., Ravanat, J.-L., Bastide, T., Bony, S., Devaux, A. (2017) Effects of biotic and abiotic factors on DNA methylation status in *Gammarus fossarum*. 18th International Symposium on Toxicity Assessment, Brésil, 16-21 juillet 2017.

Cribiu, P., Chaumot, A., Geffard, O., Ravanat, J.-L., Bastide, T., Bony, S., Devaux, A. (2018) Genomic cytosine methylation level: a molecular marker of stress in the species *Gammarus fossarum*? SETAC Europe 28th annual meeting, Rome, 13-17 mai 2018.

Introduction générale

Au cours du XXème siècle, l'industrie chimique a connu une croissance considérable. Actuellement, le nombre de composés chimiques connus est estimé à plus de 2 millions, avec environ 250 000 nouvelles substances synthétisées chaque année[1]. Parmi ces 250 000 nouvelles molécules produites annuellement, près de 1000 se retrouveront dans l'environnement[1]. Par leur position de réceptacle au sein des écosystèmes, les milieux aquatiques sont exposés à une grande partie des contaminants disséminés dans l'environnement. La diversité des substances identifiées est importante allant des composés organiques (pesticides, HAPs, PCBs, médicaments, solvants, détergents) aux minéraux (métaux, radioéléments), en passant par les microplastiques. Ces substances peuvent engendrer une dégradation de la qualité de l'eau et avoir un impact négatif sur la santé de l'homme, des biocénoses et affecter l'équilibre des écosystèmes aquatiques.

Face au risque environnemental posé par l'émission des contaminants chimiques dans le milieu aquatique, différentes réglementations nationales et internationales se sont mises en place. La Directive Cadre sur l'eau (2000/60/CE, DCE) fixe un cadre réglementaire européen pour la préservation et l'amélioration de la qualité des milieux aquatiques. Elle définit notamment une méthode de travail commune aux états membres qui consiste à élaborer quatre documents : un état des lieux, un plan de gestion pour fixer les objectifs environnementaux, un programme de mesure pour atteindre ces objectifs, et un programme de surveillance de la qualité des milieux aquatiques pour statuer sur l'atteinte ou non des objectifs définis.

Sur un autre plan, le règlement REACH (" Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals") a pour objectif d'encadrer l'utilisation des substances chimiques en Europe et ainsi protéger la santé humaine et l'environnement. Il impose depuis juin 2007 aux industriels de fournir des connaissances sur la toxicité et l'écotoxicité des substances produites ou importées à plus d'une tonne par an auprès de l'Agence des Produits Chimiques. Les substances pour lesquelles le caractère toxique est difficile à déterminer font l'objet d'un examen plus approfondi par les états membres. Ces deux réglementations mobilisent fortement les écotoxicologues car pour statuer sur la dangerosité des substances chimiques, diagnostiquer

[1] American Fisheries Society Policy Statement #6, Effects of toxic substances in surface waters, 2019

la qualité des milieux aquatiques et identifier les pressions qui s'exercent sur ces écosystèmes, des évaluations écotoxicologiques sont nécessaires. L'écotoxicologie est l'étude des sources d'entrée et des voies de transfert des agents chimiques et physiques dans les différents compartiments de l'environnement, et de leurs effets toxiques sur les organismes vivants (Butler, 1978).

L'un des objectifs principaux de l'écotoxicologie est la mise au point d'outils et de méthodologies qui permettent de mieux gérer les risques chimiques encourus par les populations animales et végétales et plus globalement par les écosystèmes afin d'assurer leur bon fonctionnement. Or, à l'heure actuelle, la majorité de ces outils et méthodologies (*i.e*. bioessais, approche biomarqueur, tests *in situ*) évalue les effets des contaminants sur des temps de réponse courts, qui ne correspondent pas à l'échelle temporelle des populations. Une population est en effet un ensemble d'organismes appartenant à différentes générations, qui se maintiennent pendant une certaine durée et dans un espace donné. Le stress chimique peut induire des effets, directement associés à l'exposition, sur ces organismes (*i.e* effets directs). D'autres effets, dits **différés** peuvent s'observer plus tardivement au cours de la vie des organismes, voire de leurs descendants. En plus de leurs délais d'apparition qui peuvent être importants, ces effets se caractérisent par le fait qu'ils peuvent se manifester au-delà de l'arrêt de l'exposition. Ainsi, un décalage temporel existe entre les effets et la perturbation qui en est la cause (O'Connor et al., 2014). Ces effets différés reposent sur des processus variés tels que des changements d'allocation d'énergie, des transferts de contaminants, des changements génétiques (mutations génétiques) ou épigénétiques (altérations des marques épigénétiques). Parmi ces mécanismes, l'étude des **régulations épigénétiques** constitue un champ disciplinaire récent en écotoxicologie (quelques décennies) qui renseigne de plus en plus sur une possibilité de transmission du message toxique au cours des générations.

Les effets différés et la connaissance des processus associés constituent aujourd'hui une problématique à fort enjeu en écotoxicologie et en évaluation des risques.

Dans un premier temps, acquérir des connaissances sur les effets différés présente un intérêt important pour mieux comprendre le lien entre exposition et effets. Du fait de l'existence des effets différés, l'état physiologique des organismes résulte, dans des proportions variées, de leurs expositions antérieures, voire de celles de leurs ascendants (Stoks et Córdoba-Aguilar,

2012 ; O'Connor et al., 2014). Des organismes exposés à de faibles concentrations au cours de leur développement peuvent présenter des effets différés importants à l'âge adulte (Pechenik, 2006 ; Debecker et al., 2017). Même si l'exposition a lieu à l'âge adulte, les capacités reproductives des organismes exposés ainsi que la qualité des cohortes produites peuvent être affectées sur le long terme, malgré la disparition de la contamination. L'exposition d'un organisme sur une période de sa vie (génération F0) peut, en plus de générer des effets différés au cours de son cycle de vie, induire des effets sur ses descendants. On parle d'**effets intergénérationnels** lorsque les effets se manifestent chez les descendants qui ont été exposés, soit directement lors de la gestation ou à travers la poche maternelle dans laquelle se déroule l'embryogénèse, soit indirectement au cours de la gamétogénèse parentale. Dans le cas où les descendants n'ont jamais été exposés, même indirectement, on parle d'**effets transgénérationnels** (Skinner et al., 2010).

Dans un second temps, mieux connaître les effets différés et les processus sous-jacents est nécessaire pour améliorer la compréhension des réponses des populations au stress chimique dans les écosystèmes (Ares, 2003). En effet, ces effets sont susceptibles de jouer un rôle important sur la **vulnérabilité** des populations face à d'autres changements environnementaux (similaires ou non aux précédents). Le caractère différé de ces effets explique pourquoi la capacité des populations à se rétablir structurellement et fonctionnellement peut être fortement altérée sur le long terme, bien après l'exposition à la perturbation (*i.e* **résilience de la population**). Les effets différés peuvent également avoir une influence importante sur l'impact **démographique** induit par un stress chimique. Enfin, les effets différés et les processus associés participent dans certains cas à l'acquisition de **tolérance** à un stress donné par la population. En effet, la tolérance peut résulter de la transmission du phénotype parental (tolérant) ou de l'environnement parental par des mécanismes de transmission non-génétique, notamment épigénétique (Bonduriansky et Day, 2009).

Malgré l'importance des effets différés pour appréhender le danger de la contamination chimique à l'échelle populationnelle et ainsi améliorer la **pertinence écologique** de l'évaluation des risques, les tests destinés à qualifier l'écotoxicité des substances et les programmes de biomonitoring ne les intègrent pas à l'heure actuelle (Thybaud, 2007 ; Campiche et al., 2007 ; Reátegui-Zirena et al., 2017 ; Castro et al., 2018). La majorité des bioessais normalisés porte sur l'évaluation de la toxicité aigüe ou chronique, mesurées sur une seule génération d'organismes. Les concentrations élevées et le temps de réponse limité des études de toxicité

aigüe ne permettent pas d'identifier d'éventuels effets différés. Il en est de même pour les bioessais de toxicité chronique qui même lorsqu'ils se déroulent sur plus d'une génération, utilisent le plus souvent des protocoles d'exposition continue (OCDE (2015), Essai n°240). En conséquence, les effets différés ne sont pas dissociables des effets directs.

En plus d'être peu explorés dans l'évaluation actuelle des risques écotoxicologiques, les effets différés ne font l'objet d'aucune stratégie scientifique explicite pour leur prise en compte (Ares, 2003 ; Groh et al., 2015). Un certain nombre d'auteurs ont ainsi plaidé pour la nécessité d'intégrer l'évaluation des effets différés inter et transgénérationnels en associant à l'exposition une période de récupération (en absence de contaminant) dans les bioessais actuels comme Hammers-Wirtz et Ratte (2000) ; Castro et al. (2018) et Matthiessen et al. (2017). Cependant, la plupart des études examinent uniquement les effets sur la première génération de descendants (F1). Or, la dynamique des effets différés au cours des générations successives peut être forte (Burggren, 2015). Compte tenu du caractère chronophage des études inter- et transgénérationnelles et de leurs coûts financiers importants, des organismes modèles de laboratoire au cycle de vie court comme les daphnies, le poisson zèbre et le nématode *Caenorhabditis elegans* sont majoritairement utilisés dans ce type d'étude. En revanche, les **espèces « environnementales » non-modèles de laboratoire** (*i.e.* organismes issus de populations vivant en milieu naturel) ne sont quasiment jamais étudiées. Les **stratégies d'histoire de vie** des espèces modèles de laboratoire et des espèces issues du milieu naturel sont pourtant très différentes et susceptibles d'avoir une influence importante sur la réponse des populations au stress chimique.

Dans ce contexte, l'objectif général de ce travail de thèse a été d'acquérir des connaissances sur les effets différés et leurs conséquences sur les populations chez l'espèce environnementale non-modèle de laboratoire *Gammarus fossarum*. Le parti-pris expérimental choisi et appliqué tout au long du travail a consisté à limiter les expositions à la génération parentale initiale (F0), puis à suivre les générations successives en milieu non contaminé. Compte-tenu du rôle prépondérant des mécanismes épigénétiques dans l'apparition d'effets différés, une marque épigénétique, la méthylation de l'ADN, a été explorée pour la toute première fois chez *Gammarus fossarum*.

Ce manuscrit de thèse se structure en cinq chapitres. Le **chapitre I** est une synthèse bibliographique centrée dans un premier temps sur la manière dont l'étude des effets différés et

des mécanismes sous-jacents associés est abordée en écotoxicologie. Cette synthèse présente ensuite les apports potentiels de l'épigénétique et plus particulièrement de la méthylation de l'ADN dans un contexte écotoxicologique. Dans une dernière partie, l'espèce utilisée dans ce travail, le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*, est présentée et son intérêt pour l'étude des effets différés discuté. Le **chapitre II** décrit de manière détaillée les méthodologies mises en œuvre durant ce travail afin de pouvoir identifier de potentiels effets inter et transgénérationnels lors d'expositions parentales réalisées au laboratoire et sur le terrain. Les **chapitres III et IV** présentent l'ensemble des résultats obtenus sous la forme de publications et de notes. Le **chapitre III** est consacré à l'exploration de la variabilité du niveau global de la méthylation de l'ADN chez *Gammarus fossarum*. Le **chapitre IV** présente les résultats des expérimentations mises en œuvre pour l'examen des effets inter et transgénérationnels. Enfin, le **chapitre V** est une discussion générale des principaux enseignements obtenus au cours de cette thèse, suivie d'une conclusion et de propositions de perspectives à ce travail.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique portant sur les effets différés et l'épigénétique en écotoxicologie animale (parties 1 et 2) ainsi que sur le modèle biologique utilisé dans ces travaux, le crustacé amphipode *Gammarus fossarum* (partie 3).

I.1. Les effets différés en écotoxicologie animale

Les effets différés désignent des effets biologiques individuels, qui se caractérisent par leur désynchronisation avec l'exposition au stress qui en est la cause. Ce type d'effet peut ainsi se manifester au-delà de l'arrêt de l'exposition. Les études présentées dans cette partie portent sur le décalage temporel entre la présence du contaminant dans le milieu et l'apparition des effets différés. Les mécanismes impliqués dans l'émergence de ces effets suite à un stress chimique et leurs conséquences sur les réponses populationnelles sont également discutés. Étant donné qu'il est rarement possible de distinguer les effets différés des effets directs pendant la phase d'exposition, nous avons fait le choix de ne présenter que les études pour lesquelles les effets postérieurs à l'exposition ont été investigués.

I.1.1. Occurrence au sein des populations

I.1.1.1. Différents types d'effets différés

Trois grands types d'effets différés peuvent être distingués : les effets intragénérationnels, intergénérationnels et transgénérationnels.

Les effets différés intragénérationnels se manifestent à un stade de vie ultérieur au stade auquel l'organisme a été exposé. De tels effets ont par exemple été mis en évidence par Xu et al. (2008). Ils ont exposé des poissons zèbres *Danio rerio* âgés de 2 jours à l'éthynylestradiol pendant leur développement embryo-larvaire et leur phase juvénile (*i.e.* 3 mois d'exposition). Après 3 mois de dépuration (absence de contaminant dans le milieu), les auteurs ont démontré des malformations sévères du spermiducte et un faible nombre de spermatozoïdes chez les mâles exposés à 2 et 10 ng EE2/L, tandis qu'une absence d'effets différés a été observée sur la croissance et le sex-ratio (Xu et al., 2008). Chez le gastéropode d'eau douce *Physa pomilia*, Kimberly et Salice (2014) ont exposé des œufs, de leur collecte jusqu'à leur éclosion, à deux concentrations de cadmium (2,5 et 10 µg/L). Après 71 jours en milieu non contaminé, les auteurs ont observé une diminution du taux de croissance des adultes, du nombre d'œufs par ponte et du succès d'éclosion de leur progéniture. Parmi les traits d'histoire de vie étudiés, seul l'âge de la première reproduction n'a pas été impacté par l'exposition des organismes au cours de leur développement embryonnaire (Kimberly et Salice, 2014).

Les effets observés sur les cohortes produites successivement par un même parent, suite à son exposition à un stress, appartiennent également à la catégorie des effets intragénérationnels (Burggren, 2015). Parmi le peu d'études disponibles, Andrewartha et

Burggren, 2012 ont montré qu'à partir de parents daphnies (*Daphnia magna*) ayant subi un stress hypoxique au cours des 6 premiers jours de vie (phase juvénile), le poids de leurs nouveau-nés produits au cours des deux premières couvées est diminué par rapport à celui des organismes témoins. Cependant, cet effet n'est pas observé chez les nouveau-nés issus de la troisième couvée et disparaît au cours du développement des nouveau-nés issus des deux premières cohortes (Andrewartha et Burggren, 2012). D'autres études ont également porté sur l'évolution des effets observés chez les cohortes produites par un même parent exposé (Sánchez et al., 2000; Minguez et al., 2015; Campos et al., 2016). Néanmoins, l'exposition chronique des parents et parfois des cohortes, ne permet pas de distinguer les effets différés des effets associés à l'accumulation du toxique au cours du temps.

L'exposition d'un organisme sur une période de sa vie (génération F0) peut, en plus de générer des effets différés au cours de son cycle de vie, induire des effets sur sa descendance. Les effets sont dits intergénérationnels lorsqu'ils se manifestent chez les descendants qui ont été exposés à la perturbation dans le milieu, soit directement lors de la gestation ou à travers la poche maternelle dans laquelle se déroule l'embryogénèse, soit indirectement au cours de la gamétogénèse parentale. Lorsque les descendants n'ont jamais été exposés au stress chimique, même indirectement, les effets sont qualifiés de transgénérationnels (Skinner et al., 2010). Le terme « effets multigénérationnels » est utilisé dans cette thèse pour désigner indistinctement les effets intergénérationnels et transgénérationnels.

Pour mieux distinguer les effets transgénérationnels des effets intergénérationnels, plusieurs cas sont présentés dans la Figure I - 1.

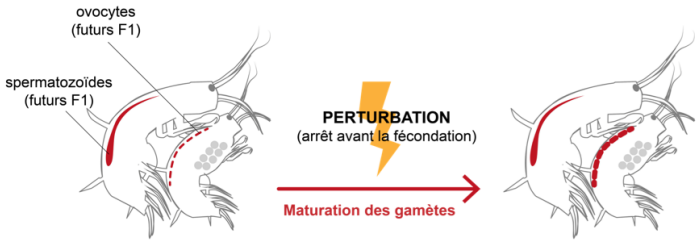
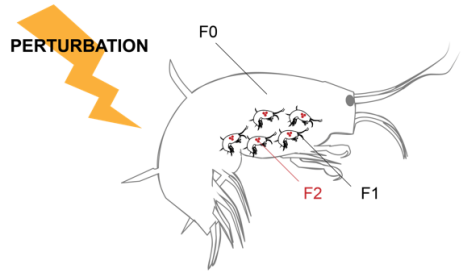
Fenêtre d'exposition	Génération chez laquelle l'effet est observé			
	F1	F2	F3	F4
B. Exposition au cours de la maturation des gamètes des parents F0 	INTER	TRANS	TRANS	TRANS
C. Exposition des femelles gravides F0 	INTER	INTER	TRANS	TRANS

Figure I - 1 : Exposition au cours de la reproduction des organismes F0 et nature intergénérationnelle (INTER) ou transgénérationnelle (TRANS) des effets différés.

Dans le cas A, les effets potentiellement observés chez les organismes F1 sont intergénérationnels car ces derniers ont été exposés de manière indirecte à travers les cellules germinales des parents F0. Il faut ainsi attendre la génération F2 pour que les effets puissent être qualifiés de transgénérationnels. Chez les espèces vivipares et les espèces dont le développement embryonnaire se déroule au sein d'une poche maternelle, l'exposition des femelles gravides (cas B) engendre une exposition directe des embryons (F1 dans cet exemple), mais également des cellules germinales de ces derniers qui donneront potentiellement les futurs F2. Les effets ne sont donc transgénérationnels que s'ils se manifestent chez la F3. Il faut noter que chez les espèces dont le développement embryonnaire a lieu dans le milieu externe, les effets observés suite à une exposition embryonnaire peuvent être considérés comme intragénérationnels.

Dans la majorité des études de la littérature portant sur les effets des expositions parentales sur la descendance, les effets différés mis en évidence sont intergénérationnels. Chez le collembole *Folsomia candida*, une réduction du nombre de juvéniles produit par les organismes F1 issus de parents exposés au méthoprène et au téflubenzurine (substances actives insecticides et perturbateurs endocriniens) pendant la maturation des gamètes a par exemple été observée par Campiche et al. (2007). Bien que minoritaires par rapport aux études s'intéressant aux effets intergénérationnels, un certain nombre d'études sont tout de même parvenues à

démontrer l'existence d'effets transgénérationnels chez des espèces modèles de laboratoire telles que le poisson zèbre *Danio rerio* (Baker et al., 2014 ; Corrales et al., 2014 ; Lombó et al., 2015 ; Knecht et al., 2017 ; Alfonso et al., 2019), le médaka *Oryzias latipes* (Seemann et al., 2015), le guppy *Poecilia reticulata* (Volkova et al., 2015), la daphnie (Guan et Wang, 2006; Sarapultseva et Dubrova, 2016 ; Trijau et al., 2018 ; De Liguoro et al., 2019), le nématode *Caenorhabditis elegans* (Kim et al., 2013 ; Wang et al., 2019) et le moustique *Aedes aegypti* (Prud'homme et al., 2017). Po et Chui (2018) ont également mis en évidence l'émergence d'effets transgénérationnels chez le gastéropode marin *Crepidula onyx* élevé pendant 2 ans au laboratoire après son prélèvement dans le milieu naturel. Ces études seront abordées plus en détail dans la partie I.1.1.3.

Dans ces travaux de thèse, un organisme est considéré comme exposé s'il a été confronté à la présence de la perturbation dans le milieu pendant une période donnée de son cycle de vie du stade gamète au stade adulte. Par conséquent, dans le cas d'une contamination chimique, même si le contaminant est encore présent dans les tissus de l'organisme, ce dernier n'est pas considéré comme étant encore exposé à partir du moment où il est transféré en milieu non contaminé. La plupart des études définissent la fenêtre d'exposition de cette même manière, à l'exception d'Alfonso et al. (2019). En effet, ces derniers tiennent compte des concentrations tissulaires du contaminant pour déterminer la persistance de l'exposition. Ainsi, observant des concentrations en contaminant significatives chez les larves F1 exposées au cours de la gamétogénèse parentale, ces auteurs ont conclu que les organismes F2 ont été indirectement exposés à travers les cellules germinales des larves F1. Les effets ne sont ainsi qualifiés de transgénérationnel qu'à partir de la génération F3.

I.1.1.2. Fenêtres de sensibilité à l'exposition au cours du cycle de vie

Les stades précoces du développement constituent des périodes cruciales au cours desquelles se déroulent le programme de différentiation des cellules et des organes (Skinner et al., 2010). Les expositions à des changements environnementaux pendant ces stades peuvent ainsi altérer cette programmation et les profils d'expression des gènes et induire l'apparition d'anomalies physiologiques et de maladies au stade adulte (Skinner et al., 2010 ; Athanasio et al., 2018 ; Chatterjee et al., 2018). Ce concept est très développé en toxicologie humaine et correspond à l'étude de l'origine développementale des maladies chez l'adulte (Feil et Fraga, 2012 ; Bailey, 2015). Ces effets intragénérationnels ou effets latents ont également été conceptualisés dans un contexte écotoxicologique. Ils se définissent comme des effets ne

s'exprimant qu'aux stades juvéniles et adultes et provenant des expériences vécues par les organismes aux stades embryonnaires et/ou larvaires (Pechenik, 2006). Dinh et al. (2016) ont par exemple montré chez la demoiselle *Coenagrion scitulum* qu'une exposition pendant le dernier stade larvaire au chlorpyrifos (substance active insecticide) peut engendrer des effets détectables uniquement durant et après la métamorphose. Au cours de la vie de nombreux organismes, la métamorphose constitue une période critique pendant laquelle les effets d' expositions antérieures peuvent se manifester ou s'amplifier (Dinh et al., 2016; Debecker et al., 2017).

Comme pour les effets directs, l'apparition et l'intensité des effets différés dépendent fortement de la fenêtre d'exposition. Segner et al. (2003) ont par exemple exposé des poissons zèbres *Danio rerio* à l'éthynylestradiol (EE2, perturbateur endocrinien) au cours de différents stades de développement. Après l'exposition, les organismes ont été transférés en milieu non contaminé et maintenus dans ces mêmes conditions jusqu'à l'âge adulte. Les auteurs ont observé des effets significatifs sur les adultes exposés au cours de leur différenciation sexuelle (performances reproductives, les niveaux de vitellogénine et la différenciation des gonades). De tels effets différés n'ont en revanche pas été constatés chez les organismes qui avaient été exposés au cours l'embryogénèse et/ou au stade larvaire (Segner et al., 2003). Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, Yu et al. (2013) ont démontré que les effets intergénérationnels induits par les métaux lourds Cd, Zn, Pb et Cu sont plus importants lorsque l'exposition parentale débute au stade L3 plutôt qu'au stade L4.

En plus des stades de développement précoces, la gamétogénèse parentale constitue une fenêtre d'exposition particulièrement sensible. En effet, chez les animaux multicellulaires parthénogénétiques ou sexués, les processus de remodelage de l'expression des gènes qui ont lieu au cours de la gamétogénèse rendent les cellules de la lignée germinale particulièrement vulnérables aux facteurs extrinsèques (Feil et Fraga, 2012 ; Norouzitallab et al., 2019). De plus, ces altérations sont susceptibles de se propager à travers les générations successives et avoir des conséquences importantes à l'échelle de la population si elles parviennent à persister au sein de la lignée germinale. L'importance des processus d'accumulation de nutriments et de facteurs cytoplasmiques (hormones, protéines, ARN, etc.) au sein des gamètes expliquent également une sensibilité importante de la gamétogénèse parentale aux perturbations environnementales (Bonduriansky et Day, 2009).

I.1.1.3. Contaminants, modalités d'exposition, espèces et temps de réponse étudiés

Dans le cadre de l'évaluation des risques, plusieurs auteurs ont démontré la pertinence d'évaluer, en plus des effets directs, les effets différés des expositions à des perturbations environnementales. Jensen et Forbes (2001) ont par exemple mis en évidence chez le gastéropode *Potamopyrgus antipodarum* que la mortalité engendrée par des expositions au Cd pendant 48h ou 96h se poursuit jusqu'à 192h après le transfert des organismes en milieu non contaminé. L'effet létal semble donc être induit par le cadmium à des concentrations beaucoup plus faibles que les LC50 obtenues dans les tests de mortalité conventionnels (Jensen et Forbes, 2001). Heintz et al., 2000 ont observé que les impacts engendrés au cours d'une exposition embryonnaire chez le saumon *Oncorhynchus gorbuscha* au laboratoire et simulant une marée noire, étaient plus élevés de 50% en intégrant les effets différés, par rapport à la seule prise en compte des effets immédiats. Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, les valeurs de EC50 des parents exposés au stade larvaire à des métaux et de leurs descendants F1 élevés en milieu non contaminé ont été calculées (Yu et al., 2013). Parmi les différents métaux étudiés, le cadmium n'est pas le plus toxique au vu des EC50 des parents et des descendants F1. Cependant, les ratios entre les EC50 des parents et des F1 de ce métal sont les plus élevés, ce qui suggère une toxicité multigénérationnelle importante du cadmium (Yu et al., 2013). De plus, Hammers-Wirtz et Ratte, 2000 ont démontré que les conclusions du test de reproduction chez la daphnie (OCDE (2012), Essai n°211) sont différentes lorsque ce dernier est prolongé sur une génération supplémentaire élevée en milieu non contaminé (soit jusqu'à ce que les organismes F1 produisent les descendants F2). De même, Pakyari et Enkegaard, 2015 ont montré que la toxicité de l'abamectine (substance active pesticide) sur les femelles de l'insecte *Scolothrips longicornis* est sous-estimée lorsque la mortalité des femelles au cours de l'exposition est le seul paramètre considéré. En effet, des effets intergénérationnels négatifs ont été mis en évidence sur la reproduction et les paramètres démographiques de la population F1 élevée en milieu non contaminé comme le taux d'accroissement asymptotique de la population λ et le temps de génération T (Pakyari et Enkegaard, 2015). Plus récemment, un protocole permettant d'incorporer les mesures de fitness des F1 au test de reproduction chez la daphnie (OCDE (2012, Essai n°211), tout en maintenant une durée du bioessai de 21 jours, a été proposé pour l'évaluation des risques, afin d'évaluer de potentiels effets multigénérationnels des substances testées (Castro et al., 2018). Deux des 4 substances testées dans cette étude, le paracétamol et le sulfate de cuivre, ont induit des effets négatifs sur les performances reproductives des descendants F1 issus de parents exposés. Toujours en lien avec la question

des effets différés et afin d'améliorer la pertinence écologique de l'évaluation des risques, certains auteurs ont aussi souligné l'intérêt de modifier les modalités d'exposition des bioessais. En effet, à l'heure actuelle, les expositions sont principalement de type aiguës ou continues. Cependant, certaines contaminations sont ponctuelles et à des concentrations relativement basses comme par exemple lors de l'utilisation des pesticides (Beketov et Liess, 2008). La durée d'exposition des organismes peut également être réduite du fait de leur déplacement dans un nouvel habitat non affecté par la contamination (Kattwinkel et al., 2015).

Une liste non-exhaustive d'études portant sur les effets différés inter et transgénérationnels suite à un stress chimique de type contamination figure dans le Tableau I - 1. Bien que certains des auteurs aient également étudié les effets d'une exposition continue, seuls les designs expérimentaux permettant de mettre en évidence des effets différés sont présentés. Les études sont classées par type d'espèce.

Tableau I - 1 : Études sur les effets différés intergénérationnels (inter) et transgénérationnels (trans).

Stress chimique			Espèce	Espèce modèle de laboratoire (EML) ou Espèce « environnementale » (EE)	Générations suivies	Effet différé démontré	Référence
Contaminant	Concentration	Fenêtre d'exposition					
Cadmium	3 µg/L	Parents (F0) (nouveau-nés – 17j)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F1 et F2	Oui, inter	Guan et Wang, 2006
Génistéine	4,4 mg/L	Parents (F0) (à partir du stade nouveau-né)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F0, F1 et F2	Non	Vandegehuchte et al., 2010a
Vinclozoline	3,6 mg/L	Parents (F0) (à partir du stade nouveau-né)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F0, F1 et F2	Non	Vandegehuchte et al., 2010a
5-azacytidine	7,4 mg/L	Parents (F0) (à partir du stade nouveau-né)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F0, F1 et F2	Oui, inter	Vandegehuchte et al., 2010a
Zinc	388 µg/L	Parents (F0) (à partir du stade nouveau-né)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F0, F1 et F2	Oui, inter	Vandegehuchte et al., 2010b
Zinc	388 µg/L	Parents (F0) (à partir du stade nouveau-né)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F0, F1 et F2	Oui, inter	Vandegehuchte et al., 2009
Dispersogen A	0,001-10,2 mg/L	Parents (F0) (nouveau-nés – 21j)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Hammers-Wirtz et Ratte, 2000
Paracétamol	1,3-4 mg/L	Parents (F0) (nouveau-nés – 21 j)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Castro et al., 2018
Dichromate de potassium	0,05-0,2 mg/L	Parents (F0) (nouveau-nés – 21 j)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F0 et F1	Non	Castro et al., 2018

Stress chimique			Espèce	Espèce modèle de laboratoire (EML) ou Espèce « environnementale » (EE)	Générations suivies	Effet différé démontré	Référence
Contaminant	Concentration	Fenêtre d'exposition					
Cuivre	0,037-0,14 mg/L	Parents (F0) (nouveau-nés – 21 j)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Castro et al., 2018
Chlorure de benzalkonium	0,009-0,040 mg/L	Parents (F0) (nouveau-nés – 21 j)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Castro et al., 2018
Sertraline	0,3-100 µg/L	Parents (F0) (nouveau-nés - 21j) Récupération de la 2ème et 5ème cohorte (F1-C2 et F1-C5)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F0, F1-C2 et F1-C5	Oui, inter pour F1-C5	Minguez et al., 2015
Venlafaxine	0,3-100 µg/L	Parents (F0) (nouveau-nés - 21j) Récupération de la 2ème et 5ème cohorte (F1-C2 et F1-C5)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F0, F1-C2 et F1-C5	Non	Minguez et al., 2015
Cadmium	0,5 µg/L et 2 µg/L	Générations F0-F13 (pdt 120j) Nouveau-nés F14 placés en milieu non contaminé	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F14	Oui, inter	Kimberly et Salice, 2015
Fluméquine	2 mg/L	Parents (F0)	*Daphnia magna* (Crustacé)	EML	F0-F3	Oui, inter et trans	De Liguoro et al., 2019
Cuivre	20 µg/L	Parents (F0) (nouveau-nés – 12j)	*Daphnia pulex* (Crustacé)	EML	F0 et F1	Non	Fernández-González et al., 2011

Stress chimique			Espèce	Espèce modèle de laboratoire (EML) ou Espèce « environnementale » (EE)	Générations suivies	Effet différé démontré	Référence
Contaminant	Concentration	Fenêtre d'exposition					
Éthylmethane sulfonate	85 ppm (0,78 mM) - 160 ppm (1,48 mM)	Parents (F0) (nouveau-nés – 21j)	*Artemia parthenogenetica* (crustacé)	EML	F0, F1 et F2	Oui	Sukumaran et Grant, 2013
Éthylmethane sulfonate	85 ppm (0,78 mM) - 160 ppm (1,48 mM)	Parents (F0) (nouveau-nés – 21j)	*Artemia franciscana* (Crustacé)	EML	F0, F1 et F2	Oui	Sukumaran et Grant, 2013
Fénoxycarbe	1- 43 µg/L	Parents (F0) (nouveau-nés – stade adulte, pdt 20j)	*Americamysis bahia* (Crustacé)	EE	F0 et F1	Oui, inter	McKenney, 2005
Précocéne II	6-18,27 mg/kg de sol sec	Parents (F0) (stades juvénile et adulte, pdt 10 j)	*Folsomia candida* (Collembole)	EML	F0 et F1	Non	Campiche et al., 2007
Méthopréne	70-300 mg/kg de sol sec	Parents (F0) (stades juvénile et adulte, pdt 10 j)	*Folsomia candida* (Collembole)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Campiche et al., 2007
Fénoxycarbe	5-3052 mg/kg de sol sec	Parents (F0) (stades juvénile et adulte, pdt 10 j)	*Folsomia candida* (Collembole)	EML	F0 et F1	Non	Campiche et al., 2007
Téflubenzuron	0,003-0,12 mg/kg de sol sec	Parents (F0) (stades juvénile et adulte, pdt 10 j)	*Folsomia candida* (Collembole)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Campiche et al., 2007
Pentachlorophénol (PCP)	30-150 mg/kg de sol sec	Parents (F0) (stades juvénile et adulte, pdt 10 j)	*Folsomia candida* (Collembole)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Zhang et Qiao, 2018
2,2',4,4'-tetrabromodiphényl éther (BDE47)	50-800 mg/kg de sol sec	Parents (F0) (stades juvénile et adulte, pdt 10 j)	*Folsomia candida* (Collembole)	EML	F0 et F1	Non	Zhang et Qiao, 2018

Stress chimique			Espèce	Espèce modèle de laboratoire (EML) ou Espèce « environnementale » (EE)	Générations suivies	Effet différé démontré	Référence
Contaminant	Concentration	Fenêtre d'exposition					
Trebon	Concentration recommandée par le fabricant (F), 0,1F et 10F	Parents (F0) (stade adulte, pdt 20j)	*Folsomia candida* (Collembole)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Szabó et Bakonyi, 2017
Cadmium	25-400 µg/L	Parents (F0) (stade adulte, pdt 6 semaines)	*Lymnaea stagnalis* (Mollusque)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Reátegui-Zirena et al., 2017
2,2',4,4'-tétrabromodiphényl éther (BDE-47)	Exposition par voie alimentaire 10 µg/L	Parents (F0) (stade larvaire – stade adulte)	*Crepidula onyx* (Mollusque)	?	F0, F1 et F2	Oui, inter et trans	Po et Chiu, 2018
Diuron	2 Pulses de 0,4 et 0,6 µg/L	Parents (F0) 2x7j d'exposition par pulses au début et au milieu de la gamétogénèse	*Crassostrea gigas* (Mollusque)	EE	F0 et F1	Oui, inter	Barranger et al., 2014
Diuron	2 Pulses de 0,4 et 0,6 µg/L	Parents (F0) 2x7j d'exposition par pulses au début et au milieu de la gamétogénèse	*Crassostrea gigas* (Mollusque)	EE	F0 et F1	Oui, inter	Barranger et al., 2015
Diuron	Exp 1 : 2 Pulses de 0,2 et 0,3 µg/L et Exp2 : 2 Pulses de 0,48 µg/L	Parents (F0) Exp 1 : 2x7j d'exposition par pulses au début et au milieu de la gamétogénèse Exp 2 : Idem + 4j à la fin de la gamétogénèse	*Crassostrea gigas* (Mollusque)	EE	F0 et F1	Oui, inter	Bachère et al., 2017

Stress chimique			Espèce	Espèce modèle de laboratoire (EML) ou Espèce « environnementale » (EE)	Générations suivies	Effet différé démontré	Référence
Contaminant	Concentration	Fenêtre d'exposition					
Cadmium	2-20 µg/L	Parents (F0) (stade adulte, pdt 7j)	*Physa pomilia*	EE	F0 et F1	Oui, inter	Plautz et Salice, 2013
Nanoparticules d'or	Exposition par voie alimentaire 5-50x10^{10} particules/mL	Parents (F0) (pdt 12h)	*Caenorhabditis elegans* (Nématode)	EML	F0-F4	Oui, trans	Kim et al., 2013
Particules de gasoil	0,01-1 µg/mL	Parents (F0) (à partir du stade larvaire, pdt 24h) F1-F5 milieu non contaminé	*Caenorhabditis elegans* (Nématode)	EML	F0-F5	Oui, inter et trans	Wang et al., 2019
Cadmium	0,022-220 µmol/L	Parents (F0) (à partir du stade larvaire, pdt 96h)	*Caenorhabditis elegans* (Nématode)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Yu et al., 2013
Cuivre	0,047-470 µmol/L	Parents (F0) (à partir du stade larvaire, pdt 96h)	*Caenorhabditis elegans* (Nématode)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Yu et al., 2013
Plomb	0,0048-48,0 µmol/L	Parents (F0) (à partir du stade larvaire, pdt 96h)	*Caenorhabditis elegans* (Nématode)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Yu et al., 2013
Zinc	0,038-380 µmol/L	Parents (F0) (à partir du stade larvaire, pdt 96h)	*Caenorhabditis elegans* (Nématode)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Yu et al., 2013

Stress chimique			Espèce	Espèce modèle de laboratoire (EML) ou Espèce « environnementale » (EE)	Générations suivies	Effet différé démontré	Référence
Contaminant	Concentration	Fenêtre d'exposition					
Thiamethoxam	?	Parents (F0) (à partir du stade larvaire)	*Coccinella septempunctata* (Insecte)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Jiang et al., 2019
Imidaclopride	0,048-4,837 mg/L	Parents (F0) (stade adulte, pdt 24h)	*Coccinella septempunctata* (Insecte)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Xiao et al., 2016
Fipronil	Concentrations recommandées par fabricant	Parents (F0) (stade oeuf-larvaire ou stade prépupal ou stade pupal)	*Trichogramma galloi* (Insecte parasitaire)	EML	F0 et F1	Pas évalué	Costa et al., 2014
λ-cyalothrine	Concentrations recommandées par fabricant	Parents (F0) (stade oeuf-larvaire ou stade prépupal ou stade pupal)	*Trichogramma galloi* (Insecte parasitaire)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Costa et al., 2014
Thiamethoxam	Concentrations recommandées par fabricant	Parents (F0) (stade oeuf-larvaire ou stade prépupal ou stade pupal)	*Trichogramma galloi* (Insecte parasitaire)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Costa et al., 2014
Spinosad	Concentrations recommandées par fabricant	Parents (F0) (stade oeuf-larvaire ou stade prépupal ou stade pupal)	*Trichogramma galloi* (Insecte parasitaire)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Costa et al., 2014
Triflumuron	Concentrations recommandées par fabricant	Parents (F0) (stade oeuf-larvaire ou stade prépupal ou stade pupal)	*Trichogramma galloi* (Insecte parasitaire)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Costa et al., 2014

Stress chimique			Espèce	Espèce modèle de laboratoire (EML) ou Espèce « environnementale » (EE)	Générations suivies	Effet différé démontré	Référence
Contaminant	Concentration	Fenêtre d'exposition					
Cuivre	Exposition par voie alimentaire 200 µg/g de nourriture	Parents (F0) (stades de développement précoce)	*Protophormia terraenovae* (Insecte)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Pölkki et al., 2012
Abamectine	Exposition par voie alimentaire 23-223 ai µg//L	Parents (F0) (stade adulte, pdt 48h)	*Scolothrips longicornis* (Insecte)	EE	F0 et F1	Oui, inter	Pakyari et Enkegaard, 2015
Chlorantraniliprole	20,25 µg//L	Parents (F0) (à partir du stade larvaire, pdt 96h)	*Plutella xylostella* (Insecte)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Guo et al., 2013
Nickel	Exposition par voie alimentaire 100 µg/g de nourriture	Parents (F0) (stade larvaire-– émergence)	*Pieris rapae* (Insecte)	EE	F0 et F1	Oui, inter	Kobiela and Snell-Rood, 2018
Deltamethrine	Exposition par spray, 2 mL de solution à 1,59 mg/L	Générations F0-F2 (stade larvaire - émergence) Œufs F3 placés en milieu non contaminé	*Leptinotarsa decemlineata* (Insecte)	EE (organismes utilisés correspondent à la 5ème génération d'organismes élevés au laboratoire)	F3	Oui, inter	Piiroinen et al., 2014
Chlorpyrifos	0,23 µg/L	Parents (F0) (stades larvaire et pupal)	*Culex pipiens* (Insecte)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Tran et al., 2018

Stress chimique			Espèce	Espèce modèle de laboratoire (EML) ou Espèce « environnementale » (EE)	Générations suivies	Effet différé démontré	Référence
Contaminant	Concentration	Fenêtre d'exposition					
Ibuprofène	1 µg/L	Exp 1 : Parents (F0) (stade larvaire – émergence) Exp 2 : Générations F0-F5 (stade larvaire – émergence)	*Aedes aegypti* (Insecte)	EML	Exp 1 : F0 et F1 Exp 2 : F6 et F7	Oui, inter et trans	Prud'homme et al., 2017
Bisphénol A	0,4 µg/L	Exp 1 : Parents (F0) (stade larvaire – émergence) Exp 2 : Générations F0-F5 (stade larvaire – émergence)	*Aedes aegypti* (Insecte)	EML	Exp 1 : F0 et F1 Exp 2 : F6 et F7	Non	Prud'homme et al., 2017
Benzo(a)pyrene	0,6 µg/L	Exp 1 : Parents (F0) (stade larvaire – émergence) Exp 2 : Générations F0-F5 (stade larvaire – émergence)	*Aedes aegypti* (Insecte)	EML	Exp 1 : F0 et F1 Exp 2 : F6 et F7	Oui, inter et trans	Prud'homme et al., 2017
Glyphosate	Concentrations recommandées par fabricant	Parents (F0) (stade larvaire, pdt 24h)	*Zygogramma bicolorata* (Insecte)	?	F0 et F1	?	Hasan et Ansari, 2016
Atrazine	Concentrations recommandées par fabricant	Parents (F0) (stade larvaire, pdt 24h)	*Zygogramma bicolorata* (Insecte)	?	F0 et F1	?	Hasan et Ansari, 2016
Métribuzine	Concentrations recommandées par fabricant	Parents (F0) (stade larvaire, pdt 24h)	*Zygogramma bicolorata* (Insecte)	?	F0 et F1	?	Hasan et Ansari, 2016

Stress chimique			Espèce	Espèce modèle de laboratoire (EML) ou Espèce « environnementale » (EE)	Générations suivies	Effet différé démontré	Référence
Contaminant	Concentration	Fenêtre d'exposition					
Alachlor	Concentrations recommandées par fabricant	Parents (F0) (stade larvaire, pdt 24h)	*Zygogramma bicolorata* (Insecte)	?	F0 et F1	?	Hasan et Ansari, 2016
Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	Concentrations recommandées par fabricant	Parents (F0) (stade larvaire, pdt 24h)	*Zygogramma bicolorata* (Insecte)	?	F0 et F1	Oui, inter	Hasan et Ansari, 2016
Fioul lourd	3000 µg/g de gravier	Parents (F0) (stade adulte, 21j) Croisement (4 conditions)	*Strongylocentrotus intermedius* (Insecte)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Duan et al., 2018
Tributylétain	30-180 µg/kg de sédiment sec	Générations F0-F3 Œufs F4 placés en milieu non contaminé	*Chironomus riparius* (Insecte)	EML	F0-F4	Oui, inter	Lilley et al., 2012
Cuivre	100 et 300 µg/L	Parents (F0) Colonies de larves F1 placées *in situ*	*Bugula neritina* (Bryozoaires)	EE	F1	Oui, inter	Marshall, 2008
Cuivre	25 µg/L	Parents (F0) (stade adulte, 4 semaines)	*Evechinus chloroticus* (Échinoderme)	EE	F0 et F1	Oui, inter	Phillips and Rouchon, 2018
Bifenthrine	1 ng/L	Parents (F0) (stade adulte, pdt 14 j) + F1 (fécondation – 21 jours après leur éclosion)	*Menidia beryllina* (poisson)	EML	F0-F2	Oui, inter	DeCourten et al., 2019

Stress chimique			Espèce	Espèce modèle de laboratoire (EML) ou Espèce « environnementale » (EE)	Générations suivies	Effet différé démontré	Référence
Contaminant	Concentration	Fenêtre d'exposition					
Éthynylestradiol (EE2)	1 ng/L	Parents (F0) (stade adulte, pdt 14 j) + F1 (fécondation – 21 jours après leur éclosion)	*Menidia beryllina* (poisson)	EML	F0-F2	Oui, inter	DeCourten et al., 2019
Éthynylestradiol (EE2)	0,5-5 ng/L	Parents (F0) (stade adulte, pdt 29 j)	*Danio rerio* (poisson)	EML	F1 et F2	Oui, inter	Nash et al., 2004
Estradiol (E2)	5 ng/L	Parents (F0) (stade adulte, pdt 29 j)	*Danio rerio* (poisson)	EML	F1 et F2	Oui, inter	Nash et al., 2004
Bisphénol A	100 et 2000 µg/L	Parents mâles (F0) (stade adulte, pdt les 14 premiers jours de la spermatogénèse)	*Danio rerio* (poisson)	EML	F0-F2	Oui, inter	Lombó et al., 2015
2,3,7,8 Tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD)	50 pg/mL	Parents (F0) (stade juvénile, 1h d'exposition à la 3ème et 7ème semaine après la fécondation)	*Danio rerio* (poisson)	EML	F0-F2	Oui, inter et trans	Baker et al., 2014
Benzo(a)pyrène	Exposition par voie alimentaire 0,25-25 µg/g de poisson	Parents (F0) (stade adulte, pdt 23j)	*Danio rerio* (poisson)	EML	F1-F4	Oui, inter et trans	Corrales et al., 2014
Benzo(a)pyrène	5 et 10 µM	Parents (F0) (stade embryon et larvaire, 6-120 heures après la fécondation)	*Danio rerio* (poisson)	EML	F0-F2	Oui, inter et trans	Knecht et al., 2017

Stress chimique			Espèce	Espèce modèle de laboratoire (EML) ou Espèce « environnementale » (EE)	Générations suivies	Effet différé démontré	Référence
Contaminant	Concentration	Fenêtre d'exposition					
Mélange de 22 polychlorobiphényles (PCB) et 7 polybromodiphényl éthers (PBDE)	Exposition par voie alimentaire	Parents (F0) (stade larvaire-stade adulte, 5-180 jours après la fécondation)	*Danio rerio* (poisson)	EML	F1-F4	Oui, inter et trans	Alfonso et al., 2019
Méthyl methanesulfonate (MMS) génotoxique	2-8 mg/L	Parents (F0) (fécondation – stade adulte)	*Danio rerio* (poisson)	EML	F0-F2	Oui, inter et trans	Faßbender et Braunbeck, 2013
Uranium appauvri	20 µg/L	Parents (F0) (stade adulte, pdt 10j)	*Danio rerio* (poisson)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Armant et al., 2017
Benzo(a)pyrène	1 µg/L	Parents (F0) (stade adulte, pdt 21 j)	*Oryzias latipes* (poisson)	EML	F1-F3	Oui, inter et trans	Seemann et al., 2015
Cadmium	1-10 µg/L	Parents (F0) (stade adulte, pdt 2 semaines) F1 exposés uniquement au stade gamète sont réexposés aux mêmes concentrations et pdt 2 semaines à l'âge adulte	*Oryzias latipes* (poisson)	EML	F1	Oui, inter	Foran et al., 2002
Éthynylestradiol (EE2)	10 ng/L	Parents mâles (F0) (stade adulte, pdt 50j)	*Oncorhynchus mykiss* (poisson)	EML	F0 et F1	Oui, inter	Brown et al., 2008

Stress chimique			Espèce	Espèce modèle de laboratoire (EML) ou Espèce « environnementale » (EE)	Générations suivies	Effet différé démontré	Référence
Contaminant	Concentration	Fenêtre d'exposition					
Éthynylestradiol (EE2)	0,8-65 ng/L	Parents mâles (F0) (stade adulte, pdt 56j)	*Oncorhynchus mykiss* (poisson)	EML	F1 et F2	Oui, inter et trans	Brown et al., 2009
Perchlorate de sodium	3,6-100 mg/L	Parents (F0) + F1 (fécondation – maturité sexuelle)	*Gasterosteaus aculeatus* (poisson)	EE	F1 et F2	Non	Bernhardt et al., 2011
Méthylmercure	Exposition par voie alimentaire 0,2-11 µg/g de poisson	Parents (F0) (stade adulte)	*Fundulus heteroclitus* (poisson)	EE	F0-F2	Oui, inter	Matta et al., 2001
Aroclor 1268 (PCB-1268)	Exposition par voie alimentaire 0,4-15 µg/g de poisson	Parents (F0) (stade adulte)	*Fundulus heteroclitus* (poisson)	EE	F0-F2	Oui, inter	Matta et al., 2001
Éthynylestradiol (EE2)	20 ng/L	Parents femelles (F0) (stade embryon, pdt 28j)	*Poecilia reticulata* (poisson)	EML	F0-F2	Oui, inter et trans	Volkova et al., 2015

D'après le Tableau I - 1, 77% des études sur les effets différés inter et transgénérationnels ont utilisé des espèces d'invertébrés ou de vertébrés modèles de laboratoire plutôt que des espèces environnementales (*i.e.* organismes issus de populations vivant en milieu naturel). Ces organismes présentent l'avantage d'avoir de courts cycles de vie et de produire un nombre important de descendants. Cependant, étendre les études multigénérationnelles aux espèces « environnementales », notamment à des invertébrés dont la reproduction est sexuée, semble pertinent pour mieux appréhender les réponses des populations naturelles. En effet, les différences entre les stratégies d'histoire de vie des espèces modèles de laboratoire et des espèces issues du milieu naturel sont importantes, ce qui peut avoir une influence sur la réponse des populations au stress chimique. D'autre part, parmi les invertébrés, seule la classe des insectes est représentée par un nombre relativement important d'espèces différentes (Tableau I - 1). Parmi les crustacés par exemple, les effets multigénérationnels d'une exposition parentale à un contaminant ont été étudiés chez seulement deux espèces de daphnie, deux espèces d'artémie et chez le myside *Americamysis bahia* (Tableau I - 1).

Quelles que soient les espèces étudiées, les effets différés induits par l'exposition parentale sont évalués au-delà de la première génération de descendants élevée en milieu non contaminé dans seulement 38% des cas (Tableau I - 1). Or, comme le montre Burggren (2015), les effets différés peuvent s'atténuer, s'amplifier, apparaître ou disparaître au cours des générations successives. Par exemple, suite à l'exposition de parents (F0) *Danio rerio* à un mélange de polychlorobiphényles et de polybromodiphényléthers, Alfonso et al. (2019) ont observé une absence de réponse chez les organismes adultes F0, F1 et F3. Au contraire, les adultes F2 issus de l'exposition parentale présentent des modifications du comportement témoignant d'une anxiété très élevée par rapport aux poissons témoins (Alfonso et al., 2019). Chez la daphnie *Daphnia magna*, des altérations phénotypiques induites par une exposition parentale à l'antibiotique fluméquine se sont manifestées chez les F1. Elles ont ensuite disparu chez les F2 et sont réapparues avec une intensité plus importante chez les F3 (De Liguoro et al., 2019). Pour finir, des effets n'ont été observés qu'à partir de la génération F2 de nématodes *Caenorhabditis elegans* issus de l'exposition parentale à des nanoparticules d'or (Kim et al., 2013). Ces organismes F2 présentent en effet des taux de reproduction significativement plus faibles que ceux des individus témoins. Chez les générations successives, les taux de reproduction augmentent progressivement pour atteindre des niveaux similaires à la condition témoin chez les F4. Du fait de cette dynamique potentielle des effets multigénérationnels,

prolonger l'étude des effets différés au-delà de la première génération de descendants F1 semble nécessaire pour améliorer encore d'avantage la pertinence écologique de l'évaluation des risques actuelle.

Concernant les contaminants, les métaux et les substances actives des pesticides et des biocides sont les plus étudiés dans les études des effets différés multigénérationnels (Tableau I - 1). La grande majorité des expositions a été réalisée au laboratoire, et non directement dans des milieux naturels (Tableau I - 1). De plus, la plupart des substances étudiées sont des perturbateurs endocriniens avérés ou suspectés chez les vertébrés comme le bisphénol A, l'éthynylestradiol (EE2), le cadmium, le plomb, les PCBs, les PBDEs, le BaP, la TCDD, le chorpyrifos, la deltamétrine, etc. (Tableau I - 1). Le caractère latent et la propagation possible sur plusieurs générations des effets induits par des perturbateurs endocriniens ont été démontrés dans de nombreuses études (McKenney, 2005 ; Schwindt, 2015 ; Matthiessen et al., 2017 ; Parrott et al., 2017 ; Windsor et al., 2018). De plus, la plupart des protocoles multigénérationnels proposés pour améliorer la pertinence écologique des bioessais concernent spécifiquement ces substances (McKenney, 2005 ; Campiche et al., 2007 ; Matthiessen et al., 2017 ; Parrott et al., 2017 ; Zhang et Qiao, 2018).

I.1.2. Les grands mécanismes impliqués dans les effets différés

Les mécanismes impliqués dans les effets différés sont encore aujourd'hui peu compris et peu étudiés en écotoxicologie. Cependant, les différents processus décrits ci-dessous semblent jouer un rôle important dans l'apparition de ces effets. Si ces mécanismes sont présentés séparément dans cette dernière partie, ils peuvent en réalité interagir entre eux.

I.1.2.1. Persistance dans les tissus et transfert de contaminants

Dans le cas des contaminations, les contaminants et leurs métabolites peuvent s'accumuler dans les tissus et être à l'origine d'effets différés au cours de la vie de l'organisme et/ou chez la descendance. Les contaminants très liposolubles peuvent être distribués facilement et rapidement au sein des différents tissus, particulièrement ceux riches en lipides comme les gonades (Duan et al., 2018).

Dans l'hypothèse d'une bioaccumulation au niveau des gonades, les contaminants ou leurs métabolites sont susceptibles d'être transférés aux descendants par le biais des gamètes femelles. L'existence de tels transferts a été mise en évidence chez des invertébrés et des

poissons exposés à des contaminants tels que le méthylmercure, le mercure, le cuivre, le cadmium, l'uranium appauvri, le 2,2',4,4'-tétrabromodiphényléther (BDE-47), un mélange de polychlorobiphényles (PCB) et de polybromodiphényléthers (PBDE) et un mélange d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (fioul lourd) (Tsui et Wang, 2004 ; Saxton et al., 2013 ; Cazan et Klerks, 2014 ; Gombeau et al., 2017 ; Reátegui-Zirena et al., 2017; Phillips et Rouchon, 2018 ; Duan et al., 2018; Po et Chiu, 2018 ; Alfonso et al., 2019). Parmi ces études, Phillips et Rouchon (2018) ont par exemple établi une corrélation entre les concentrations en cuivre mesurées au sein des gonades maternelles et les effets observés sur le développement de leurs descendants.

La manière dont évoluent les teneurs en contaminant peut varier chez une même espèce en fonction des caractéristiques physico-chimiques du contaminant qui vont conditionner son devenir dans la descendance. Par exemple, chez le poisson zèbre, Gombeau et al. (2017) et Alfonso et al. (2019) ont observé des résultats très différents. Gombeau et al. (2017) ont montré que les teneurs en uranium appauvri des organismes issus de parents exposés étaient similaires à la condition témoin dès qu'ils atteignaient le stade larvaire (96h après la fécondation). En revanche, chez les poissons zèbres issus de l'exposition parentale aux PCB et aux PBDE, les concentrations en contaminants ne sont devenues comparables aux valeurs témoins que 112 jours après la fécondation (*i.e.* à l'âge adulte) (Alfonso et al., 2019). Dans les deux cas, la diminution des concentrations en contaminants au cours du temps chez les descendants issus de l'exposition parentale peut notamment s'expliquer par un phénomène de dilution du fait de leur croissance (Alfonso et al., 2019).

I.1.2.2. Mécanismes épigénétiques

Dans ce travail de thèse, le terme épigénétique désigne l'étude des marques épigénétiques telles que les modifications des histones, la méthylation de l'ADN et les ARN non codants. Cette notion est développée dans la partie I.2 du présent chapitre, dédiée à l'épigénétique en écotoxicologie animale.

De plus en plus d'études suggèrent que la persistance des marques épigénétiques pourrait jouer un rôle crucial dans l'apparition des effets latents (Barouki et al., 2018). Par exemple, des changements de méthylation sur des gènes spécifiques ont été observés dans les testicules de poissons zèbres adultes en réponse à une exposition à très court terme à des concentrations faibles de 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) au cours de la

différenciation des gonades (Akemann et al., 2019). Beaucoup de ces gènes sont impliqués dans les processus reproductifs ou les modifications épigénétiques, ce qui suggère un rôle possible de la méthylation de l'ADN dans l'apparition à l'âge adulte des différents effets latents observés (*i.e.* altérations du transcriptome, réduction de la fécondité et changements du sex-ratio) (Akemann et al., 2019). Étant donné que l'exposition dans le milieu a eu lieu dans cette expérimentation pendant le développement des organes reproducteurs, les effets observés après 10 mois de latence semblent être fortement liés à la présence d'épimutations persistantes (Akemann et al., 2019).

Chez les invertébrés, peu d'études sont parvenues à démontrer l'implication de mécanismes épigénétiques dans l'apparition d'effets latents chez l'adulte suite à une exposition lors du développement précoce. Athanasio et al. (2018) ont par exemple évalué la persistance des motifs de méthylation altérés de six gènes ainsi que leur expression transcriptomique suite à une exposition à la 5-azacytidine (molécule déméthylante) lors du développement de daphnies *Daphnia magna*. Après 7 jours en milieu non contaminé, si certains des motifs de méthylation altérés ont été maintenus, l'expression des gènes étudiés est restée similaire à la condition témoin.

Des expositions à l'âge adulte peuvent également engendrer des changements épigénétiques qui persistent pendant un certain temps, bien que le contaminant ne soit plus présent dans les tissus des organismes. Par exemple, chez des vers adultes *Lumbricus terrestris*, les niveaux de méthylation de certains fragments d'ADN induits par une exposition à des concentrations environnementales de cadmium sur 12 semaines sont restés altérés après 7 mois en milieu non contaminé, malgré des teneurs en cadmium dans les tissus des organismes similaires à la condition témoin (Šrut et al., 2017).

L'altération des marques épigénétiques induite par une perturbation environnementale chez les organismes exposés peut parfois se transmettre à leur descendance et participer à l'émergence ou à la persistance d'effets physiologiques particuliers chez les générations successives (Burggren, 2015). Les mécanismes moléculaires associés à ce transfert ne sont généralement pas compris (Bonduriansky et Day, 2009; Youngson et Whitelaw, 2008).

Chez les animaux multicellulaires parthénogénétiques ou sexués, les cellules de la lignée germinale présentent une forte sensibilité aux perturbations environnementales du fait du remodelage important des marques épigénétiques au cours de la gamétogénèse (Feil et Fraga, 2012 ; Norouzitallab et al., 2019). Les cellules germinales primordiales peuvent

également présenter des altérations épigénétiques formées dans les cellules embryonnaires dont elles sont issues suite à une exposition très précoce (avant la gamétogénèse). Les gamètes matures peuvent ainsi présenter des altérations épigénétiques induites par une exposition antérieure, au cours du développement embryonnaire précoce ou de la gamétogénèse. Si ces altérations parviennent à se maintenir au sein des lignées germinales des générations successives, elles s'apparentent à un message toxique, transmis de générations en générations. Par exemple, chez l'huître du pacifique *Crassostrea gigas*, Bachère et al. (2017) ont montré que des expositions transitoires de géniteurs à des concentrations environnementales de diuron (de 0,2 à 0,48 µg/L) au cours de la gamétogénèse induisent chez les descendants F1 (exposés lors de la gamétogénèse parentale) des altérations des profils transcriptomiques, une augmentation du niveau global de méthylation de l'ADN et une réduction des taux de survie et de croissance pendant leur première année de vie. Cette augmentation du niveau de méthylation chez les F1 est susceptible d'avoir été transmise de la génération F0 à la génération F1 puisqu'une hyperméthylation de l'ADN des spermatozoïdes des géniteurs a été observée (Bachère et al., 2017).

Lorsque les altérations épigénétiques sont déjà présentes chez l'organisme parent (F0) et se transmettent jusqu'à la génération non exposée, on parle d'héritage épigénétique transgénérationel (Youngson et Whitelaw, 2008 ; Norouzitallab et al., 2019). Quelques exemples de ce type d'héritage chez les poissons et les invertébrés existent dans la littérature. Kamstra et al. (2017) ont par exemple exposé des poissons zèbres *Danio rerio* au cours des six jours suivant la fécondation à la 5-azacytidine, inhibiteur des DNMT1 ou au mono(2-éthylhyexyl) phtalate (MEHP). Dix loci ont présenté une différence de méthylation supérieure à 20% par rapport à la condition témoin chez les larves mâles exposées à l'une ou l'autre des substances étudiées. Suite à l'exposition à la 5-azacytidine ou au MEHP, ces différences de méthylation se sont maintenues pour six et deux d'entre eux chez les larves F1 et F2 respectivement (Kamstra et al., 2017). En plus de la persistance de ces altérations de méthylation de l'ADN, une taille réduite des larves a été observée chez les F0, F1 et F2 suite à l'exposition de la 5-azacytidine (Kamstra et al., 2017). Chez la première génération exposée de puce d'eau *Daphnia magna* (F0), la vinclozoline et la 5-azacytidine ont induit une hypométhylation globale de l'ADN. L'effet de la vinclozoline ne s'est pas propagé à travers les générations. En revanche, une hypométhylation globale de l'ADN a été observée chez les deux générations issues de l'exposition parentale à la 5-azacytidine, la F1 (exposée lors de la

gamétogénèse de la F0 et au stade embryon) et la F2 (exposée lors de la gamétogénèse de la F1) (Vandegehuchte et al., 2010a). Il est possible que ces effets aient été hérités par transmission épigénétique gamétique, mais il aurait fallu observer des changements similaires chez les descendants F3 (jamais exposés, même indirectement) pour en être certain (Mirbahai et Chipman, 2014). Contrairement à Vandegehuchte et al. (2010a), Trijau et al. (2018) sont parvenus à démontrer une transmission épigénétique gamétique chez *Daphnia magna* après l'exposition chronique de la génération parentale (F0) à des rayonnements γ. En effet, des altérations de méthylation de l'ADN ont été retrouvées chez la génération F0 (exposée du stade embryonnaire jusqu'à la sortie des nouveau-nés F1), leurs descendants F2 (exposés lors de la gamétogénèse des embryons F1) et F3 (jamais exposés). Des changements de méthylation communs aux générations F0, F2 et F3 (deux sites hyperméthylés par rapport au témoin) ont été observés. Ces changements sont susceptibles d'avoir été induits dans la lignée germinale des parents (F0) et transmis par le biais des gamètes aux descendants. De plus, un nombre important de sites présentant des altérations de méthylation identiques, a été observé chez les F2 et les F3, ce qui suggère que les changements de méthylation induits dans les gamètes des F1 (futurs F2) durant l'irradiation ont pu être transmis aux générations F2 et F3 (Trijau et al., 2018).

L'existence de tels héritages épigénétiques par les gamètes suppose que les altérations épigénétiques résistent à l'importante restructuration des cellules et de la chromatine qui a lieu au cours de la gamétogénèse et de l'embryogénèse (Mirbahai et Chipman, 2014). De plus, le mécanisme par lequel les profils de méthylation altérés de l'ADN sont hérités par mitose est connu (réplication des patrons de méthylation par les DNMT1, voir I.2.3.1). Cependant, la présence de ce mécanisme d'héritabilité au cours de la méiose n'a pas été démontré (Norouzitallab et al., 2019).

Des mécanismes de transmission des altérations des marques épigénétiques non gamétiques, à l'origine d'effets inter et transgénérationnels (*i.e.* niveaux de stress importants et peu de soins prodigués aux progénitures) ont été mis en évidence chez le rat (Youngson et Whitelaw, 2008 ; Heard et Martienssen, 2014). Le manque de soin de la part de mères stressées induit une cascade d'événements moléculaires chez leurs progénitures âgées de moins d'une semaine qui aboutit à une augmentation de la méthylation de l'ADN, une diminution de l'acétylation des histones ainsi qu'une diminution de l'expression du gène codant pour le récepteur aux glucocorticoïdes du système nerveux central (Youngson et Whitelaw, 2008 ;

Heard et Martienssen, 2014). Ces différents changements persistent jusqu'à l'âge adulte et augmentent les niveaux de stress des individus. Les rates deviennent à leur tour des mères stressées et prodiguent ainsi peu de soins à leurs petits. Elles perpétuent ainsi le même phénotype chez leur progéniture sans qu'il y ait transmission des altérations épigénétiques par le biais des gamètes (Youngson et Whitelaw, 2008 ; Heard et Martienssen, 2014). Bien que ces études ne s'intègrent pas dans la problématique de l'implication des mécanismes épigénétiques dans les réponses au stress chimique, elles montrent que l'héritage des modifications épigénétiques ne passe pas systématiquement par la lignée germinale.

I.1.2.3. Transmission de changements génétiques

Bien que la majorité des études sur les mécanismes moléculaires associés aux effets multigénérationnels porte sur les marques épigénétiques, quelques études se sont intéressées à la transmission potentielle entre les générations d'un matériel génétique endommagé par une exposition à des perturbations environnementales (Plaire et al., 2013 ; Sukumaran et Grant, 2013 ; Barranger et al., 2014, 2015 ; Hurem et al., 2017 ; Duan et al., 2018). Chez les organismes sexués, un tel transfert des dommages à l'ADN des parents à leurs descendants n'est possible que si le succès de fécondation n'est pas affecté par l'exposition. Il faut également qu'une partie des dommages primaires à l'ADN échappent aux différents mécanismes de réparation. Malgré ces obstacles, l'existence d'une transmission de dommages à l'ADN irréversibles a été suggérée par plusieurs auteurs. Chez l'huître *Crassostrea gigas*, Barranger et al. (2014) ont par exemple mis en évidence une transmission possible de dommages à l'ADN irréversibles des géniteurs, exposés au cours de la gamétogénèse au diuron, à leur progéniture. En effet, des dommages primaires à l'ADN (précoces et réversibles) ont été observés dans les gamètes des géniteurs exposés, tandis que des cassures de l'ADN irréversibles et une diminution de la teneur en ADN (hypodiploïdie) ont été constatées chez les naissains F1. Des effets négatifs sur le développement (diminution du taux d'éclosion, augmentation du taux d'anomalie des larves et métamorphose retardée) et la croissance de ces organismes ont également été observés (Barranger et al., 2014). De même, Brown et al. (2008) ont démontré chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* qu'une exposition de mâles à l'éthynylestradiol (EE2) pendant 50 jours a engendré une augmentation des spermatozoïdes aneuploïdes chez les organismes exposés ainsi que des niveaux élevés d'embryons F1 aneuploïdes et une survie embryonnaire diminuée chez ces organismes. La probabilité de propagation de ces changements génétiques irréversibles à travers les générations, voire au sein de la population, dépend de l'ampleur de leurs

conséquences sur la fitness des organismes. Dans les deux études présentées ci-dessus par exemple, la survie et la croissance des descendants F1 semblent fortement impactées, ce qui pourrait diminuer leur succès reproducteur.

I.1.2.4. Changements d'allocation d'énergie

De manière schématique, l'énergie dont dispose un organisme peut être allouée aux processus assurant sa survie, son développement, sa croissance et sa reproduction (Kooijman, 2000). Les changements environnementaux sont susceptibles de modifier la distribution de l'énergie entre ces différentes fonctions. Ces concepts ont été formalisés en écotoxicologie avec la théorie DEB (Dynamic Energy Budget) proposée par Kooijman, 2000. Les ressources énergétiques dédiées à la croissance, au développement ou à la reproduction peuvent être diminuées au profit des processus de maintenance de l'organisme exposé (Fernández-González et al., 2011 ; Andrewartha et Burggren, 2012 ; Scanes et al., 2018). Par exemple Andrewartha et Burggren (2012) ont observé une réduction de la masse corporelle et des performances reproductives chez *Daphnia magna* exposée à un stress hypoxique pendant les 6 premiers jours de développement. Les auteurs ont suggéré que ces effets pouvaient résulter d'une baisse de l'énergie investie dans la croissance et la reproduction au profit de celle allouée à la maintenance des organismes. Au contraire, une augmentation de l'investissement énergétique dans la reproduction au détriment des fonctions de maintenance a été observée chez des daphnies exposées à la sertraline (Minguez et al., 2015).

La qualité et la quantité des ressources énergétiques investies par les parents dans la reproduction peuvent avoir une influence et induire des effets différés chez leurs descendants (Bonduriansky et Day, 2009 ; Scanes et al., 2018). Les mères soumises à un stress au cours de la gamétogénèse peuvent produire, dans certains cas, des œufs de plus grande taille, permettant aux embryons ou aux larves de disposer de quantités d'énergie plus importantes (Marshall et Uller, 2007). Dans d'autres cas, le stress induit par une exposition à des métaux par exemple peut engendrer une diminution de l'énergie investie dans la production des œufs, ce qui peut conduire à des juvéniles plus petits (Alquezar et al., 2006 ; Marshall et Uller, 2007 ; Scanes et al., 2018). Par exemple Scanes et al. (2018) ont observé une réduction significative de la taille et de la teneur totale en lipides et en acylglycérides des œufs F1 produits par les parents exposés au cuivre et à des pressions partielles de gaz carbonique (pCO_2) élevées. La manière dont l'énergie investie dans la reproduction est répartie parmi les descendants peut également

influencer leur fitness. Hammers-Wirtz et Ratte (2000) ont par exemple observé que la même quantité de biomasse a été investie dans la reproduction des daphnies exposées au dispersogen® A par rapport aux témoins, mais que cette énergie a été répartie dans un nombre plus important d'œufs, disposant ainsi chacun de moins d'énergie.

La question des changements d'allocation d'énergie a essentiellement été discutée dans le cadre d'expositions chroniques (sur une génération) (Hammers-Wirtz et Ratte, 2000 ; Minguez et al., 2015) ou d'expositions multigénérationnelles (Fernández-González et al., 2011 ; Massarin et al., 2011 ; Biron et al., 2012 ; Vigneron et al., 2015). Fernández-González et al., 2011 ont par exemple suggéré que les réponses observées au cours des générations successives de daphnies exposées au cuivre pouvaient s'expliquer par un investissement énergétique important dans les processus de détoxification et de réparation des parents au détriment de la qualité des descendants. Ces derniers, soumis à la même exposition que leurs parents, doivent ainsi faire face à davantage de dépenses énergétiques pour assurer leur maintien et disposent de peu d'énergie pour se développer et se reproduire (Fernández-González et al., 2011).

I.1.2.5. Transfert de facteurs biologiques

L'environnement parental peut affecter le phénotype des descendants et induire ainsi de possibles effets différés à travers le transfert de facteurs biologiques tels que les hormones, les protéines, les lipides et les ARN de la membrane ou du cytoplasme des gamètes (Bonduriansky et Day, 2009).

Les mères exposées à des pathogènes peuvent par exemple imprégner leurs œufs de peptides provenant de leur système immunitaire. Ces peptides, ainsi transmis aux descendants, peuvent induire chez ces derniers une résistance contre une exposition ultérieure à des agents pathogènes (Bonduriansky et Day, 2009). Par exemple, chez le bourdon *Bombus terrestris*, une activité antibactérienne élevée associée au transfert de facteurs immunitaires par la biais des œufs a été observée chez les descendants de mères exposées antérieurement à une souche de *Arthrobacter globiformis* (Sadd et Schmid-Hempel, 2007).

Des facteurs cytoplasmiques tels que des ARN messagers et des protéines comme les métallothionéines provenant de parents exposés à un stress peuvent également être transférés aux descendants par le biais des gamètes. Par exemple, suite à l'exposition par injection intrapéritonéale au cadmium de femelles tilapia *Oreochromis mossambicus*, Lin et al. (2000) ont observé des teneurs élevées en ARN messagers codant pour les métallothionéines dans les

ovocytes et dans les larves F1 nouvellement écloses. Une sensibilité au cadmium moins importante a également été observée chez les descendants de mères exposées à la molécule, ce qui suggère une implication possible d'un transfert des ARN messagers maternels aux descendants (Lin et al., 2000).

Parmi les ARN, les petits ARN non codants semblent également avoir une influence importante sur le phénotype des descendants. L'injection de tels ARN régulateurs provenant des spermatozoïdes de souris mâles stressées ou obèses suite à une alimentation riche en matières grasses dans des zygotes engendre des descendants respectivement stressés ou présentant des troubles métaboliques (Barouki et al., 2018). Bien que les mécanismes impliqués soient encore incertains, les petits ARN transmis par le biais des spermatozoïdes sont les porteurs probables d'une mémoire épigénétique paternelle (Barouki et al., 2018).

Outre la transmission de molécules biologiques par le biais des gamètes, des transferts depuis des cellules somatiques des parents aux descendants peuvent également induire des effets différés chez ces derniers (Bonduriansky et Day, 2009). Par exemple chez le criquet *Schistocerca gregaria*, les femelles soumises à une densité de peuplement élevée sécrètent au niveau de leur oviducte une substance qui induit la morphologie et le comportement grégaire chez les descendants (Simpson et Miller, 2007).

I.1.3. Conséquences populationnelles

I.1.3.1. Impacts démographiques

À l'échelle de l'individu, la valeur sélective ou fitness peut se définir comme la capacité des individus à générer une descendance viable et fertile, transmettant ainsi leur patrimoine génétique à la génération suivante. Elle dépend principalement de la reproduction et de la capacité à résister aux conditions du milieu (survie et développement) de l'organisme. Les effets différés intra, inter ou transgénérationnels sur les traits d'histoire de vie d'une espèce peuvent donc avoir une influence importante sur la fitness des individus. Debecker et al. (2017) ont par exemple suggéré que la réduction de la longévité et de la taille à l'émergence des demoiselles *Ischnura elegans* exposées au stade larvaire à du zinc pourrait conduire à une diminution importante de leur fitness. En effet, la taille est positivement corrélée à la fécondité des demoiselles et avec la baisse de longévité observée, les femelles sont susceptibles de mourir avant d'avoir atteint la maturité sexuelle (Debecker et al., 2017). Chez *Daphnia magna*, Hammers-Wirtz et Ratte (2000) ont observé une diminution importante de la fitness des

descendants F1 de mères exposées au dispersogen® A (surfactant anionique). En effet, la taille des organismes F1, ainsi que le nombre et le taux de survie des descendants F2 produits sont réduits par rapport à la condition témoin (Hammers-Wirtz et Ratte, 2000). Par l'influence possible des effets différés sur la fitness des individus, les conséquences de ces derniers sur la dynamique des populations peuvent être importantes (Beckerman et al., 2002 ; O'Connor et Cooke, 2015).

Cependant, les impacts des effets différés sur la démographie de la population ne sont pas nécessairement négatifs. Les modifications multigénérationnelles des traits d'histoire de vie peuvent par exemple participer à la régulation démographique, permettant le maintien de la population suite à des changements environnementaux. LeBlanc et al. (2013) suggèrent par exemple un rôle possible de l'activation de la voie de signalisation de l'hormone juvénile méthyle farnésoate dans la régulation des populations de daphnies soumises à un stress chimique ou à un épuisement progressif des ressources alimentaires du fait d'une augmentation de la densité de la population.

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente sur les changements d'allocation d'énergie (voir I.1.2.4), des compromis peuvent exister entre les traits d'histoire de vie au cours de la vie des individus ou d'une génération à l'autre. Ces compromis dépendent fortement de l'histoire de vie de l'espèce et sont susceptibles de modifier les conséquences démographiques de changements environnementaux. Prud'homme et al. (2017) ont par exemple suggéré que le faible impact observé sur la démographie de la population de moustiques *Aedes aegypti* issus de mères exposées à de l'ibuprofène ou à du benzo[a]pyrène pourrait résulter d'une compensation de la forte mortalité observée au cours du développement par la durée d'émergence réduite et la proportion de femelles plus importante.

I.1.3.2. Acquisition de tolérance

Une population tolérante peut être définie comme une population qui, du fait d'une exposition à une perturbation environnementale, présente une baisse de sensibilité vis-à-vis d'un contaminant ou bien d'autres perturbations environnementales comme la prédation, par rapport à des populations naïves de la même espèce n'ayant pas été exposées. Cette diminution de la sensibilité biologique peut apparaître de manière désynchronisée de l'exposition qui en est la cause. Elle s'apparente alors à un effet différé.

À l'échelle individuelle, la tolérance acquise au cours du développement de l'organisme par acclimatation physiologique en réponse à des conditions environnementales peut se maintenir ou apparaître plus tardivement, voire au-delà de l'arrêt de l'exposition (Piersma et Drent, 2003). Plautz et Salice, 2013 ont par exemple mis en évidence chez l'escargot d'eau douce *Physa pomilia*, une tolérance au cadmium accrue des juvéniles exposés au cours de leur développement embryonnaire par rapport aux juvéniles non exposés antérieurement.

La tolérance d'une population peut également être acquise par la transmission du phénotype parental tolérant ou bien de l'environnement parental aux descendants *via* des mécanismes non génétiques (Plaire et al., 2013 ; Plautz et Salice, 2013 ; Kimberly et Salice, 2015 ; Norouzitallab et al., 2015, 2016 ; Reátegui-Zirena et al., 2017 ; Vigneron et al., 2019). On parle alors d'acclimatation transgénérationnelle (Uller, 2008). Vigneron et al., (2019) ont par exemple démontré que la tolérance au cadmium observée chez une population de *Gammarus fossarum* provenant d'un ruisseau contaminé de manière naturelle par du cadmium résulte d'une plasticité transgénérationnelle induite par l'exposition parentale. Par ces phénomènes d'acclimatation transgénérationnelle, des individus peuvent être tolérants à une perturbation environnementale sans y avoir été exposés de manière directe. Plautz et Salice, 2013 ont par exemple montré chez le gastéropode *Physa pomilia* que les juvéniles issus de parents exposés pendant 7 jours à 20 µg/L de cadmium ont une tolérance au cadmium plus importante que les organismes témoins. De même, Agrawal et al., 1999 ont observé la persistance de changements morphologiques permettant aux daphnies de se défendre chez les descendants F1 d'organismes exposés aux kairomones du prédateur *Chaoborus*.

I.1.3.3. Résilience de la population

Les effets différés peuvent avoir un impact important sur la résilience de la population, c'est-à-dire sur sa capacité à se rétablir structurellement et fonctionnellement après la disparition de la perturbation. La marée noire de 1989 sur les côtes de l'Alaska provoquée par l'échouage du pétrolier Exxon Valdez a eu par exemple d'importantes conséquences à long-terme (Peterson, 2003). Certains auteurs ont montré l'implication possible d'effets différés intragénérationnels conduisant au lent rétablissement des populations. Heintz et al., (2000) a par exemple mis en évidence, chez les poissons *Oncorhynchus gorbuscha* exposés à de faibles concentrations en HAP (simulant la marée noire de Exxon Valdez), des effets différés sur la croissance au stade juvénile et la survie à la maturité.

Un certain nombre d'auteurs ont étudié le temps de rétablissement des populations suite à une exposition à très court-terme (pulse) de pesticides (Kattwinkel et al., 2015). Des temps variables, en fonction des modalités d'exposition et de l'espèce considérée ont été observés (Kattwinkel et al., 2015). Par exemple, suite à l'exposition par pulse au thiaclopride (3,2 et 100 µg/L) d'un mésocosme simulant une rivière, Beketov et al., 2008 ont constaté un temps de récupération chez les espèces possédant un cycle de vie court et produisant plusieurs générations dans l'année (*e.g.* chironome) inférieur à 10 semaines. En revanche, les populations de taxons avec une durée de vie plus longue et une seule génération dans l'année (*e.g.* le plécoptère *Nemoura cinerea*) ne s'étaient toujours pas rétablies après les 7 mois d'expérimentation.

I.1.3.4. Capacité de la population à faire face à de nouveaux changements environnementaux

Les effets différés peuvent influencer la capacité de la population à faire face à de nouveaux changements environnementaux (Kimberly et Salice, 2015 ; Vigneron et al., 2015, 2019 ; Zheng et al., 2017). Une exposition au cours d'une période de vie antérieure ou chez les ascendants peut augmenter fortement la vulnérabilité des organismes à une nouvelle perturbation de l'environnement. Vigneron et al. (2015) ont par exemple mis en évidence des coûts, associés à la tolérance au cadmium d'une population naturelle de *Gammarus fossarum* acquise par acclimatation transgénérationnelle, susceptibles d'augmenter la vulnérabilité de la population face à de nouvelles conditions environnementales. En effet, suite au transfert de ces organismes en milieu non contaminé, les auteurs ont observé une inhibition alimentaire, paramètre physiologique qui, chez les gammares, peut avoir des conséquences négatives importantes sur les traits d'histoire de vie et la dynamique de population (Vigneron et al., 2015). De plus, les adultes de cette population présentaient une taille moyenne réduite par rapport à celle mesurée chez des populations de référence (Vigneron et al., 2015).

Si les effets différés sont susceptibles d'augmenter la vulnérabilité des organismes à des changements environnementaux, ils peuvent également induire une tolérance à d'autres perturbations environnementales. Zheng et al. (2017) ont par exemple démontré chez le poisson zèbre *Danio rerio* qu'une préexposition à un stress thermique induit une augmentation de l'expression des gènes associés aux défenses immunitaires et anti-oxydantes, ce qui permet aux organismes de répondre rapidement à l'exposition au cadmium à laquelle ils sont soumis juste après. De même, chez le crustacé *Artemia*, Norouzitallab et al. (2014) ont montré qu'une

exposition parentale au stade larvaire à un stress thermique engendre chez les générations successives F1-F3 une résistance accrue au pathogène *Vibrio campbellii* et au stress thermique.

Concernant les contaminations, la capacité d'une population à faire face à de nouvelles perturbations environnementales peut varier en fonction des concentrations d'exposition en contaminant. Kimberly et Salice (2015) ont par exemple montré chez *Daphnia magna* que les organismes F14 issus de parents exposés (F0-F13) à 2 µg/L de cadmium sont plus tolérants au stress thermique et à de fortes teneurs en cadmium que ceux issus de l'exposition des parents à 0,5 µg/L.

Bien que l'ampleur de l'influence des effets différés et des mécanismes sous-jacents sur les réponses populationnelles ne soit pas encore bien établie, les divers exemples décrits ci-dessus montrent que les effets différés peuvent avoir des conséquences populationnelles non négligeables. Dans le cadre de l'évaluation des risques, mieux connaître les effets différés et les processus associés pourrait ainsi aider à la compréhension des réponses des populations au stress.

I.2. L'épigénétique en écotoxicologie animale

I.2.1. L'épigénétique, un terme aux multiples définitions

À l'origine, l'épigénétique de Conrad Waddington est l'étude des mécanismes qui établissent les relations causales entre génotype et phénotype au cours du développement. L'épigénotype correspond à l'ensemble des processus développementaux qui se trouvent entre le génotype et le phénotype (Waddington, 1942). En 1958, David Nanney redéfinit l'épigénétique en distinguant deux grands systèmes de contrôle du fonctionnement cellulaire : le système génétique qui permet la synthèse d'un produit particulier (en général une protéine) par le mécanisme de transcription et le système épigénétique qui contrôle le niveau de synthèse de ce produit dans un tissu et à un moment donnés. Il souligne également la stabilité et le maintien au cours des divisions cellulaires de certains patrons d'expression (Nanney, 1958). À partir des années 60, la découverte de l'acétylation et de la méthylation des histones (Allfrey et al., 1964), de la méthylation de l'ADN (Riggs, 1975 ; Holliday et Pugh, 1975) et de leur rôle dans l'expression des gènes ont fait émerger le sens moderne donné à l'épigénétique. La définition d'Arthur Riggs de 1996, la plus couramment utilisée aujourd'hui, décrit

l'épigénétique comme l'étude des modifications du fonctionnement des gènes, héritables par mitose et/ou méiose, et qui ne peuvent être expliquées par des changements de séquence de l'ADN (Villota-Salazar et al., 2016). Si cette définition fait globalement consensus, la question de savoir si l'épigénétique doit intégrer une notion d'hérédité est encore en discussion. En effet, toutes les modifications épigénétiques ne sont pas héritables par mitose et/ou méiose et certaines sont seulement transitoires (Mann, 2014 ; Villota-Salazar et al., 2016). Certains auteurs ont proposé des définitions plus restrictives. Deans et Maggert (2015) définissent l'épigénétique comme l'étude des phénomènes et des mécanismes qui provoquent des modifications héréditaires de l'expression des gènes liées au chromosome et qui ne dépendent pas de modifications de la séquence de l'ADN. Une définition également centrée sur les chromosomes et les gènes a été proposée par Bird (2007) qui considère l'épigénétique comme l'ajustement structurel des régions chromosomiques qui permet d'enregistrer, communiquer ou perpétuer des états d'activité altérés. Dans ces deux définitions, les phénomènes comme les circuits de rétroaction, l'héritage des conformations structurelles (*e.g.* prions), la mémoire cytoplasmique ou encore les modifications temporaires de la chromatine sont exclues de la notion d'épigénétique (Villota-Salazar et al., 2016). D'autres auteurs, au contraire, souhaitent inclure ces processus et supprimer la notion d'hérédité tels que Mann (2014) qui propose l'utilisation d'un autre terme (« memigenetics » en anglais) lorsqu'il y a hérédité du statut épigénétique et Villota-Salazar et al. (2016) qui considèrent l'épigénétique comme l'étude des changements temporaires et permanents (héritables) de l'expression des gènes, non causés par des changements de séquence de l'ADN.

Depuis ces 10 dernières années, l'intérêt des scientifiques pour l'épigénétique s'est considérablement accru avec plus de 17 000 articles publiés sur le sujet en 2013, contre 2500 en 2006 (Deans et Maggert, 2015).

Aujourd'hui, d'autres champs disciplinaires que celui de la recherche biomédicale s'intéressent au domaine de l'épigénétique telles que (i) la biologie évolutive, qui interroge l'implication des mécanismes épigénétiques dans l'évolution des populations et leur adaptation au milieu (Uller, 2008 ; Hu et Barrett, 2017) (ii) l'écologie, qui cherche à comprendre les mécanismes sur lesquels reposent les variations phénotypiques naturelles et les réponses des organismes à des changements environnementaux (Bossdorf et al., 2008) ; et (iii) l'écotoxicologie, qui questionne le rôle des processus épigénétiques dans l'émergence des effets à long termes des contaminants au sein des populations et l'éventuelle utilisation des marques

épigénétiques dans le biomonitoring (Vandegehuchte et Janssen, 2011 ; Head et al., 2012 ; Brander et al., 2017 ; Chatterjee et al., 2018 ; Eirin-Lopez et Putnam, 2019). Toutefois, du fait de l'évolution de l'usage du terme « épigénétique » depuis sa création et de son ouverture à des domaines scientifiques très variés, il n'existe aujourd'hui pas de définition universelle (Morange, 2014 ; Dean et Maggert, 2015).

En fonction de la discipline dans laquelle l'étude s'inscrit, les éléments de définition du terme « épigénétique » diffèrent (Ho et Burggren, 2010). De plus, beaucoup d'études sont répertoriées dans le champ de l'épigénétique alors que les deux critères principaux de la définition communément admise d'Arthur Riggs de 1996 (indépendance vis-à-vis de la séquence de l'ADN et héritabilité), ne sont pas vérifiés (Heard et Martienssen, 2014 ; Deans et Maggert, 2015 ; Hu et Barrett, 2017). En fait, la plupart des travaux répertoriés comme épigénétiques chez les eucaryotes concernent l'étude des marques épigénétiques telles que les modifications des histones, la méthylation de l'ADN et les ARN non codants (Ho et Burggren, 2010). L'usage courant du terme tend donc à lui faire désigner l'ensemble des études portant sur ces marques épigénétiques. Dans cette thèse, le mot épigénétique est utilisé dans ce sens.

I.2.2. Intérêt de l'épigénétique en écotoxicologie animale

La programmation épigénétique repose chez les eucaryotes sur l'interaction de marques épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, les modifications post-traductionnelles par les ARN non codants et le remodelage de la chromatine. Ces processus et les composants sur lesquels ils agissent constituent l'épigénome (Norouzitallab et al., 2019). L'épigénome est une interface dynamique entre le génome qui est relativement stable et l'environnement changeant de la cellule qui peut fortement influencer les marques épigénétiques (Faulk et Dolinoy, 2011 ; Feil et Fraga, 2012 ; Best et al., 2018 ; Norouzitallab et al., 2019). A l'instar de la toxicologie humaine, dans certaines études écotoxicologiques, les modifications épigénétiques induites par l'environnement ont été associées, voire corrélées à des changements phénotypiques chez les organismes exposés. Ces phénotypes, en plus de persister au cours de la vie des organismes exposés, peuvent se transmettre aux générations futures par le biais de mécanismes d'hérédité épigénétique (Faulk et Dolinoy, 2011 ; Feil et Fraga, 2012 ; Best et al., 2018 ; Norouzitallab et al., 2019). Les changements de motifs épigénétiques peuvent ainsi avoir des effets sur les organismes et les

populations, ce qui rend leur étude pertinente pour l'écotoxicologie (Head et al., 2012 ; Hu et Barrett, 2017 ; Eirin-Lopez et Putnam, 2019).

L'étude des marques épigénétiques permettent également de mieux comprendre le lien entre exposition et effet(s). L'exposition à certaines substances chimiques au cours du développement peut entraîner des modifications épigénétiques dont les effets s'exprimeront plus tardivement, ce qui s'inscrit dans la problématique des effets différés des contaminants. De plus, par leur caractère potentiellement héritable, la transmission de modifications épigénétiques peut aboutir à l'émergence d'effets différés chez les générations futures sans que celles-ci aient été exposées. Du fait de ce décalage possible entre les signaux environnementaux et les effets de cette exposition, il est très difficile d'identifier la source d'exposition et de prédire les effets d'une substance ou d'un cocktail de contaminants sur du long terme. Intégrer les approches épigénétiques aux études écotoxicologiques permettrait de mieux incorporer l'intervalle de temps entre l'exposition et l'effet (Head et al., 2012 ; Athanasio et al., 2018).

De plus, des études suggèrent un rôle des mécanismes épigénétiques dans les phénomènes d'adaptation rapide aux contaminations par acclimatation physiologique ou par acclimatation transgénérationnelle (voir I.2.3.4). L'étude des mécanismes épigénétiques en écotoxicologie offre ainsi la possibilité de mieux comprendre comment certaines populations sont capables de se maintenir dans des milieux très contaminés.

Dans le cadre de l'évaluation des risques, et notamment du biomonitoring, des marqueurs génériques, tels que les niveaux globaux de méthylation de l'ADN, sont proposés par certains auteurs comme indicateurs du stress accumulé par les organismes au cours de leur vie (Head et al., 2012). Les marques épigénétiques de gènes spécifiques sont également susceptibles de servir de biomarqueurs d'exposition ou d'effet pour identifier des agents toxiques particuliers et pourraient être utilisées comme outils d'alerte précoce de la contamination (Head et al., 2012 ; Suarez-Ulloa et al., 2015 ; Chatterjee et al., 2018).

Certains des points justifiant la pertinence de l'épigénétique en écotoxicologie présentés ci-dessus, seront illustrés dans la partie suivante qui porte sur la méthylation des cytosines de l'ADN, marque épigénétique étudiée dans ce travail de thèse et la plus explorée jusqu'à présent.

I.2.3. Exemple de marque épigénétique : la méthylation des cytosines de l'ADN

I.2.3.1. Mécanismes impliqués et variations entre espèces

La méthylation des cytosines de l'ADN est un mécanisme présent chez de nombreux animaux (Cridge et al., 2015). Elle désigne le transfert d'un groupement méthyle en cinquième position de la base azotée cytosine formant ainsi la 5-méthylcytosine (5mC) (Figure I - 2).

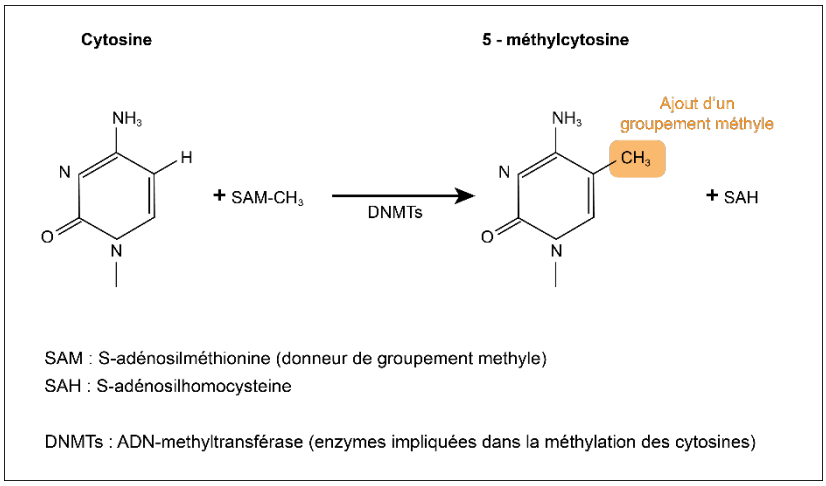


Figure I - 2 : Mécanisme chimique de la méthylation des cytosines

La méthylation de l'ADN est catalysée par l'action d'une famille d'enzymes, les ADN méthyltransférases (DNMTs), qui se divise elle-même en deux catégories conservées au cours de l'évolution (DNMT1 et DNMT3) (Goll et Bestor, 2005). Sur la base de critères d'homologie de séquences, cette famille comprenait également les DNMT2, mais leur activité dans la méthylation de l'ADN s'est avérée faible. Ces dernières semblent davantage impliquées dans la méthylation des ARN de transfert (Jeltsch et al., 2017). Les DNMT1 et DNMT3 interviennent pour la mise en place des patrons de méthylation et leur maintien lors des réplications de la molécule d'ADN. Les patrons de méthylation sont établis par les *de novo* méthyltransférases qui sont au nombre de trois chez les mammifères (DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L) et six chez le poisson zèbre (DNMT3/4/5/6/7/8) (Campos et al., 2012 ; Cheng, 2014). Les patrons de méthylation sont ensuite transmis au cours des divisions cellulaires, après la réplication de l'ADN, par la DNMT de maintenance (DNMT1). Spécifique à l'ADN hémi-méthylé, cette enzyme méthyle le brin « fils » en copiant le patron de méthylation présent sur le brin «parental » (Jurkowska et al., 2011). Cette distinction classique des fonctions des protéines DNMT1 et DNMT3 n'est pas toujours vérifiée, des études ayant montré que dans certains cas leurs

fonctions peuvent se confondre (Kim, 2002 ; Arand et al., 2012). La présence d'une ou plusieurs copies de DNMT1 et DNMT3 est généralement considérée comme nécessaire pour le fonctionnement du système de méthylation. Cependant, des données sur les séquences du génome et les cartes de la méthylation de l'ADN des insectes suggèrent des exceptions potentielles comme le lépidoptère *Bombyx mori* et *Drosophila melanogaster* (Glastad et al., 2011 ; Panikar et al., 2017).

La déméthylation de l'ADN semble reposer sur deux mécanismes, l'un passif et l'autre actif. La déméthylation passive correspond à une perte progressive des groupements méthyles à chaque division cellulaire induite par un déficit de maintenance de la méthylation lors de la réplication. En revanche, la déméthylation active peut se produire indépendamment de la réplication de l'ADN. Elle semble reposer sur l'activité de trois familles d'enzymes agissant en synergie (Bhutani et al., 2011 ; Best et al., 2018) :

-La famille TET (ten-eleven-translocation) qui catalyse la transformation des méthylcytosines (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), puis en 5-formyl-cytosine et en 5-carboxylcytosine,

-La famille AID/APOBEC, qui désamine les bases 5mC ou 5hmC,

-Des ADN thymine glycolases qui activent les systèmes de réparation par excision de base.

Chez les vertébrés, le niveau global de méthylation est élevé : environ 5% des cytosines sont méthylées chez les mammifères et oiseaux, 10% chez les poissons et amphibiens (Field et al., 2004). Les poissons tendent à avoir des pourcentages globaux de méthylation de l'ADN plus élevés que d'autres vertébrés tels que les mammifères ou les oiseaux. Cette différence peut être attribuée à un taux plus important de désamination des cytosines méthylées en 5' en thymine (et donc un pourcentage moins élevé de 5mC) chez les animaux endothermes (Head, 2014). Les pourcentages de méthylation du génome des reptiles couvrent les niveaux trouvés à la fois chez les poissons, les mammifères et les oiseaux (Varriale et Bernardi, 2006a, 2006b). Les auteurs expliquent cette large gamme de valeur par les stratégies thermorégulatrices variables des reptiles. Contrairement aux vertébrés, les niveaux de méthylation de l'ADN détectés chez la plupart des invertébrés sont faibles. Chez le crustacé *Daphnia magna* par exemple, environ 0,5% des cytosines de l'ADN sont méthylées (Asselman et al., 2015). Des valeurs similaires ont été observées chez le crustacé *Artemia* (0,4%) (Norouzitallab et al., 2014).

Chez d'autres invertébrés comme le mollusque *Crassostrea gigas* et le nématode *Trichinella spiralis*, respectivement 2% et 1,6% des cytosines totales sont méthylées (Gao et al., 2012 ; Gavery et Roberts, 2013). Les niveaux de méthylation des cytosines de beaucoup d'insectes sont compris entre 0,11 et 1% (Beeler et al., 2014 ; Kronforst et al., 2008 ; Walsh et al., 2010 ; Xiang et al., 2010). Néanmoins, quelques invertébrés ont des niveaux de méthylation élevés tels que la guêpe *Polistes dominulus* (19%), le papillon *Mamestra brassicae* (10%) et le ver *Lumbricus rubellus* (13,5%) (Mandrioli et Volpi, 2003 ; Kronforst et al., 2008 ; Kille et al., 2013). Certaines espèces semblent ne pas présenter de méthylation de l'ADN comme le nématode *Caenorhabditis elegans* (Bird, 2002). D'autres espèces comme *Drosophila melanogaster* ne possède pas les ADN méthyltransférases DNMT1, DNMT3a et DNMT3b et présente de faibles niveaux de méthylation de l'ADN (0,03-0,1%) (Capuano et al., 2014 ; Guan et al., 2019).

Dans le génome des animaux, la méthylation de l'ADN a majoritairement (mais pas systématiquement) lieu au niveau des sites CpG (cytosine-phosphate-guanine) (Glastad et al., 2011). Chez certains invertébrés tels que *Drosophila melanogaster* et *Tribolium castaneum*, les sites CpA, CpT et CpC semblent également être méthylés (Tweedie et al., 1999 ; Lyko et al., 2000 ; Feliciello et al., 2013). Les régions méthylées de l'ADN varient entre taxons. Les régions intergéniques de l'ADN, notamment composées d'éléments répétés et de transposons, sont fortement méthylées chez les vertébrés, mais rarement chez les invertébrés étudiés jusqu'à maintenant (Glastad et al., 2011 ; Wang et al., 2014). Cette hyperméthylation préviendrait l'instabilité chromosomique (gain/perte de chromosomes entiers et remaniements structuraux des chromosomes), les translocations et la disruption génique par réactivation des séquences endoparasites (Greiner, 2012). Les motifs de méthylation des invertébrés se trouvent quant à eux essentiellement dans le corps des gènes (introns et exons). De ce fait, la méthylation du génome des invertébrés est souvent qualifiée de méthylation en mosaïque (Bird, 2002). Chez les vertébrés, la méthylation de l'ADN des sites d'initiation de la transcription et des promoteurs participe généralement à la répression de l'expression des gènes et au maintien de cet état de silence (Vandegehuchte et Janssen, 2011 ; Wang et al., 2014). À l'inverse, à la fois chez les vertébrés et les invertébrés, la méthylation des unités transcriptionnelles (introns et exons) est généralement associée à des niveaux d'expression élevés (Vandegehuchte et Janssen, 2011 ; Sarda et al., 2012 ; Wang et al., 2014). En plus d'être impliquée dans l'expression des gènes, la méthylation des unités transcriptionnelles semble jouer un rôle dans la suppression de l'activité

des promoteurs intragéniques, le contrôle de l'élongation transcriptionnelle et dans la régulation de l'initiation de la traduction et de l'épissage des ARN messagers (Glastad et al., 2011 ; Norouzitallab et al., 2019).

Plusieurs mécanismes de répression de l'expression des gènes au niveau des promoteurs des gènes sont avancés. La méthylation de l'ADN peut inhiber la transcription en empêchant les facteurs de transcription de se lier aux promoteurs. Les sites méthylés peuvent également être spécifiquement reconnus par des protéines capables de se lier à l'ADN méthylé (protéines MBPs, « methyl binding proteins ») (Greiner, 2012). La reconnaissance des sites méthylés par ces protéines déclenche le recrutement des complexes de remodelage de la chromatine qui concourent à l'établissement de l'hétérochromatine. Le niveau de repliement de l'hétérochromatine empêche alors l'expression du gène.

I.2.3.2. Méthylation de l'ADN et développement

La méthylation de l'ADN intervient dans un grand nombre de mécanismes fondamentaux au cours du développement embryonnaire. Elle participe à l'établissement du phénotype de l'individu en jouant un rôle essentiel dans la différenciation et l'identité cellulaire. L'engagement d'une cellule vers un programme particulier est initié par divers *stimuli* (molécules impliquées dans le développement, hormone, changement de température, application de forces physiques, etc.). Cette perception de l'environnement est traduite au sein de la cellule par des voies de signalisation intracellulaires, qui conduisent à l'activation ou la répression de gènes cibles. Cette réponse métabolique est ensuite stabilisée par des modifications épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN. Elles permettent la persistance de cette identité chez les cellules filles issues de la cellule d'origine qui a été confrontée au signal inducteur. Sans ce verrou final, les décisions concernant le développement seraient labiles et la constitution de tissus homogènes impossible[2].

Chez les mammifères, les patrons de méthylation préexistants sont réinitialisés rapidement après la fécondation par une déméthylation quasi complète du génome pour établir la totipotence du zygote. Pendant les premiers stades de développement embryonnaire, lors de la nidation, de nouveaux profils de méthylation de l'ADN sont établis par les enzymes DNMT3s

[2] http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/?sequence=20

et sont maintenus pendant toute la durée de vie de l'organisme dans la lignée somatique (Morgan et al., 2005 ; Head, 2014). Une reprogrammation épigénétique a également lieu au cours du développement de la lignée germinale (gamétogénèse). Les cellules germinales primordiales issues des cellules embryonnaires subissent une nouvelle vague de déméthylation (Morgan et al., 2005 ; Head, 2014). Les nouvelles marques épigénétiques spécifiques sont ensuite rétablies en période fœtale chez les mâles et après la naissance chez les femelles, à chaque cycle d'ovulation[2]. Des régulations épigénétiques se poursuivent tout au long de la gamétogénèse. La maturation des gamètes par exemple, qui a lieu à partir de la puberté, implique d'importants changements épigénétiques (Gold et al., 2018).

Comme chez les mammifères, une reprogrammation épigénétique lors du développement embryonnaire a également été mise en évidence chez d'autres vertébrés tels que le poisson zèbre *Danio rerio* et le killi des mangroves *Kryptolebias marmoratus* (Mhanni et McGowan, 2004 ; MacKay et al., 2007 ; Rai et al., 2008 ; Fang et al., 2013 ; Fellous et al., 2018). En revanche, chez d'autres espèces de poissons comme le médaka *Oryzias latipes*, aucun processus de déméthylation/reméthylation globaux n'a été démontré à l'heure actuelle (Walter et al., 2002).

La méthylation de l'ADN intervient également dans le processus d'empreinte parentale des gènes. L'empreinte parentale est la mise sous silence de l'un des deux allèles parentaux. Chez la souris, le marquage se déroule dans les cellules germinales primordiales lorsqu'il y a reméthylation. Ce dernier est protégé du cycle de déméthylation qui a lieu lors de l'embryogénèse. L'empreinte parentale a également été mise en évidence chez des insectes tels que la drosophile, le diptère *Sciara coprophila* et la cochenille farineuse. Pour le diptère *Sciara coprophila*, le mécanisme à l'origine du processus d'empreinte parentale est l'élimination programmée d'un ou de deux chromosomes X d'origine paternelle en fonction du sexe du descendant. Pour la drosophile et la cochenille farineuse, les mécanismes sous-jacents qui établissent l'empreinte spécifique du parent ne sont pas encore connus (Field et al., 2004 ; Lloyd, 2000). De plus, certains auteurs avancent l'hypothèse d'un rôle particulièrement important de l'empreinte parentale dans la biologie des insectes sociaux tels que certaines espèces d'hyménoptères (Glastad et al., 2011 ; Galbraith et al., 2016).

Chez les invertébrés, aucun cycle de méthylation au cours du développement n'a encore été décrit (Glastad et al., 2011). Néanmoins, la méthylation de l'ADN semble jouer un rôle important dans le développement de ces espèces. Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, le

profil de méthylation de l'ADN évolue au cours du développement et semble essentiel à son bon déroulement, avec notamment un rôle potentiel dans le contrôle des niveaux de transcription des orthologues de gènes *Hox* (Riviere et al., 2013). Li et al. (2019) ont également observé des variations des niveaux globaux de méthylation de l'ADN dans les gonades du pétoncle *Patinopecten yessoensis* au cours de la gamétogénèse et dans les embryons/larves pendant le développement précoce. Les niveaux de méthylation de l'ADN d'un autre mollusque, la pieuvre *Octopus vulgaris*, varient également pendant les premiers stades du développement, lorsque les changements morphologiques majeurs ont lieu (Díaz-Freije et al., 2014 ; García-Fernández et al., 2017). Chez *Drosophila melanogaster*, les méthylomes des trois stades de vie embryon, pupe et adulte sont différents, ce qui suggère un rôle potentiellement important de la méthylation de l'ADN dans le développement (Panikar et al., 2017). La méthylation de l'ADN participe également au développement de certains insectes sociaux hyménoptères tels que l'abeille *Apis mellifera*. Dans les colonies d'abeilles, le devenir en tant que reine ou ouvrière n'est pas déterminé génétiquement, mais en fonction de la nourriture (Vandegehuchte et Janssen, 2011). Les larves nourries à la gelée royale sont amenées à devenir reines, tandis que celles nourries avec un complexe moins nutritif deviennent des ouvrières. Kucharski et al. (2008) ont suggéré que la méthylation de l'ADN pouvait être modifiée par l'alimentation et avoir un rôle important dans le développement et le phénotype de l'abeille adulte.

De plus, la méthylation de l'ADN pourrait être un médiateur clé dans la détermination du sexe par la température au cours de la gamétogénèse de certains poissons et reptiles (Hu et Barrett, 2017). Chez ces espèces, le sex-ratio dépend en effet de l'activité de l'aromatase gonadique Cyp19a, qui convertit de manière irréversible les androgènes en œstrogènes. Les résultats de plusieurs études suggèrent l'implication de changements de méthylation dans la variation de l'expression du gène cyp19a par la température (Hu et Barrett, 2017).

Les modulations du niveau de méthylation de l'ADN ne se restreignent pas aux processus de développement précoce et de la gamétogénèse. La dynamique de la méthylation de l'ADN peut se poursuivre tout au long de la vie des organismes. En effet, les patrons de méthylation évoluent au cours de la croissance et de la sénescence chez de nombreux animaux (Burggren, 2015). De plus, la méthylation de l'ADN participe aux régulations saisonnières du métabolisme qui permettent à certains animaux d'hiberner (Alvarado et al., 2014).

I.2.3.3. Changements environnementaux et méthylation de l'ADN

Les modulations de la méthylation de l'ADN semblent jouer un rôle important dans les réponses des organismes face aux changements environnementaux. L'ensemble des travaux présentés dans cette présente partie porte sur les poissons et les invertébrés.

De nombreuses études montrent que les facteurs environnementaux tels que le régime alimentaire, les changements physico-chimiques (température, pH, etc.), la densité des populations, la prédation, l'exposition à des organismes pathogènes et les polluants chimiques, directement ressentis par un organisme au cours de son cycle de vie, peuvent engendrer l'établissement et la maintenance de modifications épigénétiques (Faulk and Dolinoy, 2011 ; Feil and Fraga, 2012 ; Best et al., 2018 ; Norouzitallab et al., 2019). Ces modulations épigénétiques peuvent conduire à des changements dans l'expression du génome de l'organisme et avoir un effet durable sur la physiologie des organismes.

Campos et al. (2013) ont par exemple mis en évidence l'implication de la méthylation de l'ADN dans l'induction par la température d'une plasticité phénotypique des muscles chez la sole sénégalaise *Solea senegalensis*. Les auteurs ont en effet montré qu'une température d'élevage élevée (21°C) diminuait les niveaux de méthylation des cytosines du promoteur du gène de régulation de la myogenèse (myog) dans les muscles de larves en métamorphose, par rapport à une température d'élevage plus basse (15°C). Une hausse de l'expression du gène myog et une réduction de l'expression des ADN méthyltransférases DNMT1 et DNMT3b ont également été observées chez les larves soumises à 21°C. Pour finir, chez ces mêmes organismes, des fibres musculaires de plus grande taille que celles des organismes élevés à une température plus basse (15°C) ont été constatées. Chez le tunicier *Didemnum vexillum*, après 11 jours d'exposition à un stress thermique (8 jours avec une augmentation progressive de la température jusqu'à 27°C suivie de 3 jours à 27°C), Hawes et al. (2018) ont observé une différence significative dans les profils de méthylation de l'ADN du génome entier par rapport au témoin (maintenu à 19°C) ainsi qu'une croissance diminuée. Chez des fragments clonaux de coraux *Pocillopora damicornis*, une hausse du niveau global de méthylation de l'ADN a été induite par une exposition à de faibles valeurs de pH (mimant l'acidification des océans) durant 6 semaines (Putnam et al., 2016). Une diminution de la croissance et des changements de profils métaboliques ont également été observés, suggérant un lien potentiel entre les changements de

méthylation de l'ADN et la plasticité phénotypique observée. Chez le génotype Iinb1 de *Daphnia magna*, des niveaux globaux de méthylation de l'ADN significativement différents de la condition témoin ont été observés dans trois des quinze conditions testées : nourriture de faible qualité, salinité élevée et prédation par des *Triops* (Asselman et al., 2015). Chez cette même espèce, Asselman et al. (2017) ont constaté des différences de niveaux de méthylation des codons des acides aminés sérine et thréonine et des gènes associés à la synthèse, au transport et à la dégradation des protéines chez les organismes exposés aux cyanobactéries toxiques *Microcystis aeruginosa* par rapport aux témoins. Les auteurs ont proposé un mécanisme reliant ces réponses épigénétiques à la diminution de la reproduction et de la croissance observée par Lemaire et al. (2012) chez des organismes également soumis à des cyanobactéries toxiques. Les organismes exposés investissent plus d'énergie pour faire face aux changements de régulation de protéines et à l'accumulation de protéines anormales induits par l'exposition. Ainsi, l'énergie disponible pour assurer la reproduction et la croissance est moindre, ce qui affecte ces deux traits de fitness. De plus, les modifications de méthylation des cytosines des codons des acides aminés sérine et thréonine pourraient être impliquées dans des mécanismes d'épissage alternatif conduisant à l'expression de protéines alternatives non affectées par les inhibiteurs d'enzyme produits par les cyanobactéries toxiques (Asselman et al., 2017). Cette dernière étude montre que différentes hypothèses mécanistiques peuvent être avancées pour faire le lien entre les variations épigénétiques induites par les stress environnementaux et les modifications phénotypiques observées.

Concernant les polluants chimiques, une large gamme de contaminants, incluant des métaux, des produits industriels classés perturbateurs endocriniens (BPA, œstradiol, distilbène, phtalates et dioxines), des pesticides et biocides, des polluants organiques persistants (POPs) et des nanoparticules, a été identifiée comme pouvant compromettre l'intégrité fonctionnelle de l'ADN en induisant des changements de méthylation de l'ADN chez certains poissons et invertébrés (Best et al., 2018 ; Chatterjee et al., 2018). Chez le poisson zèbre, une augmentation significative de la production d'œufs, une fécondation réduite ainsi qu'une diminution significative des niveaux globaux de méthylation de l'ADN dans les ovaires et les testicules ont été observées suite à une exposition de 15 jours au BPA (1 mg/L) (Laing et al., 2016). La transcription de gènes impliqués dans les fonctions reproductives et les processus épigénétiques dans le foie et les gonades a également été impactée par l'exposition (aux concentrations de 0,1 mg/L et 1 mg/L) (Laing et al., 2016). Chez des poissons adultes de la même espèce, l'exposition

au di(2-thylhexyl) phtalate (DEHP), pendant 3 mois à des concentrations rencontrées dans l'environnement (10, 33 et 100 µg/L), a engendré une diminution de la méthylation de l'ADN des gonades, des dommages histologiques au niveau des testicules, des altérations de la production hormonale, la perturbation de la spermatogénèse et une baisse de la fécondité (Ma et al., 2018). De plus, les organismes exposés ont présenté des profils de méthylation altérés par rapport aux témoins au niveau de gènes impliqués dans la synthèse des hormones sexuelles. Des changements d'expression de ces gènes ont également été constatés, ce qui suggère un lien possible avec les altérations de méthylation observées (Ma et al., 2018). Chez l'anguille d'Europe *Anguilla anguilla*, l'exposition pendant 45 jours à des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental de cadmium (0,4 et 4 µg/L), a engendré une augmentation de la méthylation globale des sites CpG de l'ADN et une diminution de la synthèse d'ARN total dans le foie (Pierron et al., 2014b). Parmi les séquences hyperméthylées, plusieurs fragments présentent une homologie importante avec des transposons et des gènes impliqués dans le transport intracellulaire, la biosynthèse lipidique et la signalisation cellulaire. Chez les organismes exposés, certains de ces gènes avaient des niveaux de transcription différents par rapport aux témoins, ce qui suggère l'implication possible de la méthylation de l'ADN dans la réponse des organismes à l'exposition chronique au cadmium (Pierron et al., 2014b). Chez *Daphnia magna*, des niveaux globaux de méthylation de l'ADN réduits ont été observés suite à une exposition à la vinclozoline, substance active utilisée comme fongicide et classée perturbateur endocrinien (Vandegehuchte et al., 2010a). Chez le gastéropode *Cantareus aspersus*, Nica et al. (2017) ont mis en évidence une tendance à l'hyperméthylation du tissu hépatopancréatique après 28 jours d'exposition à de fortes concentrations en cadmium. Cette tendance s'est poursuivie jusqu'à la fin de l'expérience au 56ème jour (Nica et al., 2017). Enfin, chez *Drosophila melanogaster* qui présente un taux de méthylation faible (0,1%), Guan et al. (2019) ont suggéré que la méthylation de l'ADN pouvait réguler les réponses physiologiques des organismes exposés au cadmium en activant notamment les gènes impliqués dans la résistance au stress, l'apoptose et d'autres processus cellulaires.

En plus des expérimentations au laboratoire, des variations de méthylation de l'ADN ont également été observées sur des espèces exposées à des cocktails de contaminants dans leur milieu naturel. Des liens ont par exemple été établis entre les concentrations de contaminants dans les tissus de limandes communes *Limanda limanda* collectées dans la mer d'Irlande et le canal de Bristol (PCBs, Polybromodiphényléthers (PBDEs) et des métaux lourds comme le

cadmium et le plomb), l'altération de motifs de méthylation de l'ADN et les tumeurs observées dans les foies des organismes (Mirbahai et al., 2011). Pierron et al. (2014a) ont prélevé, sur un site présentant des niveaux de contamination élevés, des anguilles *Anguilla anguilla* femelles exposées à de multiples contaminants pendant leur phase juvénile. Les auteurs ont suggéré que la pollution pouvait être responsable de l'hyperméthylation de gènes impliqués dans la croissance et la différentiation des ovocytes observée dans les gonades des organismes provenant du site contaminé avant le traitement hormonal destiné à induire la maturité sexuelle. Parmi ces gènes, une corrélation positive entre les taux de méthylation du gène codant pour le récepteur de l'hormone folliculo-stimulante et les niveaux de contamination des anguilles a été établie. En plus de l'hyperméthylation de ce gène, une diminution de son expression a été observée, ce qui pourrait expliquer en partie pourquoi le traitement hormonal a été moins efficace chez les anguilles contaminées (Pierron et al., 2014a).

Du fait de la dynamique importante de la méthylation de l'ADN au cours du développement (voir I.2.3.2), les modifications environnementales au cours de cette période peuvent altérer les reprogrammations épigénétiques et mener à des changements permanents de l'expression des gènes (Martin et al., 1999 ; Faulk and Dolinoy, 2011). De plus, les altérations épigénétiques apparaissant au moment de la fécondation ou au début de l'embryogénèse sont susceptibles d'affecter une proportion élevée de cellules chez l'organisme complètement développé (Feil and Fraga, 2012). Chez le poisson zèbre par exemple, la méthylation de l'ADN semble être associée aux effets embryotoxiques induits par plusieurs contaminants tels que les énantiomères du fipronil (pesticide) (Qian et al., 2017), le bisphénol A (Olsvik et al., 2019) et l'atrazine (Wirbisky-Hershberger et al., 2017). Sussarellu et al. (2018) ont montré que les effets embryotoxiques d'une exposition au cuivre (10 µg/L) chez l'huître *Crassostrea gigas* impliqueraient des changements d'expression de gènes homéotiques induits par des modifications de patrons de méthylation des cytosines de l'ADN.

Les mécanismes par lesquels les perturbations environnementales affectent les patrons de méthylation ne sont pas encore bien compris (Chatterjee et al., 2018), mais quelques mécanismes ont été proposés. Par exemple, l'induction d'un stress oxydant est un processus pouvant rendre compte de l'effet des différents métaux sur la méthylation. Les métaux sont connus pour catalyser et augmenter la production d'espèces réactives de l'oxygène qui créent des dommages oxydants à l'ADN. Ces dommages sont susceptibles d'inhiber l'action des ADN méthyltransférases (Baccarelli et Bollati, 2009). Parmi les métaux, Takiguchi et al. (2003) ont

suggéré que le cadmium pouvait inhiber l'activité des ADN méthyltransférases en se liant au site de liaison à l'ADN et engendrer ainsi une hypométhylation de l'ADN. Pour expliquer l'hyperméthylation observée après 10 semaines d'exposition dans les cellules hépatiques de rat, l'une des hypothèses proposées par les auteurs est celle d'un effet compensatoire de l'inhibition précoce des ADN méthyltransférases engendrant une surexpression des gènes codant pour ces enzymes. Les contaminants peuvent également modifier les teneurs en S-adénosylméthionine (SAM) et en S-adénosylhomocystéine (SAH), respectivement substrat et produit de la réaction de méthylation de l'ADN (Wang et al., 2009). Les teneurs en SAM au sein des tissus peuvent par exemple baisser suite au déclenchement de la seconde phase de détoxification (Lee et al., 2009). En effet, durant cette phase, des molécules telles que le glutathion sont synthétisées en quantité importante et facilitent l'élimination du toxique en se conjuguant avec lui (Lee et al., 2009). Or, la synthèse de glutathion est réalisée à partir de l'homocystéine, molécule également utilisée pour la production de SAM. Ainsi, l'activation des mécanismes de détoxification peut diminuer les quantités de SAM disponibles et altérer les processus de méthylation de l'ADN (Figure I - 3, Lee et al., 2009).

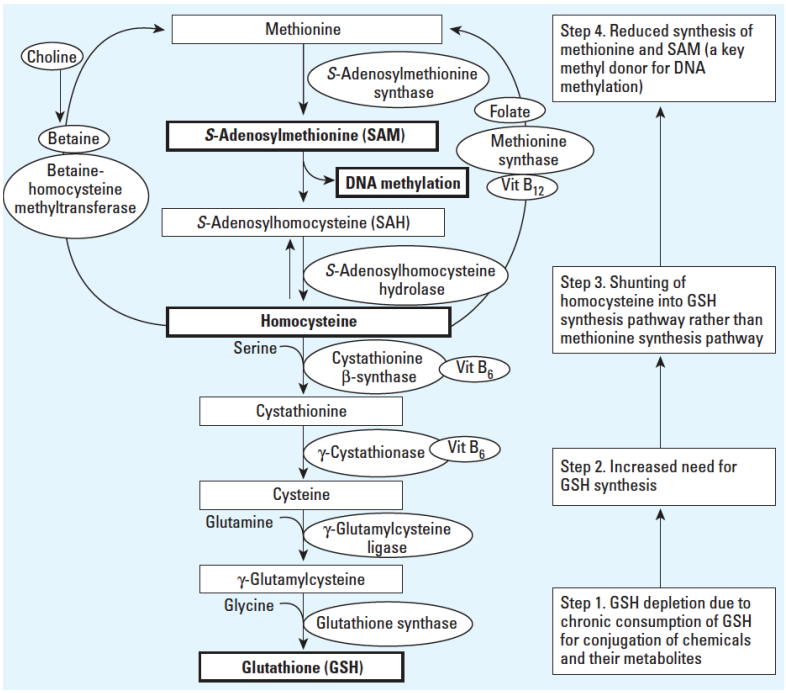


Figure I - 3 : Mécanisme hypothétique expliquant l'effet hypométhylant de certains toxiques. Source : Lee et al., 2009.

Dans toutes les hypothèses mécanistiques proposées, la raison pour laquelle seuls certains gènes présentent des motifs de méthylation altérés est inconnue (Barouki et al., 2018).

Comme le montrent les exemples mentionnés dans cette présente partie, la plupart des liens établis entre les modifications épigénétiques et les réponses phénotypiques des organismes sont de simples associations statistiques (Barouki et al., 2018 ; Chatterjee et al., 2018). L'analyse de la méthylation globale de l'ADN de l'organisme entier ou d'un tissu donne un premier aperçu des niveaux de méthylation de l'espèce et des modulations possibles. Cependant, à l'heure actuelle, l'établissement d'un schéma mécaniste permettant d'établir un lien de causalité entre les modulations du niveau global de méthylation et les observations physiologiques s'avère difficile chez la plupart des espèces. L'analyse de méthylation de gènes spécifiques dont la fonction est connue offre la possibilité d'établir des liens de corrélation, voire de cause à effet. L'établissement de tels liens reste néanmoins complexe à ce stade des connaissances sur la méthylation de l'ADN et ses interactions avec les autres marques épigénétiques.

I.2.3.4. Méthylation de l'ADN et acquisition de tolérance

Les altérations épigénétiques ne sont pas uniquement associées à des effets négatifs sur les organismes, et peuvent également leur permettre de s'adapter rapidement aux changements environnementaux (Brander et al., 2017 ; Hu et Barrett, 2017 ; Eirin-Lopez et Putnam, 2019).

Tout d'abord, les modifications des profils de méthylation de l'ADN peuvent être mises en relation avec l'induction de tolérance chez les organismes exposés en participant aux mécanismes d'acclimatation. Par exemple, chez les polychètes adultes *Spiophanes tcheriniai*, Marsh et Pasqualone (2014) ont montré que les taux métaboliques des organismes soumis à une température élevée (+4°C) étaient altérés par rapport aux organismes maintenus à une température optimale (-1,5°C). Au bout de quatre semaines d'exposition au stress thermique, leur taux métabolique était revenu au niveau de celui du témoin et des gains de méthylation sur des sites CpG spécifiques ont été observés. Ces observations suggèrent un rôle possible des changements de méthylation dans le phénomène d'acclimatation observé. Chez des polychètes tropicaux *Stylophora pistillata* soumis à une baisse du pH (mimant l'acidification des océans), une augmentation significative de la taille des cellules et du corps a été observée, entraînant la formation d'un squelette plus poreux (Liew et al., 2018). Ces changements phénotypiques semblent être associés à des modifications de méthylation et d'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la croissance des cellules. Le changement de porosité observé pourrait permettre à *S. pistillata* de s'étendre dans son milieu, malgré des taux de calcification réduits

en milieu plus acide (Liew et al., 2018). La méthylation de l'ADN pourrait donc être impliquée dans l'émergence d'un phénotype qui permette l'adaptation de *S. pistillata* à son nouveau milieu.

L'acclimatation par la régulation épigénétique, du fait de la possible persistance des altérations, offre un potentiel de mémoire environnementale au-delà d'un seul stade de vie ou d'une seule saison, ce qui peut avoir des conséquences écologiques importantes (Eirin-Lopez et Putnam, 2019). Dans les cas d'une acclimatation au cours du développement, le danger d'une réponse anticipée et relativement fixée est le décalage possible entre le phénotype généré par les conditions environnementales au moment du développement et celles rencontrées par l'organisme plus tard dans sa vie (Eirin-Lopez et Putnam, 2019).

De plus, l'exposition parentale peut induire une tolérance à d'autres perturbations environnementales chez les descendants, sans que ces derniers n'aient été exposés de manière directe (Brander et al., 2017 ; Hu et Barrett, 2017 ; Eirin-Lopez et Putnam, 2019). L'implication de marques épigénétiques dans l'émergence et la persistance de cette tolérance à travers les générations successives non exposées directement a été suggérée dans de récentes études. Oppold et al. (2015) ont montré que l'exposition parentale du moustique *Aedes albopictus* à la vinclozoline et à la génistéine (phytooestrogène) engendrait une diminution de la sensibilité à l'insecticide imidaclopride chez les deux générations successives. Ce changement de sensibilité était associé à des variations du niveau de méthylation de l'ADN global chez les parents exposés et les deux générations suivantes. Cela suggère un rôle potentiel de la méthylation de l'ADN dans l'acquisition de la tolérance à l'imidaclopride chez les F1 et F2. Une autre étude porte sur le crustacé *Artemia salina* exposé à un stress thermique non létal (Norouzitallab et al., 2014). Suite à l'exposition de parents, une augmentation de la production de protéines Hsp70 et une résistance importante au stress thermique non létal et au pathogène *Vibrio campbellii* ont été observées chez les trois générations successives de descendants. Des changements du niveau global de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones ont également été observés, ce qui suggère une contribution possible de ces modulations épigénétiques dans l'émergence et/ou l'héritage multigénérationnel des changements phénotypiques observés (Norouzitallab et al., 2014).

I.2.3.5. Méthylation de l'ADN et adaptation locale des populations

Comme nous l'avons vu précédemment, des variations épigénétiques sont susceptibles d'être induites par divers facteurs environnementaux et peuvent parfois être transmises aux générations successives. Ces conclusions reposent majoritairement sur des études menées au laboratoire, en conditions contrôlées. Les connaissances sur les variations du niveau de méthylation de l'ADN au sein des populations naturelles sont peu nombreuses (Hu et Barrett, 2017). Le lien entre ces variations et les variations phénotypiques reste également peu documenté. L'une des difficultés principales est de parvenir à différencier l'influence des variations épigénétiques de celle des variations génétiques en raison du haut degré de dépendance entre les deux (Richards et al., 2010). L'étude de populations naturelles du poisson clonal *Chrosomus eos-neogaeus* est toutefois parvenue à établir ce lien. En effet, cette dernière a mis en évidence l'effet des conditions de l'environnement local sur la variation des profils de méthylation de l'ADN parmi les individus génétiquement identiques, appartenant à différentes populations naturelles (Massicotte et al., 2011; Massicotte et Angers, 2012). La variation des conditions environnementales peut donc conduire à du polymorphisme épigénétique au niveau populationnel. Ces observations montrent également que dans les populations naturelles, certaines variations épigénétiques peuvent ne pas être totalement dépendantes des variations génétiques (Massicotte et al., 2011 ; Massicotte et Angers, 2012).

Certains auteurs avancent que les variations épigénétiques au sein des populations naturelles animales pourraient jouer un rôle dans l'adaptation des organismes à leur environnement de deux manières différentes (Bossdorf et al., 2008 ; Brander et al., 2017 ; Hu et Barrett, 2017). Tout d'abord, les processus épigénétiques peuvent être considérés comme une seconde source de variations héréditaires, similaires aux variations génétiques, sur laquelle la sélection naturelle agit (Bossdorf et al., 2008). Cela suppose que la variation épigénétique soit stable et engendre une variation phénotypique qui améliore la fitness de l'individu. Les processus épigénétiques pourraient également s'ajouter à la sélection naturelle et seraient ainsi susceptible d'accélérer le changement évolutif. En effet, contrairement au génome qui présente une stabilité importante face aux changements environnementaux, les marques épigénétiques semblent y être très sensibles. Ainsi, l'environnement ne serait pas seulement une force sélective, mais également la source des variations (Bossdorf et al., 2008). Ce rôle potentiel des marques épigénétiques dans l'évolution est très théorique. Pour autant, quelques études empiriques sur des populations naturelles semblent montrer que la méthylation de l'ADN pourrait être impliquée dans les processus évolutifs. Par exemple, Baldanzi et al. (2017) ont

montré que les variations du niveau de méthylation de l'ADN au sein de différentes populations d'amphipode *Talorchestia capensis*, présentant des sensibilités au stress thermique différentes, sont plus importantes que les variations génétiques. De plus, ces variations épigénétiques semblent être la conséquence des conditions environnementales locales (Baldanzi et al., 2017). Les résultats de cette étude suggèrent également qu'une variabilité interindividuelle importante des profils épigénétiques au sein d'une population peut générer une flexibilité phénotypique et ainsi permettre de répondre rapidement à des changements environnementaux, malgré une faible variabilité génétique (Baldanzi et al., 2017). Une autre étude sur deux lignées de ver *Lumbricus rubellus* provenant d'anciens sites miniers et tolérantes à l'arsenic suggère que pour l'une des deux lignées des changements de méthylation de l'ADN permettent aux vers d'être adaptés à la présence des contaminants via une plus grande plasticité phénotypique (Kille et al., 2013). Pour l'autre lignée, la tolérance observée semble s'expliquer par une composante génétique (sélection naturelle) (Kille et al., 2013).

Ces quelques études empiriques montrent l'existence de variations épigénétiques au sein des populations naturelles et leur potentiel rôle dans l'adaptation des populations à leur environnement, notamment au stress chimique. Cependant, l'implication des variations épigénétiques dans l'évolution des populations reste un champ de recherche émergent. En effet, le degré de dépendance des variations épigénétiques par rapport aux variations génétiques et la stabilité des changements épigénétiques sont encore peu connus (Burggren, 2015 ; Deans et Maggert, 2015 ; Hu et Barrett, 2017).

I.3. *Gammarus fossarum*, une espèce d'intérêt en écotoxicologie et plus particulièrement pour l'étude des effets différés

I.3.1. Description de l'espèce

I.3.1.1. Taxonomie

Parmi les amphipodes, le sous-ordre des *Gammaridea* constitue le taxon le plus largement répandu. Il comprend plus de 4500 espèces présentes dans des habitats variés, marins, dulçaquicoles et terrestres (Kunz et al., 2010). Au sein de la famille des gammaridés, le genre *Gammarus* est représenté par plus de 200 espèces (Väinölä et al., 2008), dont l'espèce modèle choisie pour ces travaux de thèse, *Gammarus fossarum* (Koch, 1836). Cette espèce a été, pendant de nombreuses années, considérée comme une sous-espèce de *Gammarus pulex*,

nommée *Gammarus pulex fossarum* (Wautier et Roux, 1959). La systématique est présentée dans le Tableau I - 2.

Tableau I - 2 : Taxonomie de G. fossarum (Martin et Davis, 2001)

Embranchement	**Arthropode**
Super-classe	Crustacé
Classe	Malacostracé
Sous-classe	Eumalacostracé
Super-ordre	Péracaride
Ordre	Amphipode
Sous-ordre	Gammaridea
Famille	Gammaridae
Genre	Gammarus
Espèce	*fossarum* (Koch, 1836)

Westram et al. (2011) ont démontré l'existence de trois espèces cryptiques au sein de l'espèce *G. fossarum*. La diversité au sein de *G. fossarum* est en réalité bien plus grande puisque des lignées supplémentaires ont été mises en évidence par Weiss et al. (2014) et Lagrue et al. (2014). Ces différentes lignées cryptiques ne peuvent pas être différenciées par des critères morphologiques, mais présentent une divergence phylogénétique importante. Le degré de divergence au-delà duquel ces lignées sont considérées comme des espèces distinctes est encore aujourd'hui l'objet de débat.

I.3.1.2. Habitat et place dans la chaîne trophique de l'espèce

Gammarus fossarum occupe les cours d'eau de plaine et de moyenne montagne de nombreux pays d'Europe. Son aire de répartition s'étend même jusqu'à certaines zones d'Asie mineure (Karaman et Pinkster, 1977 ; Goedmakers, 1972 ; Barnard et Barnard, 1983 ; Marković et Živić, 2007). En France, cette espèce indigène est présente sur l'ensemble du territoire à l'exception de la Corse, de la Bretagne et d'une partie de la Normandie. Après l'espèce *G.*

pulex, elle est l'espèce de gammare la plus répandue sur le territoire (Piscart et Bollache, 2012). En plus de ces deux espèces indigènes, des espèces invasives de la famille des gammares peuplent les hydrosystèmes français. Par exemple, une espèce proche du genre *Gammarus* et originaire du Danube, *Dikerogammarus villosus*, a envahi rapidement la plupart des bassins d'Europe de l'ouest à partir des années 90, excluant les espèces autochtones de certains habitats (Devin et al., 2001 ; Bollache et al., 2004).

Les densités de populations de *Gammarus fossarum* sont élevées et varient fortement en fonction des saisons (Felten, 2003 ; Beracko et al., 2012 ; Coulaud et al., 2014). Cette espèce peut tolérer une gamme de température de l'eau assez large, comprise entre 2°C et 28°C avec une valeur critique létale de l'ordre de 30°C (Wijnhoven et van Riel, 2003 ; Issartel et al., 2005 ; Verberk et al., 2018). Elle est également peu exigeante en ce qui concerne les teneurs des eaux en calcium, bien que cet élément soit indispensable à la croissance des crustacés (Pacaud, 1945). En revanche, elle présente une sensibilité importante aux milieux acides (pH < 5) et aux faibles concentrations en oxygène (Maltby, 1995 ; Peeters et Gardeniers, 1998 ; Simcic et Brancelj, 2006). Son habitat optimal correspond aux eaux alcalines, peu profondes, à forts courants, pauvres en nutriments et riches en oxygène (Peeters et Gardeniers, 1998). *G. fossarum* et plus généralement les gammaridés s'accrochent, se cachent et trouvent de la nourriture dans des substrats organiques tels que les bryophytes, les végétaux rivulaires et les feuilles en décomposition ainsi que dans des substrats de types graviers ou plus grossiers comme les galets ou les roches (Kunz et al., 2010). Ils ont un régime alimentaire varié, étant à la fois herbivores, détritivores et prédateurs d'autres animaux. Ils se nourrissent des feuilles tombées dans le cours d'eau et des biofilms qui leur sont associés. Leur alimentation est également composée de chironomidés morts, d'isopodes juvéniles, de poissons juvéniles ou blessés, et parfois même de leurs congénères (Kelly et al., 2002 ; Kunz et al., 2010). Les gammares sont des organismes essentiels au bon fonctionnement écologique des cours d'eau, participant à la décomposition et l'incorporation du matériel organique d'origine terrestre et de la nécromasse aquatique. Comme les gammares sont les proies privilégiées de nombreuses espèces de macroinvertébrés, de poissons, d'amphibiens et d'oiseaux (Macneil et al., 1997), ils assurent également la redistribution de la matière et de l'énergie au sein du réseau trophique aquatique.

I.3.1.3. Morphologie et identification de l'espèce

Comme tous les crustacés, les gammares ont deux paires d'antennes et une respiration branchiale. Ils présentent une cuticule calcifiée, un corps à symétrie bilatérale et aplati latéralement, divisé en quatre régions : le prosoma (la tête), le mésosoma (le thorax) ainsi que le métasoma et l'urosoma qui forment l'abdomen (Figure I - 4). Ces régions sont elles-mêmes séparées en segments, dont chacun porte côté ventral, une paire d'appendices articulés. Le corps des gammares est caractérisé par une convexité dorsale régulière (Figure I - 4). Les tailles des gammares adultes sont généralement comprises entre 6 et 25 mm (Lacaze, 2011 ; Coulaud, 2012 ; Vigneron, 2015).

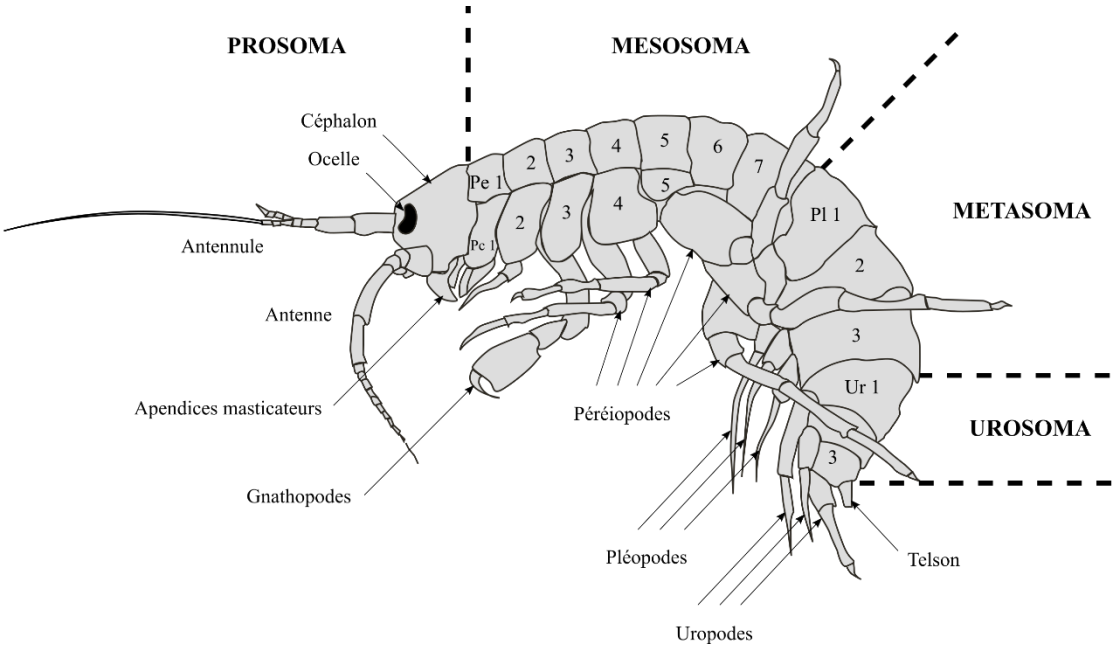


Figure I - 4 : Morphologie générale des gammaridés (modifié d'après Xuereb, 2009)

Le prosoma est constitué d'une seule pièce appelée céphalon qui porte latéralement une paire d'yeux composés et sessiles appelés ocelles, une paire d'antennules et une paire d'antennes ainsi que quatre paires d'appendices masticateurs situées sur la face inférieure (Figure I - 4).

Le mésosoma compte sept segments libres munis chacun d'une paire d'appendices uniramés constituant les péréiopodes (Figure I - 4). Les deux premiers péréiopodes sont préhensibles et constituent les gnathopodes 1 et 2 (Figure I - 4). Ils permettent aux gammares de pouvoir se fixer sur un substrat. Quatre autres péréiopodes (3 à 7) ont une fonction locomotrice (Figure I - 4). Un élément, appelé coxopodite constitue la base de chaque péréiopode (Figure I - 5). Chez les femelles et au niveau de la deuxième paire de gnathopodes, leur face interne porte une extension lobiforme, appelée oostégite. L'ensemble des oostégites

forment le plancher du marsupium, cavité ventrale dans laquelle les œufs fécondés se développent jusqu'à leur éclosion (Figure I - 5).

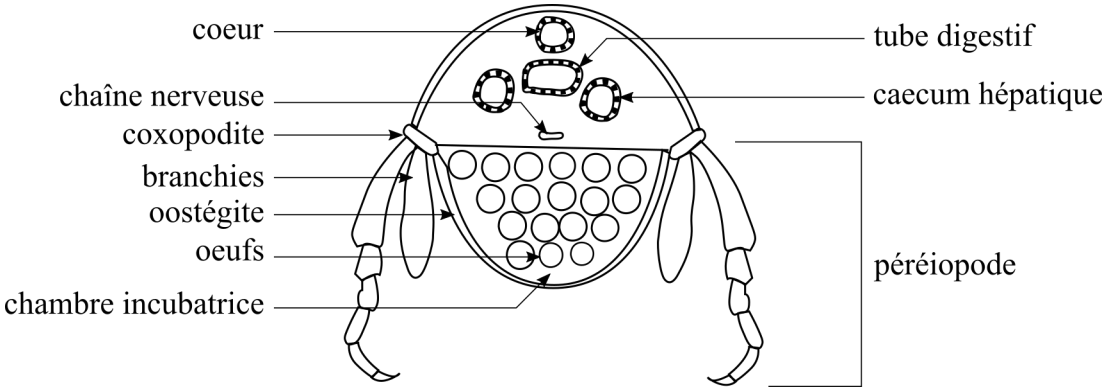


Figure I - 5 : Schéma d'une coupe transversale au niveau du mésosoma d'une femelle gammaridé (modifié d'après Xuereb, 2009)

Le metasoma est constitué de trois segments libres, qui portent les pléopodes, appendices biramés (Figure I - 4). Leur mouvement continu permet de ventiler la cavité branchiale et le marsupium des femelles. Ils ont également un rôle important dans la locomotion.

Enfin, l'urosoma est constitué de trois segments qui portent chacun une paire d'appendices biramés appelés uropodes (Figure I - 4).

La différenciation de *G. fossarum* des autres espèces de la famille des gammares peut être réalisé à partir de ses caractéristiques morphologiques (Piscart et Bollache, 2012).

I.3.1.4. Biologie et anatomie de l'espèce

I.3.1.4.1. Vue générale

Le gammare a une espérance de vie maximale de l'ordre de 2 ans et possède une croissance discontinue par mues successives. Les mâles possèdent des phases inter-mues plus longues que les femelles (Welton et Clarke, 1980). Une fois sortis du marsupium de leur mère et après un certain nombre de mues, les nouveau-nés croissent et deviennent matures. Les cinétiques de croissance, ainsi que la durée entre deux mues successives dépendent fortement de la température (Welton et Clarke, 1980 ; Pöckl, 1992 ; Pöckl et al., 2003 ; Coulaud, 2012 ; Chaumot et al., soumis).

La figure suivante présente l'anatomie générale des gammaridés (Figure I - 6).

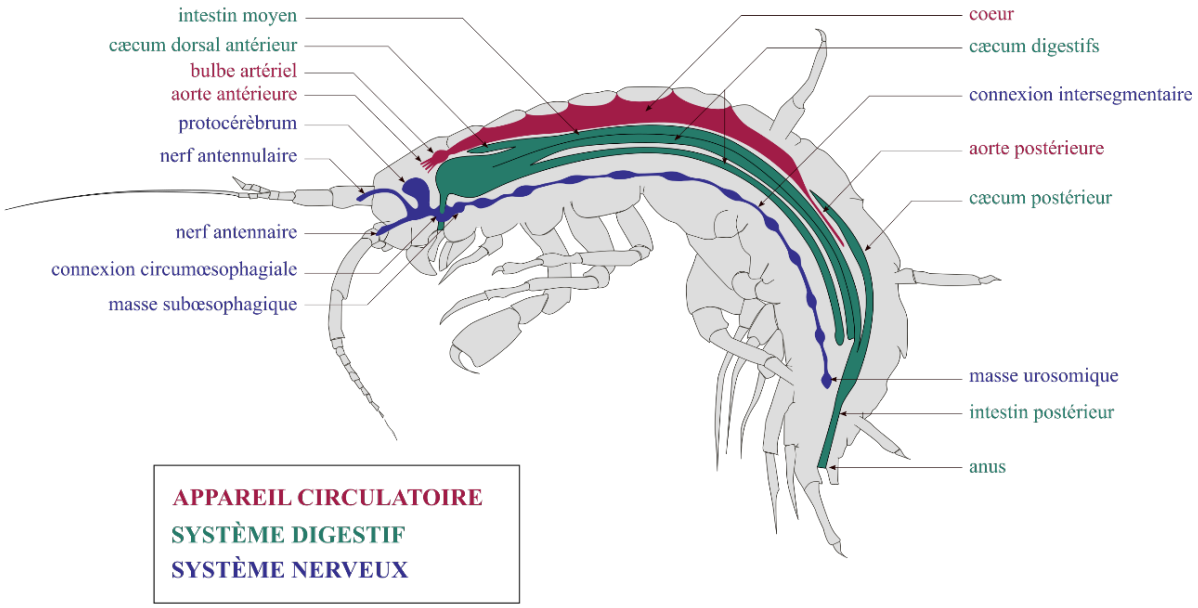


Figure I - 6 : Anatomie générale d'un Gammaridé (modifié d'après Lacaze, 2011)

Le système digestif des gammaridés débute par l'œsophage et se poursuit par une sorte d'estomac, sac ovoïde constitué de la chambre cardiaque et de la chambre pylorique. En arrière de cet « estomac » s'insère l'intestin moyen, suivi de l'intestin postérieur et de l'anus. L'appareil digestif est également composé de plusieurs *cæca* qui constituent les principaux sites de production d'enzymes digestives (Charron, 2014). Le système nerveux comprend un cerveau, appelé protocérébrum, relié aux ocelles, aux antennes et aux antennules par des nerfs. Il se poursuit ensuite par une chaîne ganglionnaire située dans la partie ventrale de l'organisme qui se compose, dans le céphalon et l'urosoma, de ganglions réunis en une masse (respectivement masse sub-oesophagique et masse inter-segmentaires) et, au niveau de chaque segment du mésosoma et du métasoma, d'une paire de ganglions soudés. Ces ganglions et masses sont reliés entre eux par des connections nerveuses inter-segmentaires et à chaque appendice par des filets nerveux (Felten, 2003). La circulation hémolymphatique des gammaridés est réalisée par le biais d'un cœur positionné au-dessus de l'appareil digestif, mais également par des mouvements squeletto-musculaires et des contractions stomacales. Le cœur forme un tube cylindrique ouvert à ses deux extrémités et est entouré d'une sorte de sac rempli d'hémolymphe nommé péricarde ou hémocœle (Felten, 2003).

I.3.1.4.2. Reproduction

G. fossarum est une espèce itéropare et sa reproduction a lieu tout au long de l'année. Pour autant, le pourcentage de femelles en reproduction varie fortement avec les saisons. Ce pourcentage est élevé au cours des saisons chaudes et au contraire très faible en hiver chez *G. fossarum* (Ladewig et al., 2006 ; Coulaud et al., 2014) ainsi que chez d'autres espèces de gammaridés (Costa et Costa, 1999 ; Sutcliffe et al.,1993).

Les appareils génitaux mâle et femelle sont composés d'une paire de gonades accolées aux intestins. Chez le mâle, elles se divisent en trois régions : le testicule, la vésicule séminale, et le canal déférent qui permet d'acheminer le sperme jusqu'à la papille génitale située au niveau de la face ventrale du péréiomère 7 (Figure I - 7). Chez la femelle, les gonades correspondent à deux ovaires, chacun associé à un oviducte. Ce dernier aboutit au niveau de la base du péréiopode 5 et permet ainsi le transfert des ovocytes jusqu'au marsupium (Figure I - 7).

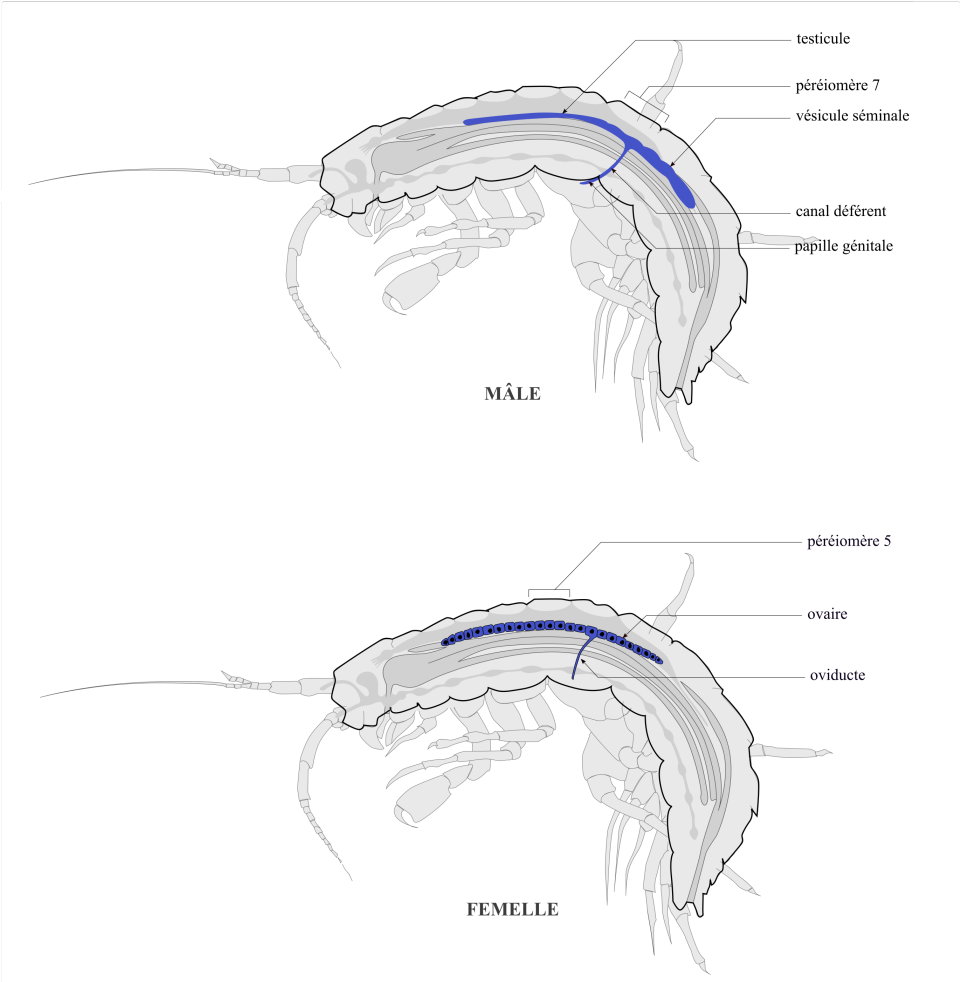


Figure I - 7 : Coupe transversale du système reproducteur de gammaridés mâle et femelle (d'après Coulaud, 2012).

I.3.1.4.2.1. L'accouplement

Lorsque la femelle approche de la fin du cycle de développement ovarien, le mâle s'accroche à elle par l'intermédiaire de ses gnathopodes antérieurs. Ils forment alors ce qu'on appelle un amplexus précopulatoire ou précopula pendant quelques jours, voire quelques semaines (Chevreux et Farge, 1925 ; Iltis et al., 2017) (Figure I - 8). Le mâle monopolise ainsi la femelle jusqu'à la fécondation.

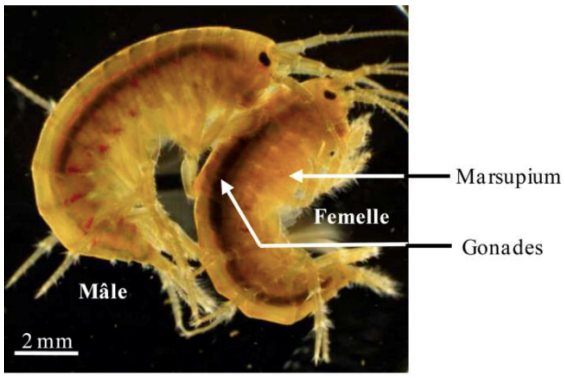


Figure I - 8 : Couple de *Gammarus fossarum* en précopula. Source : Xuereb, 2009.

La fécondation externe des ovocytes par les spermatozoïdes au sein du marsupium de la femelle est précédée par trois étapes clefs. Une fois que la femelle est parvenue à sortir de son exuvie, le mâle se positionne de manière à ce que ses papilles génitales se retrouvent face au marsupium de la femelle. La femelle expulse alors ses ovocytes vers sa poche ventrale à travers ses oviductes rendus relativement flexibles par la mue. Les spermatozoïdes du mâle peuvent ainsi féconder les œufs fraîchement pondus.

I.3.1.4.2.2. Le cycle de reproduction et le cycle de mue

Chez les femelles, le cycle de mue se découpe en six stades : A, B, C1, C2, D1 et D2 dont la détermination est basée sur l'observation microscopique du développement d'une nouvelle cuticule et du décollement de l'ancienne au niveau de la griffe des péréiopodes 3 et 4 (Geffard et al., 2010) (Figure I - 9). Les deux premiers stades correspondent à la période de post-mue (A et B), les deux suivants à l'inter-mue (C1 et C2) et les deux derniers à la pré-mue (D1 et D2).

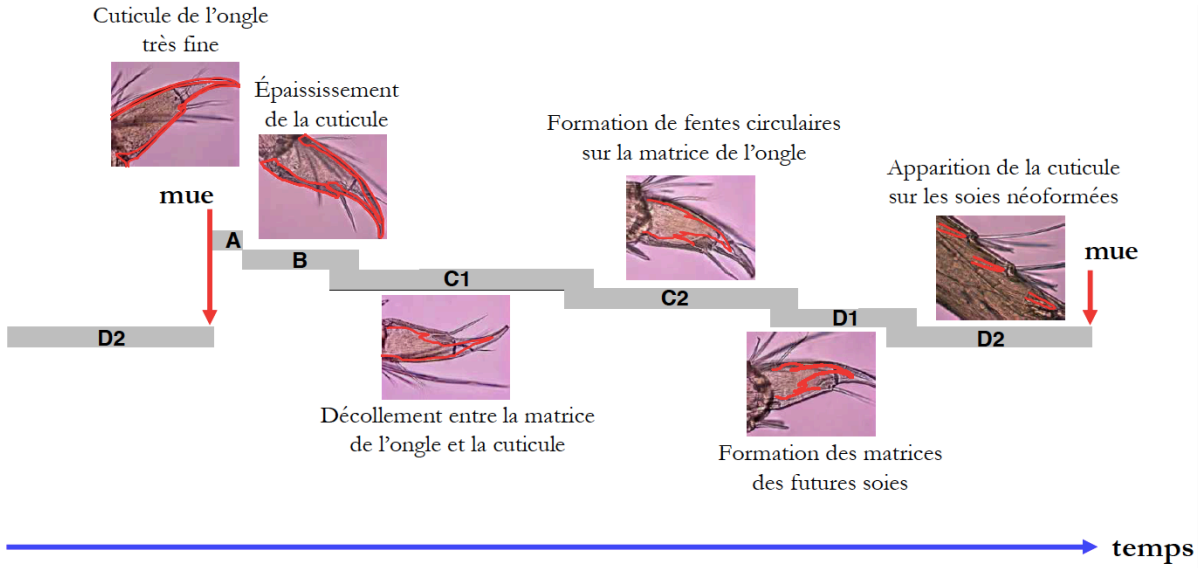


Figure I - 9 : Caractérisation des stades de mue chez la femelle G. fossarum. Source : Xuereb, 2009.

Les stades A et B, difficilement distinguables, seront dans la suite de ce travail de thèse considérés comme un seul et même stade nommé AB.

Chez les femelles, le cycle de reproduction, qui comprend la maturation des gamètes et le développement des embryons dans le marsupium, est fortement synchronisé avec le cycle de mue (Geffard et al., 2010). Peu de temps avant la mue de leur mère (*i.e.* fin du stade D2), les nouveau-nés éclosent et sortent du marsupium. Quand arrive l'exuviation, une nouvelle portée d'ovocytes matures est pondue par la femelle et vient ainsi remplacer les juvéniles sortis. Une fois ces ovocytes fécondés, le développement embryo-larvaire de cette nouvelle portée commence (Figure I - 10, cycle embryonnaire). En parallèle de la ponte, un nouveau lot d'ovocytes entre en gamétogénèse dans les gonades (Figure I - 10, cycle ovocytaire). Au cours de la maturation des gamètes des femelles, des réserves vitellines destinées aux futurs embryons s'accumulent (vitellogénèse) et deux divisions méiotiques ont lieu.

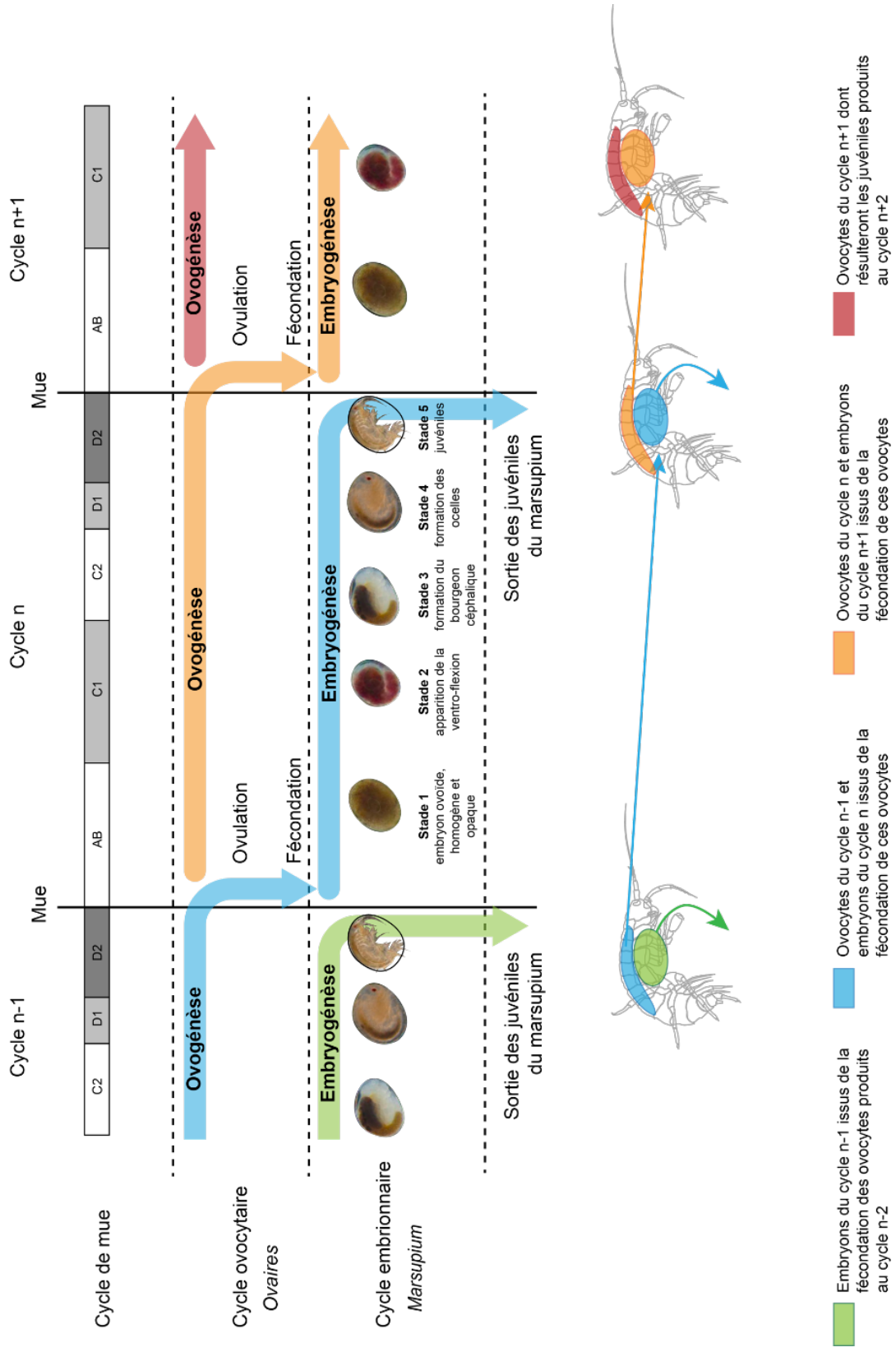


Figure I - 10 : Représentation du synchronisme entre le cycle de mue et le cycle de reproduction, incluant le cycle ovocytaire et le cycle embryonnaire (modifié d'après Xuereb, 2009 et Vigneron, 2015)

La durée du cycle d'inter-mue, et donc également du cycle de reproduction, dépendent de la température. Elle s'élève à environ 35 jours à 12°C, contre 25 jours à 16°C (Chaumot et al., soumis).

Contrairement aux femelles, le cycle de reproduction des mâles (*i.e.* spermatogénèse) n'est pas synchronisé au cycle de mue. Il est également beaucoup plus court que celui des femelles : sept jours après la fécondation suffisent pour restaurer un stock maximal de spermatozoïdes à une température de 12°C (Lacaze, 2011). À partir de la puberté, la spermatogénèse est composée de deux phases successives : une phase de maturation au cours de laquelle les spermatogonies (2n) se transforment en spermatides (n) par méiose, suivie d'une phase de différenciation pendant laquelle les spermatides se différencient en spermatozoïdes. Des différences morphologiques permettent de distinguer les spermatozoïdes matures issus de mâles en précopula (avant la fécondation), des spermatides ou spermatozoïdes immatures. La forme du noyau des spermatozoïdes est oblongue, tandis que celle des spermatides est ovoïde (Lacaze, 2011, Figure I - 11).

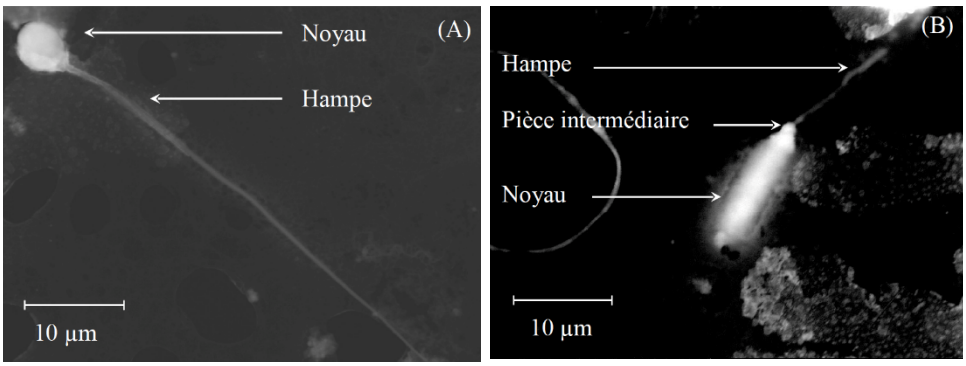


Figure I - 11 : Photographies d'une spermatide (A) et d'un spermatozoïde (B) observés sous microscope. Source : Lacaze, 2011.

I.3.2. Le gammare, un modèle d'étude pertinent en écotoxicologie et pour l'étude des effets différés

Depuis les années 70, les gammares sont fréquemment utilisés comme modèles biologiques dans les études écotoxicologiques (Kunz et al., 2010 ; Chaumot et al., 2015). De nombreux auteurs recommandent leur utilisation en tant qu'espèces sentinelles pour les milieux aquatiques lotiques et certains d'entre eux les ont déjà utilisés dans le cadre de la biosurveillance (Kunz et al., 2010 ; Gerhardt, 2011 ; Besse et al., 2013 ; Coulaud et al., 2014 ; Chaumot et al.,

2015). Cet engouement s'explique par leur pertinence écologique, leur place centrale au sein de la chaîne trophique (voir I.3.1.2) et leur sensibilité à une large gamme de contaminants (Kunz et al., 2010).

D'autres avantages, plus techniques, justifient l'utilisation des gammares en écotoxicologie et plus précisément en biosurveillance. Ils permettent également d'envisager leur possible élevage sur le long terme. Le maintien des gammares au laboratoire pendant plusieurs mois constitue toutefois un réel défi aujourd'hui étant donné le nombre très faible d'études à avoir mené ce type d'expérimentation (Pöckl, 1992 ; Borges et al., 2018 ; Lopes et al., 2019). La large répartition des populations de gammares et leur présence toute l'année à des densités élevées (voir I.3.1.2) et dans des habitats variés donne la possibilité de travailler sur des populations autochtones et de prélever toute l'année des quantités élevées de gammares. Ce dernier point présente un intérêt important dans le cadre des études inter et transgénérationnelles puisqu'elles nécessitent d'avoir au départ un nombre conséquent d'organismes parents afin de maintenir la population sur plusieurs générations. De plus, le cycle de reproduction relativement court des gammares, la production d'environ 10 à 20 nouveau-nés par femelle à chaque cycle et un temps de maturation sexuelle de quelques mois sont compatibles avec l'étude des effets différés (Coulaud, 2012 ; Lacaze, 2011). Les connaissances sur les gammares et leurs caractéristiques morphologiques facilitent également l'élaboration et la réalisation de protocoles expérimentaux pour l'étude des effets différés. En effet, le dimorphisme sexuel des gammares et la bonne connaissance du cycle de mue/reproduction des femelles permettent une identification aisée de leurs stades de mue/reproduction et du sexe des individus. De plus, l'influence de la température sur le déroulement du cycle de mue/reproduction des femelles est connue et modélisée (Coulaud, 2012 ; Chaumot et al., soumis). Leur manipulation et leur maintien au laboratoire sont aussi relativement faciles.

En plus des expérimentations contrôlées au laboratoire, il est possible de transplanter ces organismes sur le terrain, par encagement, pour la réalisation de bioessais *in situ*. Cette technique est un outil robuste pour mesurer la contamination biodisponible (métaux et substances organiques hydrophobes) dans les eaux continentales (Besse et al., 2013 ; Alric et al., 2019 ; norme AFNOR X-T90-721). Elle permet également de pouvoir envisager la mise en place de système de biosurveillance active de la qualité des milieux et de réaliser des expositions sur le terrain, réaliste d'un point de vue environnemental (Coulaud et al., 2014).

Conséquence des nombreux atouts que présentent les gammares pour l'écotoxicologie, un nombre important de réponses biologiques a été étudié chez cette famille. Ces réponses, mesurées aux niveaux d'organisation biologique sub-individuel et individuel, constituent des marqueurs disponibles pour l'évaluation de la toxicité des substances et la biosurveillance. Au niveau sub-individuel, des biomarqueurs associés aux activités de détoxification et de défense antioxydante ont été développés chez les gammares tels que les protéines de type métallothionéine, associées à l'exposition métallique (Stuhlbacher et Maltby, 1992 ; Amiard et al., 2000 ; Geffard et al., 2007 ; Khan et al., 2012), les cytochromes P450, les enzymes de défense antioxydante ou encore les niveaux de malondialdéhyde issu de l'action des espèces réactives de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés (Gismondi et al., 2013 ; Turja et al., 2014 ; Duman et Kar, 2015 ; Serdar, 2019 ; Cikcikoglu Yildirim et Yaman, 2019). Certains biomarqueurs sont spécifiques d'un mode d'action particulier comme la neurotoxicité avec la mesure de l'activité acétylcholinestérase (Xuereb et al., 2009a), la génotoxicité avec la mesure des dommages primaires à l'ADN (Lacaze et al., 2010) et l'altération de la fonction endocrine avec la mesure des protéines de type vitellogénine (Simon et al., 2010 ; Jubeaux et al., 2012). D'autres biomarqueurs sont utilisés pour évaluer l'état physiologique global des organismes comme les protéines de choc thermique (Schill et al., 2003 ; Schirling et al., 2006) ; la mesure de l'activité d'enzymes digestives et des réserves énergétiques (Dedourge-Geffard et al., 2009, 2013 ; Charron et al., 2013 ; Garaud et al., 2015) et la mesure de l'osmolarité de l'hémolymphe et de l'activité de la Na+/K+ ATPase, enzyme impliquée dans l'osmorégulation (Felten et al., 2008 ; Issartel et al., 2010 ; Dayras et al., 2017). Les approches « omics », en plein développement en écotoxicologie et susceptibles de fournir des biomarqueurs très précoces, ont également été développées chez les gammares (Trapp et al., 2014, 2015; Gismondi et al., 2017; Gouveia et al., 2018). Au niveau individuel, les réponses de plusieurs traits d'histoire de vie ont été étudiées et utilisées. Les impacts sur la reproduction ont tout d'abord été évalués, incluant les effets sur la fécondité et la fertilité (Cold et Forbes, 2004 ; Maltby et Naylor, 1990), le développement embryonnaire (Lawrence et Poulter, 2001 ; Arambourou et al., 2017), le comportement reproducteur (Cold et Forbes, 2004 ; Arambourou et al., 2019) et les anomalies gonadiques (Gross et al., 2001 ; Schirling et al., 2006). Un bioessai basé sur la mesure simultanée du stade de mue des femelles, du nombre et du stade des embryons ainsi que du nombre et de la surface des ovocytes chez notre espèce modèle *G. fossarum* a été développé par Geffard et al. (2010). La surface des ovocytes est un proxy des quantités de réserves vitellines stockées par les femelles et destinées aux futurs embryons. La bonne connaissance du

nombre d'embryons, d'ovocytes et des surfaces ovocytaires en fonction du stade de mue en condition témoin facilite l'interprétation des effets reprotoxiques mesurés et apporte également des informations sur les potentiels modes d'action impliqués (Geffard et al., 2010). D'autres traits d'histoire de vie sont utilisés pour l'évaluation des effets toxiques comme la survie (Taylor et al., 1991) et la croissance (Costa et al., 2005). Plusieurs réponses physiologiques ont également été étudiées pour évaluer l'effet de stresseurs chimiques sur les gammaridés comme la respiration (Lukančič et al., 2010 ; Lebrun et al., 2017), le taux d'alimentation (Maltby et Crane, 1994 ; Blockwell et al., 1998 ; Coulaud et al., 2011 ; De Castro-Català et al., 2017 ; Könemann et al., 2019) et le potentiel de croissance qui correspond à la mesure de la quantité d'énergie disponible pour la croissance et la reproduction (Maltby et Naylor, 1990). Pour finir, l'impact du stress toxique sur des marqueurs comportementaux tels que la locomotion et la ventilation ont été évalués (Felten et al., 2008 ; Mehennaoui et al., 2016 ; Lebrun et al., 2017).

Des liens statistiques ont pu être établis entre certaines des réponses biologiques présentées ci-dessus chez notre espèce d'étude *G. fossarum* : entre l'inhibition du taux d'alimentation et les effets sur la reproduction (Coulaud et al., 2015), entre l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) et les taux d'alimentation et la locomotion (Xuereb et al., 2009b) ainsi qu'entre les dommages primaires à l'ADN de spermatozoïdes et le développement des descendants issus des gamètes exposés (Lacaze et al., 2011b). Chez l'espèce *G. pulex*, Baird et al., 2007 ont également montré des liens statistiques entre l'inhibition du taux d'alimentation et la diminution de la survie des juvéniles et de la fécondité.

Basés sur l'établissement de liens mécanistes entre différents traits d'histoires de vie, les modèles de dynamique de population permettent de calculer les variables populationnelles telles que le temps de récupération, le taux de croissance asymptotique ou encore le risque d'extinction de la population. Ce type de modèle a été développé pour l'espèce *G. pulex* (Demyanov et al., 2006 ; Baird et al., 2007 ; Baveco et al., 2014 ; Galic et al., 2014 ; Dohmen et al., 2016), pour l'espèce marine *G. locusta* (De los Santos et al., 2015) et pour notre espèce d'étude *G. fossarum* (Coulaud et al., 2014).

L'existence de relations statistiques, ainsi que de modèles de dynamique de population permet d'envisager l'intégration des réponses sub-individuelles au niveau de l'individu et les réponses individuelles au niveau de la population. Il semble ainsi possible d'anticiper de potentielles conséquences populationnelles à partir de ces réponses. Dans le cadre de la surveillance environnementale, le modèle de dynamique de population développé chez notre

espèce modèle a déjà été proposé pour extrapoler en termes d'impacts populationnels le résultat de tests de toxicité (Coulaud et al., 2014, 2015).

Dans le cadre de la problématique des effets différés inter et transgénérationnels, des premiers résultats ont été obtenus chez *Gammarus fossarum* (Lacaze et al., 2011b). Comme mentionné ci-dessus, un lien statistique a été établi entre les dommages primaires à l'ADN de spermatozoïdes de mâles exposés à des agents mutagènes au laboratoire (F0) et les effets différés de l'exposition parentale sur les embryons F1 (exposés uniquement durant la gamétogénèse parentale). L'échelle de temps de cette étude n'a toutefois pas été suffisante pour conclure sur l'existence d'effets différés lorsque les expositions avaient lieu *in situ*. En effet, les niveaux de dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes, observés suite à l'encagement de gammares à la sortie de stations d'épuration et sur des sites présentant des contaminations métalliques environnementales, sont associés à des taux d'embryons anormaux proches des valeurs témoins (Lacaze et al., 2011a, b). Toujours chez *Gammarus fossarum*, Vigneron et al. (2016) ont mis en évidence un effet maternel important sur la sensibilité au cadmium des descendants issus d'organismes provenant de populations naïves vis-à-vis des métaux et notamment du Cd. De plus, Vigneron et al., (2019) ont démontré que la tolérance au cadmium observée chez une population de *Gammarus fossarum*, provenant d'un ruisseau contaminé de manière naturelle par du cadmium, résulte d'une plasticité transgénérationnelle induite par l'exposition parentale. La diminution de la sensibilité au Cd des organismes constituant cette population s'apparente donc à un effet différé de l'exposition parentale. Très récemment, deux études se sont intéressées aux effets différés de l'acidification de l'océan chez *G. locusta* (Borges et al., 2018 ; Lopes et al., 2019). Les organismes F0 ont été exposés à des teneurs élevées en CO_2 (mimant l'acidification de l'océan) dès leur sortie du marsupium et jusqu'à la sortie de leur propre descendance (F1). Des effets différés intergénérationnels de l'exposition parentale sur la fitness des organismes F1, en termes de survie et de reproduction, ont été mis en évidence (Borges et al., 2018). Au niveau moléculaire, Lopes et al. (2019) ont observé une hausse des dommages aux protéines chez les parents exposés. Leur machinerie anti-oxydante ne semble plus être en capacité d'éliminer l'excès de radicaux libres généré par l'acidification. Les descendants F1 adultes, exposés dans le marsupium de leur mère, présentent des niveaux de dommages à l'ADN et des niveaux de peroxydation lipidique élevés par rapport à la condition témoin (Lopes et al., 2019).

Comme mentionné précédemment, l'utilisation des gammares en écotoxicologie est pertinente d'un point de vue écologique et technique. À cela s'ajoutent d'autres atouts tels que le nombre important de marqueurs sub-individuels et individuels disponibles chez cette espèce et pertinents pour qualifier le fonctionnement de la population, ainsi que l'existence de modèles de dynamique de population. Le modèle biologique gammare offre donc la possibilité de suivre, au cours du cycle de vie des organismes exposés et de leurs descendants, un panel de marqueurs sub-individuels et individuels apportant des informations qualitatives sur de possibles impacts populationnels d'un stress chimique. Les conséquences potentielles sur la population peuvent également être quantifiées facilement par un certain nombre de modèles de dynamique de population déjà développés pour ces espèces. Il faut néanmoins être conscient de l'importance des coûts d'élevage et des difficultés logistiques que comporte ce type d'étude.

I.4. Objectifs de thèse et démarche expérimentale

Face au manque de connaissance sur l'existence et l'importance des effets différés dans les réponses individuelles et populationnelles au stress chimique au sein des milieux aquatiques, **cette thèse a pour objectif d'explorer les effets différés intergénérationnels et transgénérationnels et leurs conséquences sur le fonctionnement des populations chez une espèce « environnementale » (*i.e.* organismes issus de populations vivant en milieu naturel) : *Gammarus fossarum*.**

Compte-tenu du rôle potentiellement prépondérant des mécanismes épigénétiques dans l'apparition d'effets différés chez les organismes exposés et leur descendance, **une marque épigénétique, la méthylation globale des cytosines de l'ADN**, a tout d'abord été étudiée pour la toute première fois chez cette espèce. Pour cela, l'effet du genre (femelle ou mâle) et du stade de vie (juvénile ou adulte) sur le taux global de méthylation ont été étudiés. Nous avons aussi évalué la variabilité des niveaux de méthylation entre des organismes provenant de sites aux caractéristiques physico-chimiques contrastées. Au laboratoire, les effets de facteurs abiotiques tels que la température, la restriction alimentaire et l'exposition à des concentrations de cadmium réalistes d'un point de vue environnemental ont été suivis. Sur la base des réponses observées suite à l'exposition cadmique au laboratoire, la possible application de la méthylation des cytosines de l'ADN chez *Gammarus fossarum* comme biomarqueur de stress dans le cadre du suivi de la qualité des milieux a été envisagée. Afin d'approfondir cette dernière question,

les niveaux de méthylation ont été mesurés suite à l'encagement d'organismes sur des sites d'étude aux contextes de contamination variés.

Pour répondre à l'objectif principal de prospection des effets différés inter et transgénérationels de cette thèse, un **protocole expérimental**, permettant d'identifier de tels effets de l'**exposition parentale** à un stress chimique **au laboratoire** sur la descendance et d'**élever sur le long-terme** plusieurs générations, a été développé pour *G. fossarum*. Ce dernier est décrit dans le chapitre matériels et méthodes (voir II.4.2). À partir de ce protocole, deux expositions à des contaminants aux modes d'action *a priori* différents ont été réalisées. Le premier contaminant choisi a été le cadmium (Cd) car de nombreux effets de cet élément trace métallique à des concentrations susceptibles d'être rencontrées dans l'environnement, ont été décrits chez les gammares (Abel et Barlocher, 1988 ; Felten et al., 2008 ; Alonso et al., 2010 ; Geffard et al., 2010 ; Issartel et al., 2010 ; Duman et Kar, 2015 ; Gismondi et al., 2017). Cette molécule est particulièrement intéressante pour l'étude des effets différés car une hérédité non-génétique de modification de la sensibilité au cadmium a été mise en évidence dans de précédents travaux chez une population de *Gammarus fossarum* provenant d'un ruisseau naturellement contaminé par ce métal (Vigneron et al., 2019). De plus, chez d'autres espèces d'invertébrés, des études multigénérationnelles ont montré l'émergence d'effets inter et/ou transgénérationnels suite à l'exposition parentale au cadmium (Yu et al., 2013 ; Kimberly et Salice, 2015 ; Reátegui-Zirena et al., 2017). Pour finir, des modulations épigénétiques induites par des expositions au Cd chez des organismes aquatiques ont été mises en évidence (Pierron et al., 2014b ; Nica et al., 2017 ; Šrut et al., 2017). Afin d'étudier les effets différés d'une autre famille de contaminant, la seconde substance choisie a été la 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA). Cette molécule organique se retrouve dans l'environnement suite à son utilisation dans la fabrication d'herbicides de type phenyle-urée (*e.g.* diuron), de produits bactéricides et de teintures azoïques pour les polyesters. Des effets de cette molécule ont été observés sur différents traits biologiques chez les gammaridés (Maltby et al., 1990 ; Taylor et al., 1991, 1994 ; Blockwell et al., 1998 ; Girling et al., 2000). D'autre part, Sardo et al., 2005 ont montré chez le crustacé mysid *Mesopodopsis slabberi* que la 3,4-DCA s'accumulait et générait des dommages histologiques au niveau des gonades. Des impacts génotoxiques de la 3,4-DCA, même à de faibles concentrations, ont également été rapportés (Mucig, 2009 ; Behrens et al., 2016). Enfin, les effets intergénérationnels d'une exposition au diuron, dont la 3,4-DCA est le

principal produit de dégradation, ont été mis en évidence chez le mollusque *Crassostrea gigas* (Barranger et al., 2015 ; Bachère et al., 2017).

En plus des expositions au laboratoire et afin de se placer dans un contexte de contamination environnementale, des **expositions *in situ*** d'organismes transplantés (adultes reproducteurs) ont également été réalisées. Nous avons choisi des sites d'étude présentant des typologies de contamination contrastées (agricole, forestier, urbain et industriel) et pour lesquels des effets toxiques ont déjà été caractérisés lors de précédentes expositions *in situ* de *G. fossarum*. À la suite des expositions parentales, les parents ont été ramenés et leurs descendants élevés au laboratoire.

Que l'exposition ait été réalisée au laboratoire ou sur le terrain, les dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes, les niveaux globaux de méthylation des cytosines de l'ADN, la survie, l'activité alimentaire et les capacités reproductives ont été mesurés chez les parents exposés, dans le but de caractériser l'exposition parentale (Figure I - 12). Afin d'évaluer la qualité de la descendance et identifier d'éventuels effets différés pouvant *in fine* influencer le fonctionnement de la population, un ensemble de variables biologiques a été suivi sur les générations successives issues des parents exposés (Figure I - 12). Cet ensemble comprend les deux marqueurs moléculaires : les dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes et les niveaux de méthylation globale des cytosines de l'ADN ainsi que des traits biologiques relatifs à la croissance, la reproduction et la survie (Figure I - 12).

Pour finir, l'impact démographique des effets différés a été évalué grâce à la formalisation de **modèles de dynamique de population** pour chaque génération de descendants.

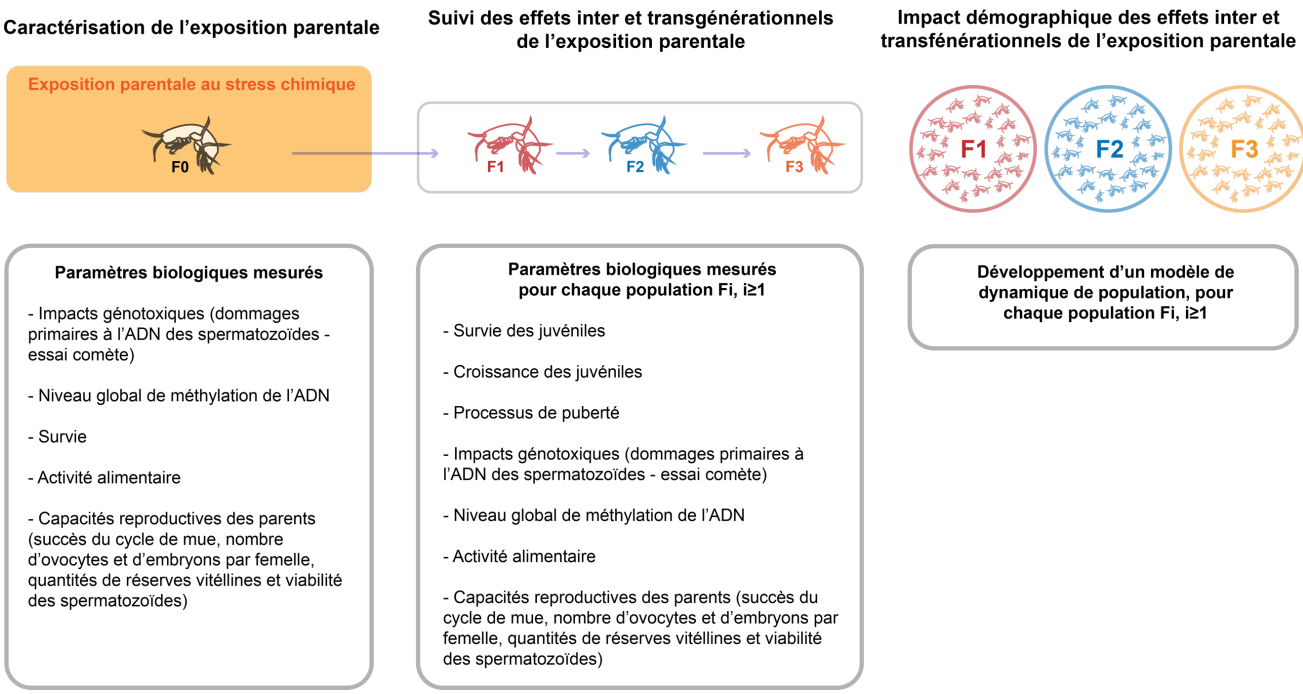


Figure I - 12 : Démarche expérimentale mise en œuvre dans cette thèse.

Chapitre II. Matériels et méthodes

Ce chapitre II détaille les méthodes mises en place dans ce travail de thèse pour prélever sur le terrain et maintenir au laboratoire les organismes tests, les expérimentations réalisées, ainsi que les protocoles de mesure des différents paramètres biologiques suivis.

La première partie concerne le prélèvement des organismes utilisés pour les expérimentations dans leur milieu naturel et leur maintien au laboratoire avant le début des expériences. La seconde partie présente les sites sur lesquels des expositions *in situ* ont été réalisées ainsi que la procédure suivie pour l'encagement des organismes. La troisième partie détaille l'étude de la marque épigénétique méthylation des cytosines de l'ADN. La quatrième partie présente les protocoles élaborés pour l'étude au laboratoire des effets transgénérationnels suite à l'exposition parentale à deux contaminants et *in situ*. La cinquième partie décrit les protocoles de mesure des paramètres biologiques suivis dans ce travail de thèse. La sixième et dernière partie concerne la construction du modèle de dynamique de population utilisé dans le cadre des expérimentations transgénérationnelles.

II.1. Prélèvement des organismes et stabulation au laboratoire

II.1.1. Sites de prélèvement dans le milieu naturel

II.1.1.1. Sites de prélèvement pour la stabulation des organismes au laboratoire

Les organismes utilisés dans ce travail de thèse ont été prélevés sur deux sites peu contaminés. Le premier est localisé dans la partie amont de la Bourbre (Isère, France) qui est un affluent du Rhône, à Bourgoin-Jallieu (longitude :5°15’31.3"E, latitude :45°36’13.1"N). Le second est la cressonnière du Bugey à Saint-Maurice-de-Rémens dans l’Ain (longitude : 5°15'42.0"E, latitude :45°57'16.8"N). Contrairement au site de Bourgoin-Jallieu, la densité des populations présentes sur ce dernier site est élevée quelle que soit la saison. Les canaux, dont l’eau provient d’un tronçon non-pollué du cours d’eau Pollon, sont riches en *Gammarus fossarum* et permettent un approvisionnement important en organisme quelle que soit la saison (Figure II - 1).

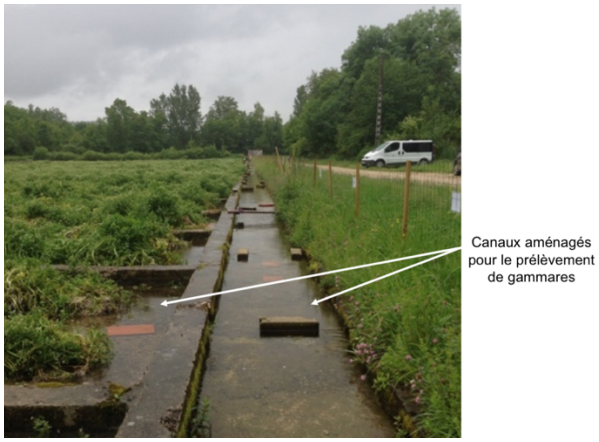


Figure II - 1 : Site de prélèvement de gammares à la cressonnière de St-Maurice-de-Rémens.

II.1.1.2. Sites de prélèvement pour l’étude de la variabilité inter-populationnelle du niveau global de méthylation des cytosines de l’ADN :

Les niveaux globaux de méthylation des cytosines de l’ADN de mâles provenant de populations de *Gammarus fossarum* présentes à de fortes densités et localisées sur des sites aux caractéristiques physico-chimiques variées (Tableau II - 1) ont été mesurés. L’ensemble des sites sont situés en amont des cours d’eau, à l’exception du site de la Cressonnière qui est, comme indiqué précédemment, un ensemble de canaux alimentés par le cours d’eau Pollon (Figure II - 1).

Les sites investigués sont peu contaminés, à l'exception des Ardillats présentant une contamination biodisponible métallique d'origine géochimique. Cette dernière a pu être mise en évidence via le déploiement de tests de bioaccumulation lors de la transplantation de gammares issus d'une population de référence (monitoring actif, Besse et al., 2013). Des niveaux d'accumulation du cadmium (gammares encagés sur le site pendant 7 jours) cinq fois plus élevés que le seuil de référence national ont été observés (Vigneron et al., 2015). Par ailleurs, la population de *Gammarus fossarum* localisée sur le site des Ardillats présente une tolérance au cadmium qui résulte d'un héritage non génétique de tolérance (Vigneron et al., 2015, 2019).

Tableau II - 1 : Populations naturelles étudiées dans le cadre de l'étude du niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN

Population	Cress		Mand	Tour	Bacu	Ardillats
Coordonnées (Long, Lat)	45°57′28.44″N 5°15′45.094″E		45°58′38.6″N 5°28′24.3″E	45°34′09.9″N 5°27′33.9″E	46°03′23.9″N 4°28′42.7″E	46°11′11.2″N 4°31′14.3″E
Moyenne de la température de l'eau (°C)	Avril-Juin	10.62	9.9	13.2	11.4	11.5
	Jul-Sep	12.07	11.7	16.4	14.8	14.2
	Oct-Dec	12.15	9.0	9.0	9.1	8.7
	Jan-Mars	10.78	7.2	5.5	5.0	5.7
Conductivité ($\mu S.cm^{-1}$)	435		366	560	117	136
Dureté ($mgCaCO3.L^{-1}$)	245		213	299	28	30
pH	7.5		8.5	8.3	8	7.9
NO_2^- (mg/L)	0		0.04	1.12	<0.02	0.05
NO_3^- (mg/L)	7.2		2.3	17	4.1	8.2
PO_4^{3-} (mg/L)	0		0.1	0.4	0.09	0.21

Population	Cress	Mand	Tour	Bacu	Ardillats
HCO_3^- (mg/L)	279.4	235	310	<30	<30
Cl^- (mg/L)	4.8	4	16	7	11
SO_4^{2-} (mg/L)	6.5	7	14	8	4
Mg^{2+} (mg/L)	3	3	3	2	2
Ca^{2+} (mg/L)	93	81	115	8	9
Na^+ (mg/L)	3.2	2	7	7	8
K^+ (mg/L)	0	1	2	1	2

II.1.2. Technique de prélèvement

Les gammares se trouvent dans du gravier fin, des racines, au niveau de débris végétaux, voire dans des briques lorsque le site de prélèvement a été aménagé pour faciliter la capture d'organismes (Figure II - 1). La technique de prélèvement consiste à déloger les gammares en remuant le substrat avec le pied ou en déplaçant les briques, puis de les récupérer en plaçant un troubleau (aire rectangulaire : 25 X 18 cm, maille 630 µm) en aval de la zone investiguée (Figure II - 2).

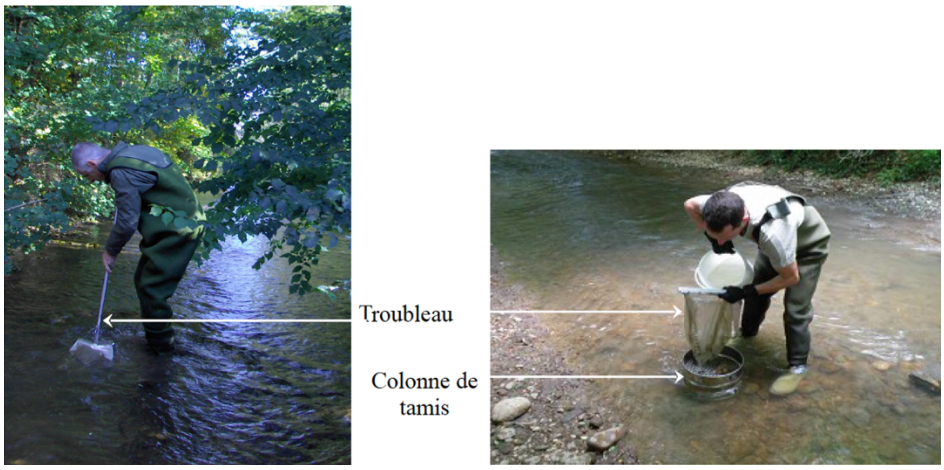


Figure II - 2 : Collecte d'organismes au troubleau et tri dans la colonne de tamis. Source : Lacaze (2011).

Le contenu du troubleau est ensuite trié à l'aide d'une colonne constituée de tamis de 10 mm (dégrilleur), 2,5 mm, 2 mm et 1,25 mm (Figure II - 2). Cette colonne est placée dans un

peu d'eau et les organismes rincés afin de permettre leur descente (Figure II - 2). Les organismes présents, dans le tamis de 2 mm pour les adultes et dans le tamis de 1,25 mm pour les juvéniles, sont ensuite récupérés et placés dans des seaux remplis d'eau du site. Pour empêcher l'anoxie, le nombre d'organismes dans un même seau est limité. Les variations de température, auxquelles les gammares sont sensibles, sont évitées grâce au stockage des seaux dans des glacières.

II.1.3. Stabulation au laboratoire

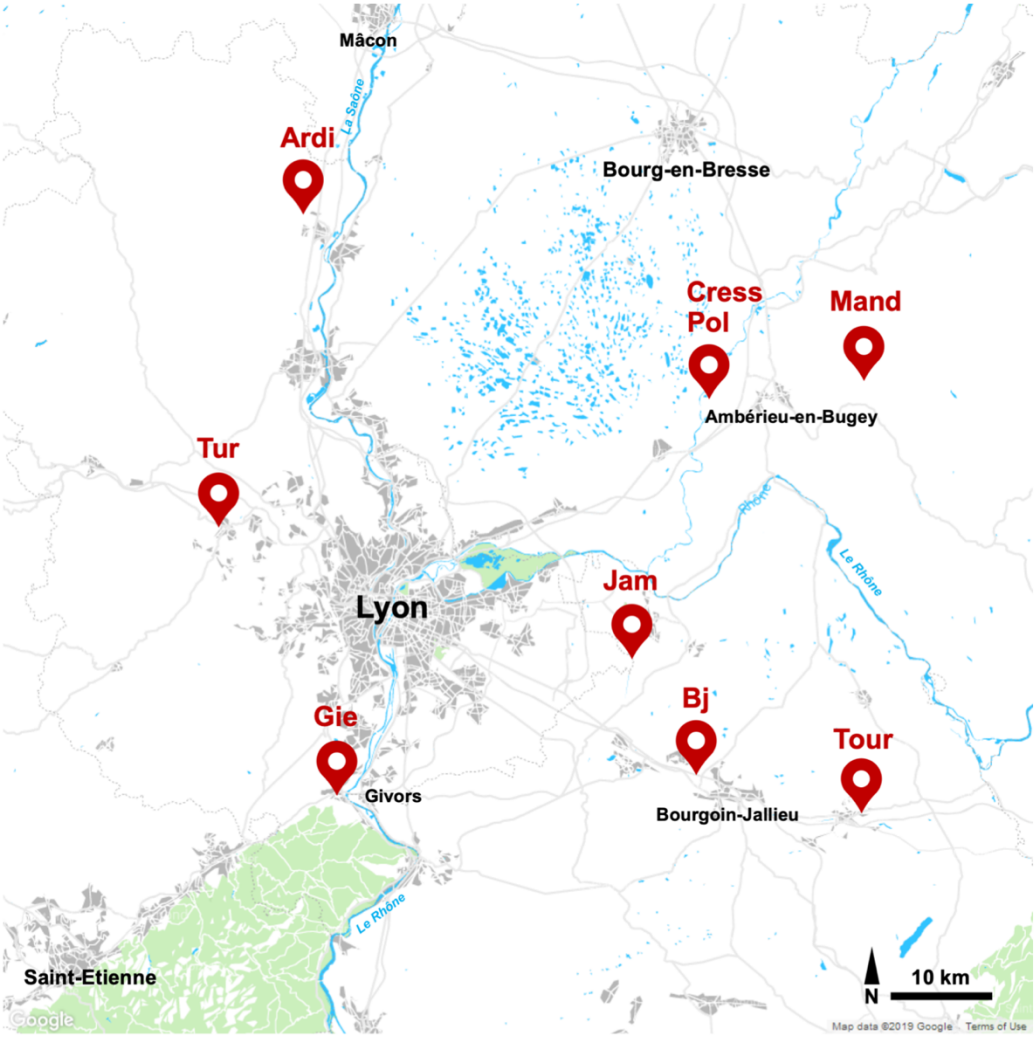
Au laboratoire, le contenu des seaux est trié pour enlever le maximum de matière organique. Les gammares sont répartis dans des aquariums de 20 L (environ 4000 organismes par aquarium) placés dans un bain-marie thermorégulé à 12 ± 0,5°C contenant de l'eau du site de prélèvement. Cette eau est par la suite remplacée progressivement par de l'eau de forage à un débit de 4L/h. Le pH est compris entre 7 et 8 et la conductivité entre 400 et 500 µS/cm. Un bullage en continu est placé dans chaque aquarium. La photopériode est de 16h de jour et de 8h de nuit avec une intensité lumineuse comprise entre 500 et 1000 lux. Les organismes sont nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*). Ces feuilles sont récoltées en automne dans une région peu anthropisée dans la localité des Ardillats (Rhône), mises à sécher et stockées au laboratoire. Avant leur utilisation, les feuilles sont conditionnées pendant au moins une semaine dans de l'eau de forage oxygénée et renouvelée en continu (*i.e* leachées) pour permettre leur réhydratation et le développement d'un biofilm pour améliorer leur appétence. Cela permet également d'éliminer le tanin qui est très toxique pour les gammares. Une fois tous les deux jours, des oligochètes lyophilisés (*Tubifex tubifex*) sont ajoutés comme complément alimentaire.

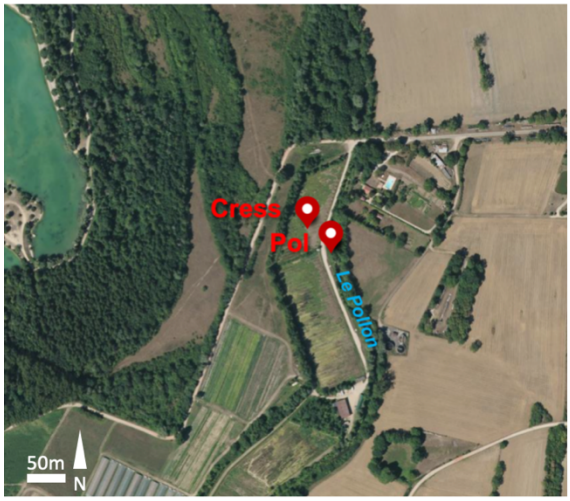
II.2. Encagement *in situ* des gammares

II.2.1. Sites d'encagement

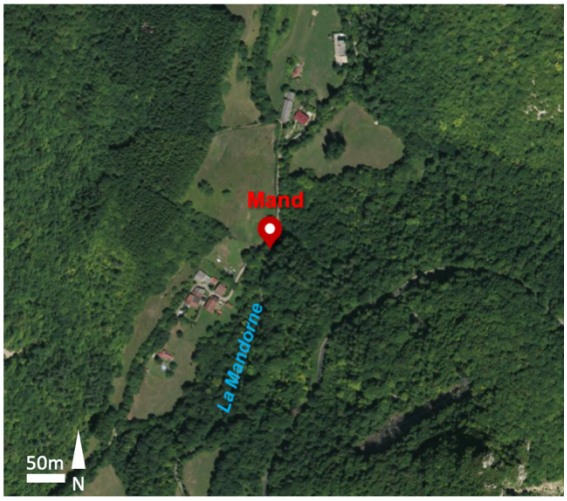
Les différents sites étudiés dans cette thèse présentent des contextes de contamination contrastés ainsi qu'une toxicité, déjà caractérisée lors de précédents travaux (Lacaze, 2011 ; Coulaud, 2012 ; Jubeaux, 2012 ; projet ANR-CESA-2012 Gamma (2012-2015) ; projet Agence de l'eau RMC-INDICE-2014). Les deux sites localisés à St-Maurice-de-Rémens, au niveau des canaux de la cressonnière du Bugey (Cress) et sur la partie du Pollon située à proximité des

canaux (Pol), ainsi que le site sur la Mandorne (Man), constituent des sites très peu contaminés (Tableau II - 2 ; Figure II - 3). Le site situé à La Tour-du-Pin sur la Bourbre (Tour) présente une qualité biologique moyenne, mais est peu contaminé (Vigneron et al., 2015 ; Tableau II - 2 ; Figure II - 3). Une pression chimique modérée a été identifiée en aval de la STEP de Bourgoin-Jallieu, sur le site Bj ainsi qu'en aval de l'agglomération de Bourgoin-Jallieu, sur le site Jam (Tableau II - 2 ; Figure II - 3). Pour finir, les sites situés sur la Turdine, le Gier et L'Ardières (respectivement Tur, Gie et Ardi) sont soumis à des contaminations importantes, aux origines variées pour les deux premiers sites (agricoles, industrielles et urbaines) et spécifiques pour l'Ardières (viticole) (Tableau II - 2 ; Figure II - 3).





45°57'24"N 5°15'43"E



45°58'37"N 5°28'24"E

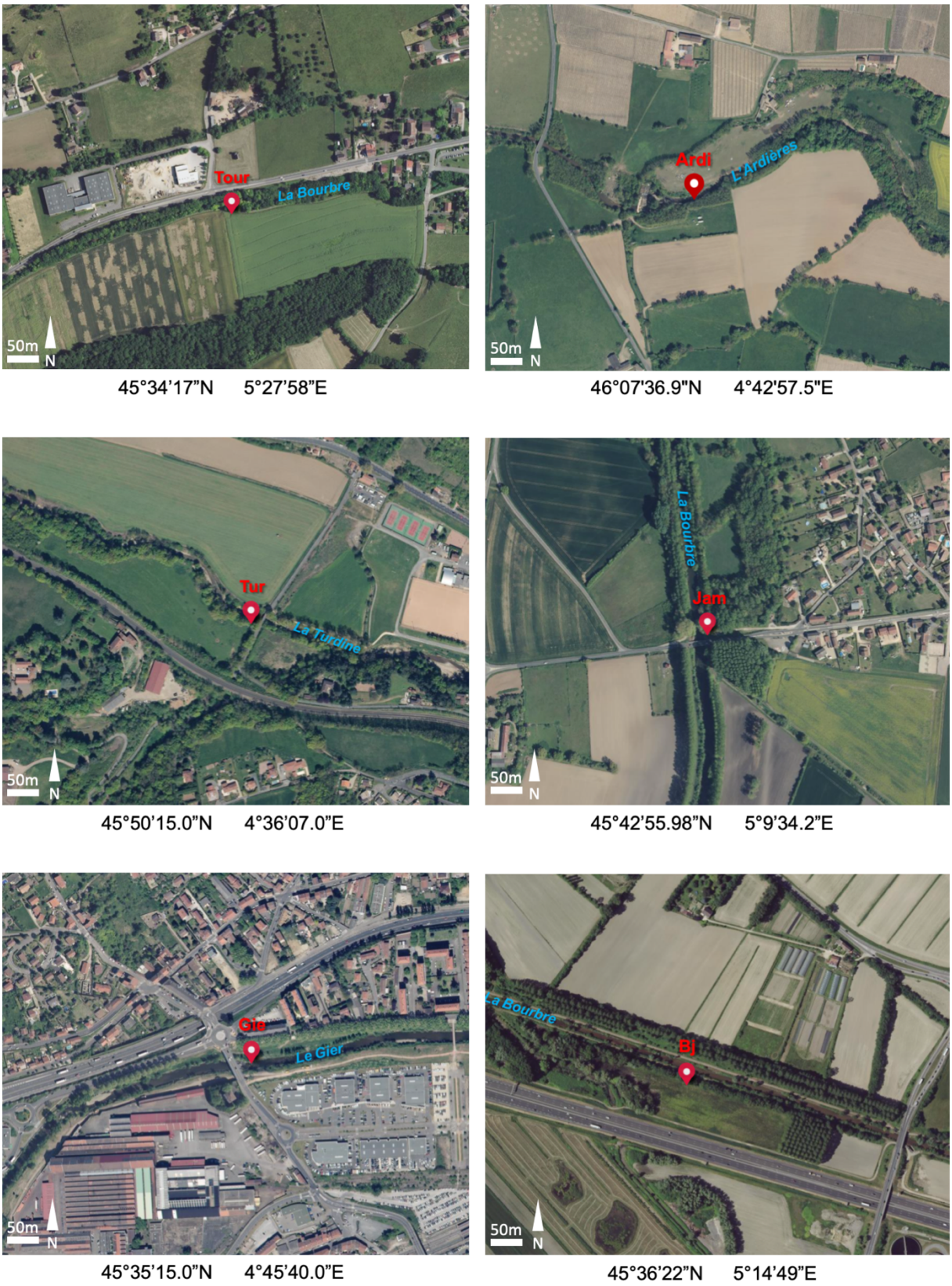


Figure II - 3 : Localisation des différents sites d'encagement

Tableau II - 2 : Caractéristiques des sites d'encagement

Sites (rivière, lieu)	Abrévia-tion	Coordonnées (Long, Lat)	Occupation des sols	Qualité biologique (QB)[3] - nutriments et polluants spécifiques (NPS)[3]			Pression chimique
				2016	2017	2018	
Canaux de la Cressonnière du Bugey alimentés par le Pollon, Saint-Maurice de Rémens (01)	Cress	45°57'24"N 5°15'43"E	Forestier et agricole	Pas de données	Pas de données	Pas de données	Faible[4]
Pollon, Saint-Maurice de Rémens (01)	Pol	45°57'24"N 5°15'43"E	Forestier et agricole	Pas de données	QB : Bon	QB : Bon	Faible[4]
Mandorne, Oncieu (01)	Mand	45°58'37"N 5°28'24"E	Forestier	QB : Bon	QB : Bon	QB : Bon	Faible[5]
Bourbre, Tour-du-Pin (38)	Tour	45°34'17"N 5°27'58"E	Urbain et agricole	QB : Moyen	QB : Moyen	Pas de données	Faible[6]

[3] Données eaufrance

[4] Suivi par biomae, entreprise proposant des prestations de biosurveillance active des masses d'eau continentale par encagement de gammares.

[5]François, A., Chaumot, A., Geffard, O. Intérêt d'un indicateur écotoxicologique pour diagnostiquer et comprendre l'état des milieux aquatiques et aider à la restauration. Rapport final, décembre 2016.

[6] Projet ANR-CESA-2012 Gamma

[7] Lacaze, E. (2011). « Un biomarqueur de génotoxicité chez Gammarus fossarum : développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel. », thèse de doctorat de l'Université de Metz.

Sites (rivière, lieu)	Abrévia-tion	Coordonnées (Long, Lat)	Occupation des sols	Qualité biologique (QB)[3] - nutriments et polluants spécifiques (NPS)[3]			Pression chimique
				2016	2017	2018	
Bourbre, en aval de la STEP de Bourgoin-Jallieu (38)	Bj	45°36'22"N 5°14'49"E	Urbain, industriel et agricole	QB : Pas de données – NPS : HAP	QB : Pas de données – NPS : HAP	Pas de données	Modérée[6, 7]
Bourbre, Tignieu-Jameyzieu (38)	Jam	45°42'55.98" N 5°9'34.2"E	Urbain, industriel et agricole	QB : Pas de données – NPS : HAP	QB : Pas de données – NPS : HAP	Pas de données	Modérée[5]
Turdine, L'Arbresle (69)	Tur	45°50'15.0"N 4°36'07.0"E	Urbain, industriel et agricole	QB : Médiocre – NPS : nitrites et phosphates	QB : Médiocre – NPS : nitrites et phosphates	QB : Médiocre – NPS : nitrites, phosphates et arsenic	Forte[5, 6]
Gier, Givors (69)	Gie	45°35'15.0"N 4°45'40.0"E	Urbain et industriel	QB : Mauvais – NPS : nitrites et phosphates, diflufenicanil	QB : Mauvais – NPS : nitrites, ammonium et phosphates	QB : Médiocre – NPS : nitrites, ammonium et phosphates	Forte[5, 6]
L'Ardières, St Jean d'Ardières (69)	Ardi	46°07'36.9"N 4°42'57.5"E	Agricole (viticole)	QB : Médiocre – NPS : phosphate et aminotriazole et arsenic	QB : Mauvais – NPS : phosphate et aminotriazole et arsenic	QB : Mauvais – NPS : phosphate et arsenic	Forte[5, 6]

[5]François, A., Chaumot, A., Geffard, O. Intérêt d'un indicateur écotoxicologique pour diagnostiquer et comprendre l'état des milieux aquatiques et aider à la restauration. Rapport final, décembre 2016.

[6] Projet ANR-CESA-2012 Gamma

[7] Lacaze, E. (2011). « Un biomarqueur de génotoxicité chez Gammarus fossarum : développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel. », thèse de doctorat de l'Université de Metz.

II.2.2. Procédure d'encagement

Les organismes triés et calibrés en taille sont répartis dans des chambres cylindriques en polypropylène perforées appelées « systèmes » (30 organismes au maximum par système) (Figure II - 4).

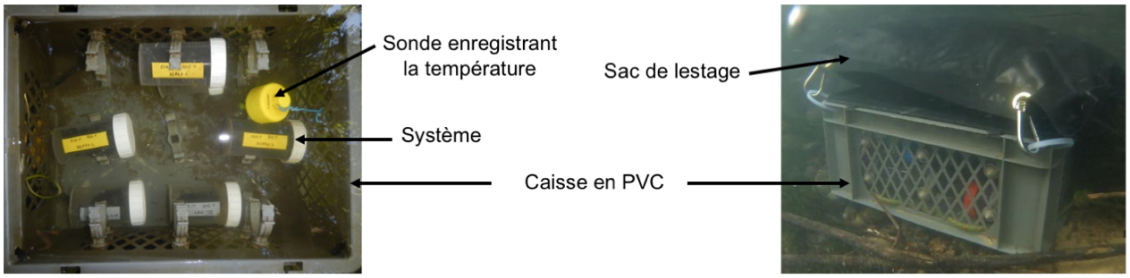


Figure II - 4 : Systèmes et caisses d'encagement. Source : Ecotox-IRSTEA.

Des feuilles d'aulne, préparées comme décrit précédemment (voir II.1.3) sont ajoutées à chaque système. Les systèmes sont transportés dans des seaux contenant de l'eau de forage saturée en oxygène dissous jusqu'aux sites d'encagement à l'aide de glacières pour éviter de générer un stress thermique. Sur les sites, les systèmes sont placés dans des caisses en PVC (longueur x largeur x hauteur : 60 x 40 x 20 cm), lestées par un sac contenant des pierres trouvées sur le site (Figure II - 4). Les caisses sont attachées à la berge par une corde.

Lors de chaque sortie sur les sites d'encagement, des mesures physico-chimiques de base, à savoir pH, conductivité et température, sont effectuées à l'aide d'une sonde multimètre. Une sonde programmable, enregistrant la température toutes les heures, est placée en permanence à l'intérieur de la caisse.

II.3. Expérimentations réalisées dans le cadre de l'étude du niveau global de méthylation de l'ADN

II.3.1. Expositions au laboratoire

L'effet de la température de l'eau, de la restriction alimentaire et du stress chimique induit par le cadmium sur le niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN ont été évalués au cours d'une même expérimentation (Figure II - 5).

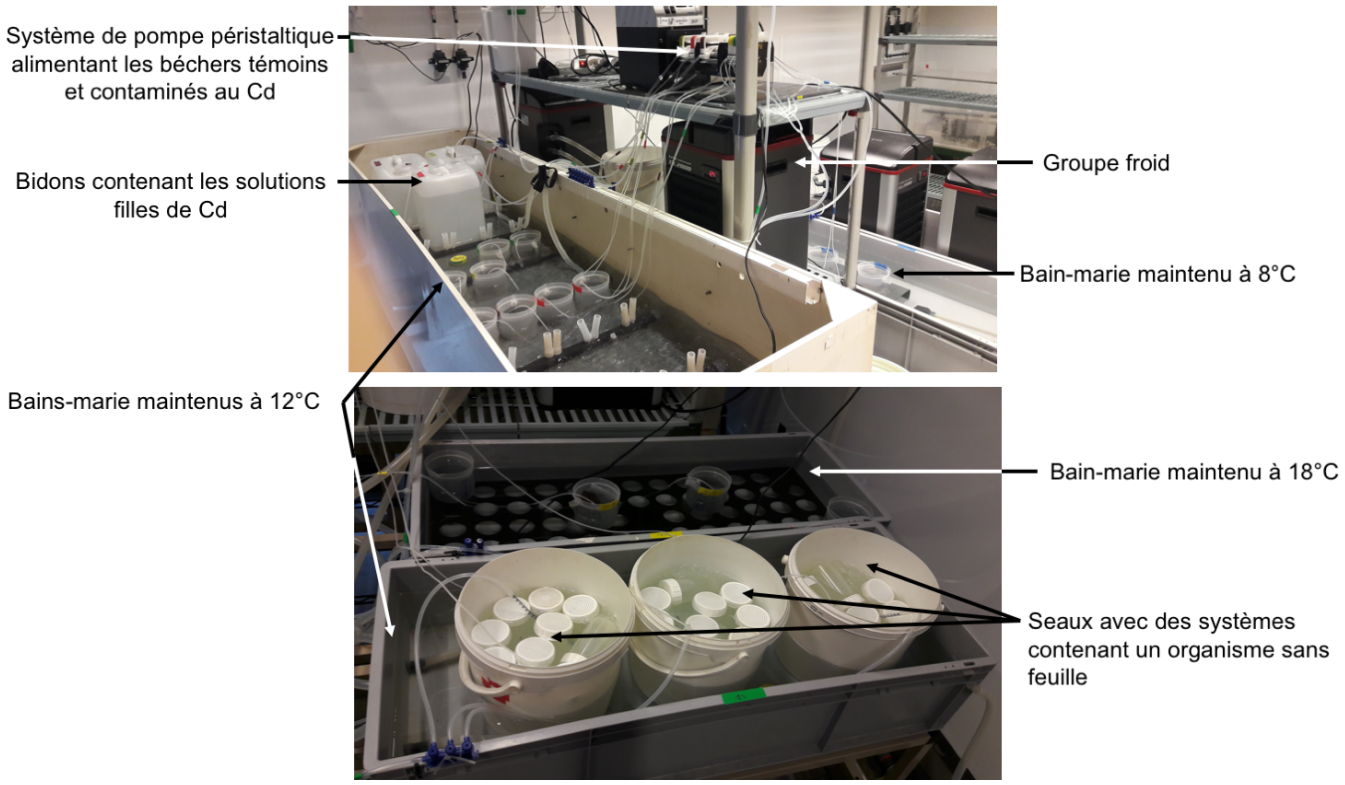


Figure II - 5 : Dispositif expérimental pour l'étude de l'effet de la température, de la privation alimentaire et du stress cadmique sur le niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN

Les organismes utilisés ont été collectés sur le site de la Cressonnière (voir II.1.1) en automne 2016. La veille du début de l'expérience, des gammares mâles homogènes en taille, ont été sélectionnés.

Pour mesurer l'effet de la température, 2 réplicats de 15 gammares ont été placés avec quelques feuilles d'aulne et de la maille fine dans des béchers en plastique contenant 500 mL d'eau de forage dans trois bains-marie distincts thermorégulés à 8°C, 12°C (témoin) et à 18°C (Figure II - 5). La température de 18°C a été choisie car elle est élevée par rapport à celles auxquelles les gammares sont soumis dans le milieu naturel dont ils proviennent (voir site de la Cressonnière Cress Tableau II - 1).

Pour l'étude de la restriction alimentaire, des mâles ont été répartis individuellement dans 30 cylindres perforés ou systèmes, placés dans 3 seaux (Figure II - 5). Un récipient de 65L rempli d'eau de forage, saturée en oxygène dissous grâce à un système de bullage, a permis d'alimenter en continu à l'aide d'une pompe péristaltique les différents béchers et seaux utilisés dans l'étude du stress thermique et de la privation alimentaire à un débit respectivement de 750 et 10,5 mL par jour.

Le stress chimique a été étudié en exposant des mâles à trois concentrations de cadmium pertinentes d'un point de vue environnemental : 0,05 ; 0,5 et 5 µg Cd/L. En effet, les concentrations en cadmium dans les cours d'eau contaminés peuvent atteindre des valeurs de l'ordre du µg/L (Felten et al., 2008). Pour chaque concentration, deux réplicats de 15 mâles ont été placés dans un bécher en plastique de 500 mL avec des feuilles d'aulne et une maille fine, répartis dans un bain-marie maintenu à 12°C (Figure II - 5). Trois solutions mères de cadmium ont été préparées dans de l'eau milliQ aux concentrations de 5 ; 0,5 et 0,05 mg Cd/L par le biais de deux dilutions en cascade. Les milieux d'exposition ont été obtenus en diluant 10 mL de solution mère dans 10 L d'eau de forage. Les solutions filles ainsi obtenues sont acheminées depuis les bidons de 10L jusqu'aux béchers d'exposition par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique à un débit de 750 mL par jour permettant un renouvellement continu des milieux (Figure II - 5).

Quel que soit le paramètre étudié, après 14 et 28 jours d'exposition, 10 organismes de chaque condition ont été échantillonnés de manière individuelle, pesés, sacrifiés à l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ADN (voir II.5.1.1).

II.3.2. Expositions *in situ*

Des expositions *in situ* par encagement de gammares provenant du site de la cressonnière (voir II.1.1) ont été réalisées sur le site de référence situé sur la Mandorne à Oncieu et sur des sites fortement impactés par les activités humaines : Ardi, Jam, Tur et Gie (Tableau II - 2). Après 7 et 28 jours d'exposition *in situ*, 10 organismes de chaque condition ont été échantillonnés de manière individuelle, pesés, sacrifiés par immersion dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ADN (voir II.5.1.1).

II.4. Expérimentations transgénérationnelles

II.4.1. Protocoles des expositions parentales

Afin d'étudier les conséquences potentielles de l'exposition parentale aux contaminants sur les générations successives de descendants, nous avons élaboré deux protocoles expérimentaux pour les expositions au laboratoire et *in situ* en nous basant sur la dynamique du cycle reproductif aujourd'hui bien décrit chez le gammare (voir I.3.1.4) (Figure II - 6).

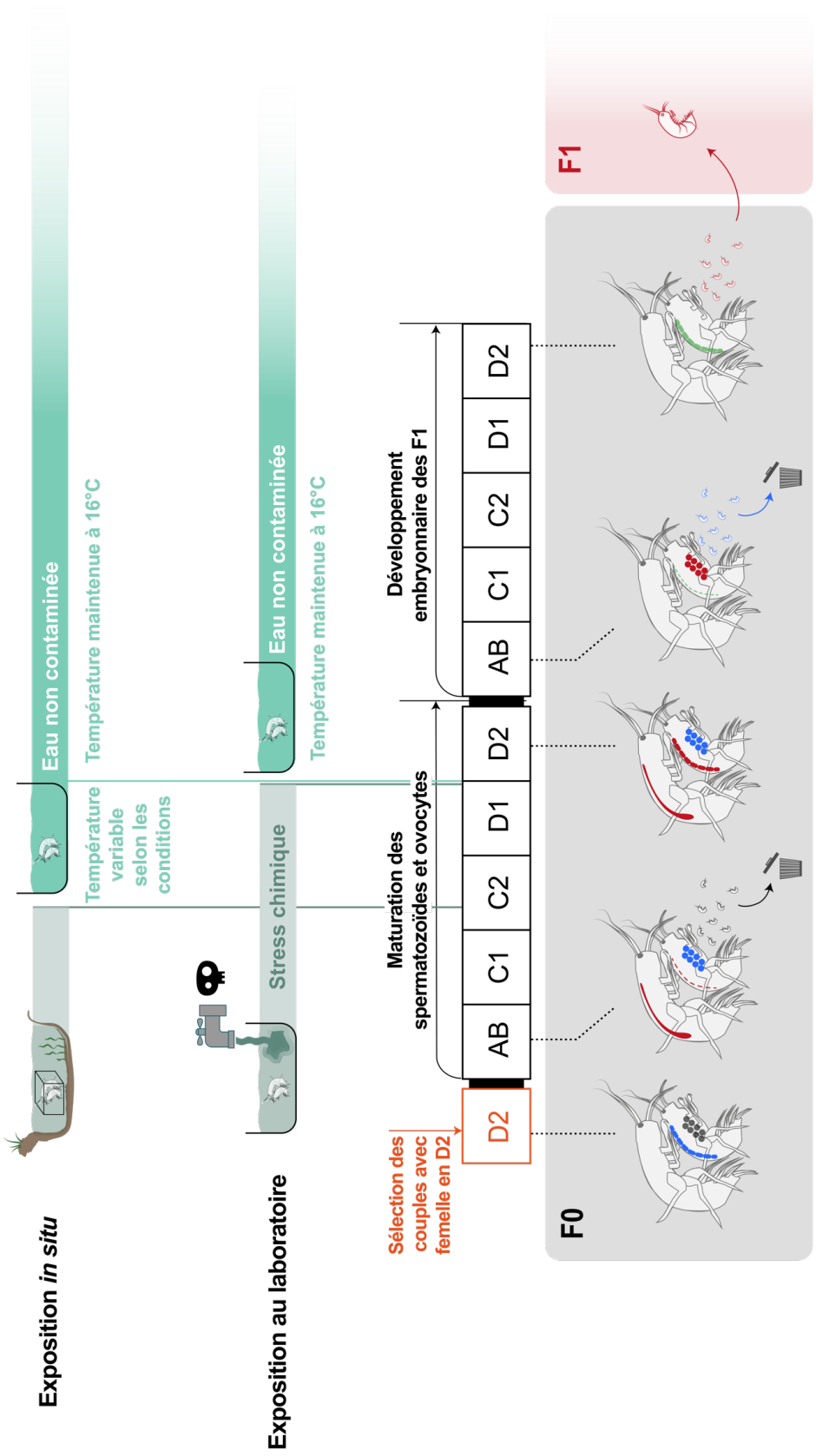


Figure II - 6 : Protocoles expérimentaux utilisés pour les expositions parentales. Rouge : organismes F1 exposés uniquement pendant la gamétogénèse parentale.

Un effet peut être qualifié de transgénérationnel lorsqu'il se manifeste chez les organismes qui n'ont jamais été exposés, y compris de manière indirecte au stade de cellule germinale (Skinner et al., 2010). Pour mettre en évidence de tels effets dès la deuxième génération de descendants (F2), la cohorte utilisée pour constituer la F1 (cohorte rouge sur la Figure II - 6) a été exposée au contaminant uniquement pendant la gamétogénèse parentale. La cohorte exposée au cours de son développement embryonnaire (cohorte bleue sur la Figure II - 6) a été éliminée à sa sortie du marsupium. Pour se garantir d'une exposition dès le début de la gamétogenèse, nous avons fait commencer l'exposition sur un ensemble d'individus sélectionnés en fin de cycle reproducteur, soit sur le point d'engager un nouveau cycle. Nous avons ainsi trié la veille du lancement de l'exposition des couples en précopula, constitués de femelles en fin de stade D2 et de mâles en fin de spermatogénèse (Figure II - 6). Cette sélection s'est basée sur l'observation à l'œil nu sur une table lumineuse des organismes pêchés quelques jours auparavant. Les femelles au stade D2 se repèrent par la présence d'ovocytes de taille importante sur le dos et d'embryons de couleur claire, similaire à la carapace des femelles prêtes à muer et à pondre. Après l'exposition, il a fallu attendre un cycle de reproduction supplémentaire en milieu non contaminé, pendant lequel le développement embryonnaire des organismes F1 s'est déroulé, pour récupérer les juvéniles F1 sortis du marsupium de leurs mères (Figure II - 6). Par la suite, la génération F1 et les suivantes ont été élevées en milieu non contaminé.

II.4.1.1. Expositions au laboratoire

Pour les expositions au laboratoire, la température a été fixée à la valeur optimale de 16°C pour avoir le cycle de vie le plus rapide possible, sans générer de stress thermique. En effet, chez les gammares, le cycle de reproduction et de mue des femelles, ainsi que la croissance dépendent de la température (Coulaud et al., 2014). À cette température, le cycle de reproduction des femelles dure en moyenne 25 jours (Chaumot et al., soumis). De plus, chez les mâles, la spermatogénèse dure 7 jours à 12°C (Lacaze, 2011). Sur la base de ces informations, nous avons fixé la durée des expositions à 21 jours afin de s'assurer de l'exposition des parents au stress chimique au cours de la phase de gamétogénèse. Cette durée permet également d'éviter la ponte des cohortes F1 dans le marsupium des femelles en milieu contaminé et ainsi l'exposition des œufs au début de leur embryogénèse. Deux expositions chimiques ont été menées au laboratoire : une première avec le cadmium comme contaminant

et une seconde avec la 3,4-dichloroaniline. Les conditions d'exposition sont décrites dans le tableau ci-dessous (Tableau II - 3).

Tableau II - 3 : Conditions des expositions réalisées au laboratoire dans le cadre des expérimentations transgénérationnelles.

	Exposition cadmium			Exposition 3,4 - DCA	
Organismes utilisés	Site situé dans la partie amont de la Bourbre (II.1.1)			Site de la Cressonnière (II.1.1)	
Durée	21 jours			21 jours	
Température	16°C			16°C	
Renouvellement du milieu	tous les jours, matin et soir			tous les deux jours	
Oxygénation	continue			continue	
Alimentation	*ad libitum*			*ad libitum*	
Concentration nominale	0,3 µg Cd/L et 3 µg Cd/L			10 µg DCA/L	
Organismes par réplicat	400 couples avec femelle au stade D2	25 mâles calibrés en taille (test alimentation)	15 mâles avec femelle au stade D2 (mesure des dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes)	15 couples avec femelle au stade D2	25 mâles calibrés en taille (test alimentation)
Nombre de réplicats par condition	1	4	2	25	4

Pour chaque condition d'exposition au cadmium, ont été placés dans un seau contenant 10 L du milieu d'exposition (Figure II - 7) : (i) 400 couples, (ii) 4 systèmes dans lesquels ont été répartis 100 mâles destinés à la réalisation d'un test alimentation (protocole du test alimentation au paragraphe II.5.4) et (iii) 2 systèmes contenant 15 mâles en précopula avec une femelle en D2, destinés aux mesures des dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes (protocole de mesure au paragraphe II.5.1.2).

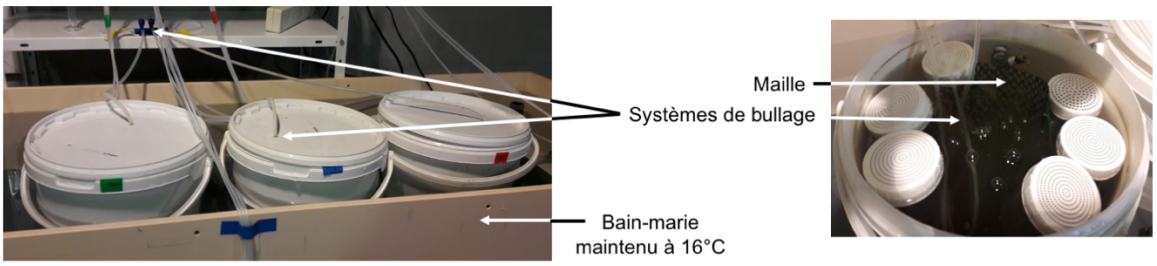


Figure II - 7 : Dispositif expérimental pour l'exposition au cadmium

Pour chaque condition d'exposition à la 3,4-DCA, 375 couples en précopula dont la femelle se trouve au stade D2 et 100 mâles calibrés destinés à la réalisation d'un test alimentation ont été répartis respectivement dans 25 et 4 béchers en verre contenant 500 mL du milieu d'exposition (Figure II - 8).

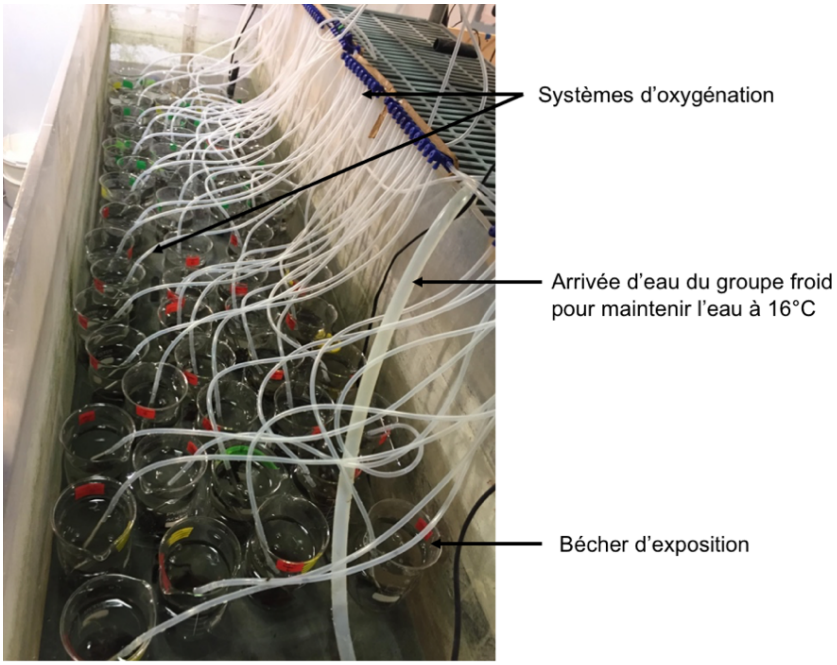


Figure II - 8 : Dispositif expérimental pour l'exposition à la 3,4-dichloroaniline

II.4.1.2. Exposition *in situ*

Comme pour les expositions au laboratoire, la durée d'exposition sur le terrain a été fixée à 21 jours. Cette durée permet de s'assurer que l'exposition a lieu au cours de la phase de gamétogénèse puisqu'aux températures des sites d'exposition *in situ* (comprises entre 8 et 12°C), les femelles sont en fin de stade C1/début stade C2 après 21 jours (Figure II - 6) et que 7 jours suffisent pour restaurer un stock maximal de spermatozoïdes à une température de 12°C

(Lacaze, 2011). Un tel temps d'exposition limite également le risque de problèmes techniques inhérents aux expérimentations *in situ* (*e.g.* perte des caisses d'encagement).

Les expositions ont eu lieu sur différents sites présentant des niveaux de contamination chimique variés : Pol, Mand, Tour, Bj, Jam, Tur et Gie (Tableau II - 2).

Pour chaque site, 200 couples et 125 mâles calibrés en taille, destinés à la réalisation du test alimentation, ont été répartis respectivement dans 20 et 4 systèmes. Compte-tenu du nombre important de sites, deux campagnes d'exposition ont été lancées à une semaine d'intervalle : une première composée des sites Tur, Jam, Gie et Bj et une seconde des sites Pol, Mand et Tour.

Les organismes utilisés pour ces deux campagnes sont issus de la même pêche sur le site de la Cressonnière du Bugey (voir II.1.1) et ont été triés la veille des encagements sur les sites de chaque campagne.

Après l'exposition, les organismes ont été transportés au laboratoire et placés dans deux aquariums de 20L par condition, contenant 5L d'eau du site de prélèvement et 5L d'eau de forage saturée en oxygène dissous et un morceau de maille en plastique afin de minimiser les agressions entre organismes. Ce milieu a progressivement été remplacé par de l'eau de forage oxygénée apportée en continu (Figure II - 9).

Du fait de l'hétérogénéité des températures des sites, les femelles récupérées après 21 jours d'exposition au sein des différents sites, ne présentaient pas le même avancement dans leur cycle de reproduction. Pour homogénéiser la collecte des organismes F1, les organismes récupérés du terrain ont été placés dans des bains-marie à différentes températures (Figure II - 9). Ces températures ont été déterminées à l'aide d'un modèle développé par Lopes et al. (soumis), qui relie la température à l'avancée du cycle de reproduction.

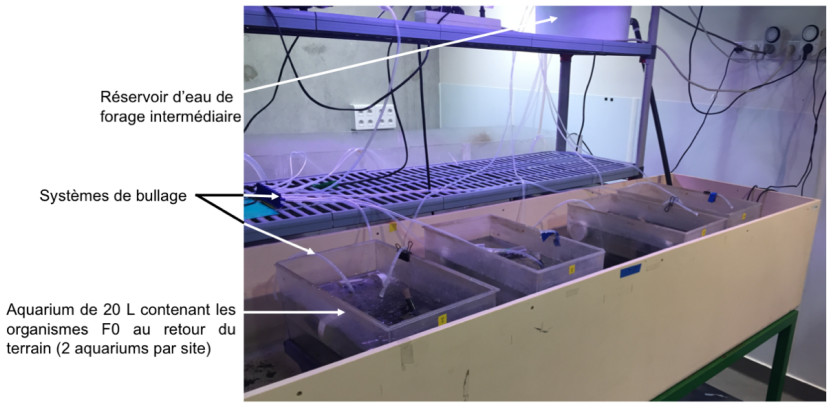


Figure II - 9 : Dispositif expérimental au retour des organismes du terrain pour l'ajustement des températures destiné à homogénéiser la récupération des juvéniles F1

II.4.2. Protocoles d'élevage des générations successives au laboratoire

Après la fécondation des gamètes (futurs F1) des parents exposés F0 en milieu non-contaminé, les femelles en retard dans leur cycle de reproduction et/ou sans embryon ou ovocyte ont été écartées, ainsi que les juvéniles nouvellement sortis (exposés durant leur développement embryonnaire) (Figure II - 6). Au moins une semaine avant la sortie des juvéniles F1, estimée grâce aux connaissances sur la durée du cycle de reproduction en fonction de la température (Chaumot et al., soumis), les parents F0 ont été transférés dans de petits aquariums de 2L contenant une maille en plastique. Ces aquariums étaient alimentés en continu par de l'eau de forage oxygénée dans un réservoir intermédiaire et acheminés jusqu'aux aquariums par gravité (Figure II - 10).

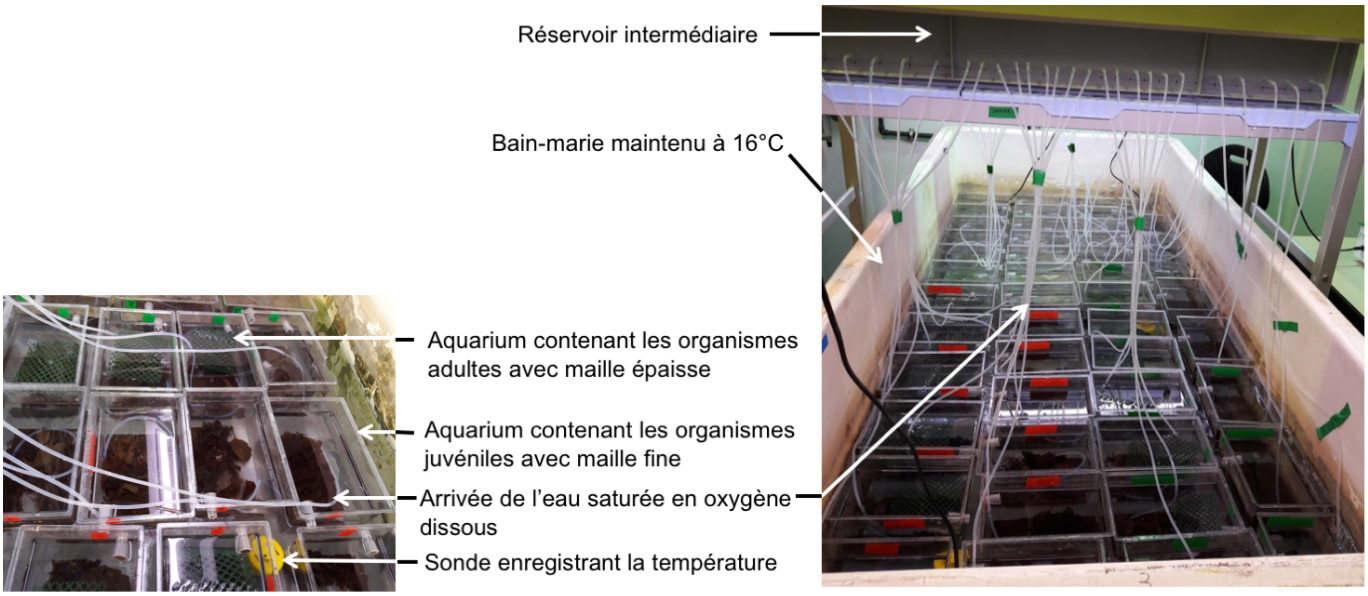


Figure II - 10 : Dispositif d'élevage des organismes issus des parents exposés

Lorsque les femelles F0 ont atteint le stade D2, les juvéniles F1 sortis du marsupium de leurs mères sont récupérés une fois par semaine au cours des deux semaines consécutives à l'apparition des premiers juvéniles. Compte-tenu de ce protocole, l'âge des juvéniles du lot est connu à plus ou moins une semaine. Pour les générations suivantes, à partir du moment où la majorité des femelles F1 et F2 des différentes conditions se trouvaient en état reproductif, les cohortes de juvéniles correspondant respectivement aux générations F2 et F3 ont été récupérées une fois par semaine pendant plusieurs semaines consécutives et placées dans différents aquariums constituant ainsi des lots distincts. Le nombre de lots finalement maintenu a été

fonction de l'expérimentation transgénérationnelle (voir la publication n°2 et la publication n°3).

Pour chaque génération, les juvéniles ont été récupérés à l'aide d'une pipette permettant de les aspirer sans les blesser (Figure II - 11).



Figure II - 11 : Collecte des juvéniles.

Ils ont été comptés et placés dans leur aquarium d'origine afin d'éviter la perte de juvéniles (longueur de 1-2 mm à la naissance). Le nombre maximum d'organismes n'a pas excédé 200 juvéniles et 100 adultes par aquarium de 2L pour ne pas engendrer de stress lié à de fortes densités. De plus, tous les aquariums d'une même expérimentation ont été placés dans le même bain-marie.

Au cours de l'ensemble des expérimentations transgénérationnelles, des sondes enregistrant les températures toutes les heures ont été placées dans chaque bain-marie. Les parents (F0) et leurs descendants ont tous été nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulne. Les fèces des parents ont été distribués à leurs descendants respectifs car les juvéniles s'en nourrissent. Pour finir, une photopériode correspondant à 16h de jour et 8h de nuit avec une intensité d'éclairement comprise entre 500 et 1000 lux a été appliquée.

II.4.3. Mesures réalisées au cours des générations successives

II.4.3.1. Caractérisation de l'exposition parentale

Afin d'évaluer les effets directs de l'exposition parentale, 7 à 11 jours après le lancement de l'exposition, un test alimentation a été réalisé sur les mâles F0 calibrés en taille. Lorsque la majorité des femelles se trouvait aux stades C2-D1, 10 femelles F0 par condition ont été

sacrifiées afin de mesurer le nombre d'ovocytes et la surface des follicules secondaires (F1 « au stade de cellule germinale », cohorte rouge, Figure II - 12) et le nombre d'embryons (exposés directement au contaminant, cohorte bleue, Figure II - 12). L'occurrence des stades de mue a également été déterminée.

Avant la fécondation des gamètes exposés, 20 mâles F0 de chaque condition au stade précopulatoire ont été collectés pour prélever leurs spermatozoïdes matures (F1 « au stade de cellule germinale » cohorte rouge, Figure II - 12). Dix d'entre eux ont été utilisés pour la mesure de la viabilité des spermatozoïdes et les 10 autres pour l'essai comète. D'autre part, 10 à 20 mâles F0 de chaque condition ont été placés individuellement dans des tubes Eppendorf® de 2 mL, pesés et tués dans de l'azote liquide. Les échantillons ont ensuite été stockés dans un congélateur à -80°C en attendant la réalisation de l'extraction d'ADN pour la mesure du niveau global de méthylation de l'ADN (II.5.1.1).

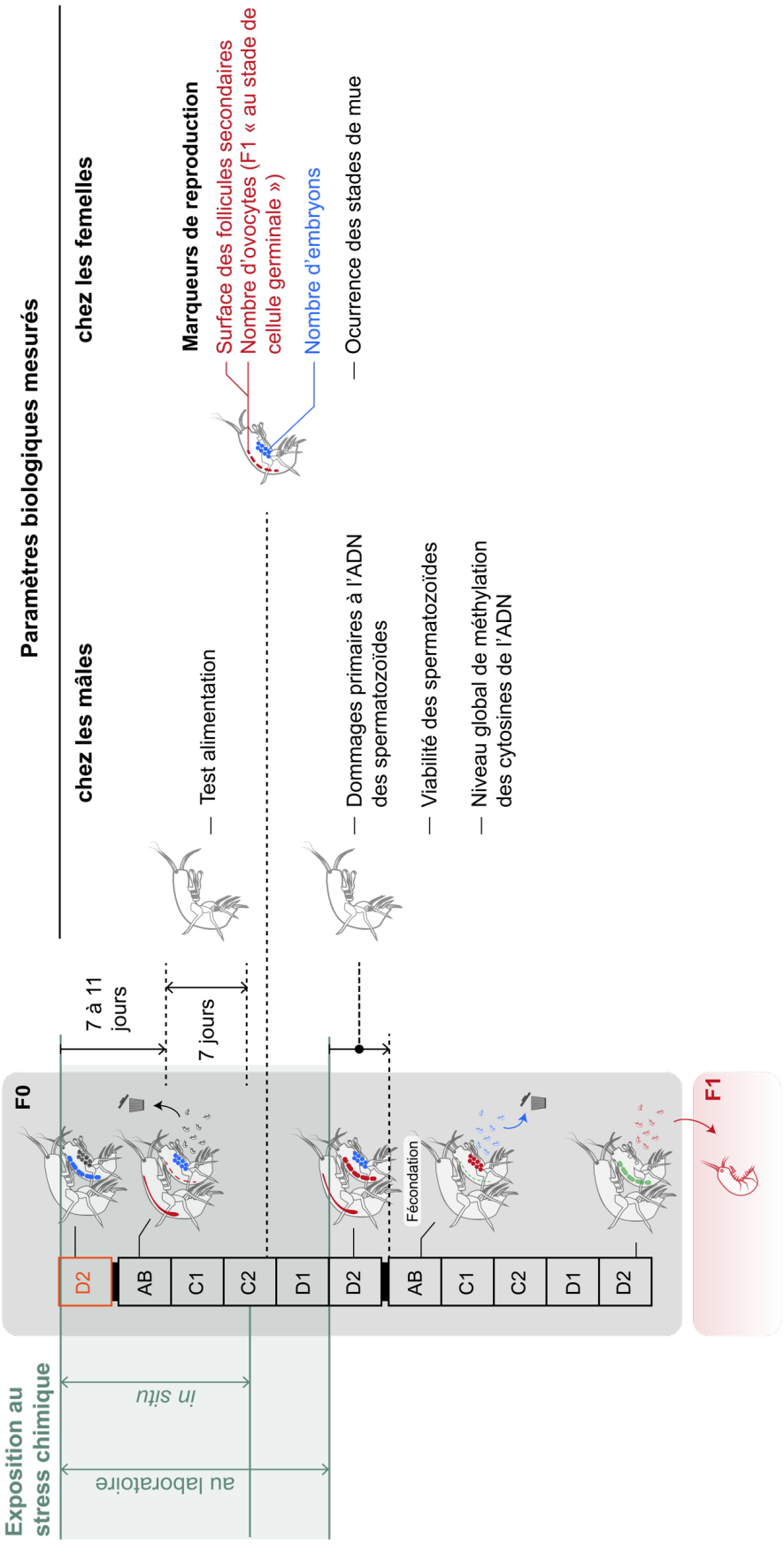


Figure II - 12 : Description et chronologie des mesures réalisées chez les parents F0.

II.4.3.2. Suivi des effets inter et transgénérationnels de l'exposition parentale

Les mesures réalisées sur les générations successives des parents exposés dans les différentes expérimentations sont répertoriées dans les tableaux ci-dessous :

Tableau II - 4 : Mesures réalisées le long des générations successives des parents exposés au Cd

Mesures	F1	F2	F3
Suivi de la survie et de la croissance des juvéniles	✓	✓	✓
Cinétique de puberté et taille à la puberté		✓	
Niveau global de méthylation de l'ADN	✓		
Dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes	✓	✓	
Viabilité des spermatozoïdes	✓		
Taux d'alimentation	✓		
Marqueur de reproduction chez les femelles	✓	✓	

Tableau II - 5 : Mesures réalisées le long des générations successives des parents exposés à la 3,4-DCA

Mesures	F1	F2	F3
Suivi de la survie et de la croissance des juvéniles	✓	✓	✓
Cinétique de puberté et taille à la puberté	✓	✓	
Niveau global de méthylation de l'ADN	✓		
Dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes	✓	✓	
Viabilité des spermatozoïdes			
Taux d'alimentation			
Marqueur de reproduction chez les femelles	✓	✓	

Tableau II - 6 : Mesures réalisées le long des générations successives des parents exposés *in situ*

Mesures	F1	F2	F3
Suivi de la survie et de la croissance des juvéniles	✓		
Cinétique de puberté et taille à la puberté			
Niveau global de méthylation de l'ADN			
Dommages primaires à l'ADN			
Viabilité des spermatozoïdes			
Taux d'alimentation			
Marqueur de reproduction chez les femelles			

II.4.3.3. Évolution des protocoles de sélection des femelles et des mâles

Le protocole de sélection des femelles et des mâles utilisés respectivement pour les mesures relatives à la reproduction et les dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes a évolué au fur et à mesure des expérimentations transgénérationnelles.

Pour la génération F0 de la première expérience d'exposition au cadmium, 10 femelles ont été sélectionnées de manière aléatoire afin de mesurer le stade de mue, le nombre d'ovocytes, d'embryons et la surface des follicules secondaires. Les stades de mue de ces femelles ont été utilisés pour comparer l'occurrence des stades de mue des trois conditions étudiées. En revanche, pour les expériences avec la 3,4-DCA et terrain, la sélection des femelles F0 n'a pas été réalisée de manière aléatoire. Elles ont été sélectionnées aux stades C2-D1 pour la mesure du nombre d'ovocytes, d'embryons et la surface des follicules secondaires. Pour évaluer l'occurrence de leurs stades de mue, le stade de mue de 30 femelles prises au hasard a été déterminé par observation à l'œil nu de leurs ovocytes et embryons. Cette méthode de détermination, basée sur la synchronisation entre le cycle de reproduction et le cycle de mue chez les gammares, a été privilégiée pour éviter de sacrifier un nombre trop important d'organismes.

Pour la génération F1 de l'expérience avec le Cd, les femelles ont été sélectionnées aléatoirement et en une seule fois. Avec ce protocole, les stades de mue des femelles n'étaient pas homogènes, ce qui n'était pas optimal pour l'analyse des données. Pour pallier cette

difficulté, chez les générations successives F2 et F3 des organismes F0 exposés au Cd et chez les générations de descendants des autres expériences transgénérationnelles (3,4-DCA et terrain), les femelles ont été sélectionnées aux stades C2-D1, trois fois par semaine à partir de la sortie des dernières cohortes de nouveau-nés utilisées pour constituer la génération suivante. Lorsque les femelles étaient en précopula avec des mâles, ces derniers ont été placés dans un autre aquarium avec des femelles en C2, récemment collectées sur le site de la cressonnière, afin de stimuler leur spermatogénèse avant la réalisation de l'essai-comète (II.5.1.2).

II.5. Mesures moléculaires et physiologiques

II.5.1. Méthylation des cytosines de l'ADN et intégrité du génome

II.5.1.1. Niveau global de la méthylation des cytosines de l'ADN

Extraction de l'ADN

En fonction du matériel biologique dont on veut extraire l'ADN, DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen®) que nous avons sélectionné propose différents protocoles. Celui choisi dans ce travail est initialement préconisé pour l'extraction de l'ADN des insectes, qui présentent une structure d'exosquelette voisine de celle des gammares[8]. Dans ce protocole optimisé pour le gammare, les organismes sont placés, individuellement pour les adultes et au nombre de 10 pour les juvéniles, dans des tubes Eppendorf® de 2 mL. Ils sont tués par contact avec de l'azote liquide pendant 20 secondes, puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ADN. Cette dernière débute par un broyage mécanique des échantillons à l'aide d'un piston pellet Eppendorf® muni d'un agitateur électrique dans du tampon de lyse (ATL®[9]) contenant du SDS, un détergent qui facilite la dénaturation des membranes lipidiques. Le protocole précis est : broyage à sec par 10 tours manuels de piston - broyage à sec 10 secondes avec agitateur - ajout de 90µL de tampon ATL puis broyage avec l'agitateur durant 10 secondes - ajout de nouveau de 90 µL de tampon ATL puis broyage avec l'agitateur durant 1 minute - le piston est remonté sans cesser l'agitation afin de ramener la matière vers le fond du tube par gravité. Une fois broyés, les échantillons

[8] Purification of total DNA from insects using the DNeasy Blood & Tissue Kit (DY14 Aug-06)

[9] Réactifs du kit DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen®)

subissent une centrifugation de 2 secondes à 2000g (6000 rpm) suivie d'une digestion enzymatique avec 20 µL de protéinase K (600mAU/mL) à 56°C pendant 3 heures. Une fois l'incubation terminée, 4 µL d'ARNase diluée dans de l'eau ultra pure (Sigma R4875, concentration finale 100 g/L) sont ajoutés et les échantillons sont centrifugés pendant 2 secondes à 2000g (6000 rpm). Les échantillons sont laissés au repos pendant 6 minutes à température ambiante et vortexés pendant 15 secondes. Deux cents µL de tampon (AL®[10]) contenant une forte concentration de chlorhydrate de guanidine, un sel chaotropique capable de modifier la solubilité des acides nucléiques sont ajoutés. Le mélange est alors vortexé pendant 10 secondes immédiatement. Deux cents µL d'éthanol absolu sont ajoutés. Le mélange est vortexé pendant 10 secondes et déposé dans la première colonne de silice en limitant la formation de mousse (Figure II - 11).

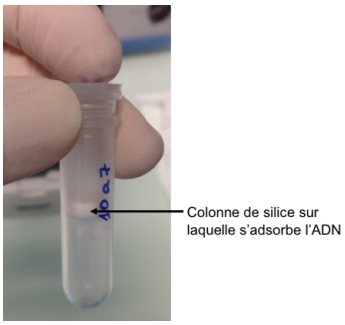


Figure II - 13 : Colonne d'élution.

Après centrifugation d'une minute à 6000 g (8000 rpm), l'ADN reste adsorbé sur le disque de silice. Deux étapes de rinçage à l'aide de 500 µL de tampon de lavage (AW1®[10] et AW2®[10]) sont ensuite réalisées dans le but d'éliminer les éventuels contaminants ainsi que les inhibiteurs enzymatiques. L'ADN est récupéré dans une dernière étape grâce à 100 µL d'un tampon d'élution (AE®[10]) contenant du Tris-EDTA. Ce tampon permet d'une part la désorption de l'ADN de la colonne en réhydratant les acides nucléiques et d'autre part une bonne conservation de l'ADN après extraction. Les échantillons obtenus sont stockés à -20°C en attendant le dosage spectrophotométrique au NanoDrop® et le dosage des cytosines méthylées.

[10] Réactifs du kit DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen®)

Contrôle de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait

Une fois l'ADN extrait, le contrôle de sa quantité et de sa qualité se fait par l'intermédiaire d'un spectrophotomètre de type NanoDrop®. Cet appareil mesure les valeurs d'absorbance d'un petit volume d'échantillon (1,5 µL) à 260 nm (absorbance de l'ADN) et à 280 nm (absorbance des protéines). La valeur d'absorbance à 260 nm (A260) permet de calculer la quantité d'ADN extrait (ng/µL) d'après le calcul suivant :

$$[\mathrm{ADN}](\mathrm{ng}/\mu\mathrm{L}) = 50 \times \mathrm{A260}$$

Le facteur 50 vient du fait qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 50 ng/ µL d'ADN.

Le NanoDrop® permet également de connaître la qualité de l'ADN extrait par le biais du rapport A260/A280 qui est attendu entre 1,8 et 2 afin de garantir une contamination minimale de l'échantillon par des protéines et/ou de l'ARN.

Dosage du niveau global de méthylation de l'ADN génomique

L'ensemble des échantillons a été dosé au sein du laboratoire LAN (Lésions des Acides Nucléiques) du CEA de Grenoble en collaboration avec le Dr Jean-Luc Ravanat et Sylvain Caillat. Une digestion enzymatique des extraits d'ADN est d'abord nécessaire pour obtenir des nucléosides libres. Elle consiste à ajouter à 50µL d'échantillon un premier mélange enzymatique contenant 0,25µL de phosphodiestérase II (0,1U/µL), 0,25µL de DNase II (10U/µL), 2,5µL de nucléase P1 (0,2U/µL) et 2,5µL de tampon MNSPDE 10X (200 mM d'acide succinique et 100 mM de $CaCl_2$). Après 2h d'incubation à 37°C, un second mélange enzymatique contenant 6µL de tampon phosphatase alcaline (10X), 0,5µL de phosphodiestérase I (0,03U/µL) et 2U de phosphatase alcaline est ajouté aux échantillons qui sont alors incubés 2h à 37°C. À la fin de l'incubation, 3,5µL d'acide chlorhydrique sont ajoutés aux échantillons pour stopper les réactions. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 5000g pendant 5 minutes et passés au SpeedVac® pour évaporer l'éthanol ajouté durant la phase d'extraction. Les échantillons sont par la suite transférés dans des flacons HPLC® puis placés dans le passeur d'échantillons de l'HPLC-MS/MS. La séparation des nucléosides obtenus par hydrolyse est réalisée par chromatographie liquide sur une colonne à polarité de phase inversée Uptisphère (Interchim ; 5 µm, 150 nmX2 mm i.d) avec une élution en mode gradient à 0,2 mL/min, comme décrit par Frelon (2000). La proportion de solvant B (2mM de formate d'ammonium contenant

10% d'acétonitrile) dans le solvant A (2mM de formate d'ammonium) atteint 25% dans les premières 10 minutes puis est maintenue à 25% pendant 5 minutes et enfin augmentée à 100% en 15 minutes. Cette dernière composition est maintenue 10 minutes supplémentaires.

A la sortie de la colonne HPLC, l'éluant est dirigé vers un spectromètre de masse Quantum ultra (Thermo Electron Coorporation) de type triple quadripôle par le biais d'une source d'ionisation « electrospray ». Le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) est utilisé pour détecter et quantifier simultanément et de façon sensible et spécifique la 2'-désoxycytidine (dCyd), la 5-méthyle-2'-désoxycytidine (5-MedCyd) et la 5-hydroxyméthyle-2'-désoxycytidine (5-HmdCyd). Le principe consiste à isoler dans le premier quadripôle l'ion pseudomoléculaire $(MH)^+$ issu de l'ionisation en mode positif de chacun des nucléosides puis à induire une fragmentation de cet ion dans le second quadripôle et enfin d'isoler un ion fils caractéristique de la molécule dans le dernier quadripôle. Pour les 3 composés détectés, la fragmentation observée correspond à la perte du 2-désoxyribose, qui possède une masse (m/z) de 116. Les transitions ions parents -> ions fils utilisées pour détecter dCyd, 5-MedCyd et 5-HmdCyd sont donc respectivement 228 -> 112, 242 -> 126 et 258 -> 142. Le dosage est effectué par calibration externe.

Seules les mesures relatives aux cytidines méthylées en C5 sont utilisées dans ce travail de thèse. Les résultats des mesures sont exprimés en taux de base de cytidines méthylées en C5 sur la quantité de cytidines (5-MedCyd/dCyd) (%).

II.5.1.2. Intégrité de l'ADN des spermatozoïdes

L'intégrité de l'ADN a été évaluée par la technique de l'essai des comètes, en conditions alcalines, qui est une microélectrophorèse de l'ADN contenu dans les noyaux de cellules isolées sur gel d'agarose. Le protocole suivi dans ce travail de thèse, proche de celui mis au point par Lacaze et al., (2010), repose en grande partie sur le protocole décrit par Singh et al. (1988). À pH>13, le test permet de révéler les cassures simple et double brins, les sites alcali-labiles, les pontages à l'ADN et les sites dont la réparation est incomplète.

Compte-tenu du nombre important de marqueurs suivi dans ces travaux de thèse, nous avons choisi d'évaluer uniquement les dommages primaires à l'ADN sur les spermatozoïdes. Ce choix s'est porté sur les spermatozoïdes plutôt que les ovocytes car Lacaze et al. (2010, 2011a, b) ont montré que le niveau basal de dommages à l'ADN des spermatozoïdes chez les

organismes témoins était plus faible que celui des ovocytes ainsi qu'une sensibilité au stress chimique plus importante chez les spermatozoïdes.

Les différentes étapes du protocole de l'essai-comète sont détaillées ci-dessous :

(i) Préparation des lames

Des lames de microscope sont couvertes d'une couche de gel d'agarose de type I à 0,8%, préparé dans du PBS à 37°C. Pour permettre la polymérisation des gels, dits « gels d'accroche », les lames sont mises à sécher au moins 16h à 20°C.

(ii) Récupération des spermatozoïdes

Pour récupérer les spermatozoïdes matures, les deux gonades entières de mâles en fin de spermatogénèse (*i.e.* en précopula) sont disséquées selon les étapes ci-dessous (Figure II - 14).



Figure II - 14 : Étapes de dissection pour la récupération des spermatozoïdes de gammares. (A) découpe du céphalon, extraction des caeca et du tube digestif de la cavité thoracique, (B) découpe de la cuticule ventrale et dorsale, (C) récupération des gonades. Source : Lacaze, 2011.

(iii) Inclusion des spermatozoïdes

Les gonades sont immédiatement dilacérées dans un tube Eppendorf® de 0,5 mL contenant 20 µL de PBS froid pour mettre en suspension les spermatozoïdes à l'aide d'une micropipette et la suspension obtenue est conservée dans la glace. Quatre-vingts µL de gel d'agarose à bas point de fusion à 0,625% (type VII) préparés dans du PBS en surfusion à 37°C sont ajoutés (concentration finale en agarose de 0,5%). Deux dépôts de 40 µL de ce mélange sont effectués sur des lames préalablement préparées et sont recouverts d'une lamelle 22x22 mm. Les lames sont ensuite placées sur une plaque à 4°C pendant 10 minutes pour la prise en masse des gels.

(iv) Lyse cellulaire

À la sortie du réfrigérateur, les lamelles sont retirées des lames en les faisant glisser délicatement. Les lames sont déposées dans une cuvette en plastique et recouvertes de solution de lyse (Tableau II - 7).

Tableau II - 7 : Composition de la solution de lyse. Source : Lacaze, 2011.

Composant	**Concentration**	**Rôle**
NaCl	2,5 M	Dégradation des protéines (histones)
Tris	10 mM	Assure les conditions alcalines
Na2EDTA	100 mM	Inhibition des nucléases, enzymes de dégradation de l'ADN en complexant les cofacteurs métalliques
DMSO	10%	Antioxydant
Triton X-100	1%	Détergent assurant la destruction des membranes cellulaires et nucléaires

Elles sont ainsi maintenues 18 à 20 heures à 4°C. À partir de cette étape, toutes les manipulations sont effectuées dans l'obscurité ou sous lumière inactinique pour éviter d'induire des dommages à l'ADN liés aux rayonnements.

(v) Déroulement de l'ADN

Après la lyse, les lames sont rincées au PBS et égouttées. Elles sont placées dans une cuve à électrophorèse horizontale et recouvertes par un tampon d'électrophorèse alcalin (pH>13, 0,3 M NaOH, 1 mM Na_2EDTA) à 4°C pendant 40 minutes pour permettre la réalisation du déroulement de l'ADN et son passage sous forme simple brin. Pour maintenir la cuve au froid, des pains de glace sont placés autour de la cuve.

(vi) Électrophorèse

À l'issue du déroulement de l'ADN, une électrophorèse est réalisée sous un champ électrique de 0,6 V/cm, avec une intensité de 300 mA pendant 24 minutes. Les fragments libres de l'ADN migrent de manière différentielle en fonction de leur taille et constituent des figures caractéristiques en forme de comètes dont la queue est proportionnelle au degré de fragmentation.

(vii) Neutralisation

Après l'électrophorèse, les lames sont sorties de la cuve, égouttées et placées sur une grille afin de pouvoir les rincer trois fois 5 minutes avec une solution de Tris (0,4 M, pH 7,5). Cette étape de neutralisation permet de rétablir l'appariement aléatoire de l'ADN en double brin et ainsi la fixation du bromure d'ethidium, agent intercalant utilisé pour la lecture des lames. Il est alors possible de travailler à la lumière du laboratoire.

(viii) Déshydratation

Afin de conserver les lames jusqu'à leur lecture, ces dernières sont déshydratées 20 minutes dans de l'éthanol absolu et laissées sécher à l'air libre à 20°C.

(ix) Marquage et lecture

Les deux gels des lames sont colorés avec 20 µL de bromure d'éthidium (0,05 mM) et recouverts d'une lamelle 22x22 mm. Ils sont ensuite observés au grossissement x400 sous un microscope à épifluorescence (Axioscope, Zeiss-Germany) équipé d'une caméra monochrome CDD (Hitachi). Cinquante cellules par gel sont alors traitées individuellement à l'aide du logiciel d'analyse d'images Comet Assay IV (Figure II - 15).

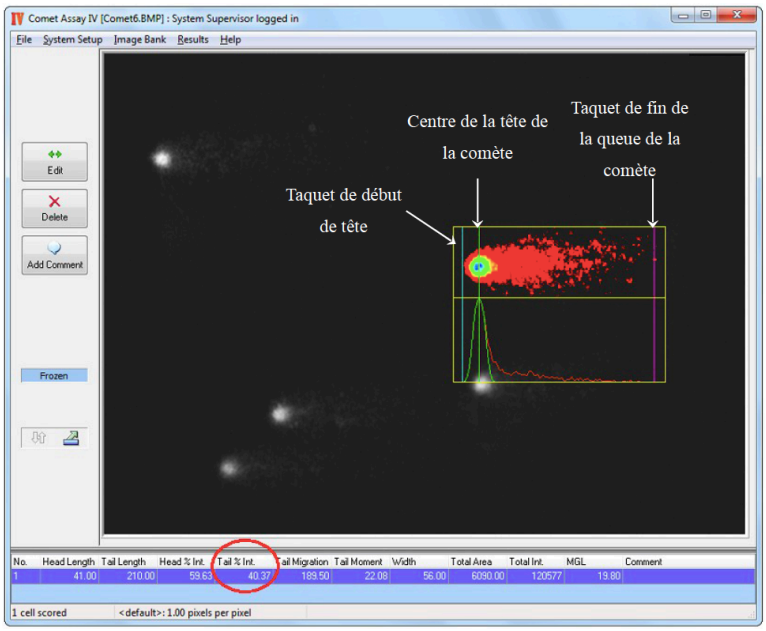


Figure II - 15 : Calcul des paramètres de mesure des dommages à l'ADN basés sur l'intensité de fluorescence des brins et leur dispersion par le logiciel Comet Assay IV®. Source : Lacaze, 2011.

Parmi les paramètres mesurés par ce logiciel, celui choisi est le pourcentage moyen d'ADN présent dans la queue de la comète, noté « tail DNA intensity » (entouré en rouge sur la Figure II - 15). Ce pourcentage de l'ADN présent dans la queue de la comète permet d'évaluer le pourcentage de l'ADN endommagé. Pour chacun des deux gels, le logiciel calcule la moyenne (respectivement M1 et M2) de ces pourcentages obtenus sur 50 cellules (mean %tail DNA). Le pourcentage de dommages primaires à l'ADN de chaque lame (constituée des deux gels) est ensuite obtenu en calculant la médiane des moyennes M1 et M2 de chacun des deux gels.

II.5.2. Viabilité des spermatozoïdes

La viabilité des spermatozoïdes a été évaluée à l'aide du kit LIVE/DEAD® Sperm Viability. Ce kit utilise deux fluorochromes spécifiques des acides nucléiques, un agent fluorescent vert SYBR 14® et l'iodure de propidium, un agent fluorescent rouge intercalant de l'ADN. Contrairement à SYBR 14® qui colore toutes les cellules, vivante ou mortes, l'iodure de propidium ne pénètre que dans les cellules dont les membranes sont endommagées (mortes) et réduit le SYBR 14®. Les spermatozoïdes matures ont été récupérés de la même manière que pour la mesure des dommages primaires à l'ADN (voir II.5.1.2). Les gonades de chaque mâle ont été dilacérées dans un tube Eppendorf® de 0,5 mL contenant 20 µL de solution HEPES (10

mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% BSA, pH = 7,4) à l'aide d'une micropipette afin de mettre les spermatozoïdes en suspension. Cinq µL de SYBR 14 à 2 % préparés dans de l'HEPES sont ajoutés à ce mélange. Les échantillons sont ensuite placés à 4°C pendant 10 minutes. Cinq µL d'iodure de propidium dilué au 1/50 dans de l'HEPES sont ensuite ajoutés au mélange contenant les spermatozoïdes en suspension et les échantillons sont de nouveau placés à 4°C pendant 10 minutes. Ensuite, 20 µL du mélange contenant les spermatozoïdes en suspension sont déposés entre lames et lamelles de 22x22 mm. Les lames sont ensuite observées sous un microscope à épifluorescence au grossissement x40 afin de pouvoir compter le nombre de cellules vivantes (vertes) et de cellules mortes (rouges).

II.5.3. Marqueurs de reproduction chez la femelle

Les stades de mue, le nombre d'ovocytes et d'embryons par femelle ainsi que la surface des follicules secondaires, représentative des quantités de réserve vitelline, ont été mesurés simultanément comme décrit dans Geffard et al. (2010). Dans un premier temps, les femelles sont photographiées sous une loupe binoculaire (x 7) équipée d'un appareil photo numérique pour mesurer leur taille *via* le logiciel d'analyse d'image SigmaScan® Pro v5.0 (Systat Software). Les ovocytes sont comptés *in vivo* en observant les ovaires par transparence à travers la cuticule sous une loupe binoculaire (x 7). Les embryons sont extraits du marsupium des femelles vivantes à l'aide d'un forceps à pointes ultra-fines sous loupe binoculaire (x80) et sont déposés dans une goutte d'eau de forage sur une lame. Les embryons sont alors dénombrés. Le stade de mue de la femelle est ensuite déterminé par l'observation microscopique de la griffe des 3èmes et 4èmes périopodes, selon la méthode décrite par Xuereb (2009) et par Geffard et al. (2010). Les extrémités des périopodes sont sectionnées avec des ciseaux de Wecker et montées entre lame et lamelle dans de l'eau de forage, puis observées sous un microscope aux grossissements x400 et x630. Pour finir, les ovocytes des femelles sont photographiés sous un microscope au grossissement x50 pour mesurer leur surface à l'aide du logiciel d'analyse d'image SigmaScan® Pro v5.0 (Systat Software).

Concernant l'analyse des données obtenues, le nombre d'ovocytes et le nombre d'embryons dépendant de la taille des femelles, les valeurs mesurées ont été normalisées par la taille. Pour cela, le nombre d'ovocytes a été divisé par la taille des femelles et le nombre d'embryons par la taille des femelles diminuée de 5 mm (taille des femelles à la puberté). Au cours du cycle de mue, le nombre d'ovocytes et la surface des follicules secondaires évoluent

et les valeurs observées peuvent être significativement différentes d'un stade de mue à l'autre (Geffard et al., 2010). Ainsi, pour pouvoir comparer les nombres d'ovocytes et les surface des follicules secondaires entre les différentes femelles de notre jeu de donnée, ces marqueurs ont été normalisés par le stade de mue en appliquant des facteurs correctifs calculés à partir de Geffard et al. (2010). De plus, le nombre d'embryons n'a pas été pris en compte dans l'analyse chez les femelles au stade D2 car, à ce stade, les nouveau-nés commencent à sortir du marsupium de leur mère (Geffard et al., 2010). Concernant l'analyse de la surface des follicules secondaires, les femelles sans ovocyte ont été retirées du jeu de données, ainsi que les femelles aux stades AB et C1 car la vitellogénèse n'est pas encore réalisée à ces stades.

II.5.4. Taux d'alimentation

Le taux d'alimentation des gammares a été mesuré en fournissant 20 disques de feuille d'aulne calibrés (20 mm de diamètre) à 20 mâles homogènes en taille placés dans chacun des 4 réplicats utilisés pour le test alimentation, comme décrit par Coulaud et al. (2011). Pour l'exposition *in situ*, un réplicat composé de 10 disques témoins (sans organisme présent) a également été ajouté aux quatre réplicats déployés sur chaque site afin de tenir compte de la dégradation des disques par des facteurs autres que la consommation par des gammares (action du biofilm, intrusion d'organismes dans les dispositifs d'exposition, etc.). Pour les expositions au laboratoire, la surface des disques témoins (sans organisme présent) est issue de la base de données de valeurs témoins du laboratoire ECOTOX d'IRSTEA de Lyon.

Afin de vérifier l'homogénéité des tailles des organismes utilisés dans le test alimentation, 20 organismes issus du tri ont été tués et conservés dans de l'éthanol pour être photographiés ultérieurement sous une loupe binoculaire au grossissement x7. Les tailles ont ensuite été mesurées à l'aide du logiciel d'analyse d'image SigmaScan® Pro v5.0 (Systat Software).

Les disques sont réalisés à l'aide d'un emporte-pièce en évitant les nervures principales, à partir de feuilles préalablement conditionnées pendant une semaine dans de l'eau de forage oxygénée et renouvelée en continu. Après la durée du test alimentation de 7 jours, les disques de feuille restants ont été récupérés et scannés afin de mesurer leur surface à l'aide du logiciel d'analyse d'image SigmaScan® Pro v5.0 (Systat Software).

Les taux d'alimentation des gammares ont été obtenus par réplicat en calculant la surface de feuille consommée par jour et par gammare ($mm^2 \cdot jour^{-1} \cdot gammare^{-1}$) comme décrit par Coulaud et al. (2011) :

$$FR_i = \frac{S_{témoin} - S_{i,t}}{\frac{n_{i,t0} + n_{i,t}}{2} \times t} \times a$$

Avec :

FR_i : taux d'alimentation du réplicat i

$S_{témoin}$: surface des disques de feuille issus du réplicat témoin sans gammare à la fin de l'exposition

$S_{i,t}$: surface des disques de feuille restant après l'expérience pour le réplicat i

t : durée en jours du test alimentation

$n_{i,t0}$ et $n_{i,t}$: nombre de gammares respectivement au début et à la fin du test alimentation

a : facteur de conversion pour passer des pixels aux mm^2

Pour la mesure *in situ*, la relation établie entre les taux d'alimentation et la température (Coulaud et al., 2011) permet d'intégrer les différences de températures entre les sites dans l'interprétation du paramètre. À partir de la moyenne des températures enregistrées sur les sites, le taux d'alimentation de référence est calculé à l'aide du modèle de Coulaud et al. (2011). Les taux d'alimentation observé sur le site sont ensuite exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport à ce taux de référence.

Compte-tenu du nombre faible de mâles adultes F1 disponibles lors de l'expérience avec le cadmium, le protocole suivi a été modifié. Pour chacun des 3 réplicats par condition, 4 mâles homogènes en taille et 4 disques de feuille calibrés ont été placés dans des aquariums de 2L.

II.5.5. Suivi de la croissance et de la survie des juvéniles

Afin de suivre la croissance des juvéniles des différentes générations, un sous-échantillon des juvéniles de chaque condition a été photographié entre leur naissance et le début de la puberté à au moins trois reprises et toutes les 3 semaines sous une loupe binoculaire.

La taille des organismes, correspondant à la longueur dorsale entre le début du prosoma et la fin du métasoma (voir morphologie des gammares au paragraphe I.3.1.3), a été estimée à l'aide du logiciel d'analyse d'image SigmaScan® Pro v5.0 (Systat Software). À partir des jeux

de données ainsi obtenus, le taux de croissance, exprimé en mm/semaine, a été calculé en soustrayant aux dernières mesures de taille la moyenne des premières mesures et en divisant par le temps (en semaine) séparant ces deux mesures.

Au cours du suivi de la croissance des juvéniles, le nombre total de juvéniles par aquarium a également été compté. Sur la base de ces données, les pourcentages de survie ont été calculés en divisant le nombre total de juvéniles F_i d'une même condition d'exposition au temps t par le nombre total des nouveau-nés F_i récupérés au départ.

II.5.6. Suivi de la puberté

À partir de la 8ème semaine après la collecte des nouveau-nés, les organismes de chaque aquarium ont été observés une fois par semaine sur une table lumineuse afin d'identifier les femelles ayant atteint la puberté. Le critère utilisé a été la présence d'ovocytes bien développés, *i.e* visible à l'œil nu sur la face dorsale des femelles. Les organismes ainsi sélectionnés ont ensuite été photographiés sous une loupe binoculaire au grossissement x10 afin de mesurer ultérieurement la taille à la puberté des femelles à l'aide du logiciel d'analyse d'image SigmaScan® Pro v5.0 (Systat Software). Les femelles pubères ont ensuite été placées dans un autre aquarium avec un nombre équivalent d'organismes supposés être des mâles de par l'absence d'ovocytes visibles et une taille plus importante que les femelles échantillonnées. Pour s'assurer que les présumés mâles n'étaient pas en réalité des femelles, ces aquariums ont également été contrôlés chaque semaine après l'isolement des organismes.

Afin de déterminer les cinétiques de puberté, le pourcentage de femelles pubères à une semaine donnée a été calculé en divisant le nombre cumulé de femelles pubères identifiées jusqu'à la semaine considérée par le nombre de femelles pubères collectées au total à la fin du suivi de la puberté.

II.6. Modèle de dynamique de population

L'impact démographique potentiel des modifications des traits d'histoire de vie enregistrées chez les générations issues des parents exposés au cadmium a été quantifié à l'aide d'un modèle de dynamique de population développé pour chaque génération de descendants.

Une méthodologie similaire à celle suivie par Prud'homme et al. (2017) et les connaissances sur la dynamique des populations de *Gammarus fossarum* (Coulaud et al., 2014,

2015) ont été utilisées pour construire les modèles matriciels de type Leslie Lefkovitch (Caswell, 2001). Ces différents modèles sont structurés en taille plutôt qu'en âge ou en stade car, chez les gammares, les traits d'histoire de vie et donc les taux de survie, de croissance et de reproduction sont fortement corrélés à la taille des individus (Coulaud et al., 2014).

Les modèles matriciels ont été construits sur la base du graphe du cycle de vie suivant (Figure II - 16) :

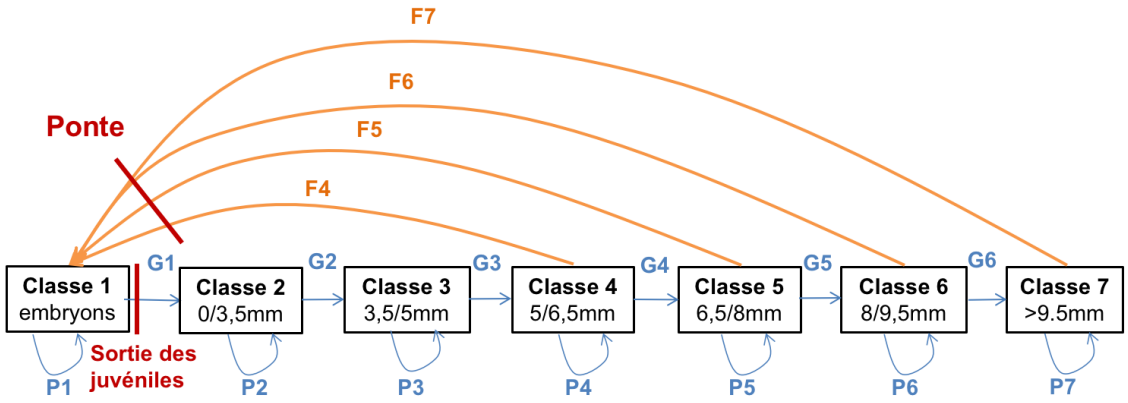


Figure II - 16 : Graphe du cycle de vie de la population de *Gammarus fossarum* du laboratoire avec discrétisation en 7 classes de taille, utilisé pour la modélisation de la dynamique de population. G_i = taux de passage de la classe *i* à la classe *i*+1, P_i = taux d'individus qui restent dans la même classe et F_i = fertilité des femelles de chacune des classes d'adultes, d'une semaine à l'autre.

Dans ces modèles, seules les femelles sont prises en compte et les populations du laboratoire sont structurées en 7 classes de taille : une première classe qui correspond aux embryons, suivie par 2 classes d'organismes juvéniles et de 3 classes d'adultes (Figure II - 16). Ces modèles sont formalisés en représentant le temps de façon discrétisée et nous avons considéré un pas de temps d'une semaine. Un recensement post-reproduction (post-breeding census) a été choisi pour la paramétrisation.

À partir du graphe du cycle de vie de *Gammarus fossarum* (Figure II - 16), la matrice de transition **A** ci-dessous a été établie :

$$\boldsymbol{A} = \begin{pmatrix} P_1 & 0 & 0 & F_4 & F_5 & F_6 & F_7 \\ G_1 & P_2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & G_2 & P_3 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & G_3 & P_4 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & G_4 & P_5 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & G_5 & P_6 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & G_6 & P_7 \end{pmatrix}$$

G_i est le taux de passage de la classe i à la classe i+1, *i.e.* le pourcentage d'individus qui survivent et qui atteignent la classe de taille suivante, et P_i le taux d'organismes qui survivent, mais restent dans la même classe de taille d'une semaine à l'autre. F_i est la fécondité des individus de chacune des classes d'adultes, *i.e.* le nombre d'ovocytes (femelles) viables produit par adulte femelle pendant une semaine.

Pour chaque génération, la valeur propre dominante λ de la matrice **A** correspond au taux de croissance asymptotique de la population et le vecteur propre à droite **w** associé à λ correspond à la structure stable de la population (Caswell, 2001).

Comme décrit par Caswell (2001), les paramètres G_i et P_i sont calculés de la manière suivante :

$$G_i = \sigma_i \gamma_i$$

$$P_i = \sigma_i \, (1 - \gamma_i)$$

Où σ_i sont respectivement la probabilité de survie des organismes dans la classe de taille i et γ_i le taux de transition, *i.e.* la proportion d'individus qui croissent de la classe de taille i à la classe i+1 après un pas de temps d'une semaine.

Les taux de transition γ_i dépendent de λ, la valeur propre dominante de la matrice de transition de la population **A**. La méthode itérative proposée par Caswell (2001) a ainsi été appliquée en utilisant la formule suivante :

$$\gamma_i = \frac{\left(\frac{\sigma_i}{\lambda}\right)^{d_i - 1}}{1 + \left(\frac{\sigma_i}{\lambda}\right) + \left(\frac{\sigma_i}{\lambda}\right)^2 + \cdots + \left(\frac{\sigma_i}{\lambda}\right)^{d_i - 1}}$$

Où d_i est la durée de la classe de taille i.

Les paramètres relatifs à la fécondité de la matrice **A** ont été calculés à partir de $\sigma_{i,\, i = \{4\, ;\, \ldots\, ;\, 7\}}$, du sexe ratio (sr), de la proportion moyenne de femelles en reproduction (fr_i), du nombre moyen d'ovocytes viables par femelle (no_i) et de la durée du cycle de reproduction des femelles (dc). Ce dernier calcul suppose que les mâles sont aptes à la reproduction et que leurs spermatozoïdes sont viables.

$$\forall\, i \in \{4; \ldots; 7\}, F_i = \sigma_i \, (sr \times fr \times no_i)/d_c$$

La matrice de transition **A** a été paramétrée indépendamment pour chacune des générations afin de projeter démographiquement les altérations des traits d'histoire de vie observées chez chacune d'elle.

Pour chaque matrice de transition, les valeurs σ_i (avec i>1) ont été calculées à partir des courbes de survie. Comme pour certaines générations les survies des classes 6 et 7 n'ont pas été mesurées, une valeur de σ_i identique à la classe inférieure (classes 5 et 6) leur a été attribuée par défaut. La survie embryonnaire σ_1, a été calculée en considérant le ratio entre le nombre d'ovocytes et le nombre d'embryons par femelle. Les durées des différentes classes de taille ont été estimées à partir de courbes de croissance obtenues en modélisant nos données expérimentales par un modèle logistique.

Concernant la fécondité $F_{i,\, i = \{4\ ;\ldots\ ;\ 7\}}$, la durée du cycle de reproduction a été fixée à 3 semaines, compte-tenu de la température de l'expérimentation de 16°C, et le sexe ratio à 50%. D'autre part, la proportion de femelles en reproduction dans chacune des classes d'adultes a été déterminée à partir des données de suivi de la puberté. Ces dernières ont en effet permis d'établir un modèle logistique exprimant le pourcentage de femelles pubères, soit le pourcentage de femelles en reproduction, au sein de la population totale en fonction du temps. Comme indiqué ci-dessus, le temps a été relié à la taille des organismes par un modèle logistique, il a ainsi été possible d'établir une relation entre le pourcentage de femelles en reproduction dans la population et la taille des femelles. Pour une classe de taille donnée, le pourcentage de femelles en reproduction correspond à la moyenne entre les pourcentages de la borne inférieure et de la borne supérieure de l'intervalle de taille de la classe. Comme le nombre d'ovocytes n'a été mesuré que sur les femelles des classes de taille 6 ou 7, les valeurs des autres classes de taille ont été estimées. Pour cela, nous avons considéré des coefficients de pondération basés sur la relation entre le nombre d'ovocytes et la taille de la femelle :

$$\text{Nombre d'ovocytes} = 2.23 \times \text{Taille}$$

Cette relation a été établie à partir d'un nombre important de données collectées par le laboratoire ECOTOX d'IRSTEA de Lyon.

Pour chaque génération, la valeur propre dominante λ de la matrice **A**, correspondant au taux de croissance asymptotique de la population (Caswell, 2001), et le vecteur propre à droite **w** associé à λ qui correspond à la structure stable de la population ont été calculés.

Chapitre III. Exploration de la variabilité du niveau de méthylation des cytosines de l'ADN chez *Gammarus fossarum*

Ce chapitre III regroupe l'ensemble des travaux sur l'étude de la variabilité du niveau de méthylation des cytosines de l'ADN chez *Gammarus fossarum*, ce qui constitue à notre connaissance la première exploration d'une marque épigénétique chez cette espèce.

Il se compose d'une publication (publication n°1) dont l'objectif était d'évaluer les variations du niveau de méthylation chez *Gammarus fossarum*. Pour cela, l'effet de facteurs biotiques (genre, stade de vie et variabilité inter-populationnelle) et abiotiques (température, restriction alimentaire et exposition cadmique) ont été explorés sur la marque épigénétique.

En complément de cette première publication qui a posé la question de la variabilité du niveau de méthylation entre populations, la note n°1 s'intéresse aux niveaux de méthylation de l'ADN chez une population de *Gammarus fossarum* historiquement exposée au cadmium et avec une histoire de vie particulière, ayant acquis une tolérance au cadmium (Vigneron et al., 2015, 2019).

Pour finir, les niveaux de méthylation de gammares encagés sur des sites d'étude aux profils de contamination contrastés et dont la toxicité a déjà été caractérisée lors de précédentes expositions *in situ* de *G. fossarum* ont été mesurés (note n°2). Le but de cette dernière étude était de compléter l'évaluation de l'utilisation possible du niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN chez *Gammarus fossarum* comme biomarqueur de stress dans le cadre du suivi de la qualité des milieux.

III.1. Publication n°1: Natural variability and modulation by environmental stressors of global genomic cytosine methylation level in a freshwater crustacean, *Gammarus fossarum*

Résumé

L'étude des marques épigénétiques présente un intérêt important pour améliorer l'évaluation des réponses des organismes aquatiques face à des facteurs environnementaux de stress. En effet, l'environnement peut induire des modifications épigénétiques, qui sont elles-mêmes susceptibles d'engendrer des changements phénotypiques. Les invertébrés non modèles tels que les gammares sont des organismes représentatifs de la diversité des communautés naturelles peuplant les cours d'eau. Malgré leur pertinence écologique, les réponses épigénétiques sont encore peu documentées chez ces espèces. Cette étude porte sur la mesure du niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN chez le crustacé amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. Dans un premier temps, la variabilité naturelle du niveau de méthylation des cytosines de l'ADN a été évaluée. Pour cela, l'effet du genre (femelle et mâle), du stade de vie (juvénile et adulte) et du site de prélèvement des organismes ont été investigués. Un effet significatif du stade de vie et une variabilité inter-populationnelle importante ont été mis en évidence. Dans un second temps, les effets de la température et de la restriction alimentaire ont été étudiés. Pour ces deux facteurs abiotiques, une hyperméthylation a été observée après 1 mois d'exposition. Pour finir, l'effet d'un stress chimique a été évalué en exposant des gammares à des concentrations de cadmium pertinentes d'un point de vue environnemental (0,05 ; 0,5 et 5 µg Cd/L). Quelles que soient les concentrations de cadmium utilisées, une hypométhylation significative a été observée après 14 jours, suivie d'une tendance à l'hyperméthylation après un mois d'exposition. Ces premiers résultats sur la méthylation des cytosines de l'ADN, jamais étudiée auparavant chez les gammares, démontrent un intérêt possible à l'utilisation du niveau de méthylation des cytosines de l'ADN chez *Gammarus fossarum* comme biomarqueur de stress.

Mots clés

Epigénétique, *Gammarus fossarum*, stress environnemental, méthylation de l'ADN

Aquatic Toxicology 205 (2018) 11–18

Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqtox

Natural variability and modulation by environmental stressors of global genomic cytosine methylation levels in a freshwater crustacean, *Gammarus fossarum*

Pauline Cribiu[a,b,*], Arnaud Chaumot[b], Olivier Geffard[b], Jean-Luc Ravanat[c], Thérèse Bastide[a], Nicolas Delorme[b], Hervé Quéau[b], Sylvain Caillat[c], Alain Devaux[a], Sylvie Bony[a]

[a] ENTPE, INRA, CNRS UMR 5023 LEHNA, rue Maurice Audin, 69518, Vaulx-en-Velin CEDEX, France
[b] IRSTEA- Groupement de Lyon, unité de recherche RiverLy, Laboratoire d'écotoxicologie, 5 rue de la Doua, 69626, Villeurbanne CEDEX, France
[c] Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, INAC-SyMMES, 17 rue des martyrs, 38054, Grenoble CEDEX 9, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Epigenetics
Gammarus fossarum
Environmental stressor
DNA methylation

ABSTRACT

To improve the assessment of aquatic organism responses to environmental stressors, there is an interest in studying epigenetic marks in addition to other validated biomarkers. Indeed, the epigenetic marks may be influenced by the surrounding environment. Non-model invertebrates such as gammarids are sentinel organisms representative of the diversity of natural stream communities. Despite their ecologically relevance, the epigenetic responses have been to date poorly documented in these species. The present study explores the measurement of the global cytosine methylation level in the genome of the freshwater crustacean *Gammarus fossarum*. In a first step, natural variability of global cytosine methylation level (basal level) was assessed by studying the effect of sex, age and sampling site of organisms. Results showed a significant effect of age and sampling site. In a second step, effects of water temperature and food starvation were studied. For both factors, a hypermethylation was observed after 1 month of exposure. In a third step, gammarids were exposed to a range of environmentally relevant cadmium concentrations (0.05–5 µg/L) in order to assess the effect of a chemical stress. Whatever the cadmium concentration used, a significant hypomethylation was observed after 14 days followed by a trend for hypermethylation after 1 month of exposure. These results are the first ones dealing with the 5C-methylation status in gammarids. The results constitute potential markers of environmental stresses in relevant sentinel species widely used in ecotoxicological studies.

1. Introduction

In order to offer a relevant and accurate environmental risk assessment in aquatic environment, understanding the organism responses to environmental stressors is a major issue. These responses involve genetic and/or metabolic, but also epigenetic effects (Head et al., 2012). In the last decades, epigenetics has been highlighted as an environment-sensitive field connecting the surrounding environment with the genome and the phenotype (Rey et al., 2016). Indeed, epigenetic marks are sensitive to environmental changes, but are also potentially heritable (either mitotically or meiotically) and can remain after the removal of the stressor. These characteristics suggest that epigenetic modifications may be passed on to further generations and deserve to be viewed as highly relevant in ecotoxicology. The interest of epigenetics in ecotoxicology is rather new but is rapidly growing (Head et al., 2012). Up to now, studies in this field target mainly the modulation of the cytosine methylation level, *i.e.* the addition of a methyl-group at the C5-position of cytosine in specific regions of the genome. DNA methylation is largely confined to genes in invertebrates, whereas intergenic regions remain largely unmethylated and are associated with active transcription (Glastad et al., 2011; Sarda et al., 2012; Yi, 2017). Several studies have shown that invertebrate genomes exhibit low global genomic cytosine methylation levels (0–2%) compared to vertebrates (5% in mammals and birds, 10% in fish and amphibians) (Feng et al., 2010; Kvist et al., 2018). Despite this, in invertebrates, some modulations of the methylated cytosine level in response to environmental factors have been observed. As an example, previous studies have shown an effect of the thermal stress on cytosine methylation in the Antarctic polychaete *Spiophanes tcherniai* (Marsh and Pasqualone, 2014), in the branchiopod crustacean *Artemia* (Norouzitallab et al.,

* Corresponding author at: ENTPE, INRA, CNRS UMR 5023 LEHNA, rue Maurice Audin, 69518, Vaulx-en-Velin CEDEX, France.
E-mail address: pauline.cribiu@entpe.fr (P. Cribiu).

https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.09.015
Received 26 July 2018; Received in revised form 4 September 2018; Accepted 30 September 2018
Available online 02 October 2018
0166-445X/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Location and physicochemical characteristics of selected sites. Part of data is from Vigneron et al. (2015). For the Cress site, mean water temperature was calculated from the 2016 year continuous temperature records. Physicochemical parameters were assessed from a punctual sampling on October 2016.

Population		Cress	Mand	Tour	Bacu
GPS coordinates		45°57′28.44″N 5°15′45.094″E	45°58′38.6″N 5°28′24.3″E	45°34′09.9″N 5°27′33.9″E	46°03′23.9″N 4°28′42.7″E
Mean water temperature (°C)	Apr-Jun	10.62	9.9	13.2	11.4
	Jul-Sep	12.07	11.7	16.4	14.8
	Oct-Dec	12.15	9.0	9.0	9.1
	Jan-Mar	10.78	7.2	5.5	5.0
Conductivity ($\mu S.\ cm^{-1}$)		435	366	560	117
Hardness ($mgCaCO3.L^{-1}$)		245	213	299	28
pH		7.5	8.5	8.3	8
NO_2^- (mg/L)		0	0.04	1.12	< 0.02
NO_3^- (mg/L)		7.2	2.3	17	4.1
PO_4^{3-} (mg/L)		0	0.1	0.4	0.09
HCO^{3-} (mg/L)		279.4	235	310	< 30
Cl^- (mg/L)		4.8	4	16	7
SO_4^{2-} (mg/L)		6.5	7	14	8
Mg^{2+} (mg/L)		3	3	3	2
Ca^{2+} (mg/L)		93	81	115	8
Na^+ (mg/L)		3.2	2	7	7
K^+ (mg/L)		0	1	2	1

2014) and in the colonial ascidian *Didemnum vexillum* (Hawes et al., 2018). The diet appeared to have an important role in the control of behavioural and developmental caste determination in social insects such as bees, ants and beetles by modulating the cytosine methylation level (Kucharski et al., 2008; Lyko et al., 2010; Wang et al., 2013; Cridge et al., 2015). Moreover, exposure to a very wide range of contaminants found in the environment such as metals, endocrine disruptors, organo-halogenated compounds and solvents may lead to epigenetic effects (Baccarelli and Bollati, 2009; Vandegehuchte et al., 2009a,b).

In ecotoxicology, most studies considering epigenetic marks in invertebrates have focused on *Daphnia* as a model organism (Asselman et al., 2015). However, in order to improve the understanding of consequences of environmental stressors in sentinel organisms representative of the diversity of natural stream communities, epigenetic studies in non-model species are mandatory. Indeed, if DNA methylation is one of the most studied epigenetic marks, almost nothing is known about the extent of DNA methylation variation among natural populations in invertebrates (Massicotte et al., 2011). Invertebrate species exhibit a low global genomic cytosine methylation level, with some variability existing between crustaceans and insects (0–1% of total cytosines) and other invertebrates such as the mollusk *Crassostrea gigas* (2%) or the parasite nematode *Trichinella spiralis* (1.6%) (Gavery and Roberts, 2013; Gao et al., 2012). A few insect species such as the cabbage butterfly *Mamestra brassicae* and the wasp *Polistes dominulus* exhibit a DNA methylation level comparable to that of vertebrates containing, respectively, 10% and 19% of 5-methyl-cytosine in their genome (Mandrioli and Volpi, 2003; Kronforst et al., 2008). In freshwater amphipods such as gammarids, *Gammarus fossarum* is recognized as a relevant sentinel species in ecotoxicology and environmental monitoring, because of its key role as both detritus feeder and food resource for many macroinvertebrates, fish and amphibian species. It is widespread and abundant in Europe and known to be sensitive to a wide range of stressors. Moreover, its biology, namely its development and reproduction, are well-known (Kunz et al., 2010; Chaumot et al., 2015).

The aim of this study was to explore the effect of some biotic and abiotic factors on the global genomic cytosine DNA methylation level in the freshwater crustacean *Gammarus fossarum*. Since in gammarids no epigenetic study had been earlier done, the first step was to determine the natural variability (basal level) of the DNA methylation level in that species. A protocol of DNA extraction from one adult organism was optimized. Effect of sex, age and sampling site on the DNA methylation level was then assessed. The second step was to evaluate the effects of two environmental stressors, water temperature and food starvation under controlled laboratory conditions. The third step was to assess the effect of a chemical stress on global genomic cytosine methylation. We chose to study the effect of environmentally relevant concentrations of cadmium because of its multi-targeted toxicity and its ubiquity in the environment.

2. Materials and methods

2.1. Gammarid field collection

Adult and juvenile gammarids were collected in spring and autumn 2016, in a non-contaminated watercress bed (Cress site, Ain, France) by using, respectively, 2–2.5 mm and 1.5–2 mm sieves. Gammarids were then quickly brought back to the laboratory to be weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C for the DNA extraction optimization step or kept in the laboratory for exposure experiments. To assess the natural variability of global methylation level of cytosine in *G. fossarum* sampled from various sites, organisms were collected in four little contaminated sites. Cress site is a bunch of channels in a watercress bed used as a reference source population by our laboratory (Gouveia et al., 2018) and the three other sites (headwater streams) were previously described by Vigneron et al. (2015). All sites showed contrasting physico-chemical characteristics, especially in terms of water hardness due to either limestone or crystalline areas (Table 1) and exhibited a high density of *G. fossarum* gammarids. Organisms were caught with a 2–2.5 mm sieve and males were quickly brought back to the laboratory, weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until DNA extraction.

2.2. Laboratory exposure experiment

The effect of water temperature, food starvation and of a chemical stress on the methylation level was assessed on male gammarids collected in autumn 2016 in the Cress site (Table 1). Before being used for laboratory experiment, organisms were maintained for 24 h at 12 ± 0.5 °C with a 16/8 h light/dark cycle, into 30 L aquaria (density of 4000 organisms/aquarium) continuously supplied with aerated uncontaminated groundwater (conductivity 600 µS/cm). They were fed *ad libitum* on alder leaves (*Alnus glutinosa*). Gammarids (dorsal length from 8 mm to 12 mm measured between the start of the prosoma and the end of the metasoma) were selected the day before the launch of the

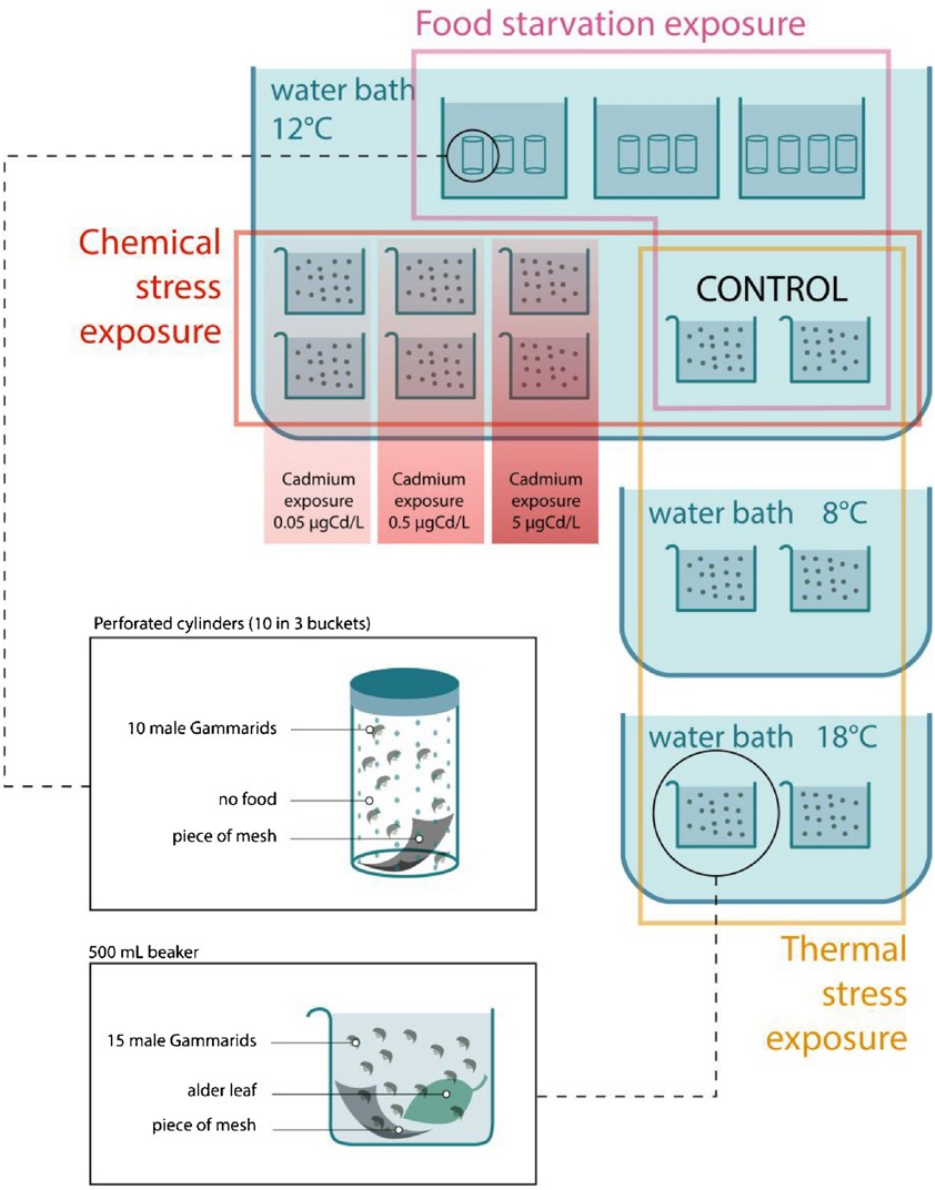


Fig. 1. Experimental design of the study of environmental stressor effects (water temperature, food starvation and chemical stress).

experiment.

To assess temperature effect, two replicates of 15 gammarids were placed with a few alder leaves (*Alnus glutinosa*) and a piece of plastic mesh in plastic beakers containing 500 mL of uncontaminated drilling water in three temperature-controlled water baths (8 °C, 12 °C (control) and 18 °C) (Fig. 1). The temperature of 18 °C was high relative to water temperatures occurring in the Cress site where gammarids were collected to study the effect of environmental stressors (Table 1). To study the effect of food starvation, ten gammarids were placed in each of ten perforated cylinders containing a piece of plastic mesh. Cylinders were randomly distributed in three buckets of uncontaminated drilling water in the 12 °C water bath (Fig. 1). For both experiments (temperature and food starvation), a 65 L container of uncontaminated drilling water supplied beakers and buckets by means of a peristaltic pump at a flow rate of 750 mL per day (for supplying beakers) and 10.5 mL per day (for supplying buckets) (as previously described by Felten et al., 2008).

To assess the effect of a chemical stress, gammarids were exposed to three environmentally relevant cadmium concentrations (0.05, 0.5 and 5 µgCd/L). Indeed, in contaminated freshwater ecosystems, concentrations may reach µg/L or higher values (*e.g.*, 67 µg/L of dissolved Cd in Flanders freshwaters) (Felten et al., 2008). Several studies have shown that crustaceans are very sensitive to cadmium (Felten et al., 2008; Geffard et al., 2010). Cadmium may negatively affect aquatic organisms even at low concentrations, likely impairing community structure and ecosystem functioning (Ciliberti et al., 2017). For each tested concentration, two replicates of 15 male gammarids were placed with a few alder leaves (*Alnus glutinosa*) and a piece of plastic mesh in plastic beakers containing 500 mL of each Cd solution in a 12 °C water bath (Fig. 1). Three Cd stock solutions were prepared in milliQ water at the concentrations of 5 mg Cd/L, 0.5 mg Cd/L and 0.05 mg Cd/L using serial dilutions. The contaminated media were obtained by adding 10 mL of stock solutions to 10 L of uncontaminated drilling water. The constant renewal of the contaminated media was achieved by means of a peristaltic pump at a flow rate of 750 mL per day (as previously described in Felten et al., 2008).

Regardless of the parameter studied, exposure lasted 14 days and 1 month because preliminary experiments had shown an absence of effect after a 5-day exposure time (data not shown). After exposure, ten

organisms from each condition were individually sampled, weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until DNA extraction.

2.3. DNA extraction, digestion and hydrolysis

DNA was extracted with the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen). The insect DNA extraction protocol proposed by the manufacturer was chosen because gammarids have a similar exoskeleton structure to insects. In order to maximize the amount of extracted DNA from one adult gammarid, this protocol was slightly modified (see 3.1 Optimization of DNA extraction).

DNA from one adult was extracted by a combination of mechanical grinding of the whole body and the addition of a lysis buffer containing SDS which facilitates lipid membrane denaturation. In order to optimize and normalize the grinding/lysis of organism, the following protocol was applied: a first dry grinding of the frozen organism placed at the bottom of a 2 ml Eppendorf tube was performed manually by 10 rounds of a piston Pellet Eppendorf®, the piston was then connected to an electrical grinder for an additional 10-second grinding. Then, 180 µL of lysis buffer were added and the mixture was ground for 70 s still using the electrical grinder. The second step of DNA extraction was a chemical lysis consisting of protein digestion with 20 µL of proteinase K (600 mAU/mL solution). After a 2000 *g* centrifugation for 2 s, samples were incubated for three hours at 56 °C. After incubation, 4 µL of 10% RNAse (Sigma R4875) were added to each sample to denature RNA followed by a 2000 *g* centrifugation for 2 s. In order to precipitate DNA, 200 µL of guanidine chlorhydrate and 200 µL of absolute ethanol were added. Then, samples were pipetted and poured onto a silica elution column. A centrifugation step of 6000 *g* for 1 min allowed the DNA adsorption onto silica. To eliminate possible contaminants and enzyme inhibitors, two wash steps were performed by adding 500 µL of wash buffer AW1 followed by a 6000 *g* centrifugation during 1 min and 500 µL of wash buffer AW2 followed by a 20,000 *g* centrifugation for 3 min. The DNA adsorbed onto silica was finally recovered by the addition of 100 µL of elution buffer (AE) containing Tris-EDTA followed by a 6000 *g* centrifugation for 1 min. The extracts were stored at −20 °C until the assessment of DNA concentration using a Nanodrop® photometer and of the final methylated nucleoside dosage.

The DNA extraction protocol for juvenile gammarids was the same as the one used for adult gammarids except that DNA was extracted from a pool of 10 organisms.

2.4. Quantification of the global cytosine methylation level

Genome-wide DNA methylation was measured using HPLC coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Method is based on a quantitative enzymatic digestion of the genomic DNA, which results in the release of all the nucleosides making up this molecule, which are then quantified by HPLC-MS/MS. Among the released nucleosides, the 2′-deoxycytosine (dC), and 5-methyl-2′deoxycytosine (5-mdC) were detected and quantified with mass spectrometry in the positive ionization mode using the so-called multiple reaction monitoring mode with transitions $m/z = 228 \text{ -> } m/z = 112$ and $m/z = 242\text{- > } m/z = 126$, respectively, as previously reported (Meador et al., 2010). These measurements were made with a TSQ Quantum Ultra electrospray ionization tandem mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc.). The conditions for DNA digestion were similar to those described previously (Ravanat et al., 2002). The hydrolyzed DNA samples were neutralized by addition of 10 µL of 0.1 M HCl and were centrifuged for 5 min at 5000 *g* before their analysis by HPLC-MS/MS. The hydrolyzed nucleosides were separated with HPLC using a linear gradient of acetonitrile in 2 mM ammonium formate, from 0% to 20% in 20 min, using an 3 mm Uptisphere (150 x 2 mm i.d.) octadecyl silyl silica gel column from Interchim (Montluçon, France) at a flow rate of 200 ml min^{-1}. Under these conditions, dC and 5-mdC were eluted at 7.6 and 11.4 min, respectively. The eluates were quantified with external calibration and the results were expressed as the percentage of 5-mdC relative to dC.

2.5. Statistical analysis

Statistical procedures were carried out with the R software (version 3.3.3). For each experiment, the Kruskal-Wallis test was used followed by a Mann-Whitney test for paired comparisons.

3. Results

3.1. Optimization of DNA extraction

The use of the very sensitive HPLC-MS/MS technique allowed to measure low levels of global genomic cytosine methylation. Since the method is very specific, the DNA purity is not supposed to be a limiting factor for the accurate determination of the methylation level. The DNA extraction step was optimized mainly in order to increase the quantity of extracted DNA from one adult organism. This was achieved through the adopted grinding procedure and the addition of two very short 2000 *g* centrifugations performed after the proteinase K step. A longer incubation time with proteinase K (16 h instead of 3 h) was tested but did not improve the yield of extracted DNA. With this optimized protocol, the amount of extracted DNA from one single organism was at least 10 µg DNA per sample.

3.2. Natural variability of the global cytosine methylation level

3.2.1. Basal level in gammarids from the reference Cress site

Genomic DNA methylation in adult gammarids from Cress site ranged between 0.38% and 0.61% with a mean value of 0.49% (Fig. 2). No difference was observed between male and female (p-value = 0.936). To evaluate the influence of age, the methylation level of cytosine in adults (male and female) and in juveniles was compared. Juveniles showed a methylation level of cytosine significantly lower and less variable than adults, ranging between 0.38% and 0.45% with a mean value of 0.41% (p-value for comparison with adults = 0.034).

3.2.2. Inter-site variability

Gammarids sampled in four sites exhibited different cytosine methylation levels (p value < 0.05) (Fig. 3). For example, the global genomic cytosine methylation level in gammarids from the Cress site was 1.7 times lower than in organisms from the Bacu site.

3.3. Effect of environmental stressors

3.3.1. Water temperature

Eight and 12 °C are within the annual range of temperature recorded

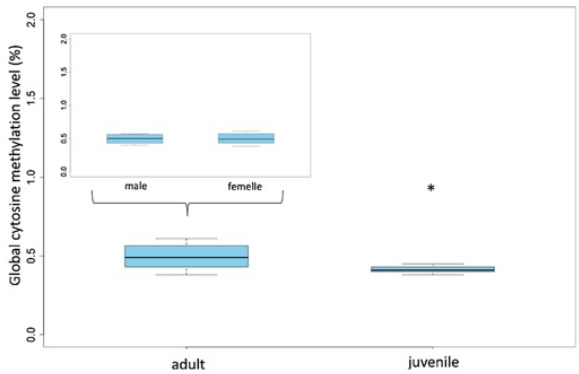


Fig. 2. Global cytosine methylation level (%) of male, female and juvenile gammarids from Cress population. n = 6 for adult and n = 10*6 for juvenile. Black star denotes a significant difference between adults and juveniles (p < 0.05).

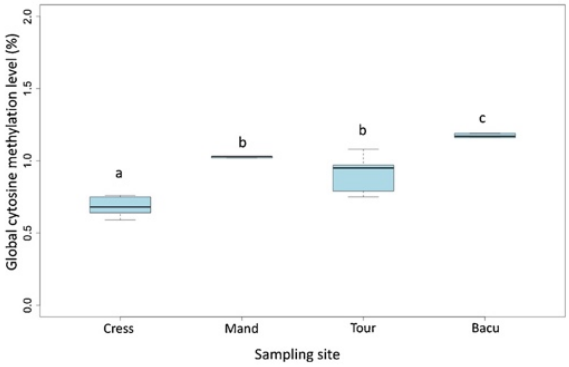


Fig. 3. Inter-population variability of the global cytosine methylation level (%). n = 5 individuals per population. Significant differences between two conditions are indicated by different letters (Mann Whitney test, $p < 0.05$).

at the Cress site and at the three other sites (Table 1). In contrast, 18 °C is out of that range and thus is likely to be a stressful temperature for gammarids.

After 14 days of maintenance, no significant difference in the methylation level was observed regardless of the temperature condition (p-value = 0.466). However, after 1 month, organisms exposed to the highest temperature (18 °C) showed a higher genomic cytosine methylation level than those exposed to 8 °C and 12 °C (p-value = 0.000828) (Fig. 4).

Exposure duration (14 days *vs* 1 month) did not affect the methylation level at either 8 °C and 12 °C (p-value = 0.14 and p-value = 0.0958, respectively). At 18 °C, after a 1-month exposure, organisms exhibited a significantly higher methylation level compared to those exposed for 14 days.

3.3.2. Food starvation

In order to ensure that the cannibalism of starved organisms was comparable with that of control (fed organisms), the mortality percentage was measured throughout the experiment. There was no difference between the mortality in control and food-starved organisms. Fourteen days of starvation had not effect on genomic cytosine methylation level (p-value = 0.125). However, after one month, a significant hypermethylation (p-value = 0.027) was observed in starved organisms with a mean value of 1.27% (min = 1.04% and max = 1.73%) compared to the control, showing a mean value of 0.87% (min = 0.57% and max = 1.41%) (Fig. 5).

3.3.3. Chemical stress

After 14 days, cytosine methylation levels in organisms exposed to Cd were significantly lower than in control, regardless of the Cd concentration (p-value < 0.05). Such an effect was no more observed after one month of exposure with a trend for hypermethylation noticed in exposed organisms compared to the control (p-value = 0.06) (Fig. 6).

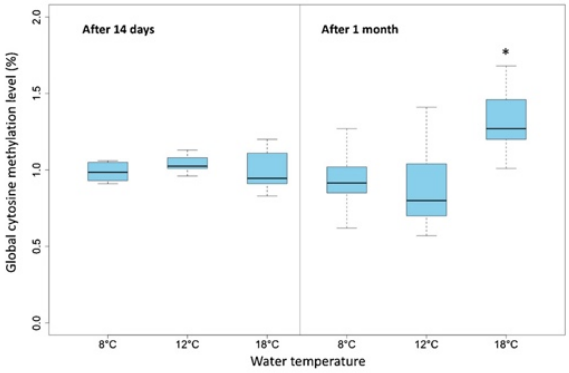


Fig. 4. Global cytosine methylation level (%) after 14 days and 1 month at 8, 12 or 18 °C exposure temperature. n = 10 individuals from the Cress population. Star denotes a significant difference compared to temperatures 8 °C and 12 °C ($p < 0.05$).

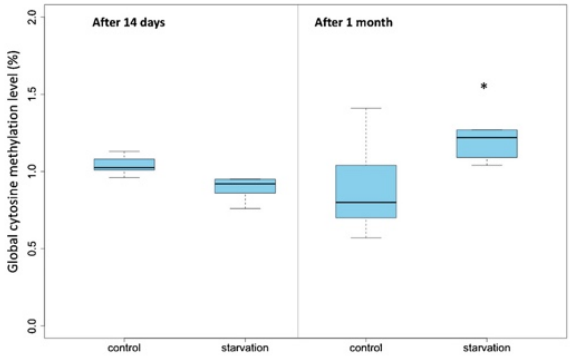


Fig. 5. Global cytosine methylation level (%) after 14 days and 1 month of food starvation compared to control (fed) condition. n = 5 organisms from the Cress population for each condition. Star denotes a significant difference compared to the control (fed) condition ($p < 0.05$).

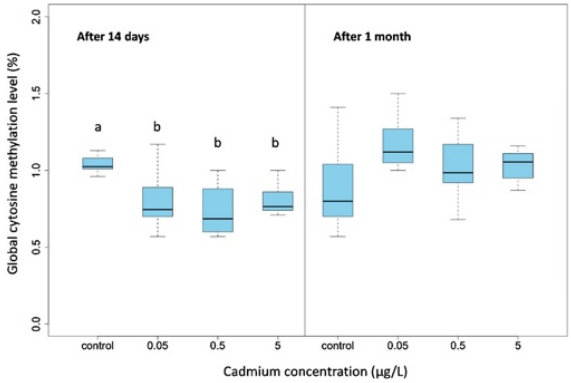


Fig. 6. Global cytosine methylation level (%) after 14 days and 1 month of cadmium exposure (0.05, 0.5 and 5 µg Cd/L). For each condition, n = 10 individuals from Cress population. A significant difference between two conditions is indicated by different letters (Mann Whitney test, $p < 0.05$).

4. Discussion

Global cytosine level of *G. fossarum* measured in the present study is far lower than that known in vertebrates, where it reaches approximately 5% in mammals and birds and up to 10% in fish and amphibians (Feng et al., 2010; Kvist et al., 2018). Global genome methylation in *Gammarus fossarum* is in the same range as that found in the crustacean *Daphnia magna* (0.49% in the genotype Iinb1 and 0.52% in the genotype Xinb3) (Asselman et al., 2015). In many insects, phylogenetically closely related to crustaceans, similar levels of methylated cytosines are observed (0.11–1%) (Xiang et al., 2010; Beeler et al., 2014; Walsh et al., 2010; Kronforst et al., 2008). A few insect species exhibit a DNA methylation level comparable to vertebrates such as the wasp *Polistes dominulus* with 19% methylation (Kronforst et al., 2008). In other invertebrates such as the mollusk *Crassostrea gigas* (2% of total cytosines) (Gavery and Roberts, 2013) and the nematode *Trichinella spiralis* (approximately 1.6%) (Gao et al., 2012), levels of methylated cytosine are only a little higher than the range observed here in *Gammarus fossarum* throughout the different experiments.

As far as we know, no study has compared the global cytosine methylation levels between female and male invertebrates yet. The only available studies assess the influence of sex in methylation of specific genes or genome regions. In contrast with the present results, these

studies have shown different methylation patterns between sexes in several *Drosophila* species (D'Ávila et al., 2010) and in the oyster *Crassostrea gigas* (Rivière, 2014). The increase in cytosine methylation level between juvenile and adult stages here underlined in *Gammarus* is in accordance with that observed in *Daphnia magna*, *i.e.* 0.13% in juveniles (7 days of life) and 0.26% in adults (32 days of life) (Vandegehuchte et al., 2009b). In light of these results, it appears that important reshuffles of genomic methylation occur during development in crustaceans (including growth and sexual maturity through successive moltings). Changes in cytosine methylation during development does not seem to be limited to crustaceans. In fact, in the honey bee *Apis mellifera*, the cytosine methylation level was 6.98% in 1-week-old workers compared with 22.49% observed in 5-week-old workers (Strachecka et al., 2012). In the same way, the analysis of different methylation statuses over the time by the MSAP (Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism) technique revealed a global cytosine demethylation between 0 day-post-hatching and 28 days-post-hatching *Octopus vulgaris* paralarvae (García-Fernández et al., 2017). Regarding a potential role of cytosine methylation on sexual maturity, Rivière (2014) have observed different methylation profiles between sexual resting and maturity in the oyster *Crassostrea gigas*.

In the present study, the methylation level appears to vary among gammarids caught at different sites. The absence of any significant difference in methylation level at 8 °C and 12 °C suggests that inter-site variability is not linked to temperature conditions during the sampling period. Other physicochemical parameters could explain a significant difference in cytosine methylation levels between the different natural populations, as proposed in previous studies carried out in other invertebrates (Baldanzi et al., 2017; Massicotte et al., 2011). Thus, an influence of water hardness on cytosine methylation could be here hypothesized since the latter was significantly lower in gammarids caught at Cress, Mand and Tour sites (higher water hardness) compared to that from Bacu site (lower water hardness). Further investigations are required to test this hypothesis.

Global cytosine methylation level in *G. fossarum* measured in the present study was influenced by a 18 °C water temperature after 1 month, which likely constitutes a stressful temperature in comparison with the thermal regime in the natural habitat recorded at the four catching sites (Table1). The effect of the highest temperature (18 °C) in exposed organisms depends on time since a significant difference in methylation level has been observed after 14-day and 1-month exposure. The observed increase in methylation level after 1 month cannot be explained by an indirect effect of the high temperature on the growth rate of an adult gammarid. Indeed, the growth rate of adult gammarids is negligible on a timescale of one month (Coulaud et al., 2014). Consistent with this, the weight of gammarids after 14 days and 1 month at 18 °C is not significantly different (data not shown, p-value = 0.8501). A similar effect of a thermal stress was observed in the Antarctic polychaete, *Spiophanes tcherniai* (Marsh and Pasqualone, 2014). After 4 weeks of exposure to 4 °C, worms showed an increase in DNA methylation compared to organisms exposed to their optimal life temperature of -1.5 °C. However, the long term exposure effect observed at 18 °C is in contrast with the study of Kong et al. (2017), who did not notice any effect of a high water temperature on the genomic cytosine methylation level in juvenile Pacific abalone *Haliotis discus hannai ino* after 2 months of exposure. Regarding the shorter exposure time, our results are in accordance with those of Asselman et al. (2015) who did not observe any effect of a high temperature (28 °C) after a short 48 h exposure in the crustacean *Daphnia magna*. In contrast, in the marine invertebrate *Didemnum vexillum,* after 11 days of exposure (8 days with a gradual temperature increase up to 27 °C followed by 3 days at 27 °C), Hawes et al. (2018) recorded a significant difference in the whole genome DNA methylation compared to control (19 °C).

The present study underlines an effect of food starvation on the global genomic cytosine methylation level in *Gammarus fossarum*, after one month. Few studies have evaluated the effect of the feeding level on DNA methylation apart in humans (Heijmans et al., 2008). The only study dealing with an invertebrate species concerns the effect of diet quality in *Daphnia*. The authors observed after 48 h a significant decrease in global DNA methylation in one genotype of *Daphnia magna* exposed to low-quality food compared to the control (normal quality food) (Asselman et al., 2015).

Regarding the consequence of a cadmium exposure on DNA methylation level, our results are not in accordance with those of Asselman et al. (2015) and Vandegehuchte et al. (2009a), which showed a lack of effect of a single- or multigeneration cadmium exposure in *Daphnia magna*. In opposite, Takiguchi et al. (2003) showed the same trend as that observed in the present study and highlighted that changes in DNA methylation in rat liver cells after exposure to high concentrations of cadmium depended on exposure duration. After one week of cadmium exposure, a decrease in global genomic cytosine methylation level was shown. On the contrary, after ten weeks of cadmium exposure, hypermethylation of DNA occurred. Several long-term studies have underlined a similar hypermethylation trend after exposure to high cadmium concentrations, in the gastropod *Cantareus aspersus* hepatopancreas (Nica et al., 2017), in hen liver and kidney cells (Zhang et al., 2009) and in human embryo lung fibroblasts (Jiang et al., 2008). Hypermethylation after a long-term exposure has also been observed in the yellow eel *Anguilla Anguilla* and in the earthworm *Lumbricus terrestris* at cadmium concentrations close to the ones used in the present study (Pierron et al., 2014; Šrut et al., 2017). Takiguchi et al. (2003) suggested that inhibition of DNA methyltransferase by cadmium (cadmium binds with the DNA binding site of DNA methyltransferase) could explain the early hypomethylation observed. After a longer exposure time to cadmium, a hypermethylation may occur due to a subsequent increase in DNA methyltransferase activity. Early DNA methyltransferase inhibition could trigger a compensatory effect in which genes are over-expressed, resulting in the observed hypermethylation.

Although a study of the effect of the duration of lab maintenance was not initially scheduled in our experimental design, results showed that the methylation level of control animals maintained for 14 days in the laboratory was significantly higher than that measured in gammarids immediately after field catching (p-value < 0.05) (see Supplementary data). This result seems to indicate that cytosine methylation level is sensitive to laboratory maintenance. Interestingly, after 1 month, the global methylation level in laboratory-reared organisms returns to the value observed in gammarids in the field. A possible short-term effect of laboratory maintenance on the methylation level in gammarids is of value considering that a lot of studies are done under such laboratory conditions even if such an effect has not been documented in the literature. In the present study, the effect of temperature, starvation and cadmium exposure were clearly shown. However, we cannot completely rule out an interaction between these recorded effects and lab maintenance effect. We are therefore currently conducting further experiments for studying more precisely the effect of maintenance in laboratory conditions on global cytosine methylation level.

5. Conclusion

In spite of low DNA methylation levels, HPLC/MS-MS technique allowed to detect sharp changes in DNA methylation level in *Gammarus fossarum* in response to environmental conditions found at the different catching sites. The inter-site variability observed in global genomic cytosine methylation level is quite significant reaching a two-fold value. DNA methylation appears to be sensitive to laboratory conditions and to environmental stressors such as temperature and food starvation. Cadmium clearly impacts this epigenetic mark following a non-monotonous time response. Indeed, changes in cytosine methylation depend on the stress duration and this should be taken into account in an ecotoxicological perspective. Further field experiments will be carried out in order to validate the use of genomic cytosine methylation level as

a biomarker of stress in gammarids. In this perspective, depending on the genome sequencing development in *Gammarus fossarum*, the study of methylation in specific genomic regions involved in the response to environmental stressors should be relevant.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the "Ministère de la transition écologique et solidaire" (France), the "Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture" (France) and the "Institut National de la Recherche Agronomique" (France). We also thank the "Commissariat de l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives" (France) for technical support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.09.015.

References

Asselman, J., De Coninck, D.I.M., Vandegehuchte, M.B., Jansen, M., Decaestecker, E., De Meester, L., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Janssen, C.R., De Schamphelaere, K.A.C., 2015. Global cytosine methylation in *Daphnia magna* depends on genotype, environment, and their interaction: genotype and environment influence DNA methylation in *Daphnia*. Environ. Toxicol. Chem. 34, 1056–1061.

Baccarelli, A., Bollati, V., 2009. Epigenetics and environmental chemicals. Curr. Opin. Pediatr. 21, 243–251.

Baldanzi, S., Watson, R., McQuaid, C.D., Gouws, G., Porri, F., 2017. Epigenetic variation among natural populations of the South African sandhopper Talorchestia capensis. Evol. Ecol. 31, 77–91.

Beeler, S.M., Wong, G.T., Zheng, J.M., Bush, E.C., Remnant, E.J., Oldroyd, B.P., Drewell, R.A., 2014. Whole-genome DNA methylation profile of the jewel wasp (*Nasonia vitripennis*). G3. Genes Genomes Genet. 4, 383–388.

Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., Maltby, L., 2015. Gammarids as reference species for freshwater monitoring. In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. (Eds.), Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks. Academic Press, pp. 253–280.

Ciliberti, A., Chaumot, A., Recoura-Massaquant, R., Chandesris, A., François, A., Coquery, M., Ferréol, M., Geffard, O., 2017. Caged Gammarus as biomonitors identifying thresholds of toxic metal bioavailability that affect gammarid densities at the French national scale. Water Res. 118, 131–140.

Coulaud, R., Geffard, O., Coquillat, A., Quéau, H., Charles, S., Chaumot, A., 2014. Ecological modeling for the extrapolation of ecotoxicological effects measured during in situ assays in Gammarus. Environ. Sci. Technol. 48 (11), 6428–6436.

Cridge, A., Leask, M., Duncan, E., Dearden, P., 2015. What do studies of insect polyphenisms tell us about nutritionally-triggered epigenomic changes and their consequences? Nutrients 7, 1787–1797.

D'Ávila, M.F., Garcia, R.N., Panzera, Y., Valente, V.L., da, S., 2010. Sex-specific methylation in Drosophila: an investigation of the Sophophora subgenus. Genetica 138, 907–913.

Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: amphipoda) exposed to cadmium. Aquat. Toxicol. 86, 413–425.

Feng, S., Cokus, S.J., Zhang, X., Chen, P.-Y., Bostick, M., Goll, M.G., Hetzel, J., Jain, J., Strauss, S.H., Halpern, M.E., Ukomadu, C., Sadler, K.C., Pradhan, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., 2010. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 8689–8694.

Gao, F., Liu, X., Wu, X.-P., Wang, X.-L., Gong, D., Lu, H., Xia, Y., Song, Y., Wang, J., Du, J., 2012. Differential DNA methylation in discrete developmental stages of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. Genome Biol. 13, R100.

García-Fernández, P., García-Souto, D., Almansa, E., Morán, P., Gestal, C., 2017. Epigenetic DNA methylation mediating *Octopus vulgaris* early development: effect of essential fatty acids enriched diet. Front. Physiol. 8.

Gavery, M.R., Roberts, S.B., 2013. Predominant intragenic methylation is associated with gene expression characteristics in a bivalve mollusc. Peer J. 1, e215.

Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: application for reproductive toxicity assessment. Environ. Toxicol. Chem. 29, 2249–2259.

Glastad, K.M., Hunt, B.G., Yi, S.V., Goodisman, M.A.D., 2011. DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era: DNA methylation in insects. Insect. Mol. Biol. 20, 553–565.

Gouveia, D., Bonneton, F., Almunia, C., Armengaud, J., Quéau, H., Degli-Esposti, D., Geffard, O., Chaumot, A., 2018. Identification, expression, and endocrine-disruption of three ecdysone-responsive genes in the sentinel species *Gammarus fossarum*. Sci. Rep. 8.

Hawes, N.A., Tremblay, L.A., Pochon, X., Dunphy, B., Fidler, A.E., Smith, K.F., 2018. Effects of temperature and salinity stress on DNA methylation in a highly invasive marine invertebrate, the colonial ascidian Didemnum vexillum. Peer J. 6, e5003.

Head, J.A., Dolinoy, D.C., Basu, N., 2012. Epigenetics for ecotoxicologists. Environ. Toxicol. Chem. 31, 221–227.

Heijmans, B.T., Tobi, E.W., Stein, A.D., Putter, H., Blauw, G.J., Susser, E.S., Slagboom, P.E., Lumey, L.H., 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. 105 (44), 17046–17049.

Jiang, G., Xu, L., Song, S., Zhu, C., Wu, Q., Zhang, L., Wu, L., 2008. Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells. Toxicology 244, 49–55.

Kong, N., Liu, X., Li, J., Mu, W., Lian, J., Xue, Y., Li, Q., 2017. Effects of temperature and salinity on survival, growth and DNA methylation of juvenile Pacific abalone, Haliotis discus hannai Ino. Chin. J. Oceanol. Limnol. 35, 1248–1258.

Kronforst, M.R., Gilley, D.C., Strassmann, J.E., Queller, D.C., 2008. DNA methylation is widespread across social Hymenoptera. Curr. Biol. 18, 287–288.

Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R., 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. Science 319 (5871), 1827–1830.

Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A., 2010. *Gammarus* spp. In aquatic ecotoxicology and water quality assessment: toward integrated multilevel tests. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 205, 1–76.

Kvist, J., Gonçalves Athanàsio, C., Shams Solari, O., Brown, J.B., Colbourne, J.K., Pfrender, M.E., Mirbahai, L., 2018. Pattern of DNA methylation in Daphnia: evolutionary perspective. Genome Biol. Evol. 10, 1988–2007.

Lyko, F., Foret, S., Kucharski, R., Wolf, S., Falckenhayn, C., Maleszka, R., 2010. The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in Queens and workers. PLoS Biol. 8, e1000506.

Mandrioli, M., Volpi, N., 2003. The genome of the lepidopteran *Mamestra brassicae* has a vertebrate-like content of methyl-cytosine. Genetica 119, 187–191.

Marsh, A.G., Pasqualone, A.A., 2014. DNA methylation and temperature stress in an Antarctic polychaete, Spiophanes tcherniai. Front. Physiol. 5.

Massicotte, R., Whitelaw, E., Angers, B., 2011. A source of random variation in natural populations. Epigenetics 6 (4), 421–427.

Meador, J.A., Su, Y., Ravanat, J.-L., Balajee, A.S., 2010. DNA dependent protein kinase (DNA-PK) deficient human glioblastoma cells are preferentially sensitized by Zebularine. Carcinogenesis 31, 184–191.

Nica, D.V., Popescu, C., Draghici, G.A., Andrica, F.-M., Privistirescu, I.A., Gergen, I.I., Stöger, R., 2017. High-level dietary cadmium exposure is associated with global DNA hypermethylation in the gastropod hepatopancreas. PLoS One 12, e0184221.

Norouzitallab, P., Baruah, K., Vandegehuchte, M., Van Stappen, G., Catania, F., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2014. Environmental heat stress induces epigenetic transgenerational inheritance of robustness in parthenogenetic Artemia model. FASEB J. 28, 3552–3563.

Pierron, F., Baillon, L., Sow, M., Gotreau, S., Gonzalez, P., 2014. Effect of low-dose cadmium exposure on DNA methylation in the endangered European Eel. Environ. Sci. Technol. 48, 797–803.

Ravanat, J.-L., Douki, T., Duez, P., Gremaud, E., Herbert, K., Hofer, T., Lasserre, L., Saint-Pierre, C., Favier, A., Cadet, J., 2002. Cellular background level of 8-oxo-7, 8-dihydro-2′-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. Carcinogenesis 23, 1911–1918.

Rey, O., Danchin, E., Mirouze, M., Loot, C., Blanchet, S., 2016. Adaptation to global change: a transposable element–epigenetics perspective. Trends Ecol. Evol. 31, 514–526.

Rivière, G., 2014. Epigenetic features in the oyster *Crassostrea gigas* suggestive of functionally relevant promoter DNA methylation in invertebrates. Front. Physiol. 5.

Sarda, S., Zeng, J., Hunt, B.G., Yi, S.V., 2012. The evolution of invertebrate gene body methylation. Mol. Biol. Evol. 29, 1907–1916.

Šrut, M., Drechsel, V., Höckner, M., 2017. Low levels of Cd induce persisting epigenetic modifications and acclimation mechanisms in the earthworm *Lumbricus terrestris*. PLoS One 12, e0176047.

Strachecka, A., Borsuk, G., Olszewski, K., Paleolog, J., Gagoś, M., Chobotow, J., Nawrocka, A., Gryzińska, M., Bajda, M., 2012. The effect of amphotericin B on the lifespan, body-surface protein concentrations, and DNA methylation levels of honey bees (*Apis mellifera*). J. Apic. Sci. 56, 107–114.

Takiguchi, M., Achanzar, W.E., Qu, W., Li, G., Waalkes, M.P., 2003. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. Exp. Cell Res. 286, 355–365.

Vandegehuchte, M.B., Kyndt, T., Vanholme, B., Haegeman, A., Gheysen, G., Janssen, C.R., 2009a. Occurrence of DNA methylation in *Daphnia magna* and influence of multigeneration Cd exposure. Environ. Int. 35, 700–706.

Vandegehuchte, M.B., Lemière, F., Janssen, C.R., 2009b. Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multigeneration Zn exposure. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 150, 343–348.

Vigneron, A., Geffard, O., Coquery, M., François, A., Quéau, H., Chaumot, A., 2015. Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a *Gammarus fossarum* population inhabiting a low-level contaminated stream. Ecotoxicology 24, 1239–1249.

Walsh, T.K., Brisson, J.A., Robertson, H.M., Gordon, K., Jaubert-Possamai, S., Tagu, D., Edwards, O.R., 2010. A functional DNA methylation system in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*: DNA methylation in the pea aphid. Insect Mol. Biol. 19, 215–228.

Wang, X., Wheeler, D., Avery, A., Rago, A., Choi, J.-H., Colbourne, J.K., Clark, A.G.,

Werren, J.H., 2013. Function and evolution of DNA methylation in *Nasonia vitripennis*. PLoS Genet. 9, e1003872.
Xiang, H., Zhu, J., Chen, Q., Dai, F., Li, X., Li, M., Zhang, H., Zhang, G., Li, D., Dong, Y., et al., 2010. Single base–resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map. Nat. Biotechnol. 28, 516–520.
Yi, S.V., 2017. Insights into epigenome evolution from animal and plant methylomes. Genome Biol. Evol. 9, 3189–3201.
Zhang, J., Fu, Y., Li, J., Wang, J., He, B., Xu, S., 2009. Effects of subchronic cadmium poisoning on DNA methylation in hens. Environ. Toxicol. Pharmacol. 27, 345–349.

Supplementary figure

FIGURE S1

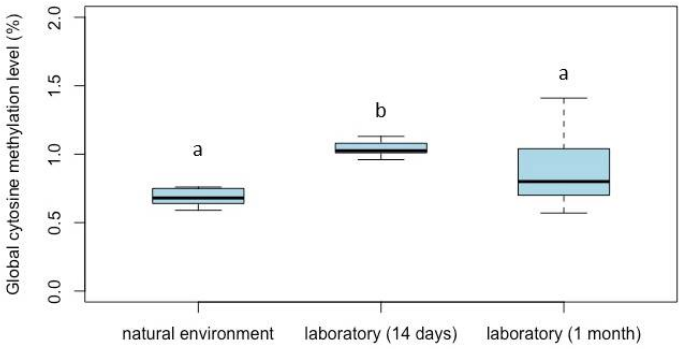


Figure S 1 : Global cytosine methylation level (%) in gammarids from the Cress population directly after sampling in the field, after 14 days and 1 month of laboratory rearing at 12°C in 500 mL beakers. (n = 5, 10 and 10 organisms, respectively). A significant difference between two conditions is indicated by different letters (Mann Whitney test, $p < 0.05$).

III.2. Note n°1 : Niveaux de méthylation de l'ADN d'une population de *Gammarus fossarum* historiquement exposée et tolérante au cadmium

Dans nos précédents travaux (publication n°1), la comparaison des niveaux de méthylation d'organismes prélevés sur quatre sites aux caractéristiques physico-chimiques variées et peu contaminés a mis en évidence une variabilité inter-populationnelle importante (d'un ordre de grandeur égal à 2) des niveaux globaux de méthylation chez *Gammarus fossarum*.

Dans le cadre de cette étude, le niveau de méthylation des organismes issus d'un autre site, Ardillats, avait également été mesuré (caractéristiques physico-chimiques du site décrites au paragraphe II.1.1.2). Ces résultats n'avaient pas été inclus dans la publication n°1 car, contrairement aux autres sites étudiés, le site Ardillats est connu pour présenter une contamination biodisponible métallique d'origine géochimique. Cette contamination a été mise en évidence par le déploiement de tests de bioaccumulation lors de la transplantation de gammares issus d'une population de référence (monitoring actif, Besse et al., 2013). Des niveaux d'accumulation du Cd (gammares encagés sur le site pendant 7 jours) cinq fois plus élevés que le seuil de référence national ont ainsi été mis en évidence (Vigneron et al., 2015). Par ailleurs, Vigneron et al. (2015, 2019) ont montré que la population de *Gammarus fossarum* localisée sur ce site présente une tolérance au cadmium et que cette dernière résulte d'un héritage non génétique de tolérance.

Comme le montre la Figure III - 1, les organismes provenant du site Ardillats possèdent des niveaux de méthylation élevés par rapport aux autres sites non contaminés avec notamment des niveaux deux fois plus importants que ceux observés chez les organismes issus du site de référence Cress.

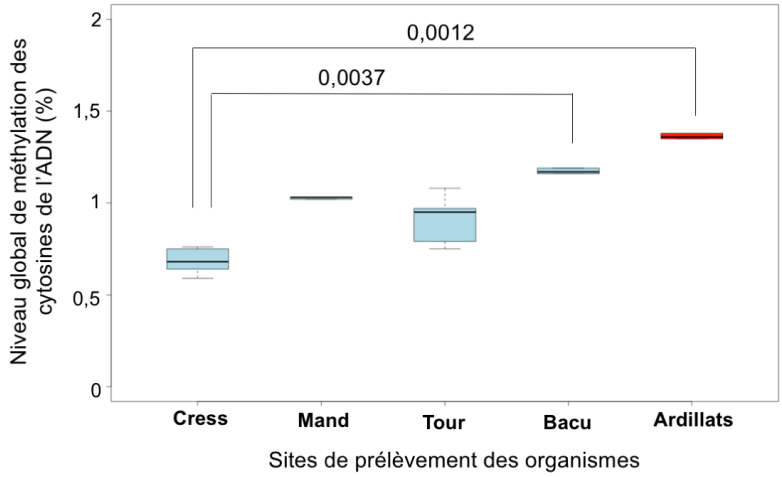


Figure III - 1 : Comparaison des niveaux de méthylation globaux des cytosines de l'ADN de gammares prélevés sur le site des Ardillats (contamination métallique) avec quatre sites non contaminés. n = 5. Test de Dunn, p-value <0.05 indiquée sur le graphique.

Ces niveaux de méthylation élevés pourraient être mis en relation avec l'exposition à long terme au cadmium des organismes sur le site Ardillats au regard de l'hyperméthylation que nous avons observée après 1 mois d'exposition à ce même métal au laboratoire (publication n°1). Ainsi, un rôle possible de la méthylation de l'ADN dans le processus d'acquisition et de transmission de la tolérance au Cd par acclimatation transgénérationnelle observé chez la population des Ardillats par Vigneron et al. (2019) peut être avancé. De manière similaire, l'implication de la méthylation de l'ADN dans l'émergence et la persistance de la tolérance à un contaminant à travers les générations a été suggérée par Oppold et al. (2015). Les auteurs ont montré que l'exposition parentale du moustique *Aedes albopictus* à la vinclozoline et à la génistéine (phytooestrogène) engendrait une diminution de la sensibilité à l'insecticide imidaclopride chez les deux générations successives. Ce changement de sensibilité était associé à des variations du niveau global de méthylation de l'ADN chez les parents exposés et les deux générations suivantes (Oppold et al., 2015).

III.3. Note n°2 : Le niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN chez *Gammarus fossarum*, un biomarqueur de stress applicable dans le suivi de la qualité des milieux ?

1- Introduction

Depuis quelques décennies, de nombreuses études ont mis en évidence la forte sensibilité de l'épigénome aux changements environnementaux. Certaines d'entre-elles ont également montré l'implication des modifications épigénétiques induites par l'environnement dans l'émergence d'altérations phénotypiques importantes (Faulk et Dolinoy, 2011 ; Chatterjee et al., 2018 ; Norouzitallab et al., 2019 ; Eirin-Lopez et Putnam, 2019). En plus du rôle majeur des marques épigénétiques dans les réponses des organismes aux perturbations environnementales, leur possible persistance au cours de la vie des individus, voire leur transmission au fil des générations, en font des objets d'étude pertinents dans le cadre de la biosurveillance des milieux (Head et al., 2012 ; Mirbahai et Chipman, 2014 ; Suarez-Ulloa et al., 2015). Les marques épigénétiques, comme la méthylation des cytosines de l'ADN sur des gènes spécifiques, pourraient par exemple servir de biomarqueurs pour identifier des agents toxiques particuliers et/ou constituer un outils d'alerte précoce de la contamination (Chatterjee et al., 2018 ; Suarez-Ulloa et al., 2015).Les marques plus génériques comme le niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN pourraient également être utilisées comme marqueur du stress accumulé par les organismes au cours de leur vie (Head et al., 2012). Malgré un intérêt croissant des scientifiques pour les mécanismes épigénétiques chez les invertébrés, les informations disponibles sont encore assez pauvres (Vandegehuchte et Janssen, 2011 ; Suarez-Ulloa et al., 2015), ce qui constitue un frein important au développement de telles approches. Finalement, les données sur la modulation de l'épigénome portent principalement sur quelques espèces comme celles appartenant au genre *Daphnia*, l'huître du pacifique *Crassostrea gigas* et le poisson zèbre *Danio rerio* en écotoxicologie aquatique (Brander et al., 2017 ; Chatterjee et al., 2018). Il existe ainsi un manque important d'études épigénétiques, qui mérite d'être comblé, chez des espèces représentatives de la diversité des populations naturelles.

Parmi les amphipodes d'eau douce, *Gammarus fossarum* est reconnue comme une espèce sentinelle pertinente en écotoxicologie et plus particulièrement pour la biosurveillance

des milieux. En effet, cette espèce joue un rôle clef dans la chaîne trophique des écosystèmes aquatiques étant à la fois détritivore et proie de nombreux macro-invertébrés, poissons et amphibiens. Elle est également largement répandue et abondante en Europe et présente une sensibilité importante à une large gamme de contaminants. Sa biologie, notamment son développement et sa reproduction, est également bien connue (Kunz et al., 2010 ; Chaumot et al., 2015).

Les premières études sur le niveau global de méthylation de l'ADN chez *Gammarus fossarum* ont mis en évidence une variabilité importante des niveaux de méthylation selon le site de prélèvement des organismes (publication n°1). Une sensibilité forte de cette marque épigénétique à une augmentation de la température a été montrée, ainsi qu'à la restriction alimentaire et à la contamination par le cadmium à des concentrations environnementales. Nous avons également observé que les réponses du niveau global de méthylation de l'ADN au stress cadmique ne variaient pas de manière monotone au cours du temps (publication n°1). Enfin, bien que l'étude de l'effet du maintien des organismes au laboratoire n'était pas prévue initialement, nos précédents travaux ont montré une sensibilité potentielle du niveau global de méthylation de l'ADN aux conditions du laboratoire (publication n°1). Ces différentes réponses aux facteurs de stress étudiés semblent être plutôt favorables au développement de cette marque épigénétique comme biomarqueur de stress. Sa sensibilité potentielle aux conditions du laboratoire et la non-monotonie de ses réponses au stress cadmique au cours du temps peuvent toutefois constituer une limite importante.

Afin d'aller plus loin sur la question de la possible utilisation du niveau global de méthylation de l'ADN chez *Gammarus fossarum* comme biomarqueur de stress chimique, les niveaux de méthylation des cytosines de l'ADN de gammares encagés *in situ* sur 5 sites aux profils de contamination contrastés et connus ont été mesurés.

2- Matériels et méthodes

Les gammares mâles de taille homogène utilisés dans cette étude proviennent du site de la cressonnière du Bugey à Saint-Maurice-de-Rémens (voir description au paragraphe II.1.1). Après acclimatation au laboratoire pendant 15 jours, les organismes ont été triés quelques jours avant l'encagement et mis en système le jour du lancement de l'exposition sur le site de référence Mand et sur les sites fortement impactés par les activités humaines : Ardi, Jam, Tur et Gie (voir descriptions au paragraphe II.2.1). Pour chaque site, 2 systèmes d'encagement

contenant chacun 20 mâles et de la nourriture *ad libitum* ont été placés dans une caisse d'encagement. Après 7 jours et 28 jours, les organismes ont été ramenés au laboratoire pour être sacrifiés par contact avec de l'azote liquide, puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ADN (protocole suivi au paragraphe II.5.1.1).

La perte de la caisse d'encagement sur le site Gie n'a malheureusement pas permis de récupérer les organismes après 28 jours d'exposition.

3- Résultats et discussion

Après 7 et 28 jours d'encagement, une survie de 100% a été observée chez les organismes pour tous les sites étudiés. Il n'y a pas de différence significative entre les niveaux de méthylation des organismes encagés sur les différents sites (test de Kruskal-Wallis, p-value > 5%) (Figure III - 2). De plus, pour chaque site étudié, les niveaux de méthylation après 7 et 28 jours ne sont pas significativement différents (test de Kruskal-Wallis, p-value > 5%) (Figure III - 2).

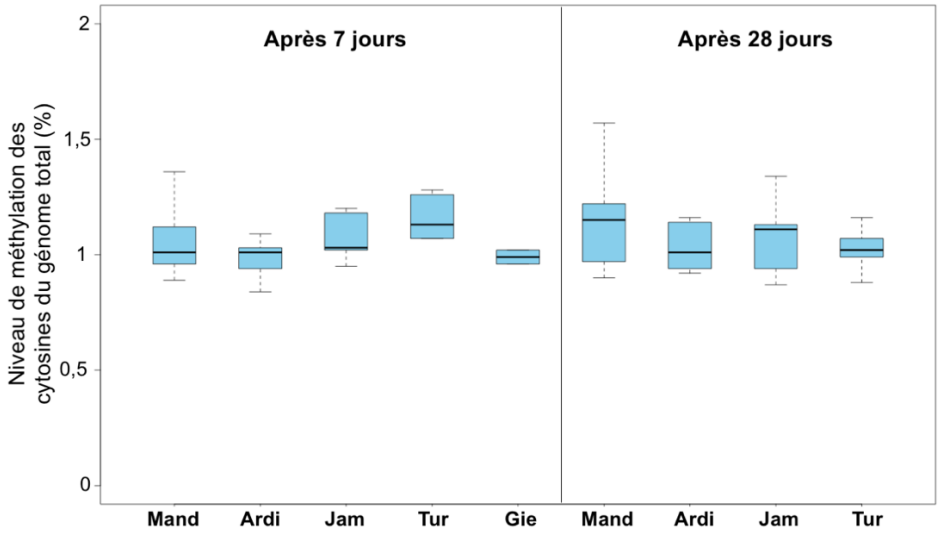


Figure III - 2 : Comparaison des niveaux globaux de méthylation des cytosines de l'ADN d'organismes encagés sur des sites aux contextes de contamination variés, n = 5.

Cette absence d'effet de la contamination *in situ* sur le niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN est surprenante puisque des effets significatifs de la qualité de l'eau sur le taux d'alimentation des organismes exposés, au même moment que les organismes utilisés pour notre expérimentation, sur les sites Ardi, Jam, Tur et Gie ont été mis en évidence. Compte-tenu de la non-monotonie des réponses au stress cadmique observée au laboratoire lors de nos

précédents travaux (Cribiu et al., 2018, publication n°1), les durées d'exposition de 7 et 28 jours n'ont peut-être pas permis d'observer les modulations de la marque épigénétique.

Quel que soit le site d'encagement, les niveaux de méthylation observés sont plus élevés que ceux mesurés sur les organismes directement prélevés à la Cressonnière (0,38 - 0,76%) (Cribiu et al., 2018, publication n°1). Nous avons alors envisagé que l'encagement lui-même puisse être un facteur confondant conduisant à un effet sur le niveau de méthylation des organismes encagés masquant alors de potentielles modulations en lien avec la qualité du milieu. Cela semble néanmoins peu probable car il a été montré, lors d'un stage de Master 2 réalisé en appui de cette thèse en 2018, que les niveaux de méthylation d'organismes encagés sur le site de la cressonnière pendant 14 et 21 jours étaient similaires à ceux des organismes directement prélevés sur le site (voir Annexe).

4- Conclusion

Compte-tenu des résultats de cette étude préliminaire *in situ*, le développement du niveau global de la méthylation des cytosines de l'ADN comme biomarqueur de stress chimique chez *Gammarus fossarum* est compromis dans le cadre de la biosurveillance. Certes, une réponse du marqueur a bien été obtenue en conditions contrôlées au laboratoire à la suite d'une exposition au cadmium (Cribiu et al., 2018, publication n°1). Cependant, aucune variation de la marque épigénétique n'a pu être observée lors des expositions *in situ* à des cocktails complexes de contaminants.

Le caractère générique du niveau global de la méthylation de l'ADN, mesuré sur le génome total de l'organisme entier, peut avoir dilué des effets épigénétiques plus localisés au niveau de certaines séquences d'ADN, de certains types cellulaires ou de certains tissus. Le développement d'approches ciblées pourrait ainsi être d'intérêt pour une utilisation de la méthylation de l'ADN comme biomarqueur de stress chimique dans le cadre du suivi de la qualité des milieux.

Chapitre IV. Étude transgénérationnelle d'une exposition parentale au stress chimique chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*

Ce chapitre IV réunit les résultats obtenus dans le cadre de l'étude transgénérationnelle de l'exposition parentale au stress chimique chez *Gammarus fossarum*.

Dans une seconde publication (publication n°2, soumis), les conséquences d'une exposition parentale au cadmium sur les traits d'histoire de vie et sur la démographie de la population au cours des trois générations successives de descendants sont présentés. Afin d'explorer les effets d'un autre contaminant, au mode d'action *a priori* différent, une seconde expérimentation transgénérationnelle utilisant le même protocole expérimental a été réalisée avec la 3,4-dichloroaniline (produit de dégradation d'herbicides de type phényle-urée) (publication n°3, en préparation). Pour finir, la note n°3 présente les résultats de l'étude des effets différés dans un contexte de contamination environnementale réaliste lors d'exposition par l'encagement *in situ* de géniteurs pendant la phase de gamétogénèse sur des sites présentant des contextes de contamination contrastés et dont la toxicité a déjà été caractérisée lors de précédentes expositions *in situ* de *G. fossarum*.

IV.1. Publication n°2: A population dynamics point of view onto delayed life-history effects of contaminants: A case study with transgenerational effects of cadmium parental exposure over three generations in the freshwater crustacean *Gammarus*.

Article soumis à Environmental Science & Technology (EST)

Résumé

Cette étude explore les effets différés d'une exposition parentale, chez le crustacé d'eau douce *Gammarus fossarum*, à des concentrations de cadmium (Cd) pertinentes d'un point de vue environnemental sur les traits d'histoire de vie de trois générations de descendants ainsi que leurs conséquences sur la démographie de la population. Pour cela, une expérimentation au laboratoire d'un an a été réalisée, couplée à un travail de modélisation de la dynamique de population. Après l'exposition des géniteurs pendant la phase de gamétogénèse, d'importants effets différés en cascade sur les traits d'histoire de vie ont été mis en évidence sur trois générations de descendants non exposés : une diminution significative du succès de reproduction chez les F1, une puberté précoce marquée et une réduction des quantités de réserves vitellines investies dans les ovocytes chez les F2, et enfin une diminution du taux de croissance des juvéniles F3. En revanche, l'analyse de ces effets inter et transgénérationnels *via* le modèle matriciel de type Lefkovitch a montré un impact faible sur la démographie de la population avec une atténuation des conséquences démographiques au cours des générations successives. Ainsi, les modifications des traits d'histoire de vie observées chez les générations de descendants peuvent être interprétées comme des compromis entre les traits d'histoire de vie liés à la stratégie de vie de l'espèce, qui aboutissent à une compensation de l'impact démographique au cours des générations successives. Au bilan, cette étude démontre que des effets différés transgénérationnels sont susceptibles d'émerger chez les populations naturelles suite à une contamination environnementale. Elle donne un nouvel éclairage sur l'impact des mécanismes populationnels, impliqués dans la régulation démographique, sur la vulnérabilité des espèces suite à un stress chimique.

Mots clés :

Effet différé, effet transgénérationnel, trait d'histoire de vie, modélisation de la dynamique de population, impact démographique, cadmium, *Gammarus fossarum*

A population dynamics point of view onto delayed life-history effects of environmental contamination: illustration with transgenerational effects of cadmium over three generations in the freshwater crustacean *Gammarus*.

Pauline Cribiu[a,b], Alain Devaux[a], Olivier Geffard[b], Khédidja Abbaci[b], Hervé Quéau[b], Nicolas Delorme[b], Laura Garnero[b], Thérèse Bastide[a], Sylvie Bony[a] , Arnaud Chaumot[b]

[a]ENTPE, INRA, CNRS UMR 5023 LEHNA, rue Maurice Audin 69518 Vaulx-en-Velin CEDEX, France

[b]IRSTEA- Groupement de Lyon, unité de recherche RiverLy, Laboratoire d'écotoxicologie, 5 rue de la Doua 69626 Villeurbanne CEDEX, France

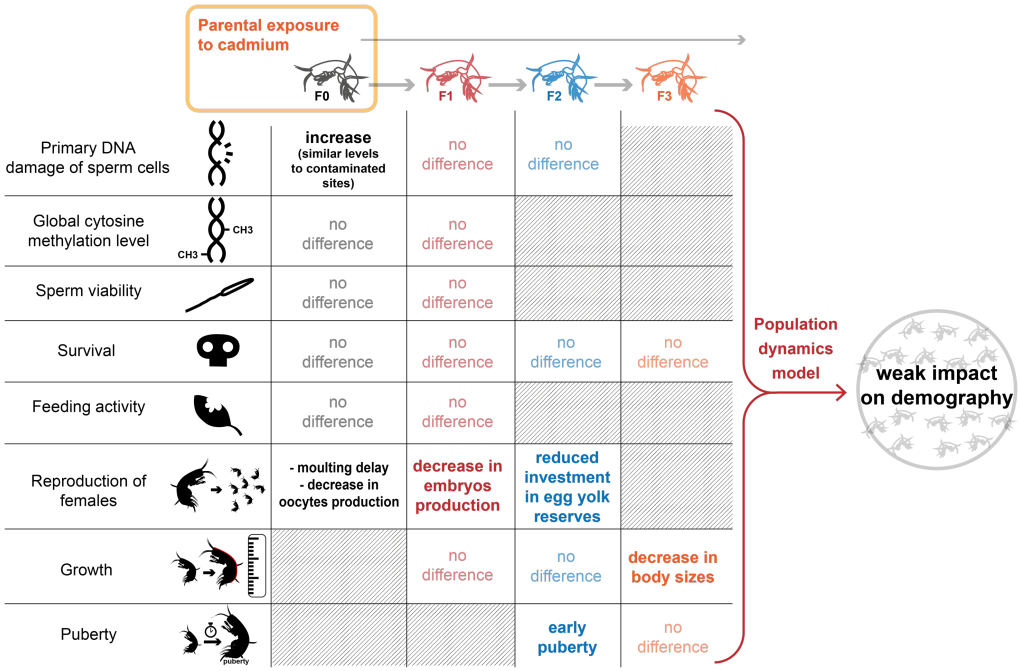
Abstract

We explored the delayed consequences of parental exposure to environmentally relevant cadmium (Cd) concentrations in terms of life-history trait impairments and demographic impacts throughout three successive offspring generations in the freshwater crustacean *Gammarus fossarum*. To this end, a challenging one-year lab experiment together with mathematical population modelling were performed. After exposure of mature spawners during one gametogenesis cycle, severe delayed cascading effects on life-history traits were highlighted along three unexposed offspring generations: a substantial decrease in F1 reproductive success, a sharp early onset of puberty in F2 offspring along with reduced investment in egg yolk reserves, and finally a strong decrease in F3 juvenile growth rates. By contrast, the analysis of these inter and transgenerational effects by means of Lefkovitch matrix population model revealed weak demographic impacts at the population level. The demographic consequences of the parental exposure seem to have been mitigated through compensatory population processes that led to deeply modified some life-history traits of the population. This study demonstrates potential long-term consequences of delayed transgenerational effects of environmental toxicity in wild populations. It sheds new light on the impact of population mechanisms, that are involved in demographic regulation, on species vulnerability after chemical stress.

Keywords:

Delayed effect, transgenerational effect, life-history trait, population dynamics modelling, demographic impact, cadmium, *Gammarus fossarum*

Abstract art



1 - Introduction

Accumulating evidences from wildlife populations and experimental studies demonstrate that environmental stressors adversely influence populations beyond exposed generations. This time lag between environmental exposure and biological impacts challenges current ecological risk assessment (Coutellec and Barata, 2013). Ecotoxicology has now highlighted that delayed effects are involved either in the development of tolerance (Plautz and Salice, 2013 ; Kimberly and Salice, 2015 ; Norouzitallab et al., 2015 ; Vigneron et al., 2019), or in the persistence and aggravation of the long-term effects of chronic contaminations (Hammers-Wirtz and Ratte, 2000 ; Yu et al., 2013 ; Castro et al., 2018). They also influence the population vulnerability to cope with additional environmental stressors (Norouzitallab et al., 2014 ; Kimberly and Salice, 2015 ; Vigneron et al., 2019 ; Zheng et al., 2017). On another hand, delayed effects may deeply affect the future ability of populations to maintain in their environment since environmental conditions in ancestors may impact significantly the subsequent performance of unexposed offspring (Beckerman et al., 2002 ; O'Connor et al., 2015). Furthermore, some authors have proposed that delayed effects on life-history traits occurring after environmental changes (*e.g.* food availability and chemical exposure) may regulate population demography and facilitate population sustainability (LeBlanc et al., 2013). The demographic impact of environmental changes may also be mitigated by life-history tradeoffs during the life time of individuals and across generations (Choi et al., 2008 ; Prud'homme et al., 2017). At the population level, such tradeoffs can sustain demographic compensation processes (Villellas et al., 2015), and they are potentially constrained by species evolutionary history for instance in case of environmental canalization phenomena (Gaillard and Yoccoz, 2003). In this context, the use of population dynamics models has already shown a substantial interest to assess the demographic consequences of life-history trait impairments in multigenerational exposure designs (Raimondo et al., 2009 ; Biron et al., 2012 ; Prud'homme et al., 2017).

Life-history trait alterations after parental exposure to chemicals are frequently documented in F1 generations, notably in arthropods (McKenney, 2005 ; Guo et al., 2013 ; Piiroinen et al., 2014 ; Pakyari and Enkegaard, 2015). Furthermore, proposals to incorporate the consequences on F1 generations in standard toxicity protocols are increasing (Hammers-Wirtz and Ratte, 2000 ; Campiche et al., 2007 ; Castro et al., 2018 ; Parrott et al., 2017). Nevertheless, few long-term studies in aquatic ecotoxicology have specifically demonstrated transgenerational effects,

i.e. effects in generations which were never exposed at any stage of their life, including germ cell and embryo stages. Most of them were realized in laboratory species such as zebrafish (Baker et al., 2014 ; Corrales et al., 2014 ; Lombó et al., 2015 ; Knecht et al., 2017 ; Alfonso et al., 2019), *Daphnia* (Guan and Wang, 2006 ; Sarapultseva and Dubrova, 2016 ; Trijau et al., 2018 ; De Liguoro et al., 2019) or *Caenorhabditis elegans* (Kim et al., 2013 ; Wang et al., 2019). More broadly, multigenerational experiments are especially restricted to model species with short life time (Coutellec and Barata, 2013). Hence, consequences of parental exposure along successive offspring generations in representative species of aquatic animal biodiversity are still poorly explored. However, specific pattern due to energy allocation or demographic strategies are expected to occur in long-term responses of populations to contamination.

Crustacean gammarids are increasingly used as bioindicators in environmental monitoring (Kunz et al., 2010 ; Chaumot et al., 2015). Metallic and especially cadmium (Cd) contaminations have been documented as a limiting factor of gammarid abundance in French watercourses (Ciliberti et al., 2017 ; Alric et al., 2019). Besides, it has been shown that transgenerational processes were involved in the modification of toxicological sensitivities and their related fitness costs, in field *Gammarus fossarum* population historically exposed to Cd (Vigneron et al., 2015, 2019). In addition, exposure to low Cd concentrations modulates epigenetic marks in *G. fossarum* (Cribiu et al., 2018) and Cd transgenerational effects are consistently reported in several other invertebrates (Yu et al., 2013 ; Kimberly and Salice, 2015 ; Reátegui-Zirena et al., 2017). Furthermore, in *G. fossarum* , delayed effect of parental genotoxic stress mediated by DNA damage in spermatozoa has been demonstrated in F1 offspring (Lacaze et al., 2011b).

In this context, the present study explored the consequences of a short parental exposure to environmentally relevant Cd concentrations in terms of genome integrity, life-history traits and demography impacts throughout three successive generations in *G. fossarum*. A challenging one-year lab experiment was performed with, at the beginning of the transgenerational experiment, genitors in which Cd exposures induced moderate physiological and molecular impacts. Delayed cascading effects on life-history traits of F1, F2 and F3 generations were interpreted with a Lefkovitch matrix model (Coulaud et al., 2014) to assess potential demographic consequences.

2 - Materials and methods

Experimental design of the transgenerational study

Figure 1 summarizes the overall experimental design established according to the knowledge of the reproductive cycle of *G. fossarum* (Geffard et al., 2010).

F0 gammarids were exposed to two environmentally relevant concentrations of Cd (0.3 and 3 µg Cd/L), fixed in the range of concentrations used in previous studies reporting sublethal effects in *G. fossarum* (Geffard et al 2010 ; Lacaze et al., 2010 ; Trapp et al. 2015 ; Gouveia et al., 2017). To apply the exposure during one gamete maturation cycle, the exposed parents were selected in precopulatory pairs with females in D2 pre-molt stage (*i.e.* just before ecdysis of females, which marks the start of a new reproductive cycle) and the exposure was stopped

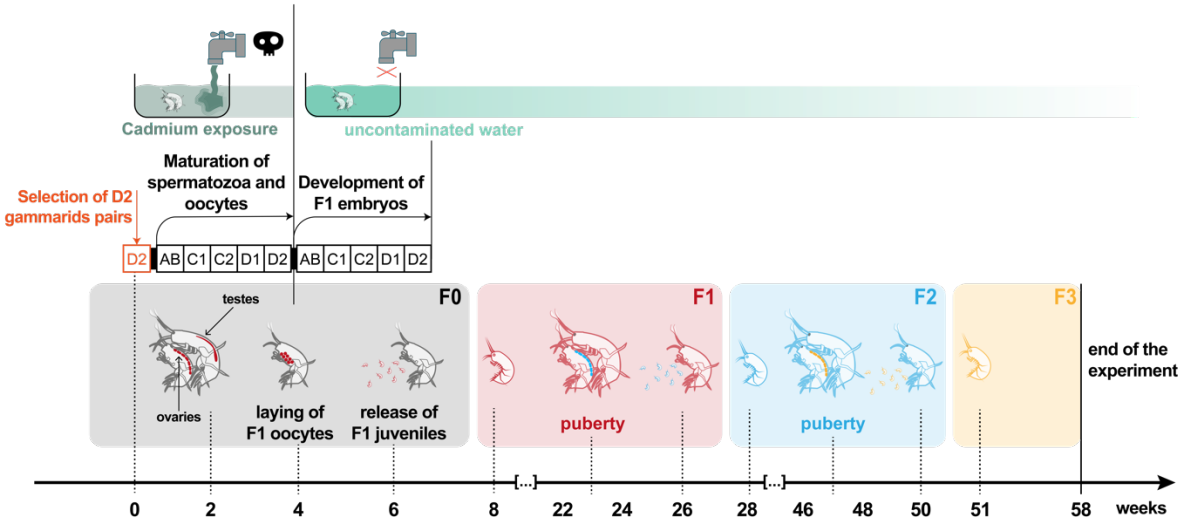


Figure 1 : Experimental design of the transgenerational study. F1 offspring was shown in red.

before the laying and the fertilization of oocytes in female marsupium (Figure 1). F0 parents with F1 embryos developing in female marsupium were then maintained in uncontaminated water (Figure 1). After their release, F1 organisms were still bred in free-Cd conditions. Successive F2 and F3 generations were developed and bred in the same condition and therefore were never exposed to Cd. The experiment was stopped after 58 weeks, when the F3 offspring reached puberty. Water temperature was set at 16°C. Gammarid parents and their offspring were fed *ad libitum* on alder leaves with the addition of parental faeces for neonates. They also received dried tubifex worms as a complementary food resource. Pieces of plastic mesh were placed in each container as shelters.

Collection of F0 spawners - Gammarids were collected from an upstream part of the Bourbre River (Isère, France) in March 2017 by using a hand-held net and were sieved (2-2.5 mm). They were quickly brought back to the laboratory and maintained for 24h before experiment, at 12°C under a 16/8h light/dark cycle into 20L aquaria (4000 organisms/aquarium) continuously supplied with aerated uncontaminated drilling water (conductivity between 400 and 500 µS/cm). Then, 1200 precopulatory pairs with females in D2 molt stage were selected and were randomly assigned to one of the three conditions (control; 0.3 µg Cd/L and 3µgCd/L).

F0 exposure to Cd - For each exposure condition, 400 precopulatory pairs were placed in 10 L buckets with test solution continuously oxygenated. F0 exposure was carried out over 21 days, *i.e.* during the parental gametogenesis (Figure 1). Test solutions were prepared from two Cd stock solutions ($CdCl_2(2^{1/2}H_2O)$ Sigma Aldrich®), respectively 1.5 mg Cd/L and 15 mg Cd/L in milliQ water and renewed twice a day to ensure the stability of exposure levels. For each solution renewal, 2 mL of stock solutions were added to 10 L of uncontaminated drilling water previously oxygenated during 24 hours at 16°C.

Offspring breeding - At the end of parental exposure, F0 gammarids of each condition were placed in three buckets of 12 L continuously supplied with uncontaminated drilling water by a gravity discharge system (4 renewals per day). Females which were delayed in their reproductive cycle and/or without embryos or oocytes were discarded. Then, the date of release of F1 juveniles was estimated from the knowledge of the gammarid reproductive cycle kinetics at 16°C (Chaumot et al., *submitted*). This estimation was confirmed by regular observations of the reproductive status of F0 gammarids. One week before the estimated date for F1 juvenile release, F0 females were placed in 2L tanks, while F0 males were discarded to avoid predation on neonates. Tanks were supplied continuously with uncontaminated drilling water (50 renewals per day). Released F1 juveniles were collected once a week during two successive weeks. Hence, age deviation between F1 juveniles collected did not exceed 15 days. Five months after F1 release, F2 juveniles were collected and 6 more months, F3 juveniles were collected following the same protocol. For each generation, collected juveniles were counted on a light table and replaced in their tank in order to avoid the loss of juveniles (length of 1-2 mm at birth). The maximum number of organisms in each tank was controlled in order to the density was not stressful for gammarids (below 200 juveniles and 100 adults per tank).

Timing of endpoint measurements over generations

In order to assess the direct effects of parental exposure, (i) a feeding assay on F0 males was performed 11 days after the beginning of Cd exposure; (ii) on the 18th day of exposure, females were randomly selected for reproductive endpoints, *i.e.* the moult stage, the number of oocytes (F1 in germ cell stage), the number of embryos and the secondary follicle surface (used as a proxy of yolk reserves); (iii) 20 days after the beginning of exposure, thirty F0 males from each condition were also sampled at precopulatory stage (before the fertilization of exposed gametes), ten of them were used for sperm viability assessment, ten for sperm genotoxicity measurement (comet-assay), and ten for assessing global DNA methylation levels.

In F1 offspring, survival and growth of juveniles were monitored. A feeding assay was conducted after puberty, and several mature organisms were sacrificed (after collecting of F2 neonates) to measure sperm viability, DNA damage, global DNA methylation levels and reproductive endpoints in females. As in F1 offspring, survival and growth of F2 and F3 juveniles were monitored. Puberty progress was evaluated in F2 organisms, but for organizational reasons, sperm viability, global DNA methylation levels and feeding rates were not assessed in males of F2 and F3 generations. Because of the long-term study, the reproductive cycles in F2 and F3 generations were desynchronized between females. Hence, contrary to the random selection at one date for F0 and F1 females, F2 and F3 females were monitored three times a week for measuring reproductive endpoints in C2-D1 females. The mature males in precopulatory pairs with the sacrificed females were then placed in tanks with mature females from a lab breeding stock for stimulating the spermatogenesis until the genotoxicity assessment (comet-assay).

Molecular and physiological measurement procedures

Genome integrity – DNA damage, including single- and double-strand breaks, DNA cross-links, alkali-labile sites and incomplete repair sites in sperm cells was assessed through the alkaline version of comet-assay by adapting the procedure described in *G. fossarum* by Lacaze et al. (2010) with slight modifications. Because of the high number of monitored endpoints in the present study, we chose to only assess the DNA damage in sperm cells, which have been shown to be more sensitive to DNA damage than oocytes (Lacaze et al., 2010). After testis dissection of mature male gammarids (n=10), 80 µL of 0.625% low-melting agarose in PBS (37°C) were mixed with 20 µL of cell suspension collected from one organism. Two 40 µL drops of this mixture were deposited onto an agarose gel-coated slide enabling further DNA damage measurement on 2*50 cells per testis sample.

Epigenetic mark – Global cytosine methylation levels in entire organisms were measured in males following the procedure described in Cribiu et al. (2018).

Feeding assay – The feeding rate of F0 organisms during exposure was assessed according to the procedure described in Coulaud et al. (2011). Twenty uniform-size male gammarids and 20 calibrated leaf discs (20 mm diameter) were enclosed in perforated cylinders (four replicates per condition), placed in the buckets during Cd exposure. After 7 days, leaf discs were collected and numerically scanned to estimate leaf surface consumption. The procedure was slightly modified for F1 male adults (5 months old) to preserve the stock of spawners dedicated to pursuing the experiment. In this case, only 4 uniform-size F1 male gammarids and 4 calibrated leaf discs were placed in a tank of 2L (three replicates per condition). Feeding rate was not evaluated for the F2 and F3 generations.

Survival – Juvenile survival was monitored by regular counting of organisms in each tank. Survival rates of juveniles for each parental exposure condition were estimated by dividing the total number of counted juveniles with the number of originally collected neonates.

Growth – Gammarid juveniles were photographed at least three times at a three-week interval under a binocular light microscope. Then, photographs were analyzed using the SigmaScan® Pro v5.0 software (Systat software). Body size, corresponding to the dorsal length from the start of the prosoma to the end of the metasoma, was measured. Weekly growth rates of individuals were estimated considering the mean body-size at the initial measurement.

Puberty monitoring – Eight weeks after the first juvenile collection of each generation, the organisms of each tank were observed once a week on the light table in order to identify female individuals reaching puberty. The criterion was the presence of newly produced oocytes in ovaries observed thanks to cuticular transparency. Then, mature females were placed in another tank with a similar number of males (without oocytes and largest in size).

In order to determine body-size at puberty, pictures of mature females were analyzed using the SigmaScan® Pro v5.0 software (Systat software). Puberty kinetics curves are expressed in terms of percentage of mature females as a function of time. Percentage of mature females was calculated by dividing the cumulative number of mature females after one week with the total number of collected mature females at the end of puberty monitoring.

Reproductive capacity – The moult stage, the number of oocytes and the number of embryos per female as well as the secondary follicle surface (used as a proxy of yolk reserves) were evaluated as described by Geffard et al. (2010). The number of embryos of D2 females were not taken into account (release of neonates at this stage). For the number of oocytes, corrective factors established from Geffard et al. (2010) were applied to integrate the influence of moult stage (*e.g.* 30% reduction between C1 and C2 stages). Because of the number of oocytes and embryos depend on female body-size, standardization has been performed dividing the total count of oocytes by female body-size and those of embryos by female body-size minus size at puberty (5mm). Regarding the analysis of secondary follicle surface, females without oocytes were discarded from the data set and AB and C1 females were not considered since secondary vitellogenesis is not initiated in these stages. Corrective factors from the study of Geffard et al. (2010) were applied to make surface measurement comparable between females in C2, D1 and D2 moult stage using C2 as reference.

The reproductive capacity of male gammarids was studied through the measurement of sperm viability using the methodology of Lacaze et al. (2010).

Statistical analysis – Statistical procedures were carried out with the R software (version 3.5.1). For quantitative data such as DNA damage, global methylation levels, feeding rate, growth rate of juveniles, body-size at puberty and reproductive capacity endpoints in males and females, a Kruskal-Wallis test (KW) was used followed by a Mann-Whitney test (MW) for paired comparisons. Survival juvenile curve comparisons have been realized in

applying a proportion test at the 7th week (for F1 generation) and 8th week (for F2 and F3 generations) after neonate collection (prop.test). The significance level used for all statistical tests was 0.05.

Population dynamics modelling

We developed a population model to assess the demographic impacts of the life-history trait modifications across generations based on the modelling approach adopted by Coulaud et al. (2014). At this end, a reference life cycle graph of *G. fossarum* (see supplementary data: Figure S 1) was defined to establish a size structured Lefkovitch matrix model (Caswell, 2001) following the formalism adopted by Prud'homme et al. (2017).

The matrix model was parametrized for each condition and each generation. Only females were taken into account and the population was structured in 7 size-classes : embryos (*class 1*), two juvenile classes (*class 2*, individuals with a size up to 2.5 mm and *class 3*, size from 3.5 to 5 mm), and four adult classes (class *4* size from 5 to 6.5 mm, *class 5* size from 6.5 to 8 mm, *class 6* size from 8 to 9,5 mm and *class 7* greater than 9,5 mm) (see supplementary data: Figure S 1). The parametrization was calibrated on a time step of one week and a post-breeding census hypothesis.

From the life cycle graph of *G. fossarum* (see supplementary data: Figure S 1), the following projection matrix **A** was established:

$$A = \begin{pmatrix} P1 & 0 & 0 & F4 & F5 & F6 & F7 \\ G1 & P2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & G2 & P3 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & G3 & P4 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & G4 & P5 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & G5 & P6 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & G6 & P7 \end{pmatrix}$$

where P_i is the proportion of surviving and remaining organisms in size-class *i*, G_i is the proportion of surviving and moving individuals from size-class *i* to size-class *i*+1 and F_i is the fertility, *i.e.* the number of female viable oocytes produced per adult female during a time step.

The first dominant eigenvalue of the matrix **A** corresponds to the asymptotic population growth rate λ, and the right eigenvector **w** associated with λ to the stable structure of the population. P_i and G_i parameters were expressed as described by Caswell (2001) as follows:

$$G_i = \sigma_i \gamma_i$$
$$P_i = \sigma_i (1 - \gamma_i)$$

where σ_i is the probability of survival after a time step in size-class *i* and γ_i is the transition rates, *i.e.* the probability of growth of individuals from size-class *i* to size-class *i*+1 after one week.

The transition rates γ_i which depend on λ were calculated by applying the iterative method proposed by Caswell (2001) according to the following formula:

$$\gamma_i = \frac{(\frac{\sigma_i}{\lambda})^{d_i - 1}}{1 + \left(\frac{\sigma_i}{\lambda}\right) + \left(\frac{\sigma_i}{\lambda}\right)^2 + \cdots + \left(\frac{\sigma_i}{\lambda}\right)^{d_i - 1}}$$

where d_i is the duration of size-class *i*.

Because a post-breeding census was used, and following the hypothesis that fertilization is not limited by male availability and sperm viability in the different conditions, fertility entries of the matrix **A** were calculated from σ_i for adult classes (i = 4, 5, 6, 7), the sex ratio (*sr*), the proportion of reproductive females (rf_i), the average number of oocytes per female (no_i) and the duration of the female reproductive cycle (d_c):

$$F_i = \sigma_i \, (sr \times rf_i \times no_i)/d_c$$

For each projection matrix (each generation in each condition), σ_i (for $i > 1$) were calculated from survival curves established during the experiment and σ_1 (proportion of surviving embryos) corresponds to the ratio between the number of embryos and oocytes. The duration of a size-class *i* (d_i) were computed by reversing logistics growth curves. Regarding the calculation of the fertility F_i, the sex ratio was set at 0.5. Given the experimental temperature of 16°C, the duration of reproductive cycle (d_c) was set at 3 weeks. The proportion of reproductive females was determined from puberty monitoring data. In addition, for F1 and F2 generations, the average number of oocytes per female of each size-class was estimated from reproductive data recorded in the different conditions. Given that these data did not cover the whole population size distribution, an extrapolation of recorded measurements to the different size classes was operated, based on the mean size of each class and a linear relationship established between oocyte number and body size of females. This relationship has been obtained from previous fertility data recorded on the same source population in different studies from our laboratory:

$no = 2.23 \times$ body size

Because the experiment was stopped before F3 puberty, the proportion of reproductive females and oocyte number in F3 generation were not recorded. As a result, they were estimated from F2 control records.

All calculations and algebric computations were conducted with the R software (version 3.5.1).

3 - Results and discussion

In all of this section, control, 0.3 µg Cd/L and 3 µg Cd/L parental exposure conditions were indicated by using the abbreviations C-F0, 0.3Cd-F0 and 3Cd-F0, respectively.

Toxicological effects of Cd exposure in F0 spawners

According to our objective to cause moderate sublethal effects in exposed parents, no influence of exposure was observed on F0 survival whatever the Cd concentration (prop.test, p-value = 0.53). Regarding reproduction endpoints, Cd-exposed females exhibited a disruption of their progress in the reproductive cycle with 40% of females at AB-C1 moult stages compared to control at the end of exposure (Figure 2, A). That confirms the moulting delay reported by Geffard et al. (2010) in *G. fossarum* under similar Cd exposure.

Standardized oocyte number in the females exposed to the highest Cd concentration appeared to be lower than in control, although the difference was not significant (KW, p-value = 0.089) (Figure 2, B). Furthermore, an absence of oogenesis was observed in 10% of exposed F0 females to 0.3 µg Cd/L and in 40% of those exposed to 3 µg Cd/L. Such levels of moulting delay and fecundity reduction are in line with that recorded in *G. fossarum* during previous *in situ* caging studies conducted in metallic field contamination contexts (Lopes et al., *submitted*). No significant difference was observed in feeding rate and mean secondary follicle surfaces per female (KW, p-value = 0.14 and p-value = 0.90, respectively) (see supplementary data: Figure S 2 and Figure S 3). Hence, dietary intake and energy allocation to eggs in females that achieved the onset of vitellogenesis were poorly affected by the exposure. This discards the hypothesis of feeding limitation that could have been advanced to explain the moulting delay and the reduction of oocyte number as already reported in this species (Coulaud et al., 2015). The high percentage of F0 females without oocytes could instead be explained by toxic effects of cadmium on gametogenesis such as a disruption of follicle recruitment or a lethal effect on the provisioned eggs.

Primary DNA damages were significantly higher in sperm of exposed F0 males whatever the Cd concentration compared to control (KW, p-value = 9.2×10^{-4}) with mean tail intensities ranging between 10 to 20% (Figure 2, C). No effect on sperm viability was observed (KW, p-value = 0.46) (see supplementary data: Figure S 4). These levels of primary DNA damages in F0 sperm cells reach the upper range of genotoxicity levels observed in field monitoring studies using caged male *G. fossarum* as a probe of genotoxicity in different French watercourses, including metallic contamination contexts (Lacaze et al., 2011a).

The difference between the global cytosine methylation level of control and Cd exposed gammarids was not significant (KW, p-value = 0.40)

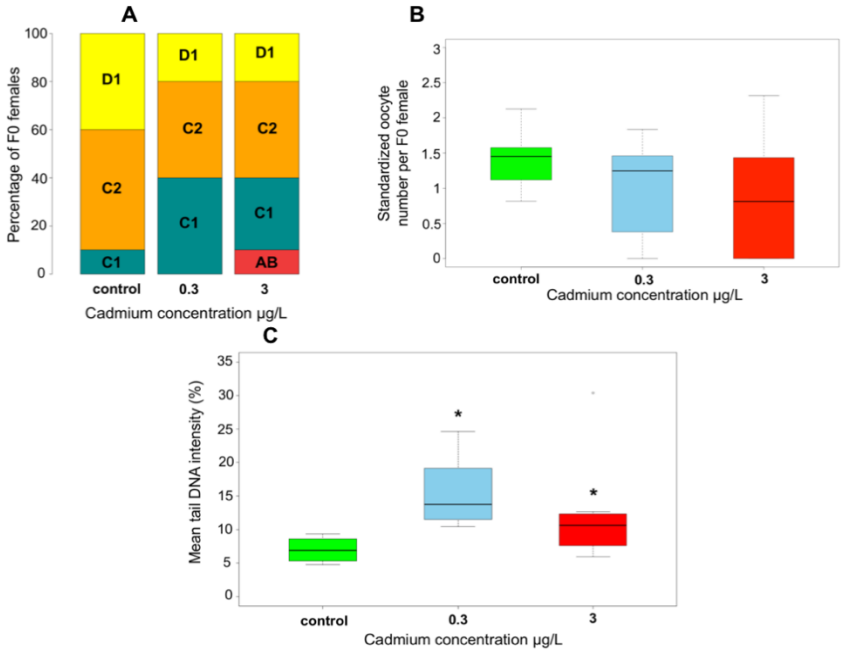


Figure 2 : F0 responses to Cd exposure. (A) Percentage of F0 females in each moult stage, n = 10. (B) Standardized oocyte number per F0 female, n = 10 (C) Mean tail DNA intensity (comet assay) in sperm of F0 males, control: n = 9, 0.3 µg Cd /L: n=8, 3 µg Cd /L: n=8.

(see supplementary data: Figure S 5). This is consistent with our previous results showing a fluctuating trend of this marker at similar Cd concentrations, with a hypomethylation after 14 days of exposure followed by a weak hypermethylation after one month (Cribiu et al., 2018).

Overall, the exposure of F0 spawners mainly caused reproductive disorders of male and female gametogenesis at similar levels to toxic effects recorded in contaminated aquatic environments. In addition, these impairments appeared to be unlikely related to energy allocation disruptions.

Cascading effects on F1, F2 reproductive features and F3 growth ability

Survival profiles of F1 juveniles from 3Cd-F0 were similar to control (prop.test, p-value = 0.99). By contrast, survival of F1 juveniles from 0.3Cd-F0 appeared to be significantly lower than in control (prop.test, p-value = 9.5×10^{-3}), but this 11% decrease is negligible in regard to juvenile survival variability in natural populations (Coulaud et al., 2014) (see supplementary data: Figure S 6). No difference in growth rates was detected in F1 from birth to adult stage between control and F0-exposed conditions (KW, p-value = 0.44) (see supplementary data: Figure S 7). In line with the conclusion that egg investment was not altered in F0 females, these results also reinforce the study of Lacaze et al. (2011b) who showed that primary DNA damages below a threshold of 20% tail DNA intensity in spermatozoa did not lead to an embryonic development impairment in *G. fossarum*. Our finding contrasts with the delayed effects observed in other species, for instance on the hatching success in F1 generation of the freshwater gastropod *Physa pomilia* after F0 exposure to 2.5 µg Cd/L and 10 µg Cd/L (Kimberly and Salice, 2014).

At the adult stage, a significant decrease in brood size of F1 females from 3Cd-F0 was observed (p-value = 1.8×10^{-3}) (Figure 3, A). Moreover, F1 females without any embryo in marsupium were only observed in cadmium exposed conditions (29% for 0.3 µg Cd/L and 12.5% for 3 µg Cd/L). However, parental exposure had not significant effect on both oocyte number, nor on secondary mean follicle surface in F1 females (KW, p-value = 0.34 and p-value = 0.59, respectively) (see supplementary data: Figure S 8 and Figure S 9). Given those results, brood size reduction can be explained by a disruption of laying, fertilization or early embryo development phases. By contrast with the present study, the reproductive capacity of F1 adult offspring in Japanese medaka *Oryzias latipes* was not affected by parental gametogenesis (F0) exposure to

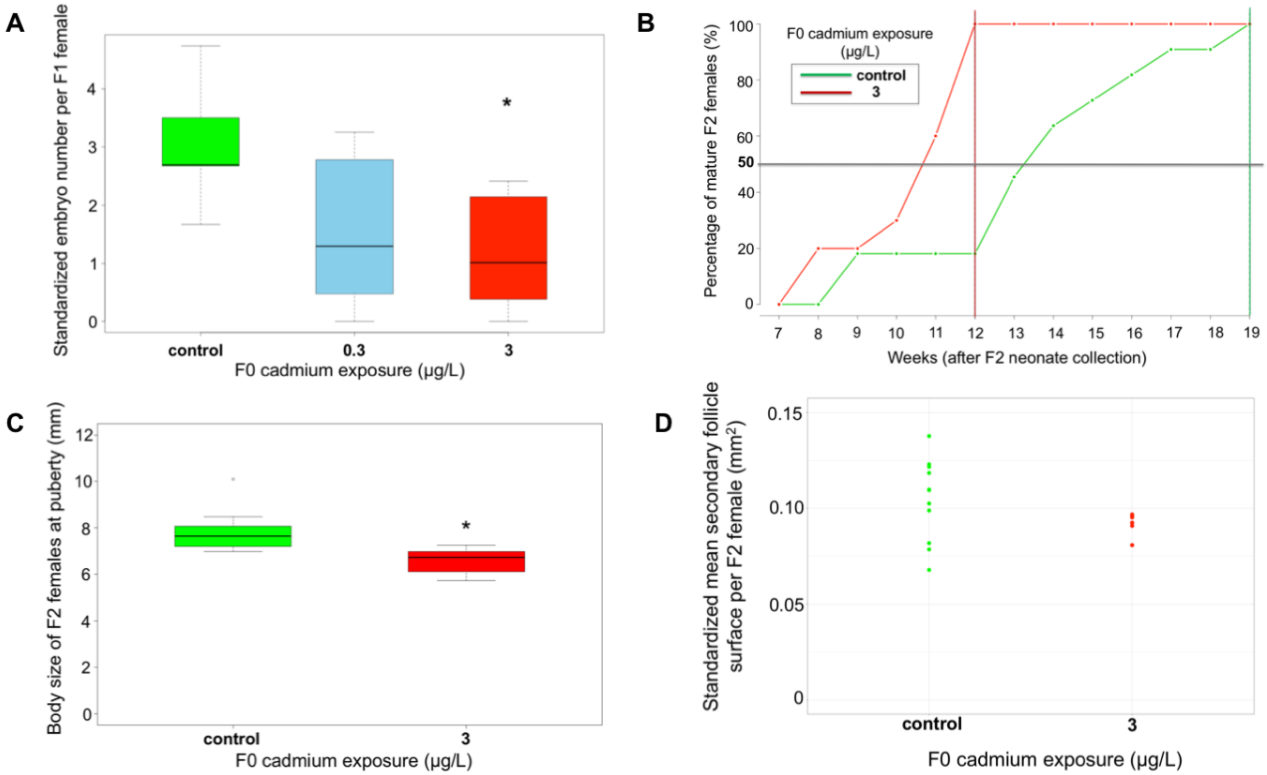


Figure 3 : Effects of F0 exposure on F1 and F2 reproductive capacity. (A) Standardized embryo number per F1 female, control: n = 9, 0.3 µg Cd /L: n=7, 3 µg Cd /L: n=8. (B) Percentage of F2 mature females (cumulative number of mature females / total female number). Total female number= 11 (control) and 10 (3 µg Cd /L). (C) Body size of F2 female at puberty (mm), control: n=11, 3 µg Cd /L: n=10. (D) Standardized mean secondary follicle surface per F2 female, control: n = 11, 3 µg Cd /L: n=7. Star denotes a significant difference compared to the control condition, $p<0.05$.

Cd concentrations of 1, 5 and 10 µg/L (Foran et al., 2002). In the same way, Guan and Wang (2006) showed that exposed F2 adult *Daphnia magna*, corresponding to F1 in the present study, during parental gametogenesis was not impacted by parental Cd exposure.

Parental exposure had no significant impact on the feeding rate of F1 males (KW, p-value = 0.43) (see supplementary data: Figure S 10), nor on sperm viability and primary DNA damages in sperm cells (KW, p-value = 0.50 and p-value = 0.088, respectively) (see supplementary data: Figure S 11 and Figure S 12). No difference in global cytosine methylation levels was observed between F1 from control and F1 from exposed conditions (0.3Cd-F0 and 3Cd-F0), but a significant increase was detected in F1 from 3Cd-F0 compared to F1 from 0.3Cd-F0 (KW, p-value = 0.021) (see supplementary data: Figure S 13).

Overall, the main effect of parental Cd exposure on F1 is a decrease in embryo production. Different mechanistic hypotheses could be put forward to explain such a reproductive impairment in F1 generation. First of all, our exposure design does not exclude the possibility of a direct deleterious impact of Cd on the early development of F1 organisms due to a potential Cd transfer from F0 mothers to their eggs (Cazan and Klerks, 2014 ; Reátegui-Zirena et al., 2017). The reproductive alteration in F1 could also stem from the delayed consequence of genome integrity impairment in F0 germ cells as recorded in sperm cells by the comet assay (Figure 2, C). Indeed, given the absence of a significant effect of exposure on F0 sperm viability, a possible consequences in offspring due to genotoxic impacts observed in F0 can be suggested, assuming that fertilization success was not affected as observed in similar Cd concentrations in invertebrates (Au et al., 2001 ; Hudspith et al., 2017) and in fish (Driessnack et al., 2016 ; Sellin et al., 2007). In addition, a lack of DNA machinery repair in crustacean sperm cells has been suggested in different studies (Erraud et al., 2019 ; Lacaze et al., 2010) and genotoxic effects of Cd on DNA machinery repair has been recorded (Hartwig, 1998 ; Emmanouil et al., 2007 ; Meng et al., 2017).

Since F1 reproductive alterations were important on 3Cd-F0 condition and the number of F2 and F3 organisms produced after F0 exposure at 0.3 µg Cd/L was substantially lower than those in C-F0 and 3Cd-F0 conditions, experimental effort focused on these two latter conditions to analyse the delayed consequences of F0 exposure up to F3 generation.

No significant difference was recorded in F2 survival rates at the 8th week after neonate collection between conditions (prop.test, p-value = 0.17) (see supplementary data: Figure S 14). However, a significant decrease in survival rates of F2 juveniles from 3Cd-F0 was observed at the 2nd week after neonate collection (prop.test, p-value = 2×10^{-3}). As in F1, no difference in growth rates was detected in F2 from birth to adult stage between control and F0-exposed conditions (MW, p-value =0.31) (see supplementary data: Figure S 15). In F2 organisms of the contaminated condition, median time to reach puberty was strongly shortened as much as 3 weeks earlier than in organisms from the control condition (Figure 3, B). When all of the monitored females were mature in each condition, the lag between C-F0 and 3Cd-F0 reached 7 weeks (Figure 3, B). Consistently, the body-size at puberty was found significantly lower than in control (MW, p-value = 1.7×10^{-4}) (Figure 3, C). Most of studies assessing the onset of puberty in successive generations after an ancestral exposure focus on rodents. For instance, accelerated pubertal development in female rats in F3 generations (corresponding to F2 offspring in our study) stemming from a F0 exposed to atrazine (McBirney et al., 2017) or to dioxins (Manikkam et al., 2012). In the same way, Rattan et al., 2018 showed that Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) exposure of F0 accelerated the onset of puberty along three generations in mice, thereby including the generation which corresponds to F2 offspring in the present study. By contrast, few studies have explored such shifts in invertebrates. For example, a delay in the emergence of males by about two weeks in F0 generation and non-exposed F1 generation was recorded in the marine mollusc *Crepidula onyx* after a 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl (BDE-47) parental exposure (Po and Chiu, 2018). Endocrine changes could be involved in the early puberty, but this deserves more extensive molecular studies. Indeed, Cd has been identified as a possible endocrine disruptor in *Gammarus fossarum* (Trapp et al., 2015). Furthermore, Leblanc et al. (2013) have shown transgenerational transmission of hormonal changes in *Daphnia pulex*, which cause substantial modifications in sex-ratio and brood size in subsequent generations of exposed females to pyriproxyfen.

Changes in secondary follicular size distribution were observed with mean secondary follicle surface above of 0.11 mm^2 in two-thirds of F2 females from 3Cd-F0, but in no F2 females from C-F0. However, the difference between the two conditions was not significant, probably due to low sample numbers (MW, p-value = 0.10) (Figure 3, D). No significant effects in oocyte and embryo number per F2 female were recorded (MW, p-value = 0.86 and p-value = 0.53, respectively) (see supplementary data: Figure S 16 and Figure S 17, respectively). Nevertheless, as F1 generation, F2 females without embryo were only observed in F0 Cd exposure condition (29% in 3 µg/L Cd exposure). In addition, F2 males exhibited primary DNA damages significantly higher than those in control condition (MW, p-value = 2.3×10^{-3}), although they remained to a very low level (<5 %) considering reference levels

defined in this species (Lacaze et al., 2011a) (see supplementary data: Figure S 18). Overall, F0 Cd exposure brought on a decrease in survival rate of F2 two-week-old juveniles, an earlier puberty, and an increase in egg abortion rates in F2 spawners. However, despite egg abortion rates in F2 spawners, mean F2 fertility was restored compared to F1 generation.

Subsequently, in contrast with F1 and F2 generations, F3 juveniles from Cd exposed F0 showed a sharp lower growth rate than control (MW, p-value = 0.021) (Figure 4 B) along with no significant difference in survival (survival rate of 100% until the 8th week after F3 neonate collection). The body-size of F3 organisms right before the puberty onset (8th week after F3 neonate collection) was affected by their great-grand-parent Cd exposure (MW, p-value = 1.9×10^{-3}) (Figure 4, A). Hence, shifts in energy allocation (*i.e.* earlier puberty and reduction of yolk reserve) observed in F2 organisms which originated from reduced F1 broods, translates in a lower growth ability of F3 offspring. Cross generation trade-offs were previously shown in *Gammarus* (Maltby and Naylor, 1990), in *Daphnia* (Minguez et al., 2015) and in the oyster *Saccostrea glomerate* (Scanes et al., 2018), where a decrease in the amount of energy allocated to eggs due to direct exposure to contaminant lead to smaller offspring.

Mitigation of demographic impact along generations

In F1, F2 and F3 generations, population dynamics models for the control condition resulted in weekly asymptotic population growth rates of 1.09, 1.07 and 1.07, respectively (Figure 5).

In addition, for each generation, the population stable structure in control has a pyramid shape, with most individuals in juvenile classes (Figure 5) as observed in previous gammarid population studies (Coulaud et al., 2014). These results indicate that lab rearing conditions allowed to properly maintain control populations in a steady state over the one-year experiment period.

Life-history trait changes in F1 generation induced 11% and 6% decrease in weekly asymptotic population growth rate compared to control, for the 0.3 µg Cd/L and 3 µg Cd/L conditions, respectively (Figure 5). The stable structure in F1 appeared to be also impacted by parental exposure (Figure 5). By contrast, in F2 and F3 populations stemming from 3Cd-F0 condition, the asymptotic population growth rates were close to control conditions and the population stable structures were restored as shown by the high percentages of individuals in juvenile classes (Figure 5). Hence, the restored fertility in F2 compared to F1, the early puberty in F2, and the decrease in size at puberty in F2 offspring supported a mitigation trend of demographic impact along generations. The reduced growth ability of F3 organisms did not seem to affect the population dynamics, even if this result has to be treated with caution since fertility rate parametrisation was based on F2 data. Such mitigation of adverse demographic effects was suggested in *Paronychiurus kimi* populations exposed to paraquat (Choi et al., 2008) or *Plectus acuminatus* populations exposed to pentachlorophenol (Kammenga et al., 1997). Prud'homme et al. (2017) showed in the mosquito that offspring life-history trait changes induced by ancestral exposure to ibuprofen or benzo[a]pyrene led to negligible population consequences due to compensation between increased mortality, accelerated developmental and female-biased sex ratio within offspring generation. In our study, compensatory processes involving trade-offs between life-history traits of successive generations (*e.g.* reduced F1 fertility *vs* greater puberty investment in F2) allowed to mitigate the demographic impact of F0 Cd exposure.

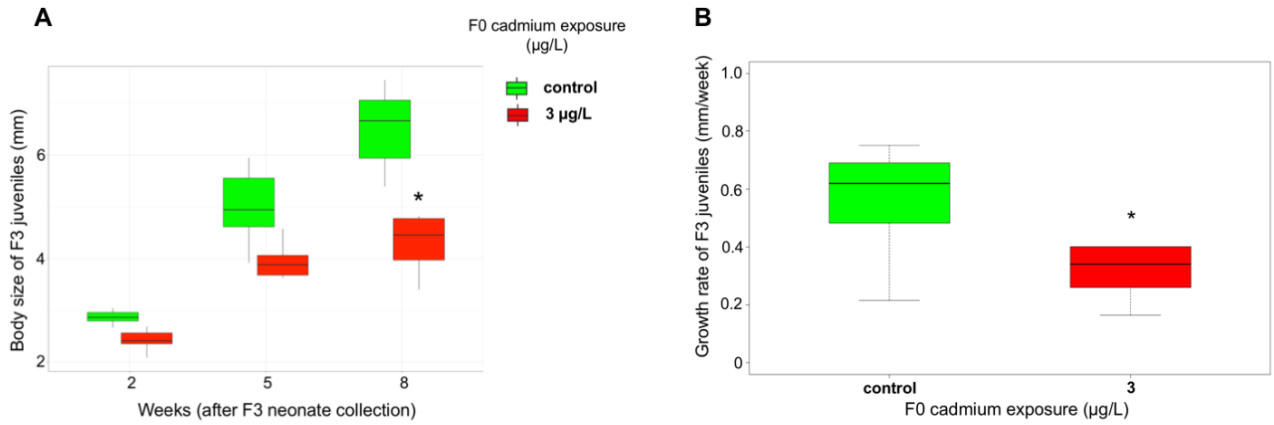


Figure 4 : Effects of F0 exposure on F3 juveniles. (A) Body size of F3 juveniles (mm), n=10. (B) Growth rate of F3 juveniles (mm/week), n = 10. Star denotes a significant difference compared to the control condition, p<0.05.

Even though compensatory population processes triggered mitigation of impact of F0 exposure, they have also deeply modified the life-history of the population, particularly with a severe reduction of F3 organism sizes. Interestingly, a field *G. fossarum* population historically exposed to Cd, in which transgenerational processes were shown to be involved in the development of Cd tolerance, was characterized by a lower mean body size of adult organisms compared to reference populations (Vigneron et al., 2015, 2019). Such shifts in body-size distribution of populations can have important consequences on aquatic ecosystem functioning, for instance in organic matter recycling by controlling detritus feeder activity of macroinvertebrates (Forrow and Maltby, 2000; Kelly et al., 2002) or in trophic chain alteration by modifying the availability of biomass for aquatic predators (Macneil et al., 1997).

Conclusion

In conclusion, despite the shortness of F0 exposure to environmental Cd concentrations and the absence of visible F1 impairments until the adult stage, important cascading effects on life-history, which were likely explained by energy allocation and demographic strategies of the species, were highlighted along the three generations. These findings notably highlight the need for considering successive generations and environmentally relevant species with diversified life-history strategies in ecotoxicological assessment in order to improve predictive approaches in the ecological risk assessment framework. Furthermore, the contrast between the severe modifications of life-history traits and the weak demographic alterations in F2 and F3 generations led us to highlight the role of compensatory population processes which might shape the long-term responses of populations to environmental toxicity.

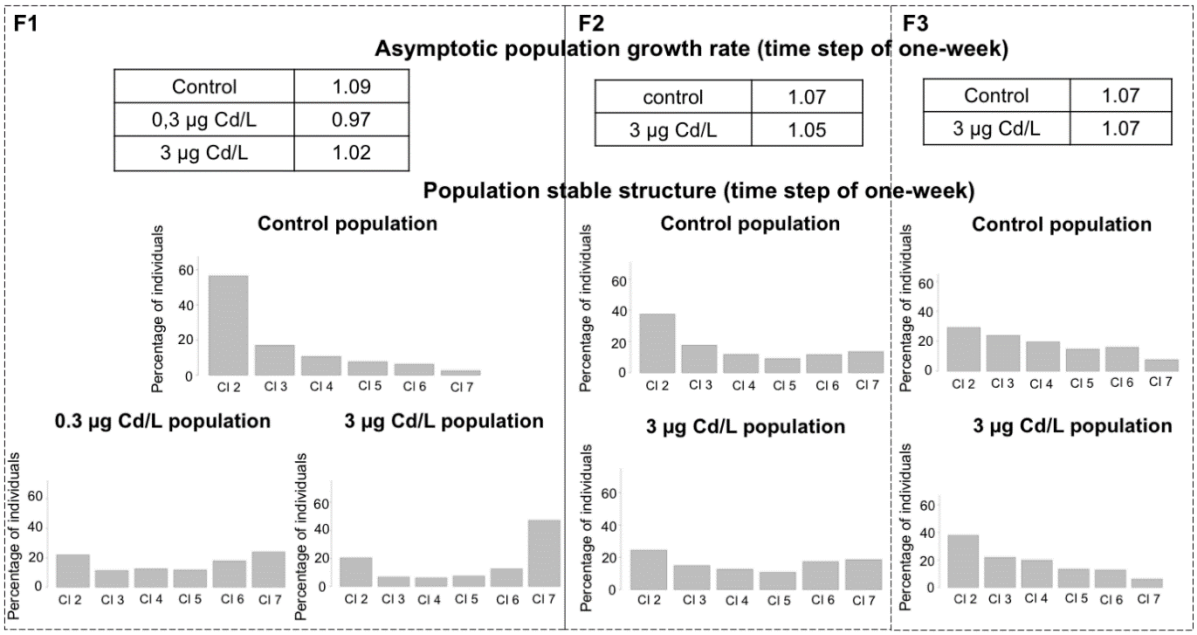


Figure 5 : Effects of F0 exposure on population growth rates and population stable structure of F1, F2 and F3 populations (time step of one-week). Cl = class. Class 1 (embryos class) is not shown because embryos are not involved in population structure.

References

-Alfonso, S., Blanc, M., Joassard, L., Keiter, S.H., Munschy, C., Loizeau, V., Bégout, M.-L., and Cousin, X. (2019). Examining multi- and transgenerational behavioral and molecular alterations resulting from parental exposure to an environmental PCB and PBDE mixture. Aquat. Toxicol. 208, 29–38.

-Alric, B., Geffard, O., Chandesris, A., Ferréol, M., François, A., Perceval, O., Piffady, J., Villeneuve, B., and Chaumot, A. (2019). Multisubstance Indicators Based on Caged Gammarus Bioaccumulation Reveal the Influence of Chemical Contamination on Stream Macroinvertebrate Abundances across France. Environ. Sci. Technol. 53, 5906–5915.

-Au, D.W.T., Lee, C.Y., Chan, K.L., and Wu, R.S.S. (2001). Reproductive impairment of sea urchins upon chronic exposure to cadmium. Part I: Effects on gamete quality. Environ. Pollut. 9.

-Baker, T.R., Peterson, R.E., and Heideman, W. (2014). Using Zebrafish as a Model System for Studying the Transgenerational Effects of Dioxin. Toxicol. Sci. 138, 403–411.

-Beckerman, A., Benton, T.G., Ranta, E., Kaitala, V., and Lundberg, P. (2002). Population dynamic consequences of delayed life-history effects. Trends Ecol. Evol. 17, 263–269.

-Biron, P.-A., Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Charles, S., and Billoir, E. (2012). Population-Level Modeling to Account for Multigenerational Effects of Uranium in Daphnia magna. Environ. Sci. Technol. 46, 1136–1143.

-Campiche, S., L'Ambert, G., Tarradellas, J., and Becker-van Slooten, K. (2007). Multigeneration effects of insect growth regulators on the springtail Folsomia candida. Ecotoxicol. Environ. Saf. 67, 180–189.

-Castro, B.B., Freches, A.R., Rodrigues, M., Nunes, B., and Antunes, S.C. (2018). Transgenerational Effects of Toxicants: An Extension of the Daphnia 21-day Chronic Assay? Arch. Environ. Contam. Toxicol. 74, 616–626.

-Caswell, H. (2001). Matrix population models: Construction, Analysis and Interpretation. Second ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

-Cazan, A.M., and Klerks, P.L. (2014). Evidence of maternal copper and cadmium transfer in two live-bearing fish species. Ecotoxicology 23, 1774–1783.

-Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., Maltby, L. (2015). Gammarids as reference species for freshwater monitoring. In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. (Eds.), Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks. Academic Press, pp. 253–280.

-Chaumot, A., Coulaud, R., Adam, O., Quéau, H., Lopes, C., Geffard, O. (2019). *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 1- gauging the confounding influence of temperature and water hardness. Submitted article.

-Choi, W.I., Neher, D.A., and Ryoo, M.I. (2008). Life-history trade-offs of *Paronychiurus kimi* (Lee) (Collembola: Onychiuridae) populations exposed to paraquat. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69, 227–232.

-Ciliberti, A., Chaumot, A., Recoura-Massaquant, R., Chandesris, A., François, A., Coquery, M., Ferréol, M., and Geffard, O. (2017). Caged *Gammarus* as biomonitors identifying thresholds of toxic metal bioavailability that affect gammarid densities at the French national scale. Water Res. 118, 131–140.

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

-Coulaud, R. (2012). Modélisation et changement d'échelles pour l'évaluation écotoxicologique : Application à deux macroinvertébrés aquatiques, *Gammarus fossarum* (crustacé amphipode) et *Potamopyrgus antipodarum* (mollusque gastéropode).

-Coulaud, R., Geffard, O., Coquillat, A., Quéau, H., Charles, S., and Chaumot, A. (2014). Ecological Modeling for the Extrapolation of Ecotoxicological Effects Measured during *in Situ* Assays in *Gammarus*. Environ. Sci. Technol. 48, 6428–6436.

-Coulaud, R., Geffard, O., Vigneron, A., Quéau, H., François, A., and Chaumot, A. (2015). Linking feeding inhibition with reproductive impairment in Gammarus confirms the ecological relevance of feeding assays in environmental monitoring: Ecological relevance of feeding assay in Gammarus. Environ. Toxicol. Chem. 34, 1031–1038.

-Corrales, J., Thornton, C., White, M., and Willett, K.L. (2014). Multigenerational effects of benzo[a]pyrene exposure on survival and developmental deformities in zebrafish larvae. Aquat. Toxicol. 148, 16–26.

-Coutellec, M.-A., and Barata, C. (2013). Special issue on long-term ecotoxicological effects: an introduction. Ecotoxicology 22, 763–766.

-Cribiu, P., Chaumot, A., Geffard, O., Ravant, J.-L., Bastide, T., Delorme, N., Quéau, H., Caillat, S., Devaux, A., Bony, S. (2018). Natural variability and modulation by environmental stressors of global genomic cytosine methylation levels in a freshwater crustacean, Gammarus fossarum. Aquatic toxicology. 205, 11-18.

-De Liguoro, M., Maraj, S., and Merlanti, R. (2019). Transgenerational toxicity of flumequine over four generations of Daphnia magna. Ecotoxicol. Environ. Saf. 169, 814–821.

-Driessnack, M.K., Matthews, A.L., Raine, J.C., and Niyogi, S. (2016). Interactive effects of chronic waterborne copper and cadmium exposure on tissue-specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 179, 165–173.

-Emmanouil, C., Sheehan, T., and Chipman, J. (2007). Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (*Mytilus edulis L.)* gill following exposure to Cd and Cr (VI). Aquat. Toxicol. 82, 27–35.

-Erraud, A., Bonnard, M., Geffard, O., Coulaud, R., Poret, A., Duflot, A., Forget-Leray, J., Geffard, A., and Xuereb, B.

(2019). Signification of DNA integrity in sperm of Palaemon serratus (Pennant 1777): Kinetic responses and reproduction impairment. Mar. Environ. Res. 144, 130–140.

-Foran, C.M., Peterson, B.N., and Benson, W.H. (2002). Influence of parental and developmental cadmium exposure on endocrine and reproductive function in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 133, 345–354.

-Forrow, D.M., and Maltby, L. (2000). Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. Environ. Toxicol. Chem. *19*, 2100–2106.

-Gaillard, J.-M., and Yoccoz, N.G. (2003). Temporal variation in survival of mammals: A case of environment canalization? Ecology 84, 3294–3306.

-Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., and Charmantier-Daures, M. (2010). Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. Environ. Toxicol. Chem. 29, 2249–2259.

-Gouveia, D., Chaumot, A., Charnot, A., Queau, H., Armengaud, J., Almunia, C., Salvador, A., and Geffard, O. (2017). Assessing the relevance of a multiplexed methodology for proteomic biomarker measurement in the invertebrate species *Gammarus fossarum*: A physiological and ecotoxicological study. Aquat. Toxicol. 190, 199–209.

-Guan, R., and Wang, W.-X. (2006). Comparison between two clones of Daphnia magna: Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics. Aquat. Toxicol. 76, 217–229.

-Guo, L., Desneux, N., Sonoda, S., Liang, P., Han, P., and Gao, X.-W. (2013). Sublethal and transgenerational effects of chlorantraniliprole on biological traits of the diamondback moth, Plutella xylostella L. Crop Prot. 48, 29–34.

-Hammers-Wirtz, M., and Ratte, H.T. (2000). Offspring fitness in *Daphnia*: Is the *Daphnia* reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level? Environ. Toxicol. Chem. 19, 1856–1866.

-Hartwig, A. (1998). Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. Toxicol. Lett. 102–103, 235–239.

-Hudspith, M., Reichelt-Brushett, A., and Harrison, P.L. (2017). Factors affecting the toxicity of trace metals to fertilization success in broadcast spawning marine invertebrates: A review. Aquat. Toxicol. 184, 1–13.

-Kammenga, J.E., Van Koert, P.H.G., Koeman, J.H., and Bakker, J. (1997). Fitness consequences of toxic stress evaluated within the context of phenotypic plasticity. Ecol. Appl. 7, 726–734.

-Kelly, D.W., Dick, J.T.A., and Montgomery, W.I. (2002). The functional role of *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? Hydrobiologia. 485, 199-203.

-Kim, S.W., Kwak, J.I., and An, Y.-J. (2013). Multigenerational Study of Gold Nanoparticles in Caenorhabditis elegans: Transgenerational Effect of Maternal Exposure. Environ. Sci. Technol. 47, 5393–5399.

-Kimberly, D.A., and Salice, C.J. (2014). If you could turn back time: Understanding transgenerational latent effects of developmental exposure to contaminants. Environ. Pollut. 184, 419–425.

-Kimberly, D.A., and Salice, C.J. (2015). Multigenerational contaminant exposures produce non-monotonic, transgenerational responses in Daphnia magna. Environ. Pollut. 207, 176–182.

-Knecht, A.L., Truong, L., Marvel, S.W., Reif, D.M., Garcia, A., Lu, C., Simonich, M.T., Teeguarden, J.G., and Tanguay, R.L. (2017). Transgenerational inheritance of neurobehavioral and physiological deficits from developmental exposure to benzo[a]pyrene in zebrafish. Toxicol. Appl. Pharmacol. 329, 148–157.

-Kunz, P.Y., Kienle, C., and Gerhardt, A. (2010). *Gammarus spp*. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests. In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 205, D.M. Whitacre, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 1–76.

-Lacaze, E., Geffard, O., Bony, S., and Devaux, A. (2010). Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 700, 32–38.

-Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., and Geffard, O. (2011a). DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. Environ. Pollut. 159, 1682–1691.

-Lacaze, E., Geffard, O., Goyet, D., Bony, S., and Devaux, A. (2011b). Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. Environ. Res. 111, 626–634.

-LeBlanc, G.A., Wang, Y.H., Holmes, C.N., Kwon, G., and Medlock, E.K. (2013). A Transgenerational Endocrine Signaling Pathway in Crustacea. PLoS ONE 8, e61715.

-Lombó, M., Fernández-Díez, C., González-Rojo, S., Navarro, C., Robles, V., and Herráez, M.P. (2015). Transgenerational inheritance of heart disorders caused by paternal bisphenol A exposure. Environ. Pollut. 206, 667–678.

-Lopes, C., Chaumot, A., Xuereb, B., Coulaud, R., Jubeaux, G., Quéau, H., François, A., Geffard, O. (2019). *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (crustacea): Part 2 – evaluating the relevance of using a molt cycle temperature – dependent model as reference to assess toxicity in freshwater monitoring. Submitted article.

-Macneil, C., Dick, J.T.A., and Elwood, R.W. (1997). The trophic exology of freshwater *Gammarus spp.* (crustacea, amphipoda): Problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. Biol. Rev. 72, 349-364.

-Maltby, L., and Naylor, C. (1990). Preliminary Observations on the Ecological Relevance of the *Gammarus* 'Scope for Growth' Assay: Effect of Zinc on Reproduction. Funct. Ecol. 4, 393.

-Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., and Skinner, M.K. (2012). Dioxin (TCDD) Induces Epigenetic Transgenerational Inheritance of Adult Onset Disease and Sperm Epimutations. PLoS ONE 7, e46249.

-McBirney, M., King, S.E., Pappalardo, M., Houser, E., Unkefer, M., Nilsson, E., Sadler-Riggleman, I., Beck, D., Winchester, P., and Skinner, M.K. (2017). Atrazine induced epigenetic transgenerational inheritance of disease, lean phenotype and sperm epimutation pathology biomarkers. PLOS ONE 12, e0184306.

-McKenney, C.L. (2005). The Influence of Insect Juvenile Hormone Agonists on Metamorphosis and Reproduction in Estuarine Crustaceans. Integr. Comp. Biol. 45, 97–105.

-Meng, J., Wang, W., Li, L., Yin, Q., and Zhang, G. (2017). Cadmium effects on DNA and protein metabolism in oyster (*Crassostrea gigas*) revealed by proteomic analyses. Sci. Rep. 7.

-Minguez, L., Ballandonne, C., Rakotomalala, C., Dubreule, C., Kientz-Bouchart, V., and Halm-Lemeille, M.-P. (2015). Transgenerational Effects of Two Antidepressants (Sertraline and Venlafaxine) on *Daphnia magna* Life History Traits. Environ. Sci. Technol. 49, 1148–1155.

-Norouzitallab, P., Baruah, K., Vandegehuchte, M., Van Stappen, G., Catania, F., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Sorgeloos, P., and Bossier, P. (2014). Environmental heat stress induces epigenetic transgenerational inheritance of robustness in parthenogenetic Artemia model. FASEB J. 28, 3552–3563.

-Norouzitallab, P., Biswas, P., Baruah, K., and Bossier, P. (2015). Multigenerational immune priming in an invertebrate parthenogenetic Artemia to a pathogenic Vibrio campbellii. Fish Shellfish Immunol. 42, 426–429.

-Norouzitallab, P., Baruah, K., Vanrompay, D., and Bossier, P. (2019). Can epigenetics translate environmental cues into phenotypes? Sci. Total Environ. 647, 1281–1293.

-O'Connor, C.M., Cooke, S.J. (2015). Ecological carryover effects complicate conservation. Ambio. 44, 582-591.

-Olsvik, P.A., Whatmore, P., Penglase, S.J., Skjærven, K.H., Anglès d'Auriac, M., and Ellingsen, S. (2019). Associations Between Behavioral Effects of Bisphenol A and DNA Methylation in Zebrafish Embryos. Front. Genet. 10.

-Pakyari, H., and Enkegaard, A. (2015). Sublethal and Transgenerational Effects of Abamectin on the Biological Performance of the Predatory Thrips Scolothrips longicornis (Thysanoptera: Thripidae). J. Econ. Entomol. 108, 559–565.

-Parrott, J.L., Bjerregaard, P., Brugger, K.E., Gray, L.E., Iguchi, T., Kadlec, S.M., Weltje, L., and Wheeler, J.R. (2017). Uncertainties in biological responses that influence hazard and risk approaches to the regulation of endocrine active substances: Uncertainties in Biological Responses. Integr. Environ. Assess. Manag. 13, 293–301.

-Piiroinen, S., Boman, S., Lyytinen, A., Mappes, J., and Lindström, L. (2014). Sublethal effects of deltamethrin exposure of parental generations on physiological traits and overwintering in Leptinotarsa decemlineata. J. Appl. Entomol. 138, 149–158.

-Plautz, S.C., and Salice, C.J. (2013). Plasticity in offspring contaminant tolerance traits: developmental cadmium exposure trumps parental effects. Ecotoxicology 22, 847–853.

-Po, B.H.K., and Chiu, J.M.Y. (2018). Transgenerational impairments of reproduction and development of the marine invertebrate *Crepidula onyx* resulted from long-term dietary exposure of 2,2′,4,4′-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47). Environ. Pollut. 235, 730–738.

-Prud'homme, S.M., Chaumot, A., Cassar, E., David, J.-P., and Reynaud, S. (2017). Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito Aedes aegypti: On the relevance of transgenerational studies. Environ. Pollut. 220, 242–254.

-Raimondo, S., Hemmer, B.L., Goodman, L.R., and Cripe, G.M. (2009). Multigenerational exposure of the estuarine sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) to 17ß-Estradiol. II. Population-level effects through two life cycles. Environ. Toxicol. Chem. 28, 2409.

-Rattan, S. Brehm, E., Gao, L., Flaws, A. (2018). Di(2-ethylhexyl) phthalate exposure during prenatal development causes adverse transgenerational effects on female fertility in mice. Toxicol. Sci. 163, 420-429.

-Reátegui-Zirena, E.G., Fidder, B.N., Olson, A.D., Dawson, D.E., Bilbo, T.R., and Salice, C.J. (2017). Transgenerational endpoints provide increased sensitivity and insight into multigenerational responses of *Lymnaea stagnalis* exposed to cadmium. Environ. Pollut. 224, 572–580.

-Sarapultseva, E.I., and Dubrova, Y.E. (2016). The long-term effects of acute exposure to ionising radiation on survival and fertility in Daphnia magna. Environ. Res. 150, 138–143.

-Scanes, E., Parker, L.M., O'Connor, W.A., Gibbs, M.C., and Ross, P.M. (2018). Copper and ocean acidification interact to lower maternal investment, but have little effect on adult physiology of the Sydney rock oyster Saccostrea glomerata. Aquat. Toxicol. 203, 51–60.

-Sellin, M.K., Eidem, T.M., and Kolok, A.S. (2007). Cadmium Exposures in Fathead Minnows: Are There Sex-Specific Differences in Mortality, Reproductive Success, and Cd Accumulation? Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52, 535–540.

-Trapp, J., Armengaud, J., Pible, O., Gaillard, J.-C., Abbaci, K., Habtoul, Y., Chaumot, A., and Geffard, O. (2015). Proteomic Investigation of Male *Gammarus fossarum*, a Freshwater Crustacean, in Response to Endocrine Disruptors. J. Proteome Res. 14, 292–303.

-Trijau, M., Asselman, J., Armant, O., Adam-Guillermin, C., De Schamphelaere, K.A.C., and Alonzo, F. (2018). Transgenerational DNA Methylation Changes in Daphnia magna Exposed to Chronic γ Irradiation. Environ. Sci. Technol. 52, 4331–4339.

-Vigneron, A., Geffard, O., Coquery, M., François, A., Quéau, H., and Chaumot, A. (2015). Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a Gammarus fossarum population inhabiting a low-level contaminated stream. Ecotoxicology 24, 1239–1249.

-Vigneron, A., Geffard, O., Quéau, H., François, A., and Chaumot, A. (2019). Nongenetic inheritance of increased Cd tolerance in a field Gammarus fossarum population: Parental exposure steers offspring sensitivity. Aquat. Toxicol. 209, 91–98.

-Villellas, J., Doak, D.F., García, M.B., Morris, W.F. (2015). Demographic compensation among populations: What is it, how does it arise and what are its implication? Ecology letters. 18, 1139-1152.

-Wang, M., Nie, Y., Liu, Y., Dai, H., Wang, J., Si, B., Yang, Z., Cheng, L., Liu, Y., Chen, S., et al. (2019). Transgenerational effects of diesel particulate matter on Caenorhabditis elegans through maternal and multigenerational exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 170, 635–643.

-Yu, Z., Chen, X., Zhang, J., Wang, R., and Yin, D. (2013). Transgenerational effects of heavy metals on L3 larva of Caenorhabditis elegans with greater behavior and growth inhibitions in the progeny. Ecotoxicol. Environ. Saf. 88, 178–184.

-Zheng, J.-L., Guo, S.-N., Yuan, S.-S., Xia, H., Zhu, Q.-L., and Lv, Z.-M. (2017). Preheating mitigates cadmium toxicity in zebrafish livers: Evidence from promoter demethylation, gene transcription to biochemical levels. Aquat. Toxicol. 190, 104–111.

Supplementary data

FIGURE S1

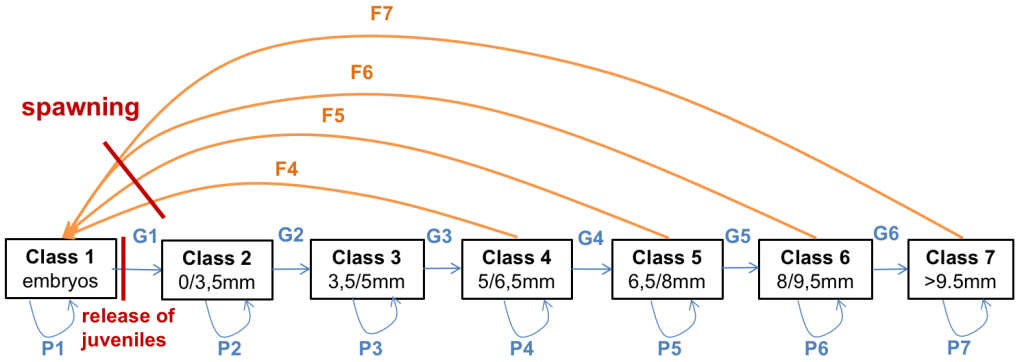


Figure S 1 : Life cycle graph of Gammarus fossarum lab population with 7 size-classes, used for modelling dynamics population. P_i = proportion of surviving and remaining organisms in size-class i, G_i = proportion of surviving and moving individuals from size-class i to size-class i+1, F_i = fertility in size-class i.

FIGURE S2

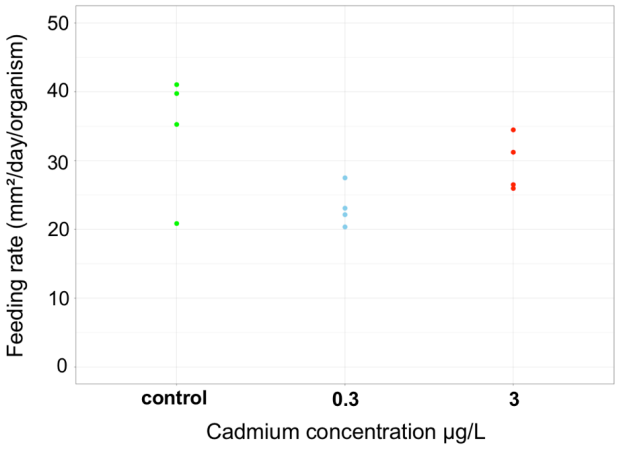


Figure S 2 : Feeding rate (mm²/day/organism) of F0 parents. Control: n = 18×4, 0.3 µg Cd/L: n=18×4, 3 µg/L: n=15×3.

FIGURE S3

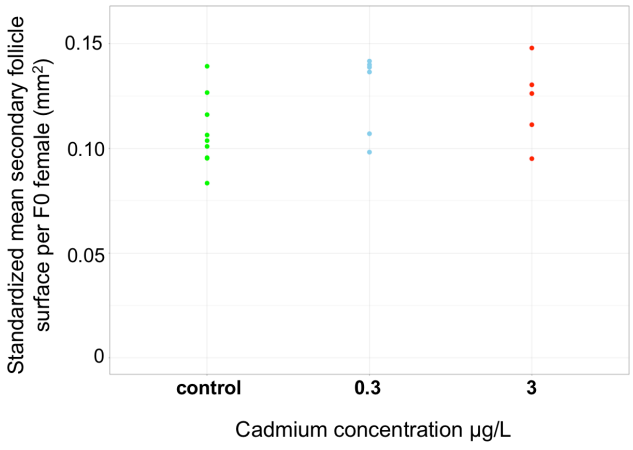


Figure S 3 : Standardized mean secondary follicle surface per F0 female (mm^2). n = 9 (control), n = 6 (0.3 µg Cd /L) and n = 5 (3 Cd µg/L).

FIGURE S4

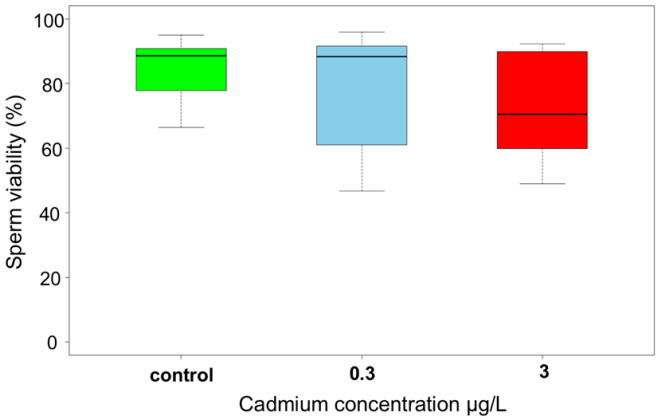


Figure S 4 : Sperm viability in F0 male gammarids. Control: n = 10, 0.3 µg Cd/L: n=9, 3 µg Cd /L: n=8.

FIGURE S5

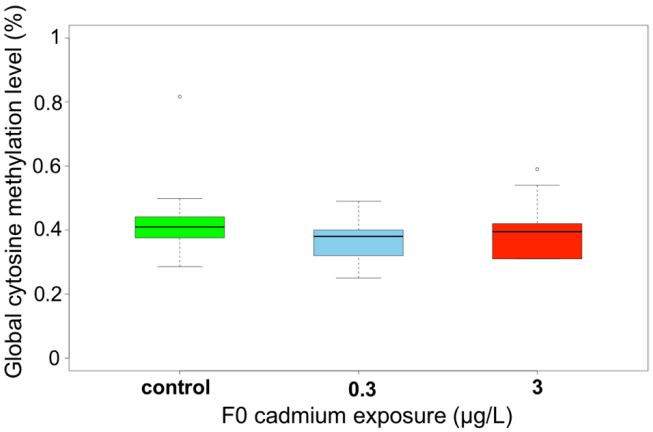


Figure S 5 : Global cytosine methylation level (%) in F0 male gammarids. Control: n = 10, 0.3 µg Cd/L: n=11, 3 µg Cd /L: n=10.

FIGURE S6

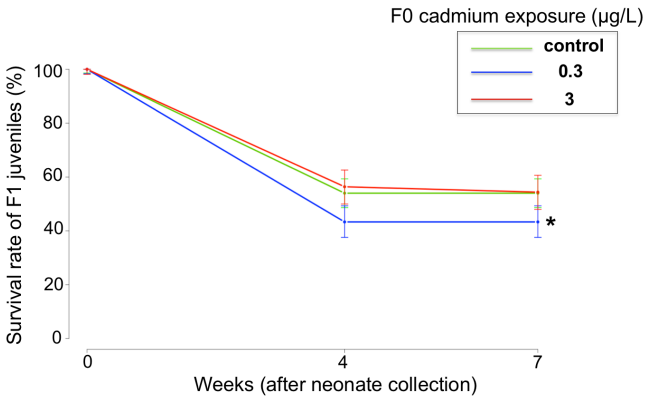


Figure S 6 : Survival rate of F1 juveniles (%). Star denotes a significant difference between C-F0 and 0.3Cd-F0 conditions, $p<0.05$.

FIGURE S7

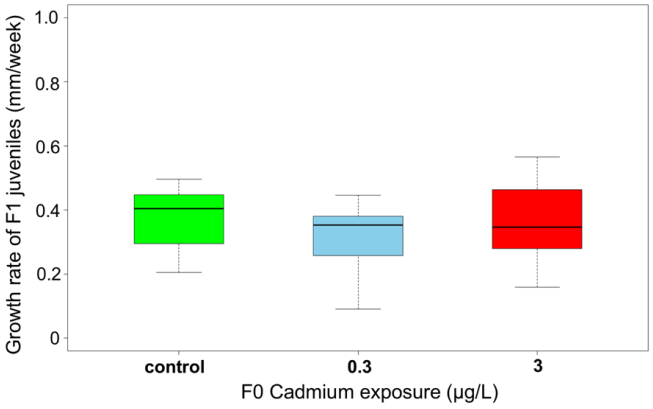


Figure S 7 : Growth rate of F1 juveniles (mm/week). n=20.

FIGURE S8

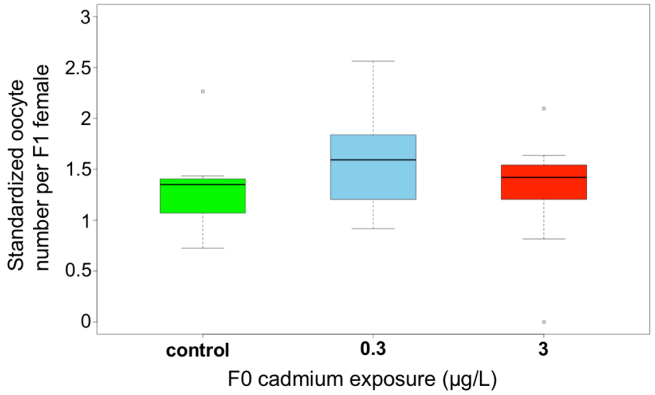


Figure S 8 : Standardized oocyte number per F1 female. n=10.

FIGURE S9

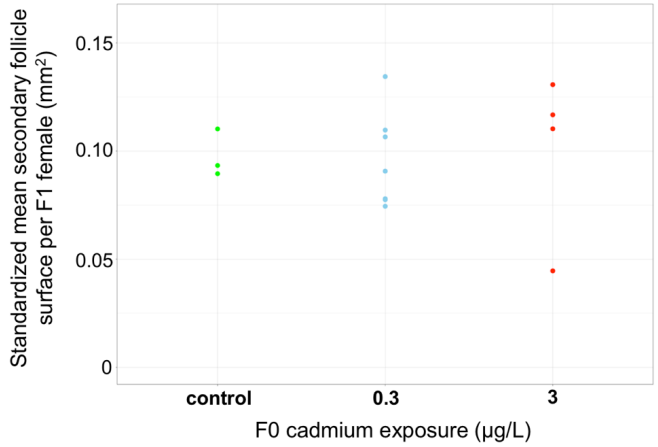


Figure S 9 : Standardized mean secondary follicle surface per F1 female. Control: n = 3, 0.3 µg Cd/L: n=7, 3 µg Cd/L: n=4.

FIGURE S10

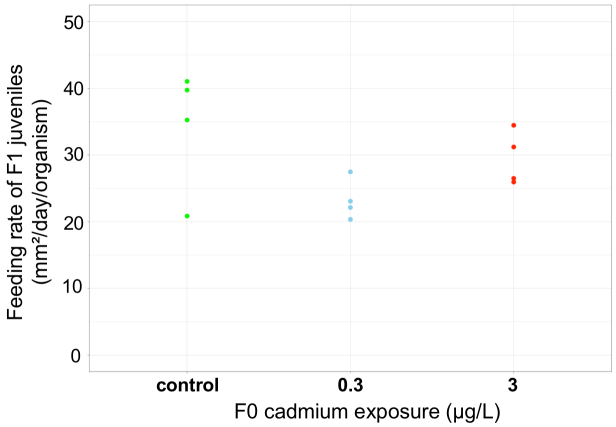


Figure S 10 : Feeding rate (mm²/day/organism) of F1. n = 4×3.

FIGURE S11

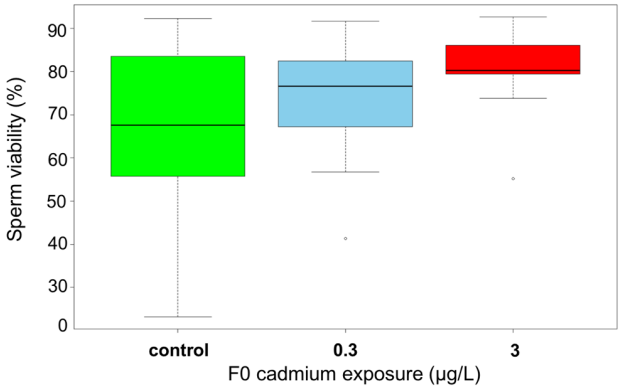


Figure S 11 : Sperm viability in F1 male gammarids. Control: n = 9, 0.3 µg Cd/L: n=9, 3 µg Cd/L: n=10.

FIGURE S12

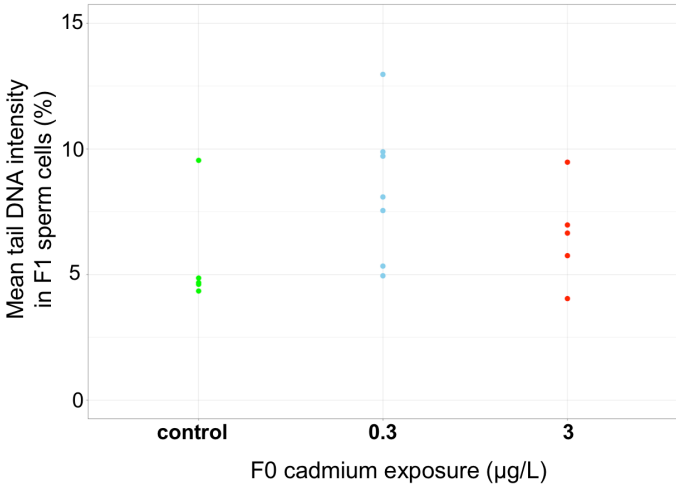


Figure S 12 : Mean tail DNA intensity (%) (comet assay) in sperm of F1 males. Control: n = 5, 0.3 µg Cd/L: n=7, 3 µg Cd/L: n=5.

FIGURE S13

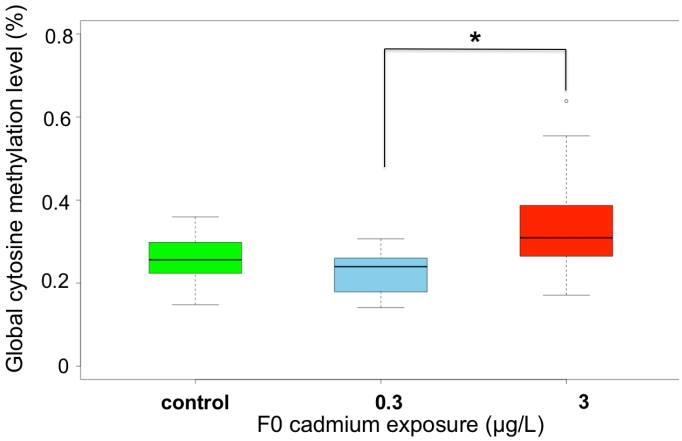


Figure S 13 : Global cytosine methylation level (%) in F1 male gammarids. Control: n = 10, 0.3 µg Cd/L: n=9, 3 µg Cd /L: n=14. Star denotes a significant difference between 0.3Cd-F0 and 3Cd-F0 conditions, $p<0.05$.

FIGURE S14

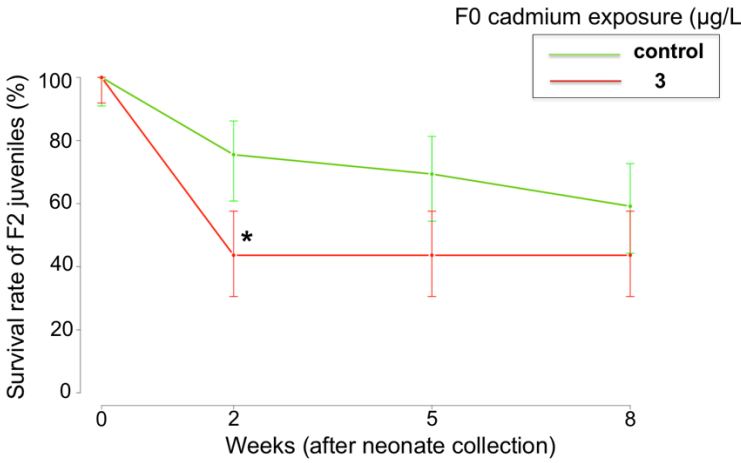


Figure S 14 : Survival rate of F2 juveniles (%). Star denotes a significant difference compared to the control condition,

FIGURE S15

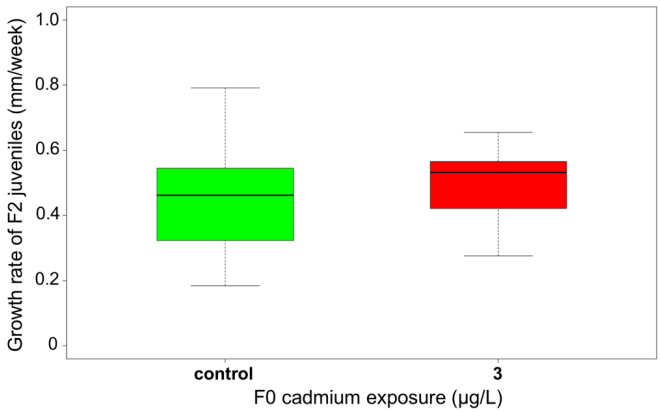


Figure S 15 : Growth rate of F2 juveniles (mm/week). Control: n = 15, 3 µg Cd/L: n=13.

FIGURE S16

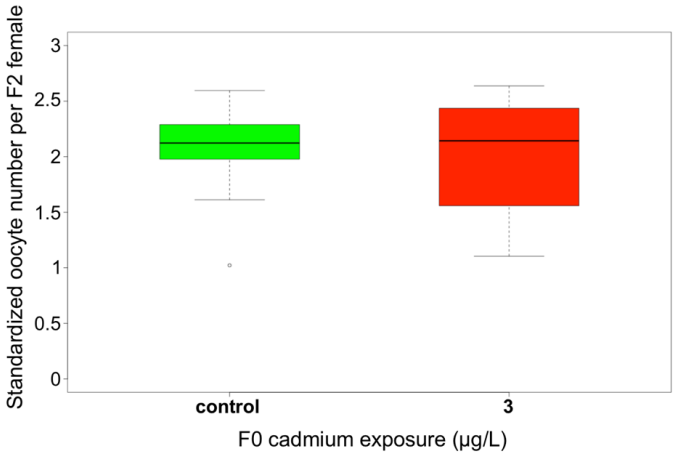


Figure S 16 : Standardized oocyte number per F2 female. Control: n = 11, 3 µg Cd/L: n=10.

FIGURE S17

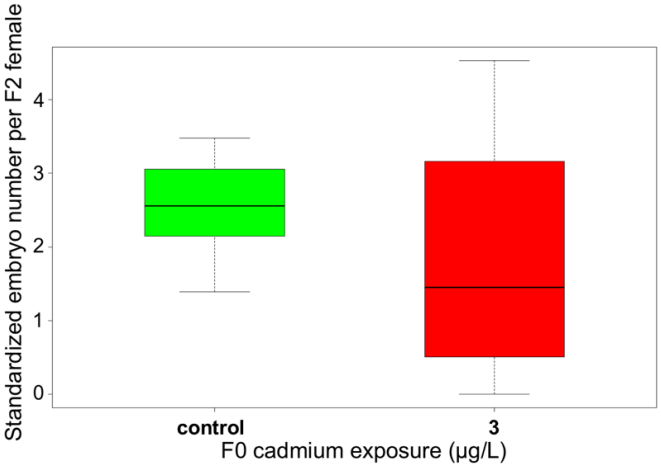


Figure S 17 : Standardized embryo number per F2 female. Control: n = 11, 3 µg Cd/L: n=7.

FIGURE S18

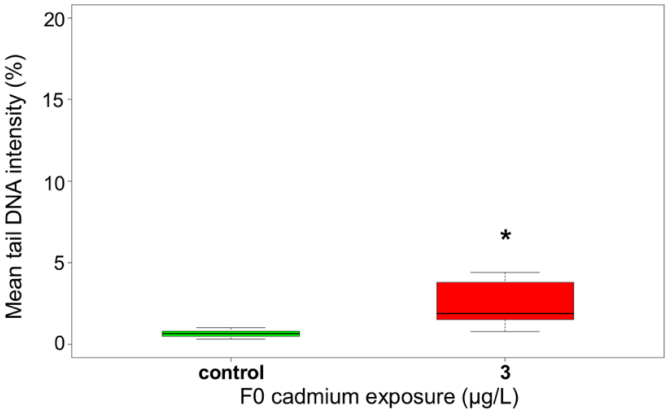


Figure S 18 : Mean tail DNA intensity (%) (comet assay) in sperm of F2 males. Control: n = 7, 3 µg Cd/L: n=7. Star denotes a significant difference compared to the control condition, $p<0.05$.

IV.2. Publication n°3 : Modification des traits d'histoire de vie jusqu'à la troisième génération de descendants chez *Gammarus fossarum* suite à une exposition parentale à une concentration environnementale de 3,4-dichloroaniline

Article en préparation

Résumé

Dans une précédente étude transgénérationnelle concernant l'exposition parentale au cadmium (publication n°2), des effets différés en cascade sur les traits d'histoire de vie ont été mis en évidence sur trois générations de descendants non exposées chez *Gammarus fossarum*. Le présent travail explore les conséquences inter et transgénérationnelles d'une exposition parentale à un autre contaminant, au mode d'action *a priori* différent, la 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) (produit de dégradation d'herbicides de type phényle-urée). De potentiels effets différés ont ainsi été suivis sur les traits d'histoire de vie chez les générations F1, F2 et F3 et sur l'intégrité de l'ADN spermatique jusqu'à la deuxième génération de descendants. Comme observé avec le cadmium, cette étude a permis de mettre en évidence l'existence d'effets en cascade sur les traits d'histoire de vie suite à une exposition parentale de courte durée à une concentration environnementale de 3,4-DCA. En effet, une augmentation du nombre d'ovocytes produits par les femelles F1 a été observée ainsi qu'une hausse des quantités de réserves vitellines investies dans les ovocytes par les femelles F2 et une taille plus importante chez les juvéniles F3 issus de l'exposition des F0. Les changements d'allocation de l'énergie entre les trois grandes fonctions biologiques maintenance, croissance et reproduction semblent avoir joué un rôle prépondérant dans l'émergence de ces effets. Enfin, des impacts génotoxiques dans la descendance ont été mis en évidence avec une augmentation des dommages primaires à l'ADN spermatique chez les descendants F1 issus des parents exposés.

Mots clés

Effet différé, effet transgénérationnel, trait d'histoire de vie, 3,4-dichloroaniline, *Gammarus fossarum*

1 - Introduction

De nombreuses études ont montré l'existence d'un possible décalage temporel entre les périodes d'exposition et les impacts biologiques. Les effets d'une perturbation environnementale peuvent en effet se manifester plus tardivement au cours de la vie des organismes, voire de leur descendance. Si ces effets différés peuvent exister lors des expositions continues, ils ne peuvent être clairement mis en évidence qu'en l'absence du facteur de stress initial dans le milieu. Compte-tenu de l'influence importante des effets différés sur la démographie, la résilience, l'acquisition de tolérance des populations et leur vulnérabilité face à une nouvelle perturbation environnementale, la connaissance de ces effets différés constitue un véritable enjeu pour améliorer la compréhension des réponses des populations au stress. Malgré cela, les effets différés restent encore aujourd'hui peu étudiés. D'autre part, la plupart des études portant sur les conséquences d'une exposition parentale chez les descendants examinent uniquement les effets sur la première génération de descendants (F1) et s'intéressent à des organismes modèles de laboratoire au cycle de vie court. Cependant, les effets différés semblent avoir une dynamique importante au cours des générations successives : ils peuvent apparaître, disparaître et leur intensité varier au fur et à mesure des générations (Burggren, 2015). Le travail rapporté dans la publication n°2 a confirmé l'existence d'une telle dynamique et ainsi la pertinence d'étudier les réponses au-delà de la F1 puisque des effets en cascade sur les traits d'histoire de vie ont été observés au cours des trois générations de descendants après une exposition parentale au cadmium chez *Gammarus fossarum*. Cette étude a également mis en évidence l'intérêt d'investiguer les effets à long terme sur des espèces « environnementales » (*i.e.* organismes issus de populations vivant en milieu naturel), aux stratégies d'histoire de vie variées. En effet, les modifications des traits d'histoire de vie observées chez les générations de descendants semblent être le résultat de compromis entre les traits d'histoire de vie liés à la stratégie de vie de l'espèce et aboutissant à une compensation de l'impact démographique au cours des générations successives (publication n°2).

Afin d'explorer les conséquences transgénérationnelles chez *Gammarus fossarum* d'un autre type de contaminant que le cadmium, les effets d'une exposition parentale à la 3,4 dichloroaniline (3,4-DCA) sur les traits d'histoire vie et l'intégrité du génome ont été explorés, là encore, au cours de trois générations successives de descendants. Cette molécule organique, classée hautement toxique pour l'environnement aquatique, est utilisée comme produit intermédiaire pour la fabrication d'herbicides de type phényle-urée (diuron, linuron, propanil et néburon), de produits bactéricides (trichlorocarbanilide) et de teintures azoïques pour les polyesters. Elle se retrouve dans l'environnement suite à l'usage de ces substances et par le biais des eaux usées industrielles, la molécule étant résistante à la dégradation en station d'épuration conventionnelle (ECB, 2006). Des effets de la 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) ont été observés chez les gammaridés à des concentrations élevées de 3,4-DCA, sur le taux d'alimentation des juvéniles (Blockwell et al., 1998), le comportement reproducteur (Girling et al., 2000), la croissance des juvéniles (Taylor et al., 1994), la mortalité (Taylor et al., 1991) et le potentiel de croissance qui correspond à la mesure de la quantité d'énergie disponible pour la croissance et la reproduction (Maltby et al., 1990). D'autre part, Sardo et al., 2005 ont montré chez le crustacé mysid *Mesopodopsis slabberi* que la 3,4-DCA s'accumulait et générait des dommages histologiques au niveau des gonades. Des impacts génotoxiques de la 3,4-DCA, même à de faibles concentrations, ont également été rapportés (Mucig, 2009 ; Behrens et al., 2016). Enfin, les effets intergénérationnels d'une exposition au diuron, dont la 3,4-DCA est le principal produit de dégradation, ont été mis en évidence chez le mollusque *Crassostrea gigas* (Barranger et al., 2015 ; Bachère et al., 2017).

Ayant peu de recul sur la chimie et les effets de la 3,4-DCA, deux concentrations (2 et 200 µg/L) ont été testées au cours d'une première expérimentation. Malheureusement, peu de temps après le lancement de cette dernière, un problème technique du dispositif expérimental a compromis l'expérience provoquant une mortalité massive dans un des deux réplicats témoins. Malgré son interruption prématurée, cette expérimentation nous a permis de constater la forte dégradation de la molécule dans les milieux d'exposition avec une diminution des concentrations de 40 à 60% en 2 jours ainsi que des effets reprotoxiques importants à des concentrations mesurées de l'ordre de 51-83 µg DCA/L (données non présentées). Nous avons ainsi pu définir une concentration d'exposition de 10 µg DCA/L pour le lancement d'une seconde expérimentation transgénérationnelle, concentration suffisamment élevée pour espérer un effet de l'exposition, tout en restant dans la gamme des concentrations rencontrées dans les milieux (*i.e.* 0,025-1,5 µg DCA/L) (Claver et al., 2006 ; ECB, 2006).

2 - Matériels et méthodes

Le protocole expérimental général de cette expérimentation est similaire à celui de l'étude des effets transgénérationnels d'une exposition parentale au cadmium (publication n°2, voir II.4.1). L'expérimentation a été arrêtée au bout de 55 semaines, avant que les juvéniles F3 n'aient atteint la puberté.

Prélèvement des parents F0

Des gammares de taille homogène ont été prélevés sur le site de la cressonnière du Bugey et maintenus pendant les 24h précédant le lancement de l'exposition dans les conditions d'élevage du laboratoire :12°C, cycle jour/nuit de 16/8h dans des aquariums de 20L (4000 organismes/aquarium) alimentés en continu par de l'eau de forage non-contaminée (conductivité comprise entre 400 et 500 µS/cm) (voir descriptions au II.1.3).

Exposition des F0 à la 3,4-DCA

Pour chaque condition d'exposition (témoin et 10 µg DCA/L), 375 couples en précopula dont la femelle était au stade D2 et 100 mâles calibrés destinés à la réalisation d'un test alimentation ont respectivement été répartis dans 25 et 4 béchers en verre contenant 500 mL de milieu d'exposition oxygéné en continu. L'exposition a duré 21 jours à 16°C afin d'assurer l'exposition des organismes au cours de la phase de gamétogénèse.

Pour obtenir la solution d'exposition à 10 µg 3,4-DCA/L, une solution mère à 5 mg 3,4-DCA/L a été préparée par dissolution de 3,4-dichloroaniline en poudre (Sigma Aldrich®) dans de l'eau milliQ et répartie dans des flacons ambrés en verre de 30 mL (15 mL de solution mère par flacon). Ces derniers ont ensuite été placés au congélateur à -20°C. Les milieux d'exposition de chaque bécher ont été renouvelés un jour sur deux par ajout de 10 mL de solution mère dans de l'eau de forage oxygénée durant les 24 dernières heures à 16°C, à l'aide d'une fiole jaugée de 5L. Cette opération a été répétée à trois reprises afin de renouveler la totalité des 29 béchers de la condition contaminée. Les milieux témoins ont également été renouvelés par de l'eau de forage saturée en oxygène dissous.

Avant chaque renouvellement, soit 48h après le dernier renouvellement, 30 mL de milieu contaminé et de milieu témoin ont été prélevés et conservés dans un flacon ambré de 125 mL à -20°C pour l'analyse ultérieure des teneurs en 3,4-DCA par l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) de Lyon. Le dosage du milieu contaminé a été effectué par couplage de la chromatographie en phase liquide (H-Class waters®) et de la spectrométrie de masse en tandem (Xevo TQ-S Waters®) (UHPLC-MS/MS). Les limites de détection et de quantification estimées sont respectivement de 0,01 µg 3,4-DCA/L et 0,02 µg 3,4-DCA/L.

Élevage des descendants en milieu non contaminé

Les protocoles d'élevage des descendants ont été similaires à ceux appliqués lors de l'expérimentation transgénérationnelle avec le Cd (publication n°2), à l'exception du protocole de collecte des nouveau-nés F2 et F3. En effet, ces derniers ont été récupérés une fois par semaine durant 6 semaines consécutives au lieu de 2 et ont été placés dans des aquariums distincts afin de disposer de réplicats temporels pour les mesures de survie, de taille et de puberté. À partir du suivi de la puberté, les organismes pubères ont été placés dans de nouveaux aquariums en ne tenant plus compte de leur lot d'origine.

Suivi des paramètres au cours des générations successives

Afin d'évaluer les effets directs de l'exposition parentale : (i) un test alimentation a été réalisé sur les mâles F0 8 jours après le lancement de l'exposition ; (ii) au 18ème jour d'exposition, 30 femelles F0 ont été sélectionnées aléatoirement et observées sur table lumineuse afin de déterminer leur avancée dans le cycle de mue ; (iii) au 19ème jour d'exposition, 10 femelles F0 aux stades C2-D1 ont été sacrifiées pour mesurer les paramètres relatifs à la reproduction, *i.e.* nombre d'ovocytes (F1 au stade de cellule germinale), nombre d'embryons et surface des follicules secondaires) ; (iv) 5 jours après la fin de l'exposition et avant la fécondation, 30 mâles F0 de chaque condition ont été sélectionnés au stade précopulatoire, 10 d'entre eux ont été utilisés pour la mesure de la viabilité des spermatozoïdes, 10 autres pour l'essai-comète et les 10 derniers pour évaluer les niveaux globaux de méthylation des cytosines de l'ADN.

Chez les descendants F1, la survie et la croissance des juvéniles, la cinétique de puberté et la taille à la puberté ont été évaluées. Après la collecte des nouveau-nés F2, des femelles aux stades C2-D1 et des mâles en fin de spermatogénèse ont été sacrifiés afin de mesurer les dommages primaires à l'ADN (essai-comète), les niveaux globaux de méthylation des cytosines de l'ADN et les paramètres relatifs à la reproduction des femelles. L'ensemble des paramètres mesurés en F1 l'ont également été en F2, à l'exception des niveaux globaux de méthylation des cytosines de l'ADN, ce marqueur n'ayant pas répondu en F0. Chez les descendants F3, la survie et la croissance des juvéniles ont été étudiées.

Concernant le suivi de la survie et de la croissance des juvéniles F2 et F3, pour chaque lot, les survies et les tailles ont été mesurées à trois reprises : la première mesure entre la 1ère et la 2ème semaine, la

seconde mesure entre la 4ème et la 5ème semaine et la troisième entre la 7ème et la 8ème semaine après la collecte des nouveau-nés. Étant donné la forte variabilité des effectifs dans chacun des lots de juvéniles F2 et F3, les pourcentages de survie ont été calculés à partir des effectifs totaux, c'est-à-dire la somme des effectifs de chacun des lots. Comme pour les survies, à chaque date de mesure, les tailles ont été analysées en agrégeant les valeurs de tous les lots. La cinétique de puberté des F2 a pu être analysée pour deux lots d'organismes et les tailles à la puberté de la totalité des lots ont été prises en compte.

Les protocoles de mesures des différents paramètres sont détaillés dans la publication n°2 ainsi qu'au paragraphe II.5.

Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R (version 3.5.1). Pour les données quantitatives telles que les dommages primaires à l'ADN, les niveaux de méthylation, le taux d'alimentation, le taux de croissance des juvéniles, la taille à la puberté et les capacités reproductives des mâles et des femelles, le test de Mann-Whitney a été utilisé pour des comparaisons par paires. Pour l'analyse des courbes de survie, un test de comparaison des proportions a été appliqué à la 8ème semaine après la collecte des nouveau-nés (prop.test sur R). Le seuil de significativité de tous les tests statistiques est égal à 0,05.

3 - Résultats

Des concentrations d'exposition réalistes au regard des niveaux environnementaux

Le dosage de la 3,4-DCA dans les milieux d'exposition après 48h, soit juste avant le renouvellement, montre un écart important entre la concentration réelle d'exposition (0,10-0,92 µg/L) et celle attendue de 10 µg/L (Tableau 1). Il confirme également l'absence de 3,4-DCA dans les milieux témoins (< 0,01 µg/L).

Tableau 1 : Résultats du dosage de la 3,4-DCA du milieu contaminé par couplage de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS).

Prélèvements (48h après la préparation, soit juste avant renouvellement du milieu)	[DCA](µg/L)
Prélèvement à J3	0.13
Prélèvement à J5	0.65
Prélèvement à J7	0.92
Prélèvement à J10	0.10
Prélèvement à J12	0.38
Prélèvement à J14	0.29
Prélèvement à J17	0.32
Prélèvement à J19	0.31
Prélèvement à J21	0.28

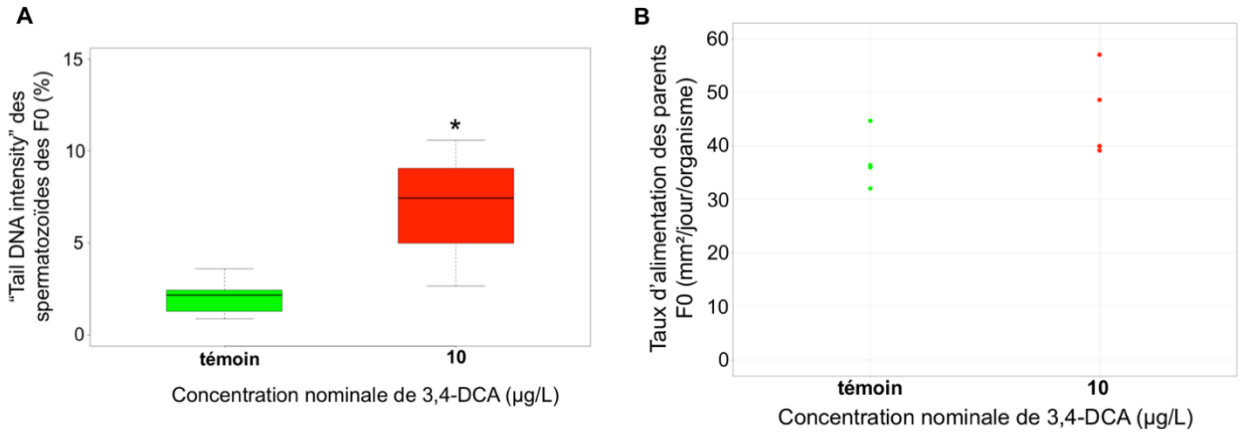


Figure 1 : Réponses des parents F0 à l'exposition. (A) Dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes de mâles F0 (essai comète), n = 10. (B) Taux d'alimentation des parents F0, n = 20×4. L'astérisque * indique une différence significative entre les conditions témoin et contaminée ($p < 0,05$).

Effets de l'exposition à la 3,4-DCA sur les parents F0

Suite à l'exposition, il n'y a pas de différence de survie entre les mâles F0 des conditions témoin et contaminée (p-value = 0.092). Cependant, la survie des femelles exposées est réduite d'environ 20% par rapport à celle des femelles témoins (68% contre 91%) (p-value = 6.2×10^{-14}). Les dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes des mâles exposés sont significativement plus élevés que ceux des organismes témoins (p-value = 7.6×10^{-5}) (Figure 1, A), tandis que la viabilité des spermatozoïdes n'est pas modifiée par l'exposition (p-value = 0.58) (Données supplémentaires : Figure S 1).

Les niveaux globaux de méthylation de l'ADN ne sont pas significativement différents (p-value = 0.67) (Données supplémentaires : Figure S 2). Il y a également une tendance à l'augmentation de la consommation des feuilles d'aulne chez les mâles exposés d'environ 20% par rapport aux témoins, bien que cette dernière ne soit pas significative (p-value = 0.11) (Figure 1, B). Les paramètres de reproduction ne sont pas affectés par l'exposition à la 3,4-DCA. L'avancée des femelles contaminées et témoins dans le cycle de reproduction est synchrone (Données supplémentaires : Figure S 3). De plus, le nombre d'ovocytes et d'embryons, ainsi que les surfaces des follicules secondaires des femelles ne sont pas impactés par l'exposition (p-value = 1, p-value = 0.14 et p-value = 0.32, respectivement) (Données supplémentaires : Figure S 4, Figure S 5 et Figure S 6, respectivement).

L'exposition de la F0 à la 3,4-DCA induit des effets en cascade sur les capacités reproductives des descendants F1 et F2 et la taille des organismes F3

La survie des organismes F1 issus des parents exposés F0 est significativement plus faible que celle des témoins (p-value = 9.4×10^{-3}) (Figure 2, A).

Les taux de croissance des juvéniles F1 ne sont pas significativement différents entre les deux conditions d'exposition (p-value = 0.94) (Données supplémentaires : Figure S 7). De même, les organismes F1 des deux conditions présentent des cinétiques de puberté similaires et des tailles à la puberté proches (p-value = 0.15) (Données supplémentaires : Figure S 8 et Figure S 9, respectivement). Chez les mâles F1 issus des parents exposés, une augmentation significative des dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes a été observée (p-value = 2.5×10^{-4}) (Figure 2, B). Le nombre d'ovocytes des femelles issues de la condition contaminée est significativement plus élevé que celui des femelles témoins de l'ordre de 20% (p-value = 1.8×10^{-3}) (Figure 2, C). Par ailleurs, il n'y a pas de différence significative entre les deux conditions en termes de nombre d'embryons et de surfaces des

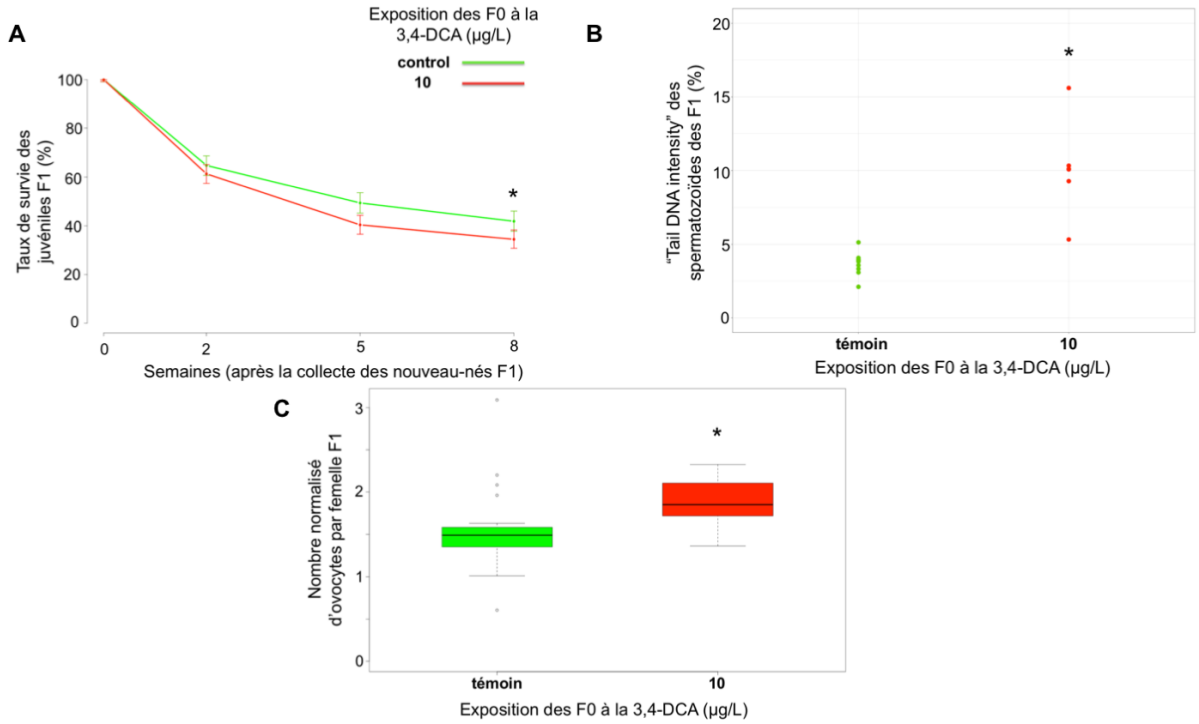


Figure 2 : Réponses des organismes F1. (A) Taux de survie des juvéniles F1, témoin : n = 573 (semaine 0), 371 (2ème semaine), 283 (5ème semaine) et 238 (8ème semaine) ; 10 µg 3,4 DCA/L : n = 641 (semaine 0), 393 (2ème semaine), 259 (5ème semaine) et 221 (8ème semaine). (B) Moyenne des dommages primaires à l'ADN de spermatozoïdes de mâles F1, témoin : n = 10 ; 10 µg 3,4 DCA/L : n = 6. (C) Nombre normalisé d'ovocytes par femelle F1, témoin : n = 19 ; 10 µg 3,4 DCA/L : n = 15. L'astérisque * indique une différence significative entre les conditions témoin et contaminée ($p < 0,05$).

follicules secondaires des femelles (p-value = 0.76 et p-value = 0.077, respectivement) (Données supplémentaires : Figure S 10 et Figure S 11).

Les survies à 8 semaines des organismes F2 ne différent pas entre les deux conditions (p-value = 0.22) (Données supplémentaires : Figure S 12). Il en est de même pour le taux de croissance des organismes F2 (p-value = 0.34) (Données supplémentaires : Figure S 13). Les cinétiques de puberté des organismes F2 issus des F0 exposés à la 3,4-DCA sont similaires à celles des témoins (Données supplémentaires : Figure S 14). Ces mêmes organismes présentent une taille à la puberté significativement plus élevée que celle des témoins (p-value = 0.013) (Données supplémentaires : Figure S 15). Cependant, cette augmentation est très faible, de l'ordre de 4%. Bien que les dommages primaires à l'ADN des mâles F2 soient significativement différents (p-value = 7.3×10^{-3}), ces derniers restent conformes aux valeurs de référence définies chez *Gammarus fossarum* (Lacaze et al., 2011a) (Figure 3, A).

Les surfaces des follicules secondaires sont significativement plus importantes chez les femelles F2 issus des F0 exposés, de l'ordre de 17% (p-value = 0.010) (Figure 3, B). Concernant les autres paramètres de reproduction suivis, le nombre d'ovocytes et d'embryons par femelle ne différent pas de manière significative (p-value = 0.68 et p-value = 0.95, respectivement) (Données supplémentaires : Figure S 16 et Figure S 17).

Les survies des juvéniles F3 ne différent pas entre les conditions témoin et contaminée (p-value = 0.32) (Données supplémentaires : Figure S 18). En revanche, les taux de croissance sont significativement plus élevés chez les organismes F3 issus de l'exposition des F0 (p-value = 2.2×10^{-16}) (Figure 4, A). Chez ces mêmes organismes, une augmentation de la taille des organismes à 8 semaines a également été observée (p-value = 2.3×10^{-6}) (Figure 4, B).

4 - Discussion

Notre étude démontre pour la première fois l'existence d'effets intergénérationnels et transgénérationnels de la 3,4-DCA chez une espèce animale. En effet, à notre connaissance, une seule étude a exploré les effets multigénérationnels d'une exposition à la 3,4-DCA chez le crustacé *Ceriodaphnia dubia* (Rose et al., 2004). Néanmoins, le protocole expérimental d'exposition n'a pas permis de mettre en évidence des effets différés puisque les quatre générations de descendants étudiées ont été exposées de manière directe.

Les concentrations réelles d'exposition mesurées après 48h (0,1 - 0,92 µg 3,4 DCA/L) sont comprises dans la gamme des valeurs mesurées dans les eaux de surface européennes, décrites entre 0,025 et 1,5 µg/L (Claver et al., 2006 ; ECB, 2006). Bien qu'une diminution de la concentration en 3,4-DCA puisse s'être établie au cours des 48h entre le renouvellement du milieu et le prélèvement d'eau pour analyse, les organismes semblent ainsi avoir été exposés à des concentrations de 3,4-DCA dans la colonne d'eau réalistes au plan environnemental et dans l'ordre de grandeur de la PNEC pour les milieux aquatiques (0,2 µg/L).

L'ordre de grandeur des niveaux d'effets enregistrés chez les organismes F0 en termes de survie et de dommages primaires à l'ADN correspondent à ceux observés en biosurveillance lors des expositions *in situ* par encagement de gammares (*e.g.* Lacaze et al., 2011a ; Charron et al., 2013 ; Ciliberti et al., 2017).

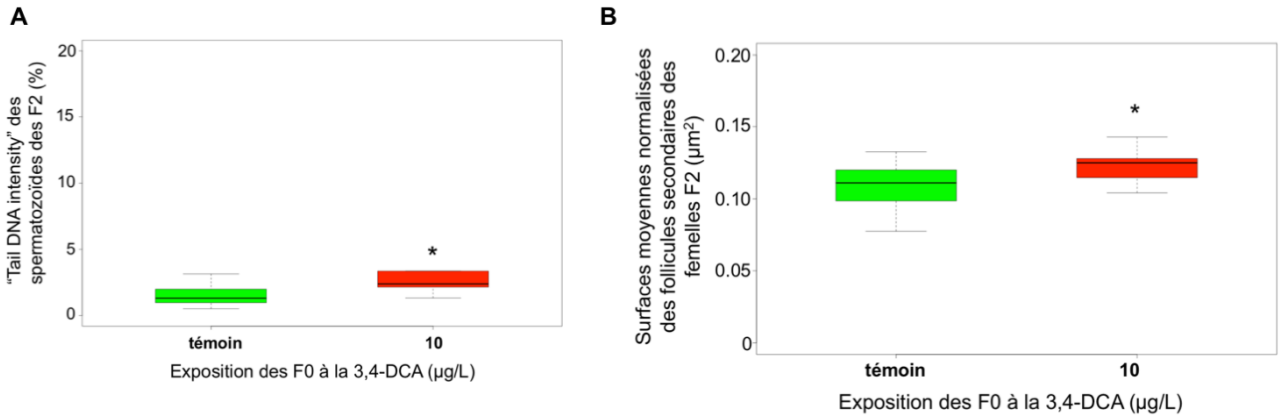


Figure 3 : Réponses des organismes F2. (A) Moyenne des dommages primaires à l'ADN de spermatozoïdes de mâles F2, témoin : n = 14 ; 10 µg 3,4 DCA/L : n = 10. (B) Surfaces moyennes normalisées des follicules secondaires des femelles F2, témoin : n = 16 ; 10 µg 3,4 DCA/L : n = 13. L'astérisque * indique une différence significative entre les conditions témoin et contaminée statistiquement ($p < 0,05$).

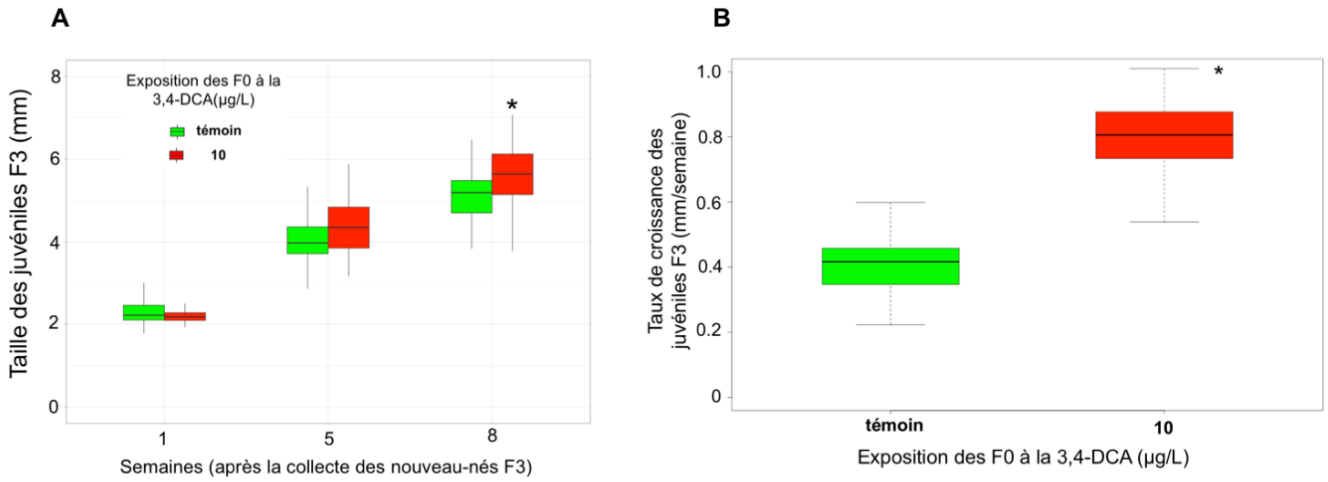


Figure 4 : Réponses des F3. (A) Taille des juvéniles F3 (mm), témoin : n = 130 (1ère semaine), 127 (5ème semaine), 93 (8ème semaine) ; 10 µg 3,4 DCA/L : n = 98 (1ère semaine), 111 (5ème semaine), 96 (8ème semaine). (B) Taux de croissance des juvéniles F3 (mm/semaine), témoin : n = 93 ; 10 µg 3,4 DCA/L : n = 96. L'astérisque * indique une différence significative entre les conditions témoin et contaminée statistiquement ($p < 0,05$).

L'exposition à la 3,4-DCA n'a pas induit d'effet significatif sur les capacités reproductives des femelles. De manière similaire, chez *Daphnia magna*, les paramètres de reproduction n'ont pas été affectés en dessous d'une concentration de 9 µg 3,4 DCA/L (Lampert, 2002).

Comme dans le cas de l'exposition parentale au cadmium, la survie et la croissance des juvéniles F1 ne sont pas impactées par l'exposition parentale à la 3,4-DCA. En effet, bien que la différence de survie entre les organismes F1 issus des parents exposés F0 et ceux témoins, la diminution observée n'est que de 7%, valeur négligeable au regard de la variabilité de la survie des juvéniles *Gammarus fossarum* dans leur milieu naturel (Coulaud et al., 2014). Ces résultats sont cohérents avec l'absence d'effet de l'exposition sur les réserves énergétiques investies par les femelles F0 dans leurs œufs (futurs F1). L'absence de conséquence de l'augmentation pourtant nette du niveau de dommage à l'ADN des spermatozoïdes sur la survie et la croissance des juvéniles donnent également un poids supplémentaire à l'étude réalisée par Lacaze et al. (2011b). Ces auteurs avaient en effet montré qu'en dessous de 20% de « tail DNA intensity », les dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes n'avaient pas d'impact apparent sur le développement embryonnaire des descendants F1 chez *Gammarus fossarum*.

Comme pour le cadmium, il a fallu attendre l'entrée des organismes F1 dans la reproduction pour observer les premiers effets différés, ici sur le nombre d'ovocytes par femelle et sur les niveaux de dommages primaires à l'ADN. L'augmentation du nombre d'ovocytes ne semble pas avoir de conséquences importantes sur la production de descendants étant donné le nombre similaire d'embryons chez les femelles F1 des conditions témoin et contaminée.

Concernant les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans l'émergence des effets observés chez les organismes F1, l'hypothèse d'un effet direct de la 3,4-DCA au cours du développement embryonnaire des organismes F1 suite au transfert de la molécule dans les ovocytes exposés est peu probable. En effet, le coefficient de partage octanol/eau de la 3,4-DCA est égal à 2,7 et des facteurs faibles de bioaccumulation ont été calculés chez divers invertébrés compris entre 9 et 18 L/Kg (ECB, 2006). D'autre part, les effets génotoxiques observés chez les organismes F1 ne peuvent probablement pas s'expliquer par un transfert des dommages primaires à l'ADN des parents exposés aux descendants via les gamètes étant donné la réversibilité des dommages primaires à l'ADN. Toutefois, des altérations épigénétiques ou génétiques interférant avec la machinerie de réparation de l'ADN et/ou avec les systèmes impliqués dans la compaction de l'ADN qui constitue une barrière aux dommages structuraux chez le spermatozoïde pourraient être à l'origine des niveaux de dommages à l'ADN observés chez les descendants F1. Dans cette hypothèse, ces changements épigénétique ou génétiques ne semblent pas s'être maintenus au sein de la population puisque les organismes F2 présentent des niveaux de dommages proches des valeurs de référence.

Les changements d'allocation d'énergie observés chez les femelles F2 issues de l'exposition de la F0 à la 3,4-DCA (*i.e.* augmentation des réserves vitellines des œufs) pourraient avoir conduit à la production de descendants de taille plus importante que les organismes témoins. Ces résultats sont en contradiction avec ceux observés avec le cadmium

(publication n°2), à savoir une diminution des quantités de réserves vitellines stockées dans les œufs des femelles F2 ainsi qu'une taille réduite des juvéniles F3.

L'augmentation de la quantité d'énergie à disposition des descendants observée dans cette présente étude ne provient pas d'un compromis énergétique entre la qualité des ovocytes (*i.e.* quantités de réserves vitellines des œufs) et le nombre des ovocytes puisque ce dernier est similaire entre les deux conditions. Cela suggère que les femelles F2 issues de l'exposition parentale ont investi des quantités d'énergie plus importantes dans la reproduction par rapport aux témoins. Contrairement à nos résultats, la plupart du temps, l'augmentation de l'investissement énergétique des femelles confrontées à un stress chimique dans la qualité de sa descendance est associée à une diminution du nombre de descendant produit (Smith et Fretwell, 1974 ; Riesch et al., 2012).

Dans le cas de l'exposition à la 3,4-DCA, l'augmentation de la taille des juvéniles issus de l'exposition parentale avant l'entrée en puberté est significative, mais faible par rapport à la condition témoin (de l'ordre de 9%). Par contraste, la diminution de taille mise en évidence chez les organismes issus de l'exposition parentale au Cd à la même date en comparaison des témoins atteint les 30% (publication n°2). Chez les gammares, la taille de la femelle et le nombre de descendants produits sont corrélés (Geffard et al., 2010). Dans l'hypothèse d'un maintien à l'âge adulte de l'augmentation de la taille des organismes F3 issus de l'exposition de la F0 par rapport aux témoins, il est peu probable qu'elle puisse engendrer une hausse du nombre de descendants susceptible de générer un impact sur la démographie de la population.

5 - Conclusion

Pour conclure, malgré la courte durée de l'exposition parentale à une concentration environnementale de 3,4-DCA et l'absence d'effets visibles jusqu'à l'entrée des F1 en reproduction, d'importants effets en cascade ont été observés au cours des trois générations successives de descendants. L'émergence de tels effets montre l'intérêt de l'étude des effets d'une exposition à un stress chimique au-delà de la première génération de descendants pour améliorer les approches prédictives développées dans le cadre de l'évaluation des risques. D'autre part, les changements d'allocation de l'énergie entre les trois grandes fonctions biologiques maintenance, croissance et reproduction semblent avoir joué un rôle important dans l'apparition des effets inter et transgénérationnels. Cela suggère une influence importante de l'histoire de vie de l'espèce sur ces réponses et ainsi l'intérêt d'investiguer les effets long termes sur des « espèces environnementales » (*i.e.* organismes issus de populations vivant en milieu naturel), aux stratégies d'histoire de vie variés.

Références

-Bachère, E., Barranger, A., Bruno, R., Rouxel, J., Menard, D., Piquemal, D., and Akcha, F. (2017). Parental diuron-exposure alters offspring transcriptome and fitness in Pacific oyster Crassostrea gigas. Ecotoxicol. Environ. Saf. 142, 51–58.

-Barranger, A., Akcha, F., Rouxel, J., Brizard, R., Maurouard, E., Pallud, M., Menard, D., Tapie, N., Budzinski, H., Burgeot, T., et al. (2014). Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally - relevant exposure to diuron: Evidence of vertical transmission of DNA damage. Aquat. Toxicol. 146, 93–104.

-Beketov, M.A., and Liess, M. (2008). Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. Environ. Toxicol. Chem. 27, 461.

-Blockwell, S.J., Taylor, E.J., Jones, I., and Pascoe, D. (1998). The Influence of Fresh Water Pollutants and Interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the Feeding Activity of Gammarus pulex (L.). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34, 41–47.

-Burggren, W.W. (2015). Dynamics of epigenetic phenomena: intergenerational and intragenerational phenotype "washout." J. Exp. Biol. 218, 80–87.

-Charron, L., Geffard, O., Chaumot, A., Coulaud, R., Queau, H., Geffard, A., and Dedourge-Geffard, O. (2013). Effect of water quality and confounding factors on digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum*. Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 9044–9056.

-Chaumot, A., Coulaud, R., Adam, O., Quéau, H., Lopes, C., Geffard, O. (2019). *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 1- gauging the confounding influence of temperature and water hardness. Submitted article.

-Ciliberti, A., Chaumot, A., Recoura-Massaquant, R., Chandesris, A., François, A., Coquery, M., Ferréol, M., and Geffard, O. (2017). Caged *Gammarus* as biomonitors identifying thresholds of toxic metal bioavailability that affect gammarid densities at the French national scale. Water Res. 118, 131–140.

-Claver, A., Ormad, P., Rodríguez, L., and Ovelleiro, J.L. (2006). Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). Chemosphere 64, 1437–1443.

-Coulaud, R. (2012). Modélisation et changement d'échelles pour l'évaluation écotoxicologique : Application à deux macroinvertébrés aquatiques, *Gammarus fossarum* (crustacé amphipode) et *Potamopyrgus antipodarum* (mollusque gastéropode).

-European Chemicals Bureau (ECB). (2006). European Union Risk Assessment Report 65: 3,4-dichloroaniline.

-Girling, A.E., Tattersfield, L., Mitchell, G.C., Crossland, N.O., Pascoe, D., Blockwell, S.J., Maund, S.J., Taylor, E.J., Wenzel, A., Janssen, C.R., et al. (2000). Derivation of Predicted No-Effect Concentrations for Lindane, 3,4-

Dichloroaniline, Atrazine, and Copper. Ecotoxicol. Environ. Saf. 46, 148–162.

-Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., and Geffard, O. (2011a). DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. Environ. Pollut. 159, 1682–1691.

-Lacaze, E., Geffard, O., Goyet, D., Bony, S., and Devaux, A. (2011b). Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. Environ. Res. 111, 626–634.

-Lampert, I.T., W. (2002). The Juvenile Growth Rate of *Daphnia*: A Short-Term Alternative to Measuring the Per Capita Rate of Increase in Ecotoxicology? Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42, 193–198.

-Maltby, L., Naylor, C., and Calow, P. (1990). Effect of stress on a freshwater benthic detritivore: scope for growth in *Gammarus pulex*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 19, 285–291.

-Mucig, C. (2009). Évaluation du potentiel génotoxique de pesticides utilisés en viticulture, approche sur lignées cellulaires de truite. Mémoire de master recherche. ENTPE, Vaulx-en-Velin. 74 p.

-Riesch, R., Plath, M., and Schlupp, I. (2012). The offspring size/fecundity trade-off and female fitness in the Atlantic molly (*Poecilia mexicana*, Poeciliidae). Environ. Biol. Fishes 94, 457–463.

-Rose, R.M., Warne, M.St.J., and Lim, R.P. (2004). Sensitivity of offspring to chronic 3,4-dichloroaniline exposure varies with maternal exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 58, 405–412.

-Stoks, R., and Córdoba-Aguilar, A. (2012). Evolutionary Ecology of Odonata: A Complex Life Cycle Perspective. Annual Review of Entomology 57, 249–265.

-Smith, C.C., and Fretwell, S.D. (1974). The Optimal Balance between Size and Number of Offspring. Am. Nat. 108, 499–506.

-Taylor, E.J., Maund, S.J., and Pascoe, D. (1991). Toxicity of four common pollutants to the freshwater macroinvertebrates *Chironomus riparius* Meigen (Insecta: Diptera) and *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea: Amphipoda). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 21, 371–376.

-Taylor, E.J., Maund, S.J., Bennett, D., and Pascoe, D. (1994). Effects of 3, 4-dichloroaniline on the growth of two freshwater macroinvertebrates in a stream mesocosm. Ecotoxicol. Environ. Saf. 29, 80–85.

Données supplémentaires :

FIGURE S1

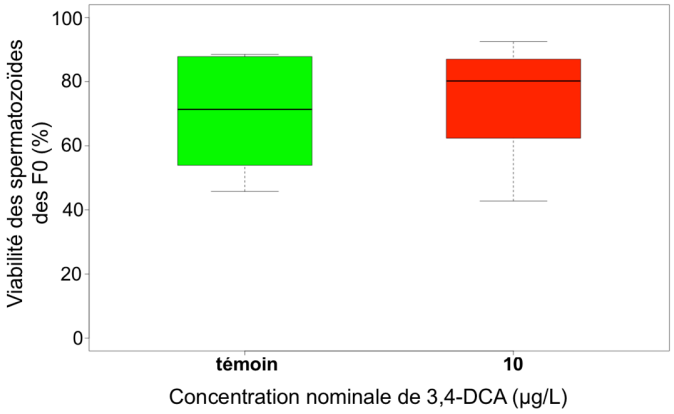


Figure S 1 : Viabilité des spermatozoïdes des F0 (%), n = 10.

FIGURE S2

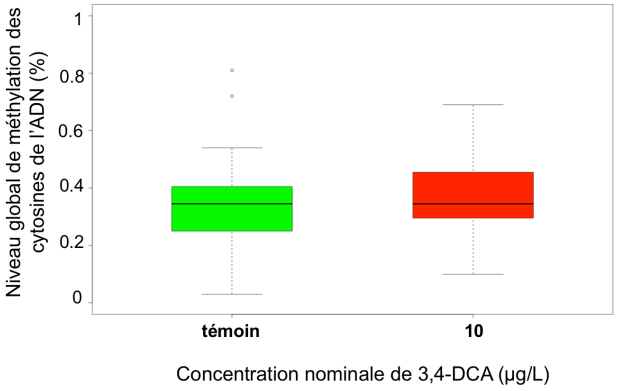


Figure S 2 : Niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN (%), n = 20.

FIGURE S3

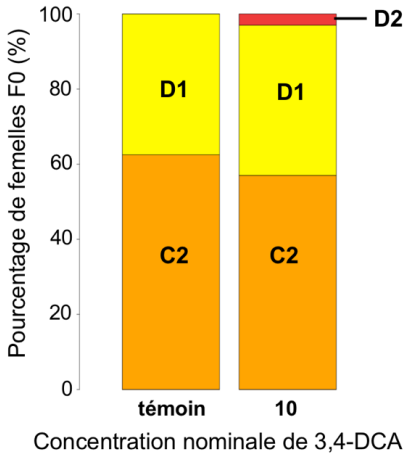


Figure S 3 : Pourcentage de femelles F0 à chaque stade de mue, n=10.

FIGURE S4

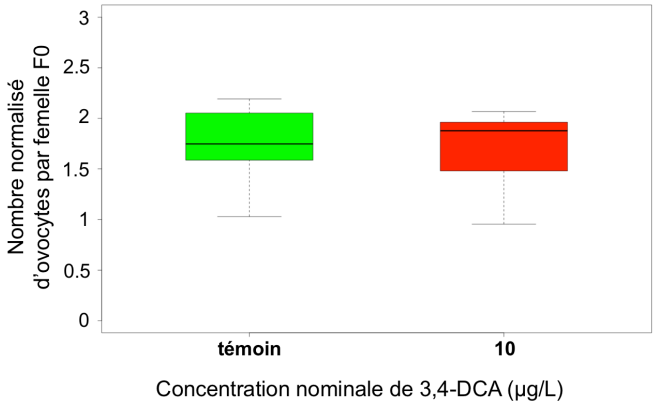


Figure S 4 : Nombre normalisé d'ovocytes par femelle F0, n=10.

FIGURE S5

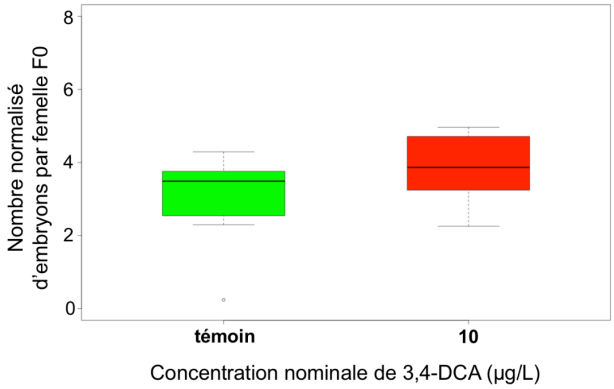


Figure S 5 : Nombre normalisé d'embryons par femelle F0, n=10.

FIGURE S6

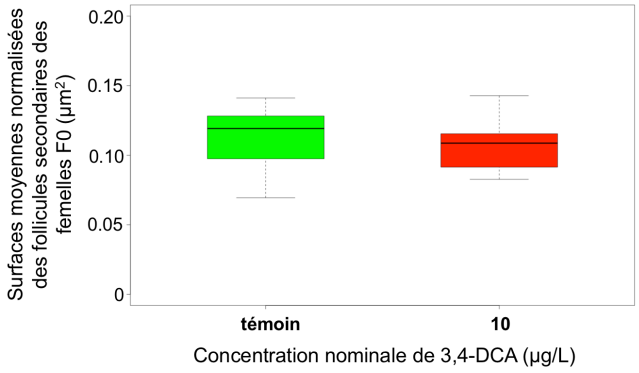


Figure S 6 : Surfaces moyennes normalisées des follicules secondaires des femelles F0, n=10.

FIGURE S7

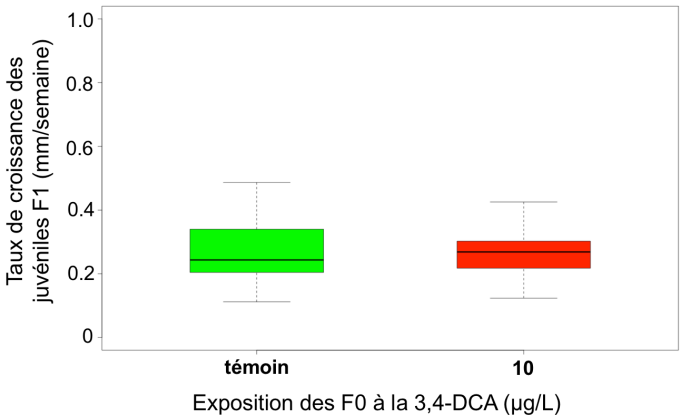


Figure S 7 : Taux de croissance des juvéniles F1 (mm/semaine), n = 25.

FIGURE S8

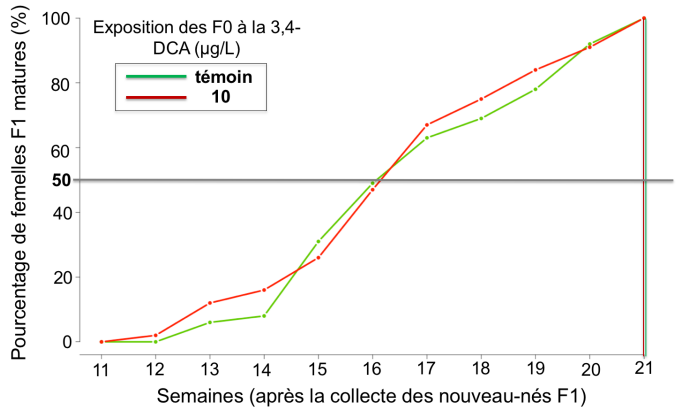


Figure S 8 : Pourcentage de femelles F1 matures (%), témoin : n = 51 ; 10 µg 3,4-DCA/L : 57.

FIGURE S9

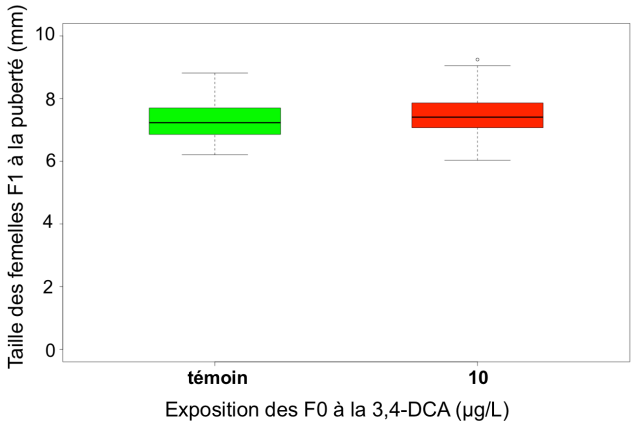


Figure S 9 : Taille des femelles F1 à la puberté (mm), témoin : n=45 ; 10 µg 3,4-DCA/L : 52.

FIGURE S10

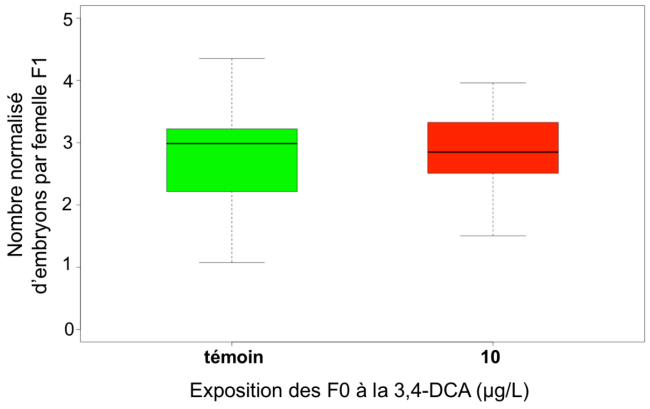


Figure S 10 : Nombre normalisé d'embryons par femelle F1, témoin : n=19 ; 10 µg 3,4-DCA/L : 15.

FIGURE S11

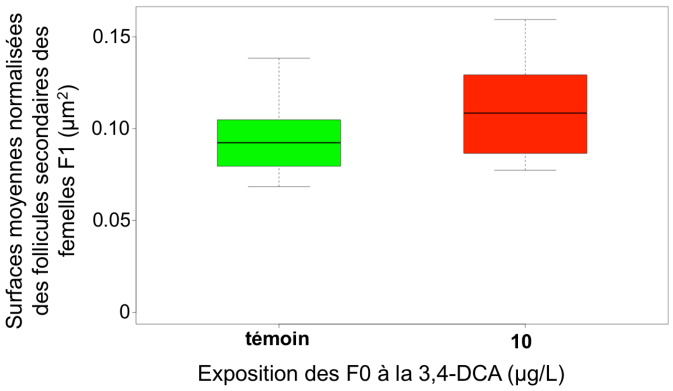


Figure S 11 : Surfaces moyennes normalisées des follicules secondaires des femelles F1, témoin : n=16 ; 10 µg 3,4-DCA/L : 14.

FIGURE S12

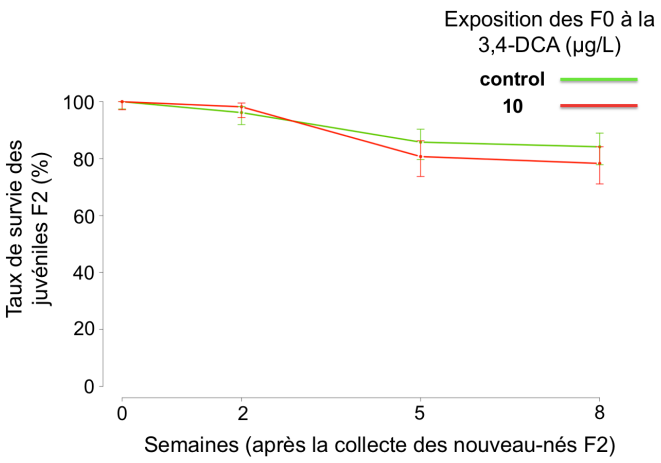


Figure S 12 : Taux de survie des juvéniles F2.

FIGURE S13

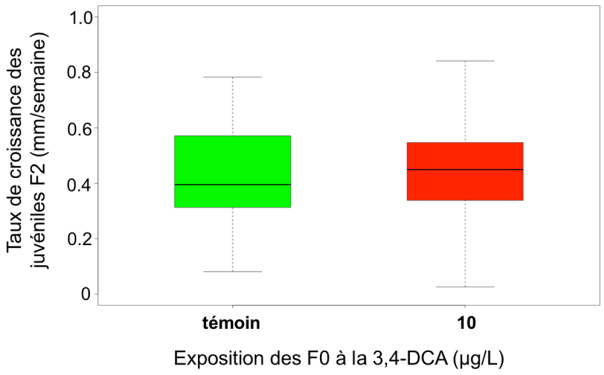


Figure S 13 : Taux de croissance des juvéniles F2 (mm/semaine), témoin : n= 25 ; 10 µg 3,4-DCA/L : n = 23.

FIGURE S14

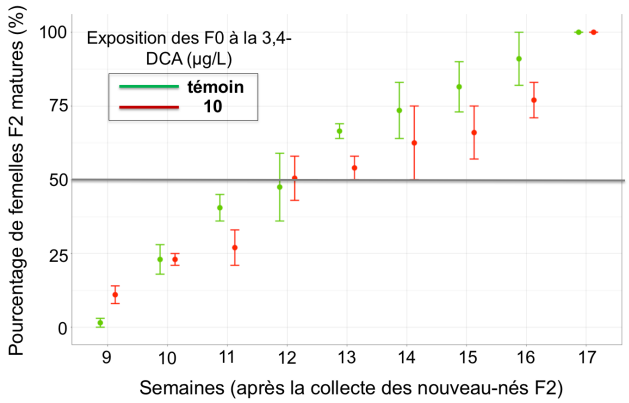


Figure S 14 : Pourcentage de femelles F2 matures (%), lot 1, témoin : n = 29 ; 10 µg 3,4-DCA/L : 12 et lot 2, témoin : n = 11 ; 10 µg 3,4-DCA/L : 14. Les points correspondent à la moyenne des pourcentages de femelles F2 matures dans les deux lots et les barres aux écarts-types.

FIGURE S15

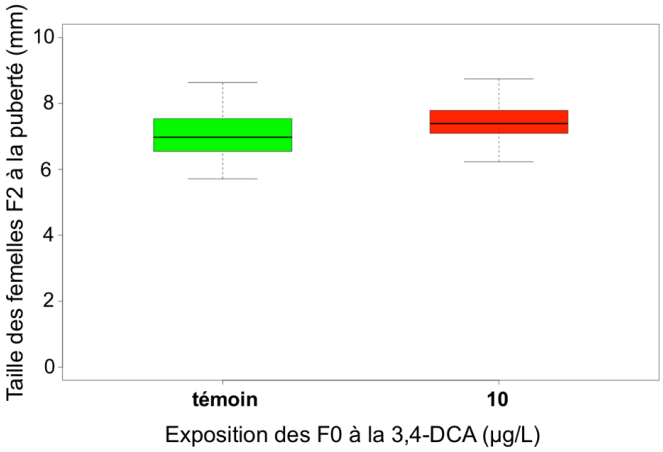


Figure S 15 : Taille des femelles F1 à la puberté (mm), témoin : n=57 ; 10 µg 3,4-DCA/L : 39.

FIGURE S16

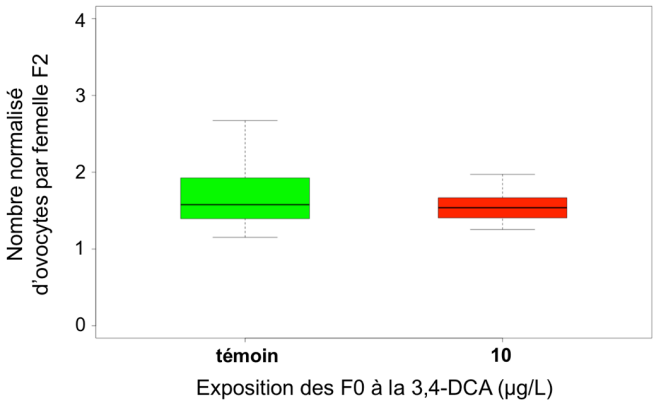


Figure S 16 : Nombre normalisé d'ovocytes par femelle F2, témoin : n = 16 ; 10 µg 3,4-DCA/L : 15.

FIGURE S17

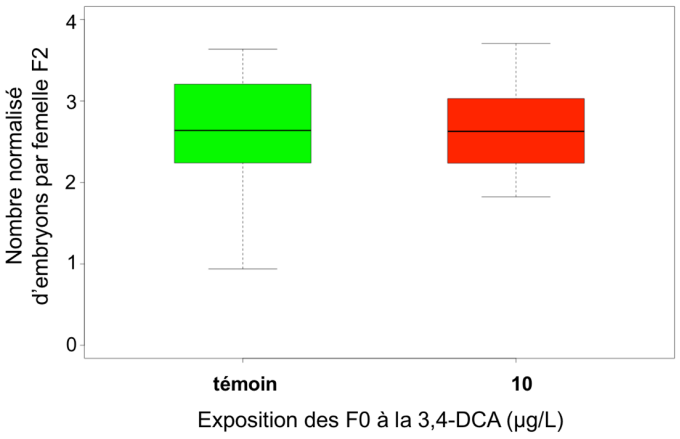


Figure S 17 : Nombre normalisé d'embryons par femelle F2, témoin : n = 16 ; 10 µg 3,4-DCA/L : 15.

FIGURE S18

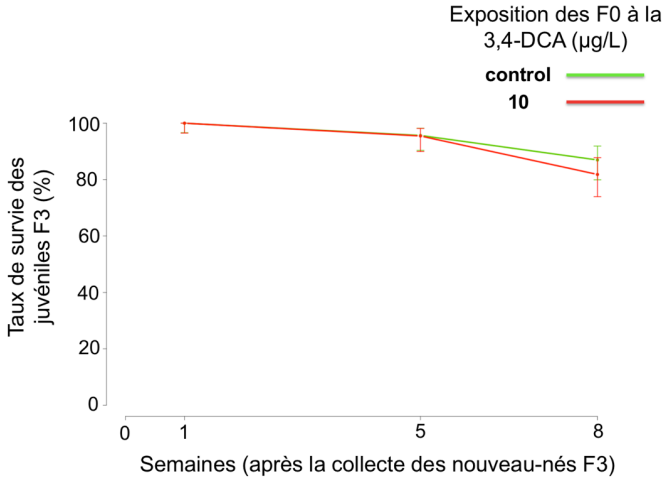


Figure S 18 : Taux de survie des juvéniles F3. Les juvéniles n'ont pas été comptés de manière précise lors de leur collecte, la survie a donc été calculée à partir de la 1ère semaine après la collecte.

IV.3. Note n°3 : Résultats préliminaires d'une exposition à des cocktails de contaminants par encagement de gammares *in situ*.

À l'heure actuelle, seulement quelques études ont évalué les conséquences d'une exposition environnementale *in situ* sur les générations successives de descendants. Chez *Gammarus fossarum*, Lacaze et al., 2011b ont par exemple étudié le développement embryonnaire des descendants F1 issus de parents encagés au cours de la phase de gamétogénèse sur des sites localisés à la sortie de stations d'épuration ou présentant des contaminations métalliques environnementales. Cette approche recourant au monitoring actif par encagement d'organismes présente l'avantage de prendre en compte la complexité (effet cocktail) et la biodisponibilité des mélanges de contaminants présents. Elle permet également d'avoir un contrôle des organismes utilisés (origine connue et variables physiologiques contrôlées). Concernant les différents marqueurs d'effets biologiques employés au cours de cette thèse, différents protocoles permettant leur mesure *in situ* ont été développés pour l'espèce *Gammarus fossarum* tels que les dommages primaires à l'ADN (Lacaze et al., 2011a), les taux d'alimentation (Coulaud et al., 2011) et les données de reproduction (Coulaud et al., 2014). D'autre part, pour chacun de ces marqueurs, des valeurs de référence intégrant leur variabilité naturelle (en réponse aux facteurs environnementaux non maîtrisables) et des valeurs seuils à partir desquels la réponse peut être qualifiée de toxique ont été définis.

Sur la base de ce savoir-faire technique et afin d'explorer l'occurrence d'effets différés dans des contextes de contamination environnementale réelle, des organismes *Gammarus fossarum* issus d'un même site de référence ont été transplantés en octobre 2017 au cours de la phase de gamétogénèse sur 7 sites d'étude aux profils de contamination contrastés et dont la toxicité a déjà été caractérisée lors de précédentes expositions *in situ* de *G. fossarum*. : Pol, Mand, Tour, Bj, Jam, Tur et Gie (voir description au paragraphe II.2.1).

Compte-tenu du nombre important de sites expérimentés, nous avions fait le choix de séparer le déploiement des encagements sur deux campagnes espacées d'une semaine : une première composée des sites Tur, Jam, Gie et Bj et une seconde des sites Pol, Mand et Tour. Les organismes utilisés pour ces deux campagnes ont tous été issus d'une même pêche sur le

site de référence de la cressonnière du Bugey à Saint-Maurice-de-Rémens (voir description au paragraphe II.1.1). Pour chaque campagne, les gammares ont été triés au laboratoire la veille du déploiement des caisses d'encagement sur les différents sites. Le nombre d'organismes pêchés a permis de lancer pour chaque site une expérimentation avec seulement 200 couples (contre 400 habituellement) répartis dans 20 systèmes et 125 mâles calibrés en taille répartis dans 4 autres systèmes. Ces derniers étaient destinés à la réalisation du test alimentation 7 jours après le lancement de l'exposition *in situ*. Face à ce nombre réduit d'organismes disponibles, nous avons été contraints d'élargir la gamme de taille des organismes encagés sur les sites lors de la seconde campagne (Pol, Mand et Tour). L'ensemble des procédures d'encagement *in situ*, de maintien des organismes au laboratoire et des diverses mesures réalisées sur la génération parentale et la F1 sont décrites dans le Chapitre II.

Comme le montre la Figure IV - 1, les niveaux de dommages primaires à l'ADN mesurés sur les spermatozoïdes de mâles F0 encagés sur les sites connus pour présenter des niveaux de contamination importants (*i.e.* Bj, Gie, Jam et Tur) sont du même ordre de grandeur que ceux déjà observés chez *Gammarus fossarum* suite à des expositions *in situ* en aval de stations d'épuration et sur des sites présentant de la contamination métallique (Lacaze et al., 2011a). Plus spécifiquement, les niveaux de dommages observés chez les mâles F0 transplantés sur le site BJ, localisé en aval de la station d'épuration de Bourgoin-Jallieu, sont cohérents avec les niveaux rapportés par Lacaze et al. (2011a) suite à l'encagement de *Gammarus fossarum* en aval de cette même station d'épuration (Figure IV - 1). Concernant les trois sites *a priori* de référence (*i.e.* Pol, Mand et Tour), les niveaux de dommages à l'ADN observés sont conformes aux valeurs de référence définies chez *Gammarus fossarum* (Lacaze et al., 2011a).

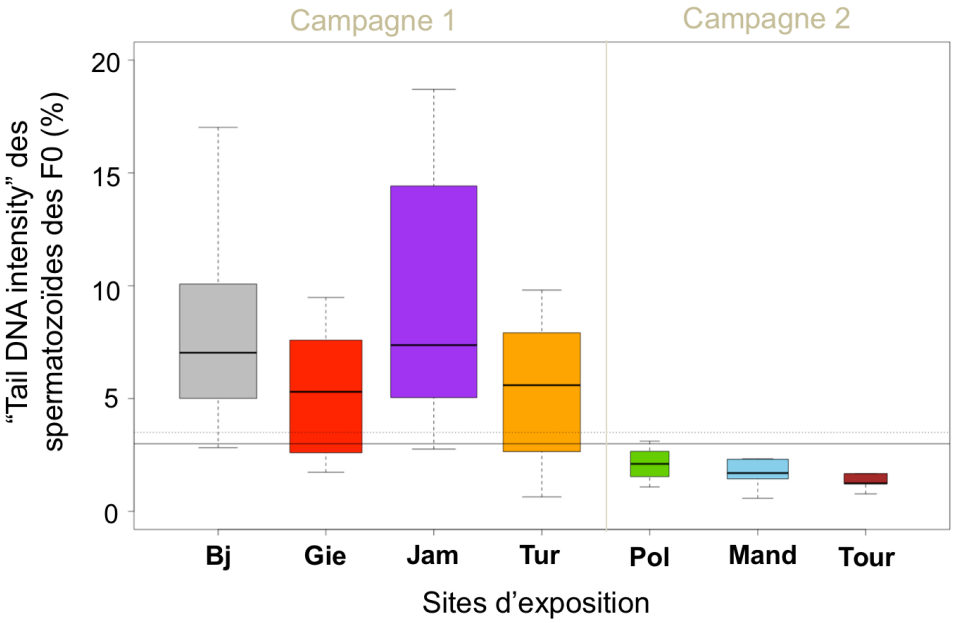


Figure IV - 1 : Moyenne des dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes des parents F0, Pol : n = 4 ; Mand : n = 10, Tour : n = 5, Bj : n = 16, Gie : n = 14, Jam : n = 20 et Tur : n = 16. Le trait noir plein correspond aux niveaux de dommages primaires à l'ADN attendus en absence de contamination, et la ligne en pointillé, au seuil de 5% au-dessus duquel l'effet mesuré est significatif et peut être qualifié d'effet toxique (Lacaze, 2011a).

Les niveaux globaux de méthylation des cytosines sont significativement différents entre les sites Mand/Jam et Tour/Jam à la suite des 21 jours d'expositions *in situ* et de 7 jours de stabulation post-exposition au laboratoire avec une hypométhylation sur le site contaminé Jam (test de Dunn avec correction de Bonferroni, p-value <0,05) (Figure IV - 2).

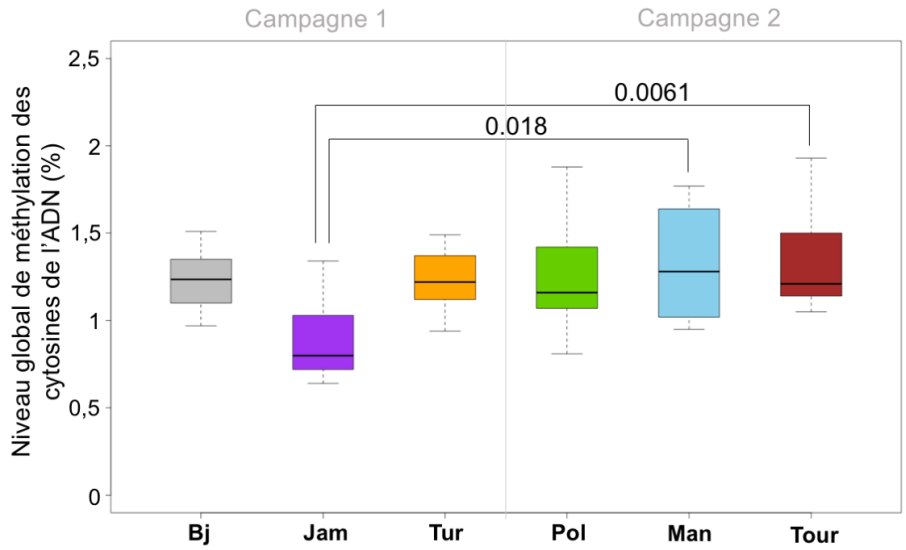


Figure IV - 2 : Niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN (%), n = 10. Test de Dunn, p-value < 0.05 indiquée sur le graphique.

La comparaison des marqueurs de reproduction des femelles F0 de la première campagne aux valeurs de référence montre que le nombre d'ovocytes par femelle F0 est anormalement bas pour l'ensemble des sites à l'exception du site Jam de la campagne 1 (Figure IV - 3). Concernant le nombre d'embryons mesuré lors de la campagne 1, seules les femelles encagées sur le site BJ possèdent un nombre d'embryon en-dessous du seuil de référence (Figure IV - 4). Lors de la campagne 2, les femelles encagés sur 2 des 3 sites de référence présentent un nombre d'embryons inférieur au seuil de référence (Figure IV - 4). Le nombre réduit d'ovocytes et d'embryons chez les femelles transplantées sur des sites *a priori* de référence suggère une mauvaise qualité du lot de femelles utilisées lors de la campagne 2. Compte-tenu des niveaux de dommages primaires à l'ADN observés dans les spermatozoïdes des mâles F0 encagés sur ces sites, une contamination ponctuelle est peu probable et ne semble donc pas pouvoir expliquer la diminution du nombre d'ovocytes constatée (Figure IV - 3). L'hypothèse d'un effet négatif de la stabulation prolongée au laboratoire sur le second lot de femelles utilisé pour la campagne 2 peut être avancé.

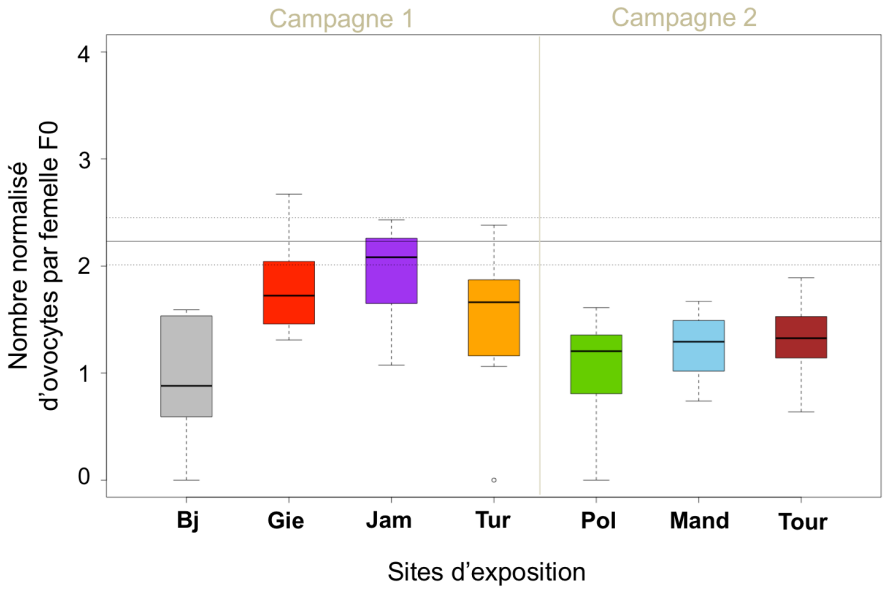


Figure IV - 3 : Nombre normalisé d'ovocytes par femelle F0, n = 10. Le trait noir plein correspond au nombre normalisé d'ovocytes moyen attendu en absence de contamination, et la ligne en pointillé, au seuil de 5% calculé pour 10 femelles en dessous duquel l'effet mesuré est significatif et peut être qualifié d'effet toxique. (données du laboratoire Ecotox d'IRSTEA de Lyon).

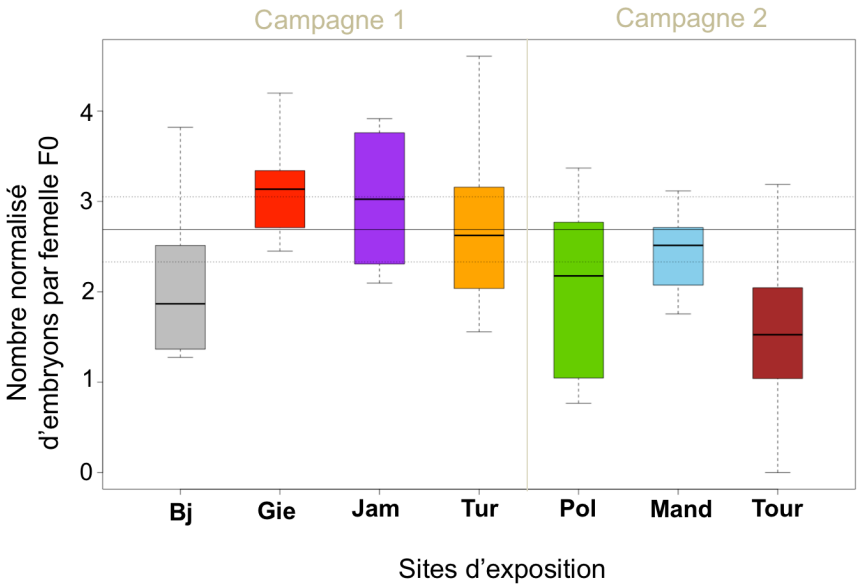


Figure IV - 4 : Nombre normalisé d'embryons par femelle F0, n = 10. Le trait noir plein correspond au nombre normalisé d'embryons moyen attendu en absence de contamination, et la ligne en pointillé, au seuil de 5% calculé pour 10 femelles en dessous duquel l'effet mesuré est significatif et peut être qualifié d'effet toxique (données du laboratoire Ecotox d'IRSTEA de Lyon).

Concernant le maintien et la reproduction des organismes F0 à leur retour du terrain, le nombre de descendants F1 récupérés a été particulièrement faible pour le site de référence Mand par rapport à l'ensemble des autres sites, malgré un nombre de femelles en reproduction important (Tableau IV - 1). La survie des juvéniles issus de ce site n'a donc pas pu être suivie.

Tableau IV - 1 : Nombre de femelles F0 en reproduction suite à l'exposition et de descendants F1 récupérés.

Site	Nombre de femelles F0 en reproduction suite à l'exposition	Nombre de nouveau-nés F1 récupérés
Pol	30	78
Mand	40	11
Tour	17	25
Bj	19	39
Gie	27	78
Jam	12	51

Tur	54	365

Une mortalité importante a été constatée chez les descendants F1 issus des parents encagés sur les sites Tur et Bj par comparaison aux survies observées lors des expérimentations au laboratoire (publications n°2 et 3) et celles des sites de référence Pol et Tour (Figure IV - 5).

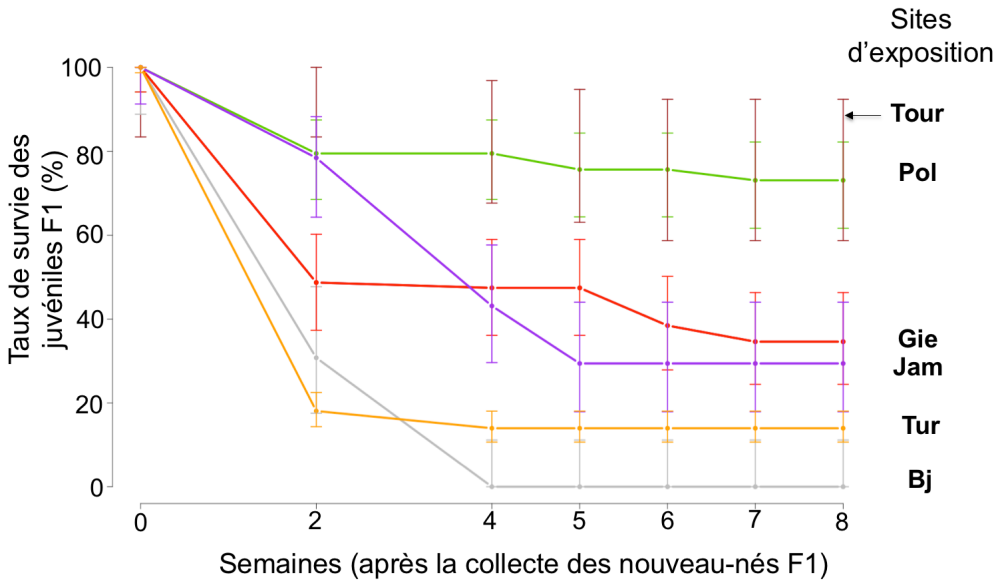


Figure IV - 5 : Taux de survie des juvéniles F1 (%).

Cette diminution des survies ne peut être attribuée à des différences de densité entre les conditions étant donné les densités équivalentes d'organismes dans les aquariums d'élevage. Cette mortalité juvénile semble pouvoir être mise en relation avec la toxicité différentielle observée chez les parents F0 en fonction des sites d'exposition, notamment l'extinction de la descendance F1 issue de l'exposition parentale sur le site Bj qui a induit les effets toxiques les plus importants chez les parents F0. Ce résultat préliminaire invite donc à réitérer des expérimentations *in situ* afin d'évaluer les effets inter et transgénérationnels dans différents contextes de contaminations environnementales.

En conclusion, l'expérimentation *in situ* n'a permis de répondre que partiellement à l'objectif d'exploration des effets différés suite à une exposition réaliste d'un point de vue environnemental fixé au départ. Malgré les difficultés associées à cette expérimentation de terrain, quelques résultats peuvent être soulignés. Les organismes encagés en aval du rejet d'une station d'épuration sur le site Bj semble avoir été fortement impactés par

l'exposition en termes d'effets sur la fécondité, la fertilité et l'intégrité de l'ADN spermatique. Cette toxicité élevée semble également avoir induit une mortalité importante chez les descendants F1. Ces effets peuvent être mis en regard des niveaux d'eau particulièrement bas observés pendant la période d'encagement des organismes sur le site BJ, qui ont pu exacerber l'impact du rejet de la station d'épuration sur la qualité du milieu récepteur. De plus, les dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes observés chez les organismes encagés sur les sites d'étude connus pour être contaminés sont à des niveaux similaires à ceux constatés lors des deux expérimentations transgénérationnelles réalisées au laboratoire (publication n°2 et publication n°3). Cela confirme l'obtention de niveaux de toxicité pertinents sur le plan environnemental lors de ces deux dernières expérimentations.

Chapitre V. Discussion générale

La première partie de ce chapitre questionne la méthodologie d'évaluation des effets différés inter et transgénérationnels qui a été suivie dans ce travail de thèse. Dans un deuxième temps, la typologie et l'interprétation à l'échelle de la population des effets différés mis en évidence lors des deux expérimentations transgénérationnelles avec le cadmium et la 3,4-dichloroaniline sont présentés. Au regard des résultats obtenus dans cette thèse, est également discuté l'intérêt de mener des études portant sur les effets inter et transgénérationnels dans le contexte de l'évaluation des risques et de la compréhension des réponses populationnelles à un stress chimique. La troisième partie se focalise sur les deux marqueurs moléculaires suivis dans les expérimentations transgénérationnelles que sont les dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes et les niveaux de méthylation globale des cytosines de l'ADN. La valeur prédictive de ces marqueurs y est notamment abordée. Une dernière partie interroge l'intérêt en écotoxicologie d'étendre les études sur les effets différés aux espèces « environnementales » non-modèles de laboratoire.

V.1. Méthodologie d'évaluation des effets différés inter et transgénérationnels chez *Gammarus fossarum*

Afin d'explorer les effets différés inter et transgénérationnels d'une exposition au stress chimique et leurs conséquences sur le fonctionnement des populations d'une espèce « environnementale » non-modèle de laboratoire (*i.e*. organismes issus de populations vivant en milieu naturel), des expositions limitées à la génération parentale initiale (F0) ont été réalisées chez *Gammarus fossarum*. Les générations successives de descendants ont ensuite été élevées en condition non-contaminée au laboratoire.

Relevant le défi d'un temps expérimental conséquent compte-tenu de la durée du cycle de vie de *Gammarus fossarum*, nous sommes parvenus à suivre les générations successives sur plus d'un an d'expérimentation lors de deux études distinctes (exposition parentale au cadmium et à la 3,4-dichloroaniline). Ce travail précurseur a permis la mise en place de protocoles d'élevage et de mesures, qui ont évolué pendant la durée des expérimentations. Par exemple, augmenter le volume du réservoir intermédiaire entre l'arrivée de l'eau de forage et les aquariums d'élevage a permis de stabiliser les conditions physico-chimiques de l'eau de forage avant son acheminement dans les aquariums. Le protocole de sélection des femelles utilisées pour les mesures relatives à la reproduction a également été amélioré au fur et à mesure des expérimentations transgénérationnelles. Pour la génération F1 de l'expérimentation cadmium, les femelles ont été sélectionnées de manière aléatoire et en une seule fois, mais une forte hétérogénéité des stades de mue a été observée, rendant l'analyse des paramètres de reproduction complexe. Pour pallier cette difficulté, par la suite, les femelles des générations de descendants ont été sélectionnées aux stades C2-D1, trois fois par semaine après avoir récupéré les nouveau-nés destinés à produire la génération suivante.

L'analyse de l'ensemble des résultats des expérimentations transgénérationnelles a été réalisée en prenant pour référence les témoins de la même génération et de la même expérimentation. Compte-tenu de la variabilité des valeurs témoins que nous avons observée d'une génération à l'autre et entre les deux expérimentations, ce choix présente toutefois certaines limites d'interprétation, notamment dans le cadre d'une éventuelle application en routine de ce type de protocole pour l'évaluation des effets transgénérationnels des substances.

En effet, cette variabilité est susceptible de modifier la sensibilité de détection des effets et ainsi limiter la comparabilité des résultats, notamment dans une démarche de priorisation des substances en fonction du danger transgénérationnel. Par exemple, dans l'expérimentation avec le Cd, les taux de croissance des juvéniles F3 témoins sont plus élevés que ceux observées chez les générations F1 et F2, ce qui peut avoir augmenté la sensibilité de détection et l'ampleur de la diminution de la taille constatée chez les juvéniles F3 issus de l'exposition parentale au Cd.

Les différences observées entre les valeurs témoins d'une expérimentation à l'autre (avec Cd et 3,4-DCA) peuvent s'expliquer par un effet temporel aléatoire ou par le fait que les populations sources utilisées dans ces deux expériences ne sont pas les mêmes. La variabilité des valeurs témoins entre les générations peut quant à elle provenir d'une fluctuation naturelle d'une génération à l'autre ou de l'effet du maintien en conditions artificielles au laboratoire. Toutefois, lorsque la variabilité des témoins entre les générations est prise en compte dans l'analyse des résultats, les effets majeurs relevés au cours des expérimentations transgénérationnelles restent marqués. Par exemple, pour l'expérimentation avec la 3,4-DCA, l'augmentation du nombre d'ovocytes des femelles F1 et des surfaces ovocytaires des femelles F2 issues de la condition contaminée sont significatives, que ces paramètres soient comparés à la condition témoin de la génération correspondante (chapitre IV, publication n°3) ou à l'agrégation des conditions témoins F0, F1 et F2 (Figure V - 1, A et B).

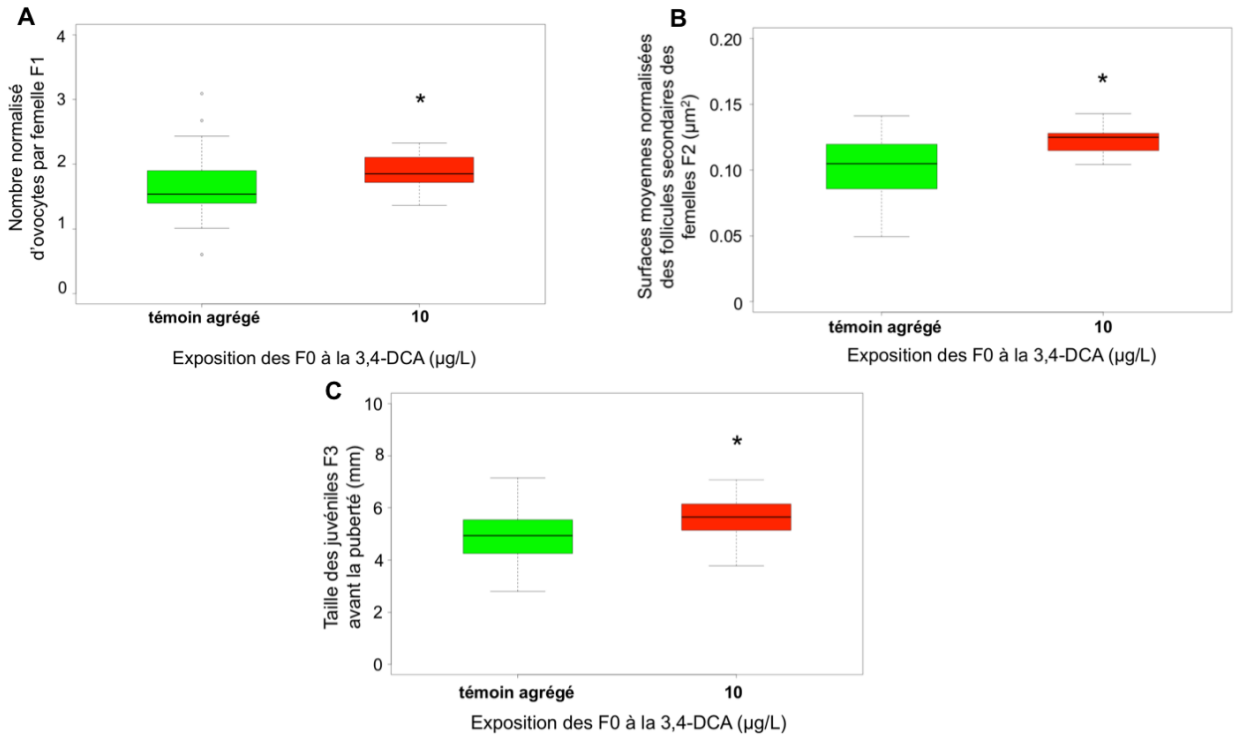


Figure V - 1 : Effets différés après exposition parentale à la 3,4-DCA : comparaison aux résultats agrégés des générations témoins. (A) Nombre normalisé d'ovocytes par femelle F1, témoin agrégé (F0, F1 et F2) : n = 45, 10 µg 3,4-DCA/L : n = 15. Test de Mann-Whitney, p-value = $6.8*10^{-3}$ (B) Surfaces moyennes normalisées des follicules secondaires des femelles F2 (μm^2), témoin agrégé (F0, F1 et F2) : n = 42, 10 µg 3,4-DCA/L : n = 13. Test de Mann-Whitney, p-value = $3.1*10^{-3}$ (C) Taille des juvéniles F3 à 8 semaines (mm), témoin agrégé (F1, F2 et F3) : n = 244, 10 µg 3,4-DCA/L : n = 96. Test de Mann-Whitney, p-value = $5.8*10^{-12}$.

Il en est de même pour l'augmentation des tailles des juvéniles F3 avant leur entrée en puberté (*i.e.* 8 semaines après leur collecte), comparées aux tailles rassemblées des juvéniles témoins F1, F2 et F3 (Figure V - 1, C). Pour l'expérimentation au Cd, lorsque les valeurs témoins du nombre d'embryons par femelle, mesurées sur les générations F0, F1 et F2 sont agrégées et comparées au nombre d'embryons des femelles F1 issues de l'exposition parentale à la plus forte concentration en Cd, les différences restent elles aussi significatives (Figure V - 2, A).

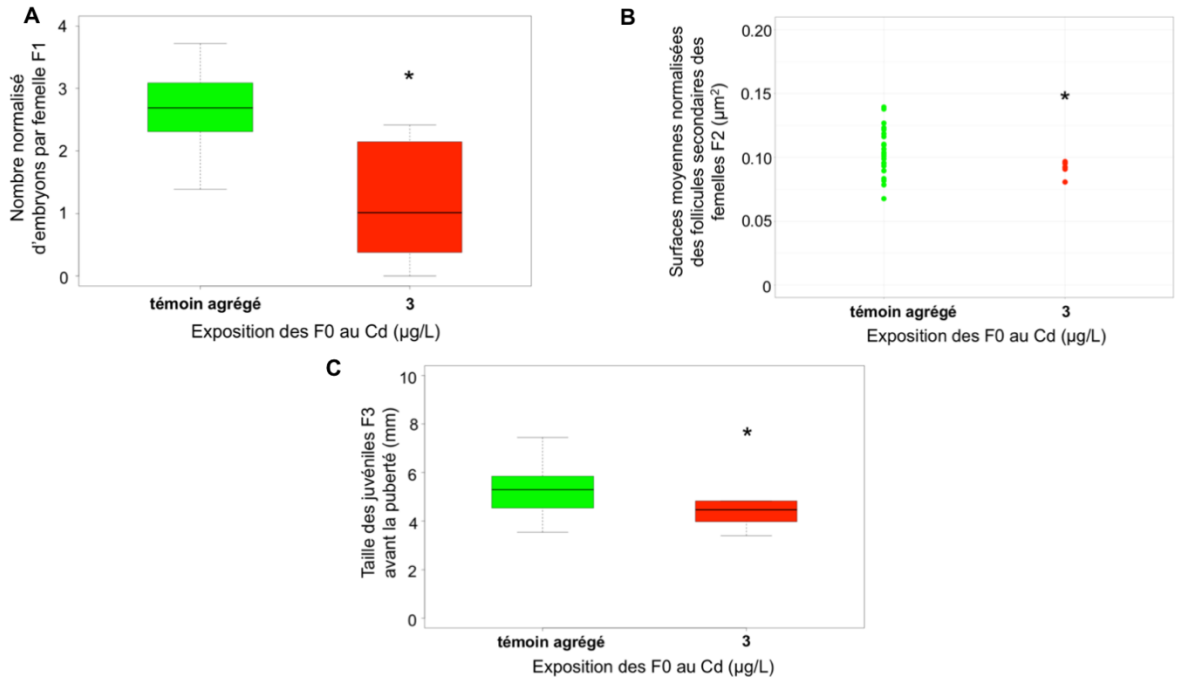


Figure V - 2 : Effets différés après exposition parentale au Cd : comparaison aux résultats agrégés des générations témoins. (A) Nombre normalisé d'ovocytes par femelle F1, témoin agrégé (F0, F1 et F2) : n = 20, 3 µg Cd/L : n = 8. Test de Mann-Whitney, p-value = $2.2*10^{-4}$. (B) Surfaces moyennes normalisées des follicules secondaires des femelles F2 (μm^2), témoin agrégé (F0, F1 et F2) : n = 23, 3 µg Cd/L : n = 7. Test de Mann-Whitney, p-value = 0.043. (C) Taille des juvéniles F3 à 8 semaines (mm), témoin agrégé (F1, F2 et F3) : n = 45, 3 µg Cd/L : n = 10. Test de Mann-Whitney, p-value = 0.049.

De même, les surfaces ovocytaires des femelles F2 et les tailles des juvéniles F3 mesurées avant la puberté (*i.e.* 8 semaines après leur collecte) de la condition contaminée (3 µgCd/L) sont significativement différentes des valeurs témoins agrégées (Figure V - 2, B et Figure V - 2, C). La puberté précoce observée chez les organismes F2 issus de l'exposition parentale au Cd ne peut être comparée avec les témoins des autres générations, la puberté n'ayant pas été suivie chez ces dernières. Cependant, cette précocité semble être forte, car 12 semaines après la collecte des nouveau-nés F2, la puberté a été atteinte par la totalité des femelles F2 suivies et issues de l'exposition des F0 au Cd, mais par moins de 50% des organismes témoins (publication n°2). De plus, la différence significative observée entre les tailles à la puberté des organismes des deux conditions (de l'ordre de 15%) renforce l'idée d'un lien entre cette puberté précoce et l'exposition parentale initiale (publication n°2).

La poursuite du travail de standardisation des protocoles d'élevage et de mesure ainsi que la possibilité de définir des valeurs de référence pour les différentes variables biologiques suivies viendraient consolider la robustesse des résultats obtenus dans le cadre d'études

réalisées sur des temps expérimentaux importants et basées sur la comparaison des conditions témoin et contaminé, comme dans ce présent travail de thèse.

V.2. Nature et interprétation populationnelle des effets différés des expositions parentales au stress chimique chez *Gammarus fossarum*

Les deux expérimentations transgénérationnelles présentées dans le Chapitre IV ont démontré l'émergence d'effets en cascade sur les traits d'histoire de vie au cours des générations successives de descendants issus de parents exposés à des concentrations environnementales de deux types de contaminants, un métal : le cadmium et le produit de dégradation de certains herbicides de type phényle-urée : la 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) (Figure V - 1 et Figure V - 2). L'observation d'effets différés inter et transgénérationnels, suite à l'exposition parentale à ces deux contaminants au mode d'action *a priori* différent, montre que l'apparition de ce type d'effet n'est pas anecdotique.

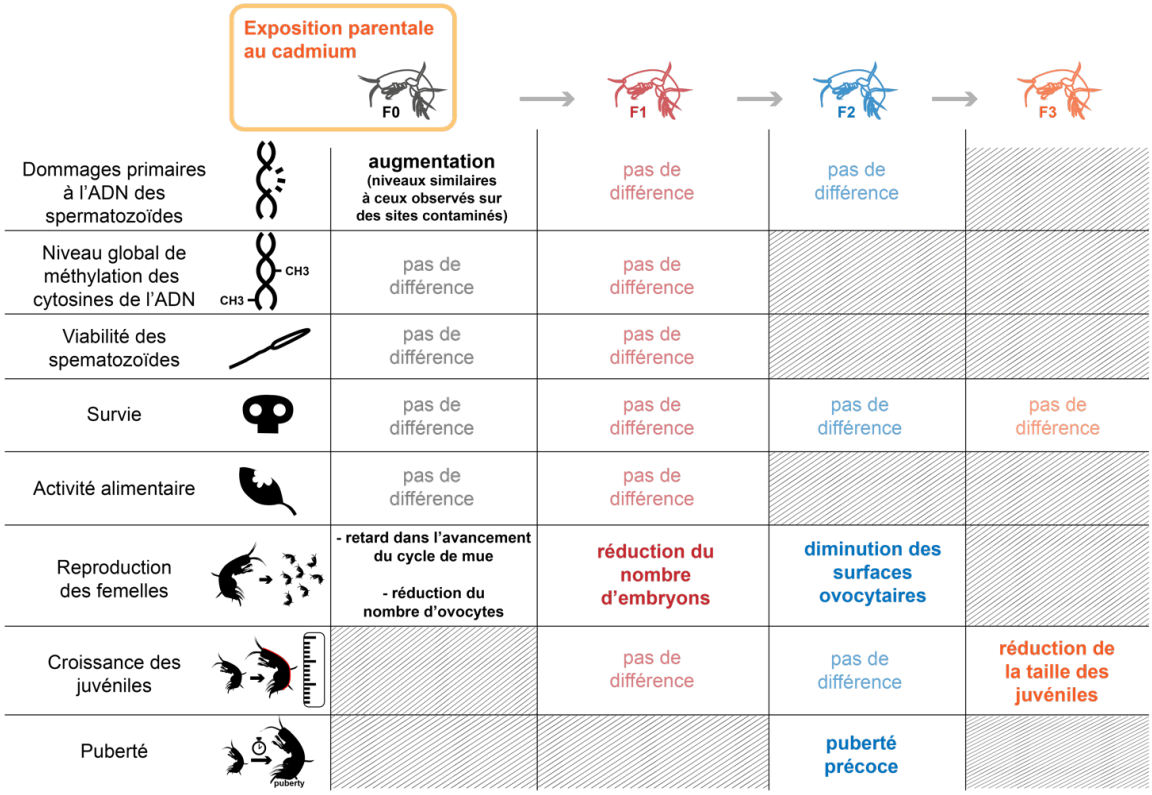


Figure V - 3 : Effets observés sur les traits d'histoire de vie et sur l'intégrité structurelle et fonctionnelle du génome au cours de trois générations suite à l'exposition parentale au Cd

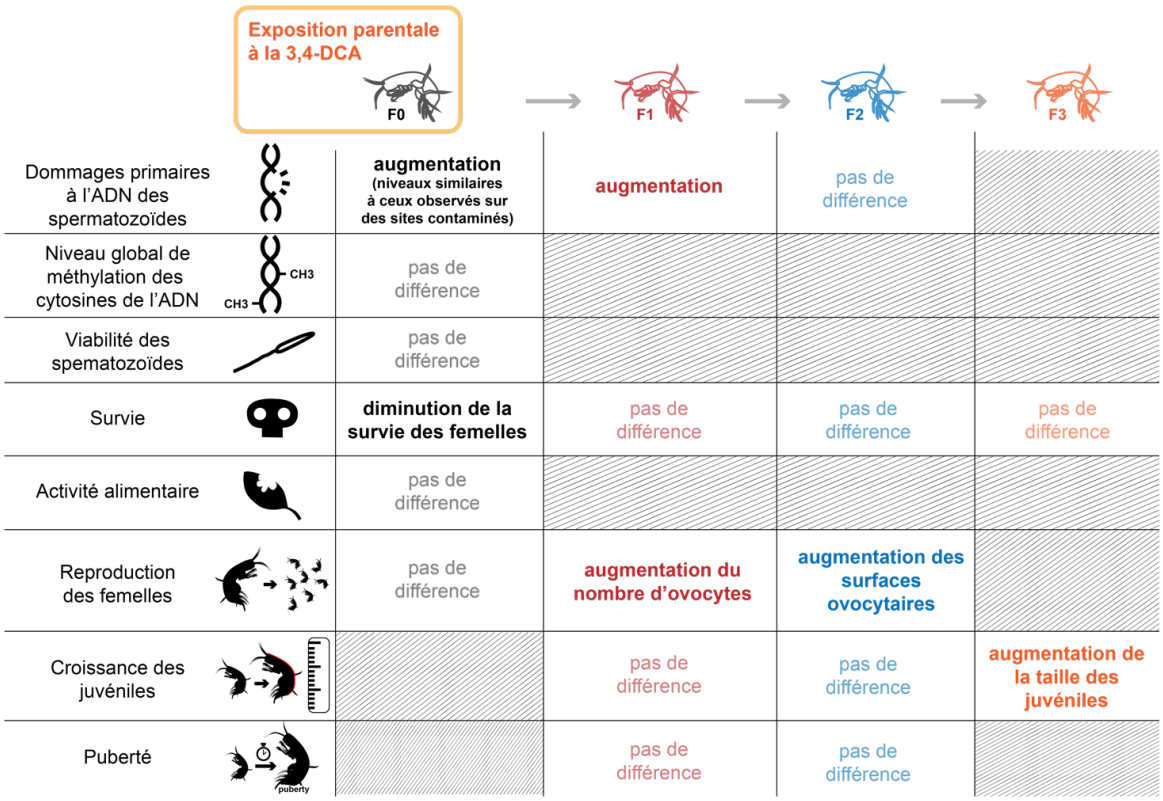


Figure V - 4 : Effets observés sur les traits d'histoire de vie et sur l'intégrité structurelle et fonctionnelle du génome au cours de trois générations suite à l'exposition parentale à la 3,4-DCA

Au regard de ces deux figures de synthèse des résultats des deux expérimentations transgénérationnelles (Figure V - 3 et Figure V - 4), les effets différés sur les traits d'histoire de vie observés au cours des générations successives sont différents. Comme attendu, ces résultats soulignent deux modes d'action distincts entre le cadmium et la 3,4-DCA sur les organismes exposés directement (F0) et lors de la gamétogénèse parentale (F1). Ils montrent également des modalités différentes d'émergence des effets transgénérationnels chez les générations F2 et F3.

Si les effets observés sur les traits d'histoire de vie lors des deux expérimentations transgénérationnelles diffèrent, ils ont en commun leur instabilité au fil des générations. Les effets sur une génération de descendants semblent avoir entraîné ceux de la génération suivante, ce qui suggère une dynamique des effets en cascade. En effet, pour l'expérimentation avec le cadmium, la diminution de la taille des portées chez les femelles F1 est corrélée avec l'émergence de femelles F2 présentant des traits d'histoire de vie susceptibles de traduire des patrons d'allocation d'énergie modifiés, à savoir un investissement plus rapide dans la

reproduction (*i.e*. puberté précoce) et une réduction de l'énergie investie ou disponible pour la reproduction (*i.e*. diminution des quantités de réserves vitellines) (Figure V - 3). Ces modifications d'investissement énergétique dans les processus reproductifs (*i.e.* les réserves vitellines des oeufs) observées chez les F2 semblent aboutir chez les descendants F3 à des taux de croissance et une taille 8 semaines après leur collecte significativement plus faibles que les organismes témoins. Pour l'expérimentation avec la 3,4-DCA, le changement d'allocation d'énergie observé chez les femelles F2, à savoir l'augmentation de l'énergie investie ou disponible pour la reproduction (*i.e.* augmentation des quantités de réserves vitellines), a conduit à une augmentation des taux de croissance et de la taille à 8 semaines chez les juvéniles F3 issus de l'exposition parentale initiale (Figure V - 4). Au bilan, nos travaux confirment la forte dynamique des effets différés mise en évidence dans de précédentes études (Burggren, 2015). Ils montrent également qu'il est difficile d'anticiper les effets inter et transgénérationnels sans un suivi des réponses au cours des générations successives en l'état actuel des connaissances sur les mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués dans l'émergence des effets différés. Or, le temps de réponse étudié dans les tests écotoxicologiques classiques se limite à la génération exposée et celui de la plupart des études portant sur les effets inter et transgénérationnels ne dépasse pas la première génération de descendants. La pertinence écologique de l'évaluation des risques pourrait ainsi être améliorée par la réalisation d'un nombre plus important d'études sur les effets différés au-delà de la première génération de descendants et sur les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Grâce au prolongement du temps de réponse étudié au-delà de la première génération de descendants et à l'utilisation d'un modèle de dynamique de population, nous avons pu constater, dans le cas du cadmium, que le patron de modifications des traits d'histoire de vie aboutissait à une compensation de l'impact démographique au cours des générations F1, F2 et F3 (publication n°2). Au regard de ce constat, la stratégie d'histoire de vie de l'espèce, qui conditionne les compromis d'allocation énergétique entre les traits d'historie de vie et entre les générations, semble contraindre la propagation des effets différés en cascade observés suite au stress cadmique. Ces conclusions, déduites à partir de la mesure de paramètres populationnels (*i.e*. le taux de croissance asymptotique de la population et la structure stable de la population), soulignent l'importance d'une interprétation au niveau populationnel pour appréhender l'émergence des effets différés sur la descendance.

Enfin, nos travaux ont mis en évidence des conséquences importantes à long terme sur la descendance (1 an) suite à une exposition courte des parents (21 jours) sur les traits d'histoire de vie de la population. En effet, une capacité de croissance réduite chez les organismes F2 issus de l'exposition parentale au Cd a été observée avec une taille à la puberté diminuée de 15% et un âge à la puberté réduit de 3 semaines par rapport à la condition témoin (50% des femelles F2 suivies atteignant la puberté au bout d'environ 13 semaines pour la condition témoin contre moins de 11 semaines pour la condition à 3 µg Cd/L). De même, une réduction des taux de croissance et des tailles avant la puberté (*i.e.* 8 semaines après leur collecte), respectivement de 40% et 30% par rapport aux témoins ont été constatés chez les juvéniles F3 issus des F0 exposés au Cd. Cette diminution de la capacité de croissance des organismes F3 peut être mise en perspective avec la réduction de la taille moyenne des adultes par rapport à celle des populations de référence, observée chez une population de *Gammarus fossarum* historiquement exposée au Cd et dont la tolérance résulte d'une acclimatation transgénérationnelle (Vigneron et al., 2015, 2019).

La réduction des capacités de croissance des organismes F2 et F3 intégrée dans le fonctionnement démographique de la population ne semble pas affecter sa dynamique de population. Cette conclusion est néanmoins à considérer avec précaution puisque l'arrêt de l'expérimentation nous a contraint à réaliser la paramétrisation des caractéristiques de reproduction de la génération F3 sur la base des données de la seconde génération (publication n°2). Compte-tenu du lien existant entre la taille des femelles et le nombre de descendants produits, la diminution de taille enregistrée chez les juvéniles F3 avant leur entrée en puberté peut avoir des incidences importantes sur la capacité reproductive des futures femelles et ainsi conduire à des conséquences démographiques nouvelles.

Dans l'hypothèse du maintien de la diminution de taille au sein de la population, la vulnérabilité des organismes face à de nouveaux changements environnementaux peut être modifiée. Par leur taille réduite, les organismes composant la population pourraient par exemple avoir un accès limité aux ressources alimentaires dans l'hypothèse d'une augmentation de la compétition intra et/ou interspécifique. D'autre part, de possibles conséquences sur le fonctionnement de l'écosystème aquatique pourraient également se manifester. Les processus de décomposition et d'incorporation de la matière organique d'origine terrestre et de la nécromasse aquatique auxquels les gammares participent (Kelly et al., 2002 ; Forrow et Maltby,

2000) pourraient par exemple être altérés et la biomasse disponible pour les nombreux prédateurs des gammares réduite (Macneil et al., 1997).

V.3. Valeur prédictive des marqueurs moléculaires génotoxiques et épigénétiques dans l'évaluation des effets différés

Dans ce travail de thèse, la mesure des dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes chez *Gammarus fossarum* par l'essai-comète a permis de marquer les expositions au cadmium et à la 3,4-DCA menées au laboratoire et de s'assurer que la pression toxique subie par les géniteurs était réaliste d'un point de vue environnemental (publication n°2 et publication n°3). En effet, les niveaux de dommages des parents exposés lors de ces deux expérimentations étaient du même ordre de grandeur que ceux observés suite à l'exposition *in situ* réalisée dans ces présents travaux par encagement de gammares sur des sites connus pour être contaminés (note n°3). Ils correspondent également à la gamme de valeurs observée lors du déploiement de ce marqueur de génotoxicité à la sortie de stations d'épuration et sur des sites présentant des contaminations métalliques environnementales (Lacaze et al., 2011a).

Un lien entre les niveaux de dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes de mâles exposés à un stress chimique et le développement embryonnaire des descendants F1 exposés au cours de la gamétogénèse parentale a été établi par Lacaze et al. (2011b). Sur la base de cette relation, les auteurs ont proposé une valeur seuil d'effet intergénérationnel de 20% « tail DNA intensity », à partir de laquelle l'effet observé sur la descendance F1 au stade embryonnaire peut être considéré comme significatif.

Dans les deux expérimentations transgénérationnels (Cd et 3,4-DCA) que nous avons réalisées, les niveaux de dommages primaires à l'ADN observés se trouvaient en-dessous de 20% de « tail DNA intensity ». La survie et la croissance des juvéniles F1 suivis au laboratoire après l'exposition des parents n'ont pas été affectées. Cette absence de conséquence de l'augmentation du niveau de dommage à l'ADN des spermatozoïdes sur les juvéniles F1 semble ainsi donner un poids supplémentaire à la valeur seuil d'effet de 20% de « tail DNA intensity » définie par Lacaze et al. (2011b).

Cependant, l'étude des effets au-delà du développement embryonnaire et juvénile des descendants F1 nous a permis de mettre en évidence, dans les deux cas d'étude, l'émergence

d'effets inter et transgénérationnels en dessous de la valeur seuil d'effet de 20% de « tail DNA intensity » établie par Lacaze et al. (2011b) (Figure V - 3 et Figure V - 4). Nos résultats démontrent ainsi l'intérêt de l'étude des effets inter et transgénérationnels sur les traits d'histoire de vie dans l'interprétation des réponses de marqueurs précoces d'effet comme les dommages primaires à l'ADN en termes de signification fonctionnelle pour l'individu.

Les niveaux de dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes constatés chez la génération parentale F0 exposée au Cd et à la 3,4-DCA se sont avérés être des marqueurs précoces, précédant l'émergence d'effets différés sur les traits d'histoire de vie observés au cours des générations successives. Cependant, ce marqueur de génotoxicité n'a pas permis d'anticiper qualitativement et quantitativement les modifications des traits d'histoire de vie et leurs conséquences populationnelles et écosystémiques potentielles. En effet, si les effets génotoxiques mesurés sur les gamètes des mâles exposés au Cd et à la 3,4-DCA sont à des niveaux similaires, les effets sur les traits d'histoire de vie observés au cours des générations successives et leurs impacts possibles sur la population et le fonctionnement des écosystèmes ont été très différents entre les deux expérimentations (Figure V - 3 et Figure V - 4). Par exemple, la diminution de la taille de 30% des organismes F3 issus de l'exposition parentale au Cd est susceptible de réduire la biomasse disponible dans la chaîne trophique et les quantités de matière organique recyclées. En revanche, l'augmentation de taille de l'ordre de 9% observée chez les organismes F3 issus de l'exposition parentale à la 3,4-DCA semble faible pour pouvoir engendrer un potentiel effet écologique.

L'occurrence d'impacts génotoxiques dans la descendance n'a été mise en évidence que chez les organismes F1 issus des parents exposés à la 3,4-DCA (publication n°3). Cela ne peut probablement pas s'expliquer par un transfert des dommages primaires à l'ADN des parents exposés aux descendants *via* les gamètes étant donné la réversibilité des dommages primaires à l'ADN. De même, l'hypothèse d'un effet génotoxique de la 3,4-DCA au cours du développement embryonnaire des organismes F1 suite au transfert de la molécule *via* l'ovocyte est peu probable. La 3,4-DCA présente en effet un faible potentiel de bioaccumulation avec un coefficient de partage octanol/eau égal à 2,7 et des facteurs de bioaccumulation calculés chez divers invertébrés compris entre 9 à 18 L/Kg (ECB, 2006). Finalement, des altérations épigénétiques ou génétiques interférant avec la machinerie de réparation de l'ADN et/ou avec les systèmes impliqués dans la compaction de l'ADN qui constituent une barrière essentielle

aux dommages structuraux chez le spermatozoïde pourraient être à l'origine des niveaux de dommages à l'ADN observés chez les descendants F1. Dans cette hypothèse, ces changements épigénétiques ou génétiques ne semblent pas s'être maintenus au sein de la population puisque les organismes F2 présentent des niveaux de dommages proches des valeurs de référence.

Compte-tenu du rôle supposé prépondérant, au regard de la littérature scientifique, des mécanismes épigénétiques dans l'apparition d'effets différés chez les organismes exposés et leur descendance (Youngson et Whitelaw, 2008 ; Barouki et al., 2018 ; Norouzitallab, 2019), une marque épigénétique, la méthylation globale des cytosines de l'ADN a été étudiée chez *Gammarus fossarum* et intégrée à la batterie de paramètres biologiques suivie dans le cadre des expérimentations transgénérationnelles. Nos résultats ont démontré l'existence d'une méthylation en C5 des cytosines de l'ADN chez *Gammarus fossarum*. Ils ont également révélé de faibles niveaux de méthylation globale des cytosines de l'ADN (*e.g.* population Cress, niveaux compris entre 0,38% et 0,61%), soit du même ordre de grandeur que ceux mesurés jusqu'à présent chez la plupart des invertébrés (0 - 2%) (publication n°1). L'étude de l'influence de facteurs abiotiques sur les niveaux de méthylation globale des cytosines a notamment mis en évidence la modulation de cette marque épigénétique au laboratoire suite à un stress cadmique appliqué à des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental (0,05 - 5 µg Cd/L) (publication n°1). Des différences de niveaux de méthylation ont également été observées entre des organismes encagés sur des sites de référence et des sites connus pour être soumis à de la contamination chimique (note n°3). De plus, la comparaison des niveaux de méthylation de la population des « Ardillats », dont la tolérance au cadmium résulte de processus d'acclimatation transgénérationnelle (Vigneron et al., 2015, 2019), avec ceux de populations de référence suggère un rôle possible de la méthylation de l'ADN dans l'acquisition de cette tolérance (note n°1).

Malgré ces premiers résultats prometteurs, le suivi de la méthylation globale des cytosines de l'ADN lors des expérimentations transgénérationnelles avec le cadmium et la 3,4-DCA n'a pas permis de mettre en évidence des modulations de cette marque épigénétique en parallèle de l'émergence des effets différés sur la descendance. Dans ces études, la méthylation globale des cytosines de l'ADN n'a donc pas été prédictive des effets différés observés. En effet, aucune variation des niveaux de méthylation n'a été observée chez les mâles F0 exposés au Cd et à la 3,4-DCA ainsi que chez les descendants F1 issus de l'exposition parentale au Cd (publications

n°1 et n°2). L'absence de réponse dans l'expérimentation avec le Cd, qui contredit notre premier résultat d'exposition au laboratoire, peut potentiellement s'expliquer par la cinétique des réponses de cette marque épigénétique. L'exposition au Cd lors de l'étude des variations de la méthylation des cytosines de l'ADN a montré la fluctuation de ce marqueur avec une hypométhylation après 14 jours suivie d'une hyperméthylation après 1 mois (publication n°1). La durée d'exposition de 21 jours (intermédiaire entre 14 et 28 jours) des organismes F0 à des concentrations similaires de Cd lors de l'expérimentation transgénérationnelle pourrait ainsi expliquer l'absence de signal (publication n°2). Le caractère fluctuant de ce marqueur a déjà été constaté par d'autres auteurs. Takiguchi et al., 2003 ont par exemple observé chez des cellules de foie de rat, exposées à des concentrations élevées de Cd, que les niveaux de méthylation globale des cytosines de l'ADN dépendaient de la durée d'exposition.

L'absence de réponse de cette marque globale lors des expérimentations transgénérationnelles n'exclut pas la possible implication de mécanismes épigénétique dans l'émergence des effets différés sur les traits d'histoire de vie. En effet, le caractère générique de cette marque épigénétique, mesurée sur le génome total de l'organisme entier, peut avoir dilué des effets épigénétiques plus localisés au niveau de gènes ou autres parties du génome spécifiques (Sussarellu et al., 2018 ; Olsvik et al., 2019).

Afin d'avoir une vision plus fine sur les variations des niveaux de méthylation des cytosines suite à une exposition et sur leur éventuel transfert à la descendance, le développement d'approches ciblées serait d'intérêt. La mesure des niveaux globaux de méthylation des cytosines de l'ADN provenant de tissus ou de types cellulaires spécifiques comme les gonades ou gamètes pourrait être aussi envisagée. Les processus épigénétiques potentiellement impliqués pourraient également être investigués par la mesure de la méthylation sur des gènes ciblés, voire des séquences régulatrices. Cette dernière pourrait rendre possible l'identification de liens entre les modulations de méthylation et les effets observés, comme récemment réalisé notamment par Asselman et al. (2017) chez *Daphnia magna* et par Akemann et al. (2019) chez le poisson zèbre. Une telle approche nécessite une bonne connaissance moléculaire de l'espèce, ce qui fait depuis quelques années l'objet de travaux chez les gammares, notamment au sein du laboratoire d'écotoxicologie d'IRSTEA de Lyon, ouvrant ainsi des perspectives dans ce sens (*e.g.* Trapp et al., 2014, 2015, 2018 ; Gouveia et al., 2017, 2018, 2019 ; Cogne et al., 2019a, b)

V.4. Apport de l'étude des effets différés des contaminants chez une espèce « environnementale » non-modèle de laboratoire en écotoxicologie

Le modèle biologique de cette thèse, *G. fossarum*, a été choisi du fait de son importance dans l'écologie des hydrosystèmes d'eau douce, de la bonne connaissance de sa biologie et de ses avantages techniques permettant d'envisager un élevage à long terme (*e.g.* abondance toute l'année dans le milieu naturel). À cela s'ajoutent d'autres atouts tels que le nombre important de marqueurs sub-individuels et individuels développés chez cette espèce et permettant de qualifier le fonctionnement de la population, ainsi que l'existence de modèles de dynamique de population (voir I.3.2). Toutefois, cette espèce présente un cycle de vie relativement long avec une puberté atteinte vers 4 mois, soit 1 année complète d'expérimentation nécessaire pour obtenir les nouveau-nés de la génération F3. Ceci contraint donc la mise en œuvre d'études multigénérationnelles et explique le recours pratiquement systématique à des espèces modèles de laboratoire aux cycles de vie courts. Pourtant, nos travaux soulignent un intérêt tout particulier de réaliser ce type d'étude sur des populations d'espèces non-modèles issues du milieu naturel.

À ce jour, les espèces très majoritairement utilisées dans les expérimentations intergénérationnelles et transgénérationnelles en écotoxicologie aquatique pour les eaux douces et estuariennes ont été la daphnie et le poisson zèbre (Tableau V - 1).

Tableau V - 1 : Inventaire des espèces d'eau douce et estuariennes, utilisées dans les études intergénérationnelles et transgénérationnelles publiées depuis 2000.

Espèce	**Référence**
Daphnia magna (Crustacé)	Guan et Wang, 2006
Daphnia magna (Crustacé)	Vandegehuchte et al., 2010a
Daphnia magna (Crustacé)	Vandegehuchte et al., 2010b
Daphnia magna (Crustacé)	Vandegehuchte et al., 2009
Daphnia magna (Crustacé)	Hammers-Wirtz and Ratte, 2000

Espèce	Référence
Daphnia magna (Crustacé)	Castro et al., 2018
Daphnia magna (Crustacé)	Minguez et al., 2015
Daphnia magna (Crustacé)	Kimberly et Salice, 2015
Daphnia magna (Crustacé)	De Liguoro et al., 2019
Daphnia pulex (Crustacé)	Fernández-González et al., 2011
Americamysis bahia (Crustacé)	McKenney, 2005
Lymnaea stagnalis (Mollusque)	Reátegui-Zirena et al., 2017
Physa pomilia (Mollusque)	Plautz et Salice, 2013
Chironomus riparius (Insecte)	Lilley et al., 2012
Menidia beryllina (poisson)	DeCourten et al., 2019
Menidia beryllina (poisson)	DeCourten et al., 2019
Danio rerio (poisson)	Nash et al., 2004
Danio rerio (poisson)	Nash et al., 2004
Danio rerio (poisson)	Lombó et al., 2015
Danio rerio (poisson)	Baker et al., 2014
Danio rerio (poisson)	Corrales et al., 2014
Danio rerio (poisson)	Knecht et al., 2017
Danio rerio (poisson)	Alfonso et al., 2019
Danio rerio (poisson)	Faßbender et Braunbeck, 2013
Danio rerio (poisson)	Armant et al., 2017
Oryzias latipes (poisson)	Seemann et al., 2015
Oryzias latipes (poisson)	Foran et al., 2002
Oncorhynchus mykiss (poisson)	Brown et al., 2008
Oncorhynchus mykiss (poisson)	Brown et al., 2009
Gasterosteaus aculeatus (poisson)	Bernhardt et al., 2011
Poecilia reticulata (poisson)	Volkova et al., 2015

Les organismes du genre *Daphnia* ou de l'espèce *Danio rerio* utilisés dans ces études sont issus de lignées élevées en conditions contrôlées au laboratoire (faible diversité génétique, conditions d'élevage très standardisées et constantes, etc.), ceci depuis de nombreuses générations. D'autre part, les espèces classiquement étudiées au laboratoire ont des fonctionnements de dynamique de population désaisonnalisés. Enfin, la reproduction des daphnies est exclusivement parthénogénétique du fait des conditions optimales dans lesquelles les populations de laboratoire sont élevées.

L'ensemble de ces éléments confère des stratégies d'histoire de vie éloignées de celles rencontrées chez les espèces sentinelles plus représentatives de l'environnement naturel. En effet, contrairement aux espèces de laboratoire, les populations d'espèces présentes dans les milieux naturels sont soumises à divers facteurs environnementaux liés par exemple à la variabilité saisonnière ou encore aux interactions écosystémiques (*e.g.* prédation et compétition). Ces facteurs façonnent l'histoire de vie et notamment les patrons et les stratégies d'allocation énergétique de ces espèces.

Nos travaux chez *G. fossarum*, et notamment l'expérimentation transgénérationnelle avec le Cd, ont montré que les réponses individuelles observées chez les générations successives (*e.g.* taille réduite des organismes F3) résultent potentiellement de compromis et d'effets en cascade entre les traits d'histoire de vie des différentes générations de descendants (*e.g.* réduction du nombre d'embryons par femelle F1 et puberté précoce des organismes F2) (publication n°2). De tels compromis peuvent également être suggérés au regard des réponses à l'exposition à la 3,4-DCA, entre par exemple les effets négatifs observés chez les parents exposés (*i.e.* réduction de la survie des femelles F0 et de la qualité des spermatozoïdes des mâles F0) et l'augmentation de la fertilité (*i.e.* nombre d'ovocytes) de leurs descendants F1. Dans les deux expérimentations, les changements d'allocation entre les grandes fonctions telles que la maintenance, la croissance et la reproduction ont semblé jouer un rôle prépondérant dans l'émergence des effets en cascade sur les traits d'histoire de vie. Au-delà de cette interprétation au niveau des conséquences individuelles de l'exposition parentale sur la descendance, ces compromis et effets en cascade sur les traits d'histoire de vie semblent être façonnés par des patrons répondant à des processus de compensation démographique.

Au bilan, les compromis entre les traits d'histoire de vie et les changements d'allocation d'énergie associés étant fortement liés à l'histoire de vie de l'espèce, nos résultats soulignent

une influence potentiellement majeure de la stratégie d'histoire de vie de l'espèce considérée dans l'émergence des réponses individuelles et populationnelles observées sur la descendance après l'exposition de la génération parentale initiale. De manière similaire, Sukumaran et al. (2013) ont montré que les réponses des générations non exposées issues d'une exposition parentale au mutagène méthanesulfonate d'éthyle (EMS) dépendaient de la stratégie de reproduction de l'espèce. Cette étude a en effet mis en évidence que l'impact de l'exposition sur la fitness et la démographie de la population au cours des générations successives est plus important chez l'espèce dont la reproduction est asexuée (*Artemia parthenogenetica*) que chez l'espèce dont la reproduction est sexuée (*Artemia franciscana*).

Compte-tenu de l'influence importante de l'histoire de vie de l'espèce dans les réponses individuelles et populationnelles à long terme mise en évidence dans nos travaux, étendre l'étude des effets différés à des espèces « environnementales » aux stratégies d'histoire de vie variées semble indispensable pour améliorer l'évaluation et la compréhension des réponses des populations naturelles au stress chimique. Certes, utiliser une espèce représentative de l'environnement comme *Gammarus fossarum* dans des expérimentations transgénérationnelles nécessite un effort expérimental conséquent, mais cet effort est largement compensé par les connaissances apportées par de telles études. Cette approche s'inscrit en complément des études et méthodologies actuellement disponibles chez les espèces de laboratoire qui répondent quant à elles à un objectif de compréhension des mécanismes toxicologiques sous-jacents aux impacts observés sur la descendance.

Conclusion générale et perspectives

Face au manque de connaissance important sur l'existence et l'importance des effets différés dans les réponses individuelles et populationnelles au stress chimique, cette thèse a eu pour objectif d'explorer les effets différés inter et transgénérationnels et leurs conséquences sur le fonctionnement des populations chez une espèce « environnementale » non-modèle de laboratoire : *Gammarus fossarum*. Compte-tenu du rôle potentiellement prépondérant des mécanismes épigénétiques dans l'apparition d'effets différés décrit chez certaines espèces, une marque épigénétique, la méthylation globale des cytosines de l'ADN a également été explorée.

Nos travaux ont confirmé l'intérêt de prolonger le temps de réponse étudié au-delà de la première génération de descendants pour améliorer la compréhension des réponses populationnelles et la pertinence écologique de l'évaluation des risques actuelle. Ils ont également démontré l'intérêt de la mesure des dommages primaires à l'ADN des spermatozoïdes chez *Gammarus fossarum* comme indicateur d'exposition chimique et d'effets. Le développement de la méthylation globale des cytosines de l'ADN a montré que malgré des niveaux faibles chez le crustacé *Gammarus fossarum*, des changements peuvent être détectés. Une variabilité importante des niveaux de méthylation entre différentes populations provenant de sites distincts a tout d'abord été mise en évidence. Parmi ces populations, celle des « Ardillats », tolérante au Cd, présente des niveaux de méthylation élevés par rapport aux autres sites de référence, ce qui suggère un rôle possible de la méthylation de l'ADN dans l'acquisition de cette tolérance. De plus, les expérimentations réalisées au laboratoire ont démontré que divers stress (*i.e.* stress thermique, cadmique et privation alimentaire) peuvent induire des modulations des niveaux globaux de méthylation des cytosines de l'ADN. Concernant les expositions *in situ* par encagement d'organismes, la détection de telles variations n'a pas été systématique, malgré l'exposition dans des sites induisant une toxicité claire sur les organismes exposés. Cela relativise l'utilisation des niveaux globaux de la méthylation des cytosines de l'ADN comme biomarqueur d'exposition ou d'effets de la contamination des milieux aquatiques. Le suivi de la méthylation globale peut également s'avérer complexe puisque les réponses de cette marque épigénétique ne sont pas nécessairement monotones, comme observé suite à l'exposition au Cd pendant 14 jours et 1 mois. Certainement du fait de la possible non-monotonie des réponses et de son caractère générique, cette marque épigénétique n'a pas permis de mettre en évidence l'implication des modulations de méthylation dans l'émergence des effets

différés sur les traits d'histoire de vie lors des expérimentations menés au laboratoire (cadmium et 3,4-DCA). Nos travaux ont pourtant mis en évidence des conséquences importantes à long terme (1 an) suite à une exposition courte (21 jours) sur les traits d'histoire de vie de la population (*e.g.* réduction de 30% de la taille des juvéniles issus de l'exposition parentale au Cd, 8 semaines après leur collecte). Par ailleurs, nous avons pu souligner un rôle potentiellement majeur des compromis entre les traits d'histoire de vie dans les réponses individuelles et populationnelles au cours des générations successives. Ces réponses sont ainsi fortement influencées par la stratégie d'histoire de vie de *Gammarus fossarum*, ce qui questionne l'utilisation, dans la plupart des études à long terme, d'espèces de laboratoire aux stratégies d'histoire de vie très particulières.

Cette exploration des effets différés intergénérationnels et transgénérationnels chez l'espèce « environnementale » non-modèle de laboratoire *Gammarus fossarum* ouvre un certain nombre de perspectives.

Comme cela a été initié dans cette thèse, la méthodologie que nous avons mise en œuvre pourrait être utilisée pour évaluer la toxicité des milieux naturels par encagement de gammares géniteurs et suivi de leur descendance au laboratoire. Il serait également intéressant d'examiner la dynamique des effets le long des générations successives, induits par d'autres contaminants que ceux investigués dans ce travail de thèse afin d'évaluer l'occurrence des effets inter et transgénérationnels ainsi que la variabilité des patrons d'effets observés selon la typologie des contaminants.

D'autre part, la méthodologie développée dans cette thèse pourrait être améliorée par la poursuite du travail de standardisation des protocoles d'élevage et de mesure et la détermination d'une gamme de valeurs de référence des traits d'histoire de vie après de longues périodes d'élevage au laboratoire. Cela permettrait en effet la maîtrise et l'intégration de la variabilité expérimentale d'une génération à l'autre et entre les expériences dans la lecture des effets de l'exposition parentale.

Si des effets inter et transgénérationnels sont susceptibles de se manifester au cours des générations successives suite à l'exposition parentale au stress chimique, le degré de persistance des effets au cours de la vie de l'individu exposé (effets intragénérationnels) peuvent, en parallèle, avoir une influence sur la résilience de la population. Ainsi, en complément de l'approche multigénérationnelle suivie dans cette thèse, l'étude des effets de l'exposition parentale sur les cohortes successives produites par les parents exposés (F0) après l'exposition

présenterait un intérêt important dans la compréhension des réponses populationnelles. Au départ, cette seconde approche avait été intégrée à cette thèse, mais le maintien difficile des organismes F0 au laboratoire après leur deuxième cycle de reproduction (*i.e.* après la collecte des organismes constituant la F1) n'a pas permis de mener à bien cette part de l'étude. Il serait ainsi intéressant de réinterroger cette question de l'évolution des effets différés au cours du cycle de vie des parents exposés. Par exemple, même si les conséquences démographiques des effets inter et transgénérationnels au cours des générations sont importantes suite à l'exposition parentale à un stress chimique, ces impacts pourraient être complétement dilués par l'émergence de nouvelles cohortes présentant par exemple des capacités reproductrices rétablies.

Enfin, si nos travaux ont permis de mettre en évidence l'existence d'effets différés en cascade le long des générations successives, les mécanismes moléculaires impliqués n'ont pas été examinés. Des expérimentations complémentaires seraient donc intéressantes à réaliser afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux effets différés. Le suivi de marqueurs de dommages pérennes à l'ADN (mutations) sur les gamètes pourrait permettre d'identifier une éventuelle transmission d'altérations au fil des générations au sein de la population. La mesure des variations des niveaux de méthylation sur des tissus spécifiques comme les gonades et sur les embryons pourrait également permettre de mettre en évidence un éventuel transfert de motifs de méthylation des parents aux descendants. Ces marqueurs restent néanmoins relativement génériques. Des approches plus fonctionnelles dites « omiques » telles que la protéogénomique seraient intéressantes à intégrer dans ce type d'étude afin de relier les effets sur les traits d'histoire de vie à des mécanismes moléculaires, tout en restant conscient de la difficulté que représente souvent l'analyse détaillée et l'interprétation de ces outils. Concernant les mécanismes épigénétiques, les modulations de la méthylation des cytosines pourraient être examinées sur des gènes ciblés, voire des séquences régulatrices. En complément, l'étude du transcriptome permettrait l'identification d'éventuels liens entre ces modulations et l'expression des gènes.

Références bibliographiques

Abel, T., and Barlocher, F. (1988). Uptake of cadmium by *Gammarus fossarum* (Amphipoda) from food and water. J. Appl. Ecol. *25,* 223-231.

Agrawal, A.A., Laforsch, C., and Tollrian, R. (1999). Transgenerational induction of defences in animals and plants. Nature *401*, 60-63.

Akemann, C., Meyer, D.N., Gurdziel, K., and Baker, T.R. (2019). Developmental Dioxin Exposure Alters the Methylome of Adult Male Zebrafish Gonads. Front. Genet. *9*, 1-12.

Alfonso, S., Blanc, M., Joassard, L., Keiter, S.H., Munschy, C., Loizeau, V., Bégout, M.-L., and Cousin, X. (2019). Examining multi- and transgenerational behavioral and molecular alterations resulting from parental exposure to an environmental PCB and PBDE mixture. Aquat. Toxicol. *208*, 29-38.

Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Lirsky, A.E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. Proc. Natl Acad Sci USA *51,* 786-794.

Alonso, Á., De Lange, H.J., and Peeters, E.T.H.M. (2010). Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *G. fossarum*. Ecotoxicology *19,* 133-140.

Alquezar, R., Markich, S.J., and Booth, D.J. (2006). Effects of metals on condition and reproductive output of the smooth toadfish in Sydney estuaries, south-eastern Australia. Environ. Pollut. *142*, 116-122.

Alric, B., Geffard, O., Chandesris, A., Ferréol, M., François, A., Perceval, O., Piffady, J., Villeneuve, B., and Chaumot, A. (2019). Multisubstance Indicators Based on Caged *Gammarus* Bioaccumulation reveal the influence of chemical contamination on stream macroinvertebrate abundances across France. Environ. Sci. Technol. *53*, 5906–5915.

Alvarado, S., Fernald, R.D., Storey, K.B., and Szyf, M. (2014). The Dynamic Nature of DNA Methylation: A Role in Response to Social and Seasonal Variation. Integr. Comp. Biol. *54*, 68-76.

Amiard, J., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., and Rainbow, P. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquat. Toxicol. *76*, 160-202.

Andrewartha, S.J., and Burggren, W.W. (2012). Transgenerational Variation in Metabolism and Life-History Traits Induced by Maternal Hypoxia in *Daphnia magna*. Physiol. Biochem. Zool. *85*, 625-634.

Arambourou, H., Decamps, A., Quéau, H., Dabrin, A., Neuzeret, D., and Chaumot, A. (2017). Use of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) embryo for toxicity testing: A case study with cadmium: Use of *Gammarus fossarum* embryo for toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. *36*, 2436-2443.

Arambourou, H., Vulliet, E., Daniele, G., Noury, P., Delorme, N., Abbaci, K., Forcellini, M., Tutundjian, R., and Barata, C. (2019). Comparison in the response of three European Gammarid species exposed to the growth regulator insecticide fenoxycarb. Environ. Sci. Pollut. Res. *26*, 11496-11502.

Arand, J., Spieler, D., Karius, T., Branco, M.R., Meilinger, D., Meissner, A., Jenuwein, T., Xu, G., Leonhardt, H., Wolf, V., et al. (2012). In Vivo Control of CpG and Non-CpG DNA Methylation by DNA Methyltransferases. PLoS Genet. *8*, e1002750.

Ares, J. (2003). Time and space issues in ecotoxicology: Population models, landscape pattern analysis, and long-range environmental chemistry. Environ. Toxicol. and Chem. *22*, 945-957.

Armant, O., Gombeau, K., Murat El Houdigui, S., Floriani, M., Camilleri, V., Cavalie, I., and Adam-Guillermin, C. (2017). Zebrafish exposure to environmentally relevant concentration of depleted uranium impairs progeny development at the molecular and histological levels. PLOS ONE *12*, e0177932.

Asselman, J., De Coninck, D.I.M., Vandegehuchte, M.B., Jansen, M., Decaestecker, E., De Meester, L., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Janssen, C.R., and De Schamphelaere, K.A.C. (2015). Global cytosine methylation in *Daphnia magna* depends on genotype, environment, and their interaction: Genotype and environment influence DNA methylation in *Daphnia*. Environ. Toxicol. Chem. *34*, 1056-1061.

Asselman, J., De Coninck, D.I., Beert, E., Janssen, C.R., Orsini, L., Pfrender, M.E., Decaestecker, E., and De Schamphelaere, K.A. (2017). Bisulfite Sequencing with *Daphnia* Highlights a Role for Epigenetics in Regulating Stress Response to *Microcystis* through Preferential Differential Methylation of Serine and Threonine Amino Acids. Environ. Sci. Technol. *51*, 924-931.

Athanasio, C.G., Sommer, U., Viant, M.R., Chipman, J.K., and Mirbahai, L. (2018). Use of 5-azacytidine in a proof-of-concept study to evaluate the impact of pre-natal and post-natal exposures, as well as within generation persistent DNA methylation changes in *Daphnia*. Ecotoxicology *27*, 556-568.

Au, D.W.T., Lee, C.Y., Chan, K.L., and Wu, R.S.S. (2001). Reproductive impairment of sea urchins upon chronic exposure to cadmium. Part I: Effects on gamete quality. Environ. Pollut. *111*, 1-9.

Baccarelli, A., and Bollati, V. (2009). Epigenetics and environmental chemicals. Curr. Opin. Pediatr. *21*, 243-251.

Bachère, E., Barranger, A., Bruno, R., Rouxel, J., Menard, D., Piquemal, D., and Akcha, F. (2017). Parental diuron-exposure alters offspring transcriptome and fitness in Pacific oyster Crassostrea gigas. Ecotoxicol. Environ. Saf. *142*, 51-58.

Bailey, K.A. (2015). Chapter 11 - Developmental origins of adult disease: Impacts of exposure to environmental toxicants. In: Rebecca, C.F., Systems biology in toxicology and environmental health. Academic Press (ed), Boston, 239-253.

Baird, D.J., Brown, S.S., Lagadic, L., Liess, M., Maltby, L., Moreira-Santos, M., Schulz, R., and Scott, G.I. (2007). *In Situ*–Based Effects Measures: Determining the Ecological Relevance of Measured Responses. Integrated Environmental Assessment and Management *3*, 259-267.

Baker, T.R., Peterson, R.E., and Heideman, W. (2014). Using Zebrafish as a Model System for Studying the Transgenerational Effects of Dioxin. Toxicol. Sci. *138*, 403-411.

Baldanzi, S., Watson, R., McQuaid, C.D., Gouws, G., and Porri, F. (2017). Epigenetic variation among natural populations of the South African sandhopper *Talorchestia capensis*. Evol. Ecol. *31*, 77-91.

Barnard, J. L., and Barnard, C. M. (1983). Freshwater Amphipod of the world- I. Evolutionary patterns. Hayfield associates.

Barouki, R., Melén, E., Herceg, Z., Beckers, J., Chen, J., Karagas, M., Puga, A., Xia, Y., Chadwick, L., Yan, W., et al. (2018). Epigenetics as a mechanism linking developmental exposures to long-term toxicity. Environ. Int. *114*, 77-86.

Barranger, A., Akcha, F., Rouxel, J., Brizard, R., Maurouard, E., Pallud, M., Menard, D., Tapie, N., Budzinski, H., Burgeot, T., et al. (2014). Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an

environmentally-relevant exposure to diuron: Evidence of vertical transmission of DNA damage. Aquat. Toxicol. *146*, 93-104.

Barranger, A., Benabdelmouna, A., Dégremont, L., Burgeot, T., and Akcha, F. (2015). Parental exposure to environmental concentrations of diuron leads to aneuploidy in embryos of the Pacific oyster, as evidenced by fluorescent *in situ* hybridization. Aquat. Toxicol. *159*, 36-43.

Baveco, J.M.H., Norman, S., Roessink, I., Galic, N., and Van Den Brink, P.J. (2014). Comparing population recovery after insecticide exposure for four aquatic invertebrate species using models of different complexity: Recovery of four aquatic invertebrate species. Environ. Toxicol. Chem. *33*, 1517-1528.

Beckerman, A., Benton, T.G., Ranta, E., Kaitala, V., and Lundberg, P. (2002). Population dynamic consequences of delayed life-history effects. Trends Ecol. Evol. *17*, 263-269.

Beeler, S.M., Wong, G.T., Zheng, J.M., Bush, E.C., Remnant, E.J., Oldroyd, B.P., and Drewell, R.A. (2014). Whole-Genome DNA Methylation Profile of the Jewel Wasp (*Nasonia vitripennis*). G3: Genes, Genomes, Genetics *4*, 383-388.

Behrens, D., Rouxel, J., Burgeit, T., and Akcha, F. (2016). Comparative embryotoxicity and genotoxicity of the herbicide and its metabolites in early life stages of *Crassostrea gigas*: Implication of reactive oxygen species production. Aquat. Toxicol. *175,* 249-259.

Beketov, M.A., and Liess, M. (2008). Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. Environ. Toxicol. Chem. *27*, 461-470.

Beketov, M.A., Schäfer, R.B., Marwitz, A., Paschke, A., and Liess, M. (2008). Long-term stream invertebrate community alterations induced by the insecticide thiacloprid: Effect concentrations and recovery dynamics. Sci. Total Environ. *405*, 96-108.

Beracko, P., Sýkorová, A., and Štangler, A. (2012). Life history, secondary production and population dynamics of *Gammarus fossarum* (Koch, 1836) in a constant temperature stream. Biologia (Bratisl.) *67*, 164-171.

Bernhardt, R.R., von Hippel, F.A., and O'Hara, T.M. (2011). Chronic perchlorate exposure causes morphological abnormalities in developing stickleback. Environ. Toxicol. Chem. *30*, 1468-1478.

Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., and Geffard, O. (2013). Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. Water Res. *47*, 650-660.

Best, C., Ikert, H., Kostyniuk, D.J., Craig, P.M., Navarro-Martin, L., Marandel, L., and Mennigen, J.A. (2018). Epigenetics in teleost fish: From molecular mechanisms to physiological phenotypes. Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. *224*, 210-244.

Bhutani, N., Burns, D.M., and Blau, H.M. (2011). DNA Demethylation Dynamics. Cell *146*, 866-872.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. *16*, 6-21.

Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. Nature *447*, 396-398.

Biron, P.-A., Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Charles, S., and Billoir, E. (2012). Population-Level Modeling to Account for Multigenerational Effects of Uranium in *Daphnia magna*. Environ. Sci. Technol. *46*, 1136–1143.

Blockwell, S.J., Taylor, E.J., Jones, I., and Pascoe, D. (1998). The Influence of Fresh Water Pollutants and Interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the Feeding Activity of *Gammarus pulex* (L.). Arch. Environ. Contam. Toxicol. *34*, 41-47.

Bollache, L., Devin, S., Wattier, R., Chovet, M., Beisel, J.-N., Moreteau, J.-C., and Rigaud, T. (2004). Rapid range extension of the Ponto-Caspian amphipod *Dikerogammarus villosus* in France: potential consequences. Arch. Für Hydrobiol. *160*, 57-66.

Bonduriansky, R., and Day, T. (2009). Nongenetic Inheritance and Its Evolutionary Implications. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics *40*, 103-125.

Borges, F.O., Figueiredo, C., Sampaio, E., Rosa, R., and Grilo, T.F. (2018). Transgenerational deleterious effects of ocean acidification on the reproductive success of a keystone crustacean (*Gammarus locusta*). Mar. Environ. Res. *138*, 55-64.

Bossdorf, O., Richards, C.L., and Pigliucci, M. (2008). Epigenetics for ecologists. Ecol. Lett. *11*, 206-115.

Brander, S.M., Biales, A.D., and Connon, R.E. (2017). The Role of Epigenomics in Aquatic Toxicology. Environ. Toxicol. Chem. *36*, 2565-2573.

Brown, K.H., Schultz, I.R., Cloud, J.G., and Nagler, J.J. (2008). Aneuploid sperm formation in rainbow trout exposed to the environmental estrogen 17 -ethynylestradiol. Proc. Natl. Acad. Sci. *105*, 19786-19791.

Brown, K.H., Schultz, I.R., and Nagler, J.J. (2009). Lack of a heritable reproductive defect in the offspring of male rainbow trout exposed to the environmental estrogen 17α-ethynylestradiol. Aquat. Toxicol. *91*, 71-74.

Burggren, W.W. (2015). Dynamics of epigenetic phenomena: intergenerational and intragenerational phenotype "washout." J. Exp. Biol. *218*, 80-87.

Butler PA, Lowe JI. 1978. Flowing sea water toxicity tests using oyster (*Crassostrea virginica*). In Bioassay Procedures for the Ocean Disposal Permit Program, EPA-600/9-78-010, 25-27.

Campiche, S., L'Ambert, G., Tarradellas, J., and Becker-van Slooten, K. (2007). Multigeneration effects of insect growth regulators on the springtail *Folsomia candida*. Ecotoxicol. Environ. Safety *67*, 180-189.

Campos, C., Valente, L.M.P., and Fernandes, J.M.O. (2012). Molecular evolution of zebrafish dnmt3 genes and thermal plasticity of their expression during embryonic development. Gene *500*, 93-100.

Campos, C., Valente, L., Conceição, L., Engrola, S., and Fernandes, J. (2013). Temperature affects methylation of the *myogenin* putative promoter, its expression and muscle cellularity in Senegalese sole larvae. Epigenetics *8*, 389-397.

Campos, B., Jordão, R., Rivetti, C., Lemos, M.F.L., Soares, A.M.V.M., Tauler, R., and Barata, C. (2016). Two-generational effects of contaminants in *Daphnia magna*: Effects of offspring quality. Environ. Toxicol. Chem. *35*, 1470-1477.

Capuano, F., Mülleder, M., Kok, R., Blom, H.J., and Ralser, M. (2014). Cytosine DNA Methylation Is Found in *Drosophila melanogaster* but Absent in *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe*, and Other Yeast Species. Anal. Chem. *86*, 3697-3702.

Castro, B.B., Freches, A.R., Rodrigues, M., Nunes, B., and Antunes, S.C. (2018). Transgenerational Effects of Toxicants: An Extension of the *Daphnia* 21-day Chronic Assay? Arch. of Environ. Contam. Toxicol. *74*, 616-626.

Caswell, H. (2001). Matrix population models: Construction, Analysis and Interpretation. Second ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Cazan, A.M., and Klerks, P.L. (2014). Evidence of maternal copper and cadmium transfer in two live-bearing fish species. Ecotoxicology *23*, 1774-1783.

Charron, L., Geffard, O., Chaumot, A., Coulaud, R., Queau, H., Geffard, A., and Dedourge-Geffard, O. (2013). Effect of water quality and confounding factors on digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum*. Environ. Sci. Pollut. Res. *20*, 9044-9056.

Charron, L. (2014). Biomarqueurs épigénétiques chez un amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*: Développement, lien avec le succès reproducteur et application *in situ*. Université de Reims Champagne-Ardenne.

Chatterjee, N., Gim, J., and Choi, J. (2018). Epigenetic profiling to environmental stressors in model and non-model organisms: Ecotoxicology perspective. Environ. Health Toxicol. *33*, e2018015.

Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., Maltby, L. (2015). Gammarids as reference species for freshwater monitoring. In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. (Eds.), Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks. Academic Press, pp. 253-280.

Chaumot, A., Coulaud, R., Adam, O., Quéau, H., Lopes, C., and Geffard, O. (2019). *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 1- gauging the confounding influence of temperature and water hardness. Submitted article.

Cheng, X. (2014). Structural and Functional Coordination of DNA and Histone Methylation. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *6*, a018747.

Chevreux, E., and Farge, L. (1925). Faune de France : Amphipodes. Fédération française des sociétés de sciences naturelles. Office central de faunistique. Ed. Lechevalier.

Choi, W.I., Neher, D.A., and Ryoo, M.I. (2008). Life-history trade-offs of *Paronychiurus kimi* (Lee) (Collembola: Onychiuridae) populations exposed to paraquat. Ecotoxicol. Environ. Saf. *69*, 227-232.

Cikcikoglu Yildirim, N., and Yaman, M. (2019). The usability of oxidative stress and detoxification biomarkers in *Gammarus pulex* for ecological risk assessment of textile dye methyl orange. Chem. Ecol. *35*, 319-329.

Ciliberti, A., Chaumot, A., Recoura-Massaquant, R., Chandesris, A., François, A., Coquery, M., Ferréol, M., and Geffard, O. (2017). Caged *Gammarus* as biomonitors identifying thresholds of toxic metal bioavailability that affect gammarid densities at the French national scale. Water Res. *118*, 131-140.

Claver, A., Ormad, P., Rodríguez, L., and Ovelleiro, J.L. (2006). Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). Chemosphere *64*, 1437-1443.

Cogne, Y., Almunia, C., Gouveia, D., Pible, O., François, A., Degli-Esposti, D., Geffard, O., Armengaud, J., and Chaumot, A. (2019a). Comparative proteomics in the wild: Accounting for intrapopulation variability improves describing proteome response in a Gammarus pulex field population exposed to cadmium. Aquat. Toxicol. *214*, 1-8.

Cogne, Y., Degli-Esposti, D., Pible, O., Gouveia, D., François, A., Bouchez, O., Eché, C., Ford, A., Geffard, O., Armengaud, J., et al. (2019b). *De novo* transcriptomes of 14 gammarid individuals for proteogenomic analysis of seven taxonomic groups. Sci. Data *6*, 1-7.

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

Corrales, J., Thornton, C., White, M., Willett, K.L. (2014). Multigenerational effects of benzo[a]pyrene exposure on survival and developmental deformities in zebrafish larvae. Aquat. Toxicol. *148*, 16-26.

Costa, F.O., and Costa, M.H. (1999). Life history of the amphipod *Gammarus locusta* in the Sado estuary (Portugal). Acta Oecologica *20*, 305-314.

Costa, F.O., Neuparth, T., Correia, A.D., and Helena Costa, M. (2005). Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: II. Organism and population-level endpoints. Mar. Environ. Res. *60*, 93-110.

Costa, M.A., Moscardini, V.F., da Costa Gontijo, P., Carvalho, G.A., de Oliveira, R.L., and de Oliveira, H.N. (2014). Sublethal and transgenerational effects of insecticides in developing *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*): Toxicity of insecticides to *Trichogramma galloi*. Ecotoxicology *23*, 1399-1408.

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

Coulaud, R. (2012). Modélisation et changement d'échelles pour l'évaluation écotoxicologique : Application à deux macroinvertébrés aquatiques, *Gammarus fossarum* (crustacé amphipode) et *Potamopyrgus antipodarum* (mollusque gastéropode). Thèse de doctorat. Université Claude Bernard, Lyon.

Coulaud, R., Geffard, O., Coquillat, A., Quéau, H., Charles, S., and Chaumot, A. (2014). Ecological Modeling for the Extrapolation of Ecotoxicological Effects Measured during in Situ Assays in *Gammarus*. Environ. Sci. Technol. *48*, 6428-6436.

Coulaud, R., Geffard, O., Vigneron, A., Quéau, H., François, A., and Chaumot, A. (2015). Linking feeding inhibition with reproductive impairment in *Gammarus* confirms the ecological relevance of feeding assays in environmental monitoring: Ecological relevance of feeding assay in *Gammarus*. Environ. Toxicol. Chem. *34*, 1031-1038.

Coutellec, M.-A., and Barata, C. (2013). Special issue on long-term ecotoxicological effects: an introduction. Ecotoxicology *22*, 763-766.

Cribiu, P., Chaumot, A., Geffard, O., Ravant, J.-L., Bastide, T., Delorme, N., Quéau, H., Caillat, S., Devaux, A., Bony, S. (2018). Natural variability and modulation by environmental stressors of global genomic cytosine methylation levels in a freshwater crustacean, *Gammarus fossarum*. Aquat. Toxicol. *205*, 11-18.

Cridge, A., Leask, M., Duncan, E., and Dearden, P. (2015). What Do Studies of Insect Polyphenisms Tell Us about Nutritionally-Triggered Epigenomic Changes and Their Consequences? Nutrients *7*, 1787-1797.

D'Ávila, M. F., Garcia, R. N., Panzera, Y., Valente, V. L. da S., 2010. Sex-specific methylation in Drosophila: an investigation of the *Sophophora subgenus*. Genetica *138*, 907-913.

Dayras, P., Charmantier, G., Chaumot, A., Vigneron, A., Coquery, M., Quéau, H., Artells, E., Lignot, J.-H., Geffard, O., and Issartel, J. (2017). Osmoregulatory responses to cadmium in reference and historically metal contaminated *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) populations. Chemosphere *180*, 412-422.

De Castro-Català, N., Muñoz, I., Riera, J.L., and Ford, A.T. (2017). Evidence of low dose effects of the antidepressant fluoxetine and the fungicide prochloraz on the behavior of the keystone freshwater invertebrate *Gammarus pulex*. Environ. Pollut. *231*, 406-414.

De Liguoro, M., Maraj, S., and Merlanti, R. (2019). Transgenerational toxicity of flumequine over four generations of *Daphnia magna*. Ecotoxicol. and Environ. Saf. *169*, 814-821.

De los Santos, C.B., Neuparth, T., Torres, T., Martins, I., Cunha, I., Sheahan, D., McGowan, T., and Santos, M.M. (2015). Ecological modelling and toxicity data coupled to assess population recovery of marine amphipod *Gammarus locusta*: Application to disturbance by chronic exposure to aniline. Aquat. Toxicol. *163*, 60-70.

Deans, C., and Maggert, K.A. (2015). What Do You Mean, "Epigenetic"? Genetics *199*, 887–896.94Debecker, S., Dinh, K.V., and Stoks, R. (2017). Strong Delayed Interactive Effects of Metal Exposure and Warming: Latitude-Dependent Synergisms Persist Across Metamorphosis. Environ. Sci. Technol. *51*, 2409-2417.

DeCourten, B.M., Connon, R.E., and Brander, S.M. (2019). Direct and indirect parental exposure to endocrine disruptors and elevated temperature influences gene expression across generations in a euryhaline model fish. PeerJ *7*, e6156.96

Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, O., and Geffard, A. (2009). Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An *in situ* experiment. Chemosphere *77*, 1569-1576.

Dedourge-Geffard, O., Charron, L., Hofbauer, C., Gaillet, V., Palais, F., Lacaze, E., Geffard, A., and Geffard, O. (2013). Temporal patterns of digestive enzyme activities and feeding rate in gammarids (*Gammarus fossarum*) exposed to inland polluted waters. Ecotoxicol. Environ. Saf. *97*, 139-146.

Demyanov, V., Wood, S.N., and Kedwards, T.J. (2006). Improving ecological impact assessment by statistical data synthesis using process-based models. J. R. Stat. Soc. Ser. C Appl. Stat. *55*, 41-62.

Devin, S., Beisel, J.N., Bachmann, V., and Moreteau, J.C. (2001). *Dikerogammarus villosus* (Amphipoda : *Gammaridae*) : another invasive species newly established in the Moselle river and French hydrosystems. Ann. Limnol. - Int. J. Limnol. *37*, 21-27.

Díaz-Freije, E., Gestal, C., Castellanos-Martínez, S., and Morán, P. (2014). The role of DNA methylation on *Octopus vulgaris* development and their perspectives. Front. Physiol. *5*, 1-7.

Dinh, K.V., Janssens, L., Therry, L., Bervoets, L., Bonte, D., and Stoks, R. (2016). Delayed effects of chlorpyrifos across metamorphosis on dispersal-related traits in a poleward moving damselfly. Environ. Pollut. *218*, 634-643.

Dohmen, G.P., Preuss, T.G., Hamer, M., Galic, N., Strauss, T., van den Brink, P.J., De Laender, F., and Bopp, S. (2016). Population-level effects and recovery of aquatic invertebrates after multiple applications of an insecticide: Modeling Insecticide Effects on Aquatic Invertebrates. Integr. Environ. Assess. Manag. *12*, 67-81.

Driessnack, M.K., Matthews, A.L., Raine, J.C., and Niyogi, S. (2016). Interactive effects of chronic waterborne copper and cadmium exposure on tissue-specific metal accumulation and reproduction in

fathead minnow (*Pimephales promelas*). Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 179, 165-173.

Duan, M., Xiong, D., Bai, X., Gao, Y., Xiong, Y., Gao, X., and Ding, G. (2018). Transgenerational effects of heavy fuel oil on the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* considering oxidative stress biomarkers. Mar. Environ. Res. *141*, 138-147.

Duman, F., and Kar, M. (2015). Evaluation of effects of exposure conditions on the biological responses of *Gammarus pulex* exposed to cadmium. Int. J. Environ. Sci. Technol. *12*, 437-444.

Eirin-Lopez, J.M., and Putnam, H.M. (2019). Marine Environmental Epigenetics. Ann. Rev. of Mar. Sci. *11*, 335-368.

Emmanouil, C., Sheehan, T., and Chipman, J. (2007). Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (*Mytilus edulis L.)* gill following exposure to Cd and Cr (VI). Aquat. Toxicol. 82, 27-35.

Erraud, A., Bonnard, M., Geffard, O., Coulaud, R., Poret, A., Duflot, A., Forget-Leray, J., Geffard, A., and Xuereb, B. (2019). Signification of DNA integrity in sperm of *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Kinetic responses and reproduction impairment. Mar. Environ. Res. *144*, 130-140.

European Chemicals Bureau (ECB). (2006). European Union Risk Assessment Report 65: 3,4-dichloroaniline.

Fang, X., Corrales, J., Thornton, C., Scheffler, B.E., and Willett, K.L. (2013). Global and gene specific DNA methylation changes during zebrafish development. Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. *166*, 99-108.

Faßbender, C., and Braunbeck, T. (2013). Reproductive and genotoxic effects in zebrafish after chronic exposure to methyl methanesulfonate in a multigeneration study. Ecotoxicology *22*, 825-837.

Faulk, C., and Dolinoy, D.C. (2011). Timing is everything: The when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. Epigenetics *6*, 791-797.

Feil, R., and Fraga, M.F. (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. Nat. Rev. Genet. *13*, 97-109.

Feliciello, I., Parazajder, J., Akrap, I., and Ugarković, Đ. (2013). First evidence of DNA methylation in insect *Tribolium castaneum*: Environmental regulation of DNA methylation within heterochromatin. Epigenetics *8*, 534-541.

Fellous, A., Labed-Veydert, T., Locrel, M., Voisin, A.-S., Earley, R.L., and Silvestre, F. (2018). DNA methylation in adults and during development of the self-fertilizing mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*. Ecol. Evol. *8*, 6016-6033.

Felten, V. (2003). Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophisiologie de *Gammarus fossarum* Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda) : Approche intégrée à différents niveaux d'organisation. Université de Metz.

Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., and Geffard, O. (2008). Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. Aquat. Toxicol. *86*, 413-425.

Feng, S., Cokus, S.J., Zhang, X., Chen, P.-Y., Bostick, M., Goll, M.G., Hetzel, J., Jain, J., Strauss, S.H., Halpern, M.E., Ukomadu C., Sadler, K.C., Pradhan, S., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E. (2010). Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. Proceedings of the National Academy of Sciences *107*, 8689-8694.

Fernández-González, M.A., González-Barrientos, J., Carter, M.J., and Ramos-Jiliberto, R. (2011). Parent-to-offspring transfer of sublethal effects of copper exposure: Metabolic rate and life-history traits of *Daphnia*. Rev. Chil. Hist. Nat. *84*, 195-201.

Field, L.M., Lyko, F., Mandrioli, M., and Prantera, G. (2004). DNA methylation in insects. Insect Mol. Biol. *13*, 109-115.

Foran, C.M., Peterson, B.N., and Benson, W.H. (2002). Influence of parental and developmental cadmium exposure on endocrine and reproductive function in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. *133*, 345-354.

Forrow, D.M., and Maltby, L. (2000). Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. Environ. Toxicol. Chem. *19*, 2100-2106.

Gaillard, J.-M., and Yoccoz, N.G. (2003). Temporal variation in survival of mammals: A case of environment canalization? Ecology *84*, 3294-3306.

Galbraith, D.A., Kocher, S.D., Glenn, T., Albert, I., Hunt, G.J., Strassmann, J.E., Queller, D.C., and Grozinger, C.M. (2016). Testing the kinship theory of intragenomic conflict in honey bees (*Apis mellifera*). Proc. Natl. Acad. Sci. *113*, 1020-1025.

Galic, N., Ashauer, R., Baveco, H., Nyman, A.-M., Barsi, A., Thorbek, P., Bruns, E., and Van den Brink, P.J. (2014). Modeling the contribution of toxicokinetic and toxicodynamic processes to the recovery of *Gammarus pulex* populations after exposure to pesticides: Modeling TKTD and amphipod population recovery. Environ. Toxicol. Chem. *33*, 1476-1488.

Gao, F., Liu, X., Wu, X.-P., Wang, X.-L., Gong, D., Lu, H., Xia, Y., Song, Y., Wang, J., Du, J., et al. (2012). Differential DNA methylation in discrete developmental stages of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. Genome Biol. *13*: R100.

Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V., and Giamberini, L. (2015). Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO2) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeseli*. Aquat. Toxicol. *158*, 63-74.

García-Fernández, P., García-Souto, D., Almansa, E., Morán, P., and Gestal, C. (2017). Epigenetic DNA Methylation Mediating *Octopus vulgaris* Early Development: Effect of Essential Fatty Acids Enriched Diet. Front. Physiol. *8*, 1-22.

Gavery, M.R., and Roberts, S.B. (2013). Predominant intragenic methylation is associated with gene expression characteristics in a bivalve mollusc. PeerJ *1*, e215.

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

Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., and Charmantier-Daures, M. (2010). Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. Environ. Toxicol. Chem. *29*, 2249-2259.

Gerhardt, A. (2011). GamTox: A Low-Cost Multimetric Ecotoxicity Test with *Gammarus* spp. for *In* and *Ex Situ* Application. Int. J. Zool. *2011*, 1-7.

Girling, A.E., Tattersfield, L., Mitchell, G.C., Crossland, N.O., Pascoe, D., Blockwell, S.J., Maund, S.J., Taylor, E.J., Wenzel, A., Janssen, C.R., et al. (2000). Derivation of Predicted No-Effect Concentrations for Lindane, 3,4-Dichloroaniline, Atrazine, and Copper. Ecotoxicol. Environ. Saf. *46*, 148-162.

Gismondi, E., Cossu-Leguille, C., and Beisel, J.-N. (2013). Do male and female gammarids defend themselves differently during chemical stress? Aquat. Toxicol. *140-141*, 432-438.

Gismondi, E., Thomé, J.-P., Urien, N., Uher, E., Baiwir, D., Mazzucchelli, G., De Pauw, E., Fechner, L.C., and Lebrun, J.D. (2017). Ecotoxicoproteomic assessment of the functional alterations caused by chronic metallic exposures in gammarids. Environ. Pollut. *225*, 428-438.

Glastad, K.M., Hunt, B.G., Yi, S.V., and Goodisman, M.A.D. (2011). DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era: DNA methylation in insects. Insect Mol. Biol. *20*, 553-565.

Goedmakers, A. (1972). *Gammarus fossarum* Koch, 1835: Redescription based on neotype material and notes on its local variation (Crustacea, Amphipoda). Bijdragen tot de Dierkunde *42,*125-138.

Gold, H.B., Jung, Y.H., and Corces, V.G. (2018). Not just heads and tails: The complexity of the sperm epigenome. J. Biol. Chem. *293*, 13815-13820.

Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. Annu. Rev. Biochem. *74*, 481-514.

Gombeau, K., Bourdineaud, J.-P., Ravanat, J.-L., Armant, O., Camilleri, V., Cavalie, I., Floriani, M., and Adam-Guillermin, C. (2017). Epigenetic, histopathological and transcriptomic effects following exposure to depleted uranium in adult zebrafish and their progeny. Aquat. Toxicol. *184*, 14-25.

Gouveia, D., Chaumot, A., Charnot, A., Queau, H., Armengaud, J., Almunia, C., Salvador, A., and Geffard, O. (2017). Assessing the relevance of a multiplexed methodology for proteomic biomarker measurement in the invertebrate species *Gammarus fossarum*: A physiological and ecotoxicological study. Aquat. Toxicol. 190, 199-209.

Gouveia, D., Bonneton, F., Almunia, C., Armengaud, J., Quéau, H., Degli-Esposti, D., Geffard, O., and Chaumot, A. (2018). Identification, expression, and endocrine-disruption of three ecdysone-responsive genes in the sentinel species *Gammarus fossarum*. Sci. Rep. *8*, 1-13.

Gouveia, D., Cogne, Y., Gaillard, J.-C., Almunia, C., Pible, O., François, A., Degli-Esposti, D., Geffard, O., Chaumot, A., and Armengaud, J. (2019). Shotgun proteomics datasets acquired on Gammarus pulex animals sampled from the wild. Data Brief *27*, 104650.

Greiner, V. (2012). Epigénétique et méthylation de l'ADN : étude des mécanismes d'interaction du domaine SRA de UHRF1 avec l'ADN hémi-méthylé. Université de Strasbourg.

Groh, K.J., Carvalho, R.N., Chipman, J.K., Denslow, N.D., Halder, M., Murphy, C.A., Roelofs, D., Rolaki, A., Schirmer, K., and Watanabe, K.H. (2015). Development and application of the adverse outcome pathway framework for understanding and predicting chronic toxicity: I. Challenges and research needs in ecotoxicology. Chemosphere *120*, 764-777.

Gross, M.Y., Maycock, D.S., Thorndyke, M.C., Morritt, D., and Crane, M. (2001). Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. Environ. Toxicol. Chem. *20*, 1792-1797.

Guan, R., and Wang, W.-X. (2006). Comparison between two clones of Daphnia magna: Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics. Aquat. Toxicol. *76*, 217-229.

Guan, D.-L., Ding, R.-R., Hu, X.-Y., Yang, X.-R., Xu, S.-Q., Gu, W., and Zhang, M. (2019). Cadmium-induced genome-wide DNA methylation changes in growth and oxidative metabolism in *Drosophila melanogaster*. BMC Genomics *20*. 1-13.

Guo, L., Desneux, N., Sonoda, S., Liang, P., Han, P., and Gao, X.-W. (2013). Sublethal and transgenerational effects of chlorantraniliprole on biological traits of the diamondback moth, *Plutella xylostella L.* Crop Prot. *48*, 29-34.

Hammers-Wirtz, M., and Ratte, H.T. (2000). Offspring fitness in *Daphnia*: Is the *Daphnia* reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level? Environmental Toxicology and Chemistry *19*, 1856-1866.

Hartwig, A. (1998). Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. Toxicol. Lett. *102–103*, 235-239.

Hasan, F., and Ansari, M.S. (2016). Ecotoxicological hazards of herbicides on biological attributes of *Zygogramma bicolorata* Pallister (Coleoptera: Chrysomelidae). Chemosphere *154*, 398-407.

Hawes, N.A., Tremblay, L.A., Pochon, X., Dunphy, B., Fidler, A.E., and Smith, K.F. (2018). Effects of temperature and salinity stress on DNA methylation in a highly invasive marine invertebrate, the colonial ascidian *Didemnum vexillum*. PeerJ *6*, e5003.

Head, J.A., Dolinoy, D.C., and Basu, N. (2012). Epigenetics for ecotoxicologists. Environmental Toxicology and Chemistry *31*, 221-227.

Head, J.A. (2014). Patterns of DNA Methylation in Animals: An Ecotoxicological Perspective. Integr. Comp. Biol. *54*, 77-86.

Heard, E., and Martienssen, R.A. (2014). Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. Cell *157*, 95-109.

Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., Slagboom, P. E., Lumey, L. H. (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 17046-17049.

Heintz, R., Rice, S., Wertheimer, A., Bradshaw, R., Thrower, F., Joyce, J., and Short, J. (2000). Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development. Marine Ecology Progress Series *208*, 205-216.

Ho, D.H., and Burggren, W.W. (2010). Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective. J. Exp. Biol. *213*, 3-16.

Holliday, R., Pugh, J.E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. Science *187,* 226-232.

Hu, J., and Barrett, R.D.H. (2017). Epigenetics in natural animal populations. J. Evol. Biol. *30*, 1612-1632.

Hudspith, M., Reichelt-Brushett, A., and Harrison, P.L. (2017). Factors affecting the toxicity of trace metals to fertilization success in broadcast spawning marine invertebrates: A review. Aquat. Toxicol. *184*, 1-13.

Hurem, S., Gomes, T., Brede, D.A., Lindbo Hansen, E., Mutoloki, S., Fernandez, C., Mothersill, C., Salbu, B., Kassaye, Y.A., Olsen, A.-K., et al. (2017). Parental gamma irradiation induces reprotoxic effects accompanied by genomic instability in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Environ. Res. *159*, 564-578.

Iltis, C., Dechaume-Moncharmont, F.-X., Galipaud, M., Moreau, J., Bollache, L., and Louâpre, P. (2017). The curse of being single: both male and female *Gammarus pulex* benefit energetically from precopulatory mate guarding. Anim. Behav. *130*, 67-72.

Issartel, J., Boulo, V., Wallon, S., Geffard, O., and Charmantier, G. (2010). Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). Chemosphere *81*, 701-710.

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

Jeltsch, A., Ehrenhofer-Murray, A., Jurkowski, T.P., Lyko, F., Reuter, G., Ankri, S., Nellen, W., Schaefer, M., and Helm, M. (2017). Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation. RNA Biol. *14*, 1108-1123.

Jensen, A., Forbes, V.E. (2001). Interclonal variation in the acute and delayed toxicity of cadmium to the european prosobranch gastropod *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). Arch. Environ. Contam. Toxicol. *40,* 230-235.

Jiang, G., Xu, L., Song, S., Zhu, C., Wu, Q., Zhang, L., Wu, L. (2008). Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells. Toxicology *244*, 49-55.

Jiang, J., Zhang, Z., Yu, X., Yu, C., Liu, F., and Mu, W. (2019). Sublethal and transgenerational effects of thiamethoxam on the demographic fitness and predation performance of the seven-spot ladybeetle *Coccinella septempunctata L.* (Coleoptera: Coccinellidae). Chemosphere *216*, 168-178.

Jubeaux, G. (2012). Développement de la mesure de la vitellogénine chez les invertébrés & utilisation de marqueurs de la perturbation endocrinienne chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum.* Thèse de doctorat. Université Claude Bernard, Lyon.

Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Quéau, H., Chaumot, A., and Geffard, O. (2012). Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. Aquat. Toxicol. *112-113*, 72-82.

Kammenga, J.E., Van Koert, P.H.G., Koeman, J.H., and Bakker, J. (1997). Fitness consequences of toxic stress evaluated within the context of phenotypic plasticity. Ecol. Appl. 7, 726-734.

Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P., and Jeltsch, A. (2011). Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases. ChemBioChem *12*, 206-222.

Karaman, G.S., Pinkster, S. (1977) Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia: part II. *Gammarus roeseli-group* and related species. Bijdragen tot de Dierkunde *47,* 166-196.

Kamstra, J.H., Sales, L.B., Aleström, P., and Legler, J. (2017). Differential DNA methylation at conserved non-genic elements and evidence for transgenerational inheritance following developmental exposure to mono(2-ethylhexyl) phthalate and 5-azacytidine in zebrafish. Epigenetics Chromatin *10*, 1-18.

Kelly, D.W., Dick, J.T.A., and Montgomery, W.I. (2002). The functional role of *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? Hydrobiologia. *485,* 199-203.

Kattwinkel, M., Liess, M., Arena, M., Bopp, S., Streissl, F., and Römbke, J. (2015). Recovery of aquatic and terrestrial populations in the context of European pesticide risk assessment. Environ. Rev. *23*, 382-394.

Kille, P., Andre, J., Anderson, C., Ang, H.N., Bruford, M.W., Bundy, J.G., Donnelly, R., Hodson, M.E., Juma, G., Lahive, E., et al. (2013). DNA sequence variation and methylation in an arsenic tolerant earthworm population. Soil Biol. Biochem. *57*, 524–532.

Khan, F.R., Bury, N.R., and Hogstrand, C. (2012). Copper and zinc detoxification in *Gammarus pulex* (L.). J. Exp. Biol. *215*, 822-832.

Kim, S.W., Kwak, J.I., and An, Y.-J. (2013). Multigenerational Study of Gold Nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*: Transgenerational Effect of Maternal Exposure. Environ. Sci. Technol. *47*, 5393-5399.

Kim, G.-D. (2002). Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. EMBO J. *21*, 4183-4195.

Kimberly, D.A., and Salice, C.J. (2014). If you could turn back time: Understanding transgenerational latent effects of developmental exposure to contaminants. Environ. Pollut. *184*, 419-425.

Kimberly, D.A., and Salice, C.J. (2015). Multigenerational contaminant exposures produce non-monotonic, transgenerational responses in *Daphnia magna*. Environ. Pollut. *207*, 176-182.

Kobiela, M.E., and Snell-Rood, E.C. (2018). Nickel Exposure Has Complex Transgenerational Effects in a Butterfly. Integr. Comp. Biol. 1-10.

Knecht, A.L., Truong, L., Marvel, S.W., Reif, D.M., Garcia, A., Lu, C., Simonich, M.T., Teeguarden, J.G., and Tanguay, R.L. (2017). Transgenerational inheritance of neurobehavioral and physiological deficits from developmental exposure to benzo[a]pyrene in zebrafish. Toxicol. Appl. Pharmacol. *329*, 148-157.

Kong, N., Liu, X., Li, J., Mu, W., Lian, J., Xue, Y., Li, Q., (2017). Effects of temperature and salinity on survival, growth and DNA methylation of juvenile Pacific abalone, *Haliotis discus hannai Ino*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology 35, 1248-1258.

Könemann, S., Müller, Y., Tschentscher, D., Krauss, M., Inostroza, P., Brückner, I., Pinnekamp, J., Schiwy, S., and Hollert, H. (2019). Combination of In Situ Feeding Rate Experiments and Chemical Body Burden Analysis to Assess the Influence of Micropollutants in Wastewater on *Gammarus pulex*. Int. J. Environ. Res. Public. Health *16*, 1-13.

Kronforst, M.R., Gilley, D.C., Strassmann, J.E., and Queller, D.C. (2008). DNA methylation is widespread across social Hymenoptera. Curr. Biol. *18*, R287–R288.

Kooijman, S. A. L. M. 2000. Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems, Cambridge University Press. Cambridge, seconde édition.

Kunz, P.Y., Kienle, C., and Gerhardt, A. (2010). *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests. In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 205, D.M. Whitacre, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 1-76.

Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., and Maleszka, R. (2008). Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation. Science *319*, 1827-1830.

Kvist, J., Gonçalves Athanàsio, C., Shams Solari, O., Brown, J.B., Colbourne, J.K., Pfrender, M.E., Mirbahai, L., 2018. Pattern of DNA Methylation in Daphnia: Evolutionary Perspective. Genome Biology and Evolution 10, 1988-2007.

Lacaze, E., Geffard, O., Bony, S., and Devaux, A. (2010). Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. *700*, 32-38.

Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., and Geffard, O. (2011a). DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. Environmental Pollution *159*, 1682-1691.

Lacaze, E., Geffard, O., Goyet, D., Bony, S., and Devaux, A. (2011b). Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. Environmental Research *111*, 626-634.

Lacaze, E. (2011). Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gammarus fossarum* : développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel. Thèse de doctorat. Université de Metz.

Ladewig, V., Jungmann, D., Köhler, H.-R., Schirling, M., Triebskorn, R., and Nagel, R. (2006). Population Structure and Dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) Upstream and Downstream from Effluents of Sewage Treatment Plants. Arch. Environ. Contam. Toxicol. *50*, 370-383.

Lagrue, C., Wattier, R., Galipaud, M., Gauthey, Z., Rullmann, J.P., Dubreuil, C., Rigaud, T., Bollache, L. (2014). Confrontation of cryptic diversity and mate discrimination within *Gammarus pulex* and *Gammarus fossarum* species complexes. Freshwater Biology *59,* 2555-2570.

Laing, L.V., Viana, J., Dempster, E.L., Trznadel, M., Trunkfield, L.A., Uren Webster, T.M., van Aerle, R., Paull, G.C., Wilson, R.J., Mill, J., et al. (2016). Bisphenol A causes reproductive toxicity, decreases *dnmt1* transcription, and reduces global DNA methylation in breeding zebrafish *(Danio rerio)*. Epigenetics *11*, 526-538.

Lampert, I.T., W. (2002). The Juvenile Growth Rate of *Daphnia*: A Short-Term Alternative to Measuring the Per Capita Rate of Increase in Ecotoxicology? Arch. Environ. Contam. Toxicol. *42*, 193-198.

Lawrence, A.J., and Poulter, C. (2001). Impact of copper, pentachlorophenol and benzo [a] pyrene on the swimming efficiency and embryogenesis of the amphipod *Chaetogammarus marinus*. Mar. Ecol. Prog. Ser. *223*, 213-223.

LeBlanc, G.A., Wang, Y.H., Holmes, C.N., Kwon, G., and Medlock, E.K. (2013). A Transgenerational Endocrine Signaling Pathway in Crustacea. PLoS ONE *8*, e61715.

Lebrun, J.D., Uher, E., and Fechner, L.C. (2017). Behavioural and biochemical responses to metals tested alone or in mixture (Cd-Cu-Ni-Pb-Zn) in *Gammarus fossarum*: From a multi-biomarker approach to modelling metal mixture toxicity. Aquat. Toxicol. *193*, 160–167.

Lee, D.-H., Jacobs, D.R., and Porta, M. (2009). Hypothesis: a Unifying Mechanism for Nutrition and Chemicals as Lifelong Modulators of DNA Hypomethylation. Environ. Health Perspect. *117*, 1799-1802.

Lemaire, V., Brusciotti, S., van Gremberghe, I., Vyverman, W., Vanoverbeke, J., and De Meester, L. (2012). Genotype × genotype interactions between the toxic cyanobacterium *Microcystis* and its grazer, the waterflea *Daphnia*: G × G interactions between *Microcystis* and *Daphnia*. Evol. Appl. *5*, 168-182.

Li, Y., Zhang, L., Li, Y., Li, W., Guo, Z., Li, R., Hu, X., Bao, Z., and Wang, S. (2019). Dynamics of DNA Methylation and DNMT Expression During Gametogenesis and Early Development of Scallop *Patinopecten yessoensis*. Mar. Biotechnol. *21*, 196-205.

Liew, Y.J., Zoccola, D., Li, Y., Tambutté, E., Venn, A.A., Michell, C.T., Cui, G., Deutekom, E.S., Kaandorp, J.A., Voolstra, C.R., et al. (2018). Epigenome-associated phenotypic acclimatization to ocean acidification in a reef-building coral. Sci. Adv. *4*: eaar8028.

Lilley, T.M., Ruokolainen, L., Pikkarainen, A., Laine, V.N., Kilpimaa, J., Rantala, M.J., and Nikinmaa, M. (2012). Impact of Tributyltin on Immune Response and Life History Traits of *Chironomus riparius*: Single and Multigeneration Effects and Recovery from Pollution. Environ. Sci. Technol. *46*, 7382-7389.

Lin, H.C., Hsu, S.C., and Hwang, P.P. (2000). Maternal transfer of cadmium tolerance in larval *Oreochromis mossambicus*. J. Fish Biol. *57*, 239-248.

Lloyd, V. (2000). Parental Imprinting in *Drosophila.* Genetica *109,* 35-44.

Lombó, M., Fernández-Díez, C., González-Rojo, S., Navarro, C., Robles, V., and Herráez, M.P. (2015). Transgenerational inheritance of heart disorders caused by paternal bisphenol A exposure. Environ. Pollut. *206*, 667-678.

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

Lopes, C., Chaumot, A., Xuereb, B., Coulaud, R., Jubeaux, G., Quéau, H., François, A., Geffard, O. (2019). *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (crustacea): Part 2 – evaluating the relevance of using a molt cycle temperature – dependent model as reference to assess toxicity in freshwater monitoring. Submitted article.

Lukančič, S., Žibrat, U., Mezek, T., Jerebic, A., Simčič, T., and Brancelj, A. (2010). A new method for early assessment of effects of exposing two non-target crustacean species, *Asellus aquaticus* and *Gammarus fossarum*, to pesticides, a laboratory study. Toxicol. Ind. Health *26*, 217-228.

Lyko, F., Ramsahoye, B.H., Jaenisch, R. (2000). DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. Nature *408*, 538-540.

Lyko, F., Foret, S., Kucharski, R., Wolf, S., Falckenhayn, C., Maleszka, R., (2010). The Honey Bee Epigenomes: Differential Methylation of Brain DNA in Queens and Workers. PLoS Biology 8, e1000506.

Ma, Y.-B., Jia, P.-P., Junaid, M., Yang, L., Lu, C.-J., and Pei, D.-S. (2018). Reproductive effects linked to DNA methylation in male zebrafish chronically exposed to environmentally relevant concentrations of di-(2-ethylhexyl) phthalate. Environ. Pollut. *237*, 1050-1061.

MacKay, A.B., Mhanni, A.A., McGowan, R.A., and Krone, P.H. (2007). Immunological detection of changes in genomic DNA methylation during early zebrafish development. Genome *50*, 778-785.

Macneil, C., Dick, J.T.A., and Elwood, R.W. (1997). The trophic ecology of freshwater *Gammarus spp.* (crustacea, amphipoda): Problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. Biol. Rev. *72,* 349-364.

Maltby, L., and Naylor, C. (1990). Preliminary Observations on the Ecological Relevance of the *Gammarus* "Scope for Growth" Assay: Effect of Zinc on Reproduction. Funct. Ecol. *4*, 393.

Maltby, L., Naylor, C., and Calow, P. (1990). Effect of stress on a freshwater benthic detritivore: scope for growth in *Gammarus pulex*. Ecotoxicol. Environ. Saf. *19*, 285-291.

Maltby, L., and Crane, M. (1994). Responses of *Gammarus pulex* (amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. Environ. Pollut. *84*, 45-52.

Maltby, L. (1995). Sensitivity of the crustaceans *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) to short-term exposure to hypoxia and unionized ammonia: Observations and possible mechanisms. Water Res. *29*, 781-787.

Mandrioli, M., and Volpi, N. (2003). The genome of the lepidopteran *Mamestra brassicae* has a vertebrate-like content of methyl-cytosine. Genetica *119,* 187-191.

Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., and Skinner, M.K. (2012). Dioxin (TCDD) Induces Epigenetic Transgenerational Inheritance of Adult Onset Disease and Sperm Epimutations. PLoS ONE 7, e46249.

Mann, J.R. (2014). Epigenetics and memigenetics. Cell. Mol. Life Sci. *71*, 1117-1122.

Marković, Z., and Živić, I. (2007). Distribution of the species *Gammarus balcanicus* and *Gammarus fossarum* on the territory of Serbia (central part of the Balkan peninsula). Crustaceana *80*, 67-76.

Marsh, A.G., and Pasqualone, A.A. (2014). DNA methylation and temperature stress in an Antarctic polychaete, *Spiophanes tcherniai*. Front. Physiol. *5*, art173.

Marshall, D.J., and Uller, T. (2007). When is a maternal effect adaptive? Oikos *116*, 1957-1963.

Marshall, D.J. (2008). Transgenerational plasticity in the sea: Context-dependent maternal effects across the life history. Ecology *89*, 418-427.

Martin, C.C., Laforest, L., Akimenko, M.-A., and Ekker, M. (1999). A Role for DNA Methylation in Gastrulation and Somite Patterning. Dev. Biol. *206*, 189-205.

Martin, J.W., and Davis, G.E. (2001). An updated classification of the recent Crustacea. *Science Series (Los Angeles)*, 39. Natural History Museum of Los Angeles County: Los Angeles. VII, 123 pp.223.

Massarin, S., Beaudouin, R., Zeman, F., Floriani, M., Gilbin, R., Alonzo, F., and Pery, A.R.R. (2011). Biology-based modeling to analyze Uranium toxicity data on *Daphnia magna* in a Multigeneration Study. Environ. Sci. Technol. *45*, 4151-4158.

Massicotte, R., Whitelaw, E., and Angers, B. (2011). DNA methylation: A source of random variation in natural populations. Epigenetics *6*, 421-427.

Massicotte, R., and Angers, B. (2012). General-Purpose Genotype or How Epigenetics Extend the Flexibility of a Genotype. Genet. Res. Int. *2012*, 1-7.

Matta, M.B., Linse, J., Cairncross, C., Francendese, L., and Kocan, R.M. (2001). Reproductive and transgenerational effects of methylmercury or Aroclor 1268 on *Fundulus heteroclitus*. Environ. Toxicol. Chem. *20*, 327-335.

Matthiessen, P., Ankley, G.T., Biever, R.C., Bjerregaard, P., Borgert, C., Brugger, K., Blankinship, A., Chambers, J., Coady, K.K., Constantine, L., et al. (2017). Recommended approaches to the scientific evaluation of ecotoxicological hazards and risks of endocrine-active substances: Ecotoxicological Evaluation of Endocrine-Active Substances. Integr. Environ. Assess. Manag. *13*, 267-279.

McBirney, M., King, S.E., Pappalardo, M., Houser, E., Unkefer, M., Nilsson, E., Sadler-Riggleman, I., Beck, D., Winchester, P., and Skinner, M.K. (2017). Atrazine induced epigenetic transgenerational inheritance of disease, lean phenotype and sperm epimutation pathology biomarkers. PLOS ONE 12, e0184306.

McKenney, C.L. (2005). The Influence of Insect Juvenile Hormone Agonists on Metamorphosis and Reproduction in Estuarine Crustaceans. Integr. Comp. Biol. *45*, 97-105.

Meador, J.A., Su, Y., Ravanat, J.-L., Balajee, A.S., (2010). DNA dependent protein kinase (DNA-PK) deficient human glioblastoma cells are preferentially sensitized by Zebularine. Carcinogenesis 31, 184-191.

Mehennaoui, K., Georgantzopoulou, A., Felten, V., Andreï, J., Garaud, M., Cambier, S., Serchi, T., Pain-Devin, S., Guérold, F., Audinot, J.-N., et al. (2016). *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) as a model organism to study the effects of silver nanoparticles. Sci. Total Environ. *566-567*, 1649-1659.

Meng, J., Wang, W., Li, L., Yin, Q., and Zhang, G. (2017). Cadmium effects on DNA and protein metabolism in oyster (*Crassostrea gigas*) revealed by proteomic analyses. Sci. Rep. *7*, 1-16.

Mhanni, A.A., and McGowan, R.A. (2004). Global changes in genomic methylation levels during early development of the zebrafish embryo. Dev. Genes Evol. *214*.

Minguez, L., Ballandonne, C., Rakotomalala, C., Dubreule, C., Kientz-Bouchart, V., and Halm-Lemeille, M.-P. (2015). Transgenerational Effects of Two Antidepressants (Sertraline and Venlafaxine) on *Daphnia magna* Life History Traits. Environ. Sci. Technol. *49*, 1148-1155.

Mirbahai, L., Yin, G., Bignell, J.P., Li, N., Williams, T.D., and Chipman, J.K. (2011). DNA methylation in liver tumorigenesis in fish from the environment. Epigenetics *6*, 1319-1333.

Mirbahai, L., and Chipman, J.K. (2014). Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of lifetime stressor exposures. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. *764-765*, 10-17.

Morange, M. (2014). L'épigénétique. Études vol. *novembre*, 45-55.

Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., and Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. Hum. Mol. Genet. *14*, R47-R58.

Mucig, C. (2009). Evaluation du potentiel génotoxique de pesticides utilisés en viticulture, approche sur lignées cellulaires de truite. Mémoire de master recherche. ENTPE, Vaulx-en-Velin. 74 p.

Nanney, D.L. (1958). Epigenetic control systems. Proc. Natl Acad Sci USA *44,* 712-717.

Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., and Tyler, C.R. (2004). Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish. Environ. Health Perspect. *112*, 1725-1733.

Nica, D.V., Popescu, C., Draghici, G.A., Andrica, F.-M., Privistirescu, I.A., Gergen, I.I., and Stöger, R. (2017). High-level dietary cadmium exposure is associated with global DNA hypermethylation in the gastropod hepatopancreas. PLOS ONE *12*, e0184221.

Norouzitallab, P., Baruah, K., Vandegehuchte, M., Van Stappen, G., Catania, F., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Sorgeloos, P., and Bossier, P. (2014). Environmental heat stress induces epigenetic transgenerational inheritance of robustness in parthenogenetic Artemia model. FASEB J. *28*, 3552-3563.

Norouzitallab, P., Biswas, P., Baruah, K., and Bossier, P. (2015). Multigenerational immune priming in an invertebrate parthenogenetic *Artemia* to a pathogenic *Vibrio campbellii*. Fish Shellfish Immunol. *42*, 426-429.

Norouzitallab, P., Baruah, K., Biswas, P., Vanrompay, D., and Bossier, P. (2016). Probing the phenomenon of trained immunity in invertebrates during a transgenerational study, using brine shrimp *Artemia* as a model system. Sci. Rep. *6*.

Norouzitallab, P., Baruah, K., Vanrompay, D., and Bossier, P. (2019). Can epigenetics translate environmental cues into phenotypes? Sci. Total Environ. *647*, 1281-1293.

O'Connor, C.M., Norris, D.R., Crossin, G.T., and Cooke, S.J. (2014). Biological carryover effects: linking common concepts and mechanisms in ecology and evolution. Ecosphere *5*, art28.

O'Connor, C.M., and Cooke, S.J. (2015). Ecological carryover effects complicate conservation. Ambio *44*, 582-591.

OCDE (2012), Essai n° 211 : *Daphnia magna*, essai de reproduction, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Éditions OCDE, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264185470-fr.

OCDE (2015), Essai n° 240 : Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez médaka (MEOGRT), Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Éditions OCDE, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264242319-fr.

Olsvik, P.A., Whatmore, P., Penglase, S.J., Skjærven, K.H., Anglès d'Auriac, M., and Ellingsen, S. (2019). Associations Between Behavioral Effects of Bisphenol A and DNA Methylation in Zebrafish Embryos. Front. Genet. *10*, art184.

Oppold, A., Kreß, A., Vanden Bussche, J., Diogo, J.B., Kuch, U., Oehlmann, J., Vandegehuchte, M.B., and Müller, R. (2015). Epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. *122*, 45-53.

Pacaud, A. (1945). Les amphipodes de la faune nutritive des eaux douces françaises. Bulletin français de pisciculture *136,* 105-120.

Pakyari, H., and Enkegaard, A. (2015). Sublethal and Transgenerational Effects of Abamectin on the Biological Performance of the Predatory Thrips *Scolothrips longicornis* (Thysanoptera: Thripidae). J. Econ. Entomol. *108*, 559-565.

Panikar, C.S., Paingankar, M.S., Deshmukh, S., Abhyankar, V., and Deobagkar, D.D. (2017). DNA Methylation Changes in a Gene-Specific Manner in Different Developmental Stages of *Drosophila melanogaster*. Curr. Sci. *112*, 1165-1175.

Parrott, J.L., Bjerregaard, P., Brugger, K.E., Gray, L.E., Iguchi, T., Kadlec, S.M., Weltje, L., and Wheeler, J.R. (2017). Uncertainties in biological responses that influence hazard and risk approaches to the regulation of endocrine active substances: Uncertainties in Biological Responses. Integr. Environ. Assess. Manag. *13*, 293-301.

Pechenik, J.A. (2006). Larval experience and latent effects--metamorphosis is not a new beginning. Integrative and Comparative Biology *46*, 323-333.

Peeters, E.T.H.M., and Gardeniers, A.J.J.P. (1998). Logistic regression as a tool for defining habitat requirements of two common gammarids. Freshw. Biol. *39*, 605-615.

Peterson, C.H. (2003). Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. Science *302*, 2082-2086.

Phillips, N.E., and Rouchon, A.M. (2018). A dose-dependent relationship between copper burden in female urchin gonads and developmental impairment of their offspring. Mar. Environ. Res. *136*, 120-125.

Pierron, F., Bureau du Colombier, S., Moffett, A., Caron, A., Peluhet, L., Daffe, G., Lambert, P., Elie, P., Labadie, P., Budzinski, H., et al. (2014a). Abnormal Ovarian DNA Methylation Programming during Gonad Maturation in Wild Contaminated Fish. Environ. Sci. Technol. *48*, 11688-11695.

Pierron, F., Baillon, L., Sow, M., Gotreau, S., and Gonzalez, P. (2014b). Effect of Low-Dose Cadmium Exposure on DNA Methylation in the Endangered European Eel. Environ. Sci. Technol. *48*, 797-803.

Piersma, T. and Drent, J. (2003). Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. Trends Ecol. Evol. *18*, 228-233.

Piiroinen, S., Boman, S., Lyytinen, A., Mappes, J., and Lindström, L. (2014). Sublethal effects of deltamethrin exposure of parental generations on physiological traits and overwintering in *Leptinotarsa decemlineata*. J. Appl. Entomol. *138*, 149-158.

Piscart, C., Bollache, L. (2012). Crustacés amphipodes de surface (Gammares d'eau douce). Introduction Pratique à la Systématique des Organismes des Eaux Continentales Françaises, 11. Thonon-les-Bains, FRA : Association française de limnologie, 122.

Plaire, D., Bourdineaud, J.-P., Alonzo, A., Camilleri, V., Garcia-Sanchez, L., Adam-Guillermin, C., and Alonzo, F. (2013). Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of Daphnia magna exposed to uranium. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. *158*, 231-243.

Plautz, S.C., and Salice, C.J. (2013). Plasticity in offspring contaminant tolerance traits: developmental cadmium exposure trumps parental effects. Ecotoxicology *22*, 847-853.

Po, B.H.K., and Chiu, J.M.Y. (2018). Transgenerational impairments of reproduction and development of the marine invertebrate *Crepidula onyx* resulted from long-term dietary exposure of 2,2′,4,4′-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47). Environ. Pollut. *235*, 730-738.

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

Pöckl, M., Webb, B.W., and Sutcliffe, D.W. (2003). Life history and reproductive capacity of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda) under naturally fluctuating water temperatures: a simulation study. Freshw. Biol. *48*, 53-66.

Pölkki, M., Kangassalo, K., and Rantala, M.J. (2012). Transgenerational Effects of Heavy Metal Pollution on Immune Defense of the Blow Fly *Protophormia terraenovae*. PLoS ONE *7*, e38832.272

Prud'homme, S.M., Chaumot, A., Cassar, E., David, J.-P., and Reynaud, S. (2017). Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito *Aedes aegypti*: On the relevance of transgenerational studies. Environ. Pollut. *220*, 242-254.

Putnam, H.M., Davidson, J.M., and Gates, R.D. (2016). Ocean acidification influences host DNA methylation and phenotypic plasticity in environmentally susceptible corals. Evol. Appl. *9*, 1165-1178.

Qian, Y., Wang, C., Wang, J., Zhang, X., Zhou, Z., Zhao, M., and Lu, C. (2017). Fipronil-induced enantioselective developmental toxicity to zebrafish embryo-larvae involves changes in DNA methylation. Sci. Rep. *7*.

Rai, K., Huggins, I.J., James, S.R., Karpf, A.R., Jones, D.A., and Cairns, B.R. (2008). DNA Demethylation in Zebrafish Involves the Coupling of a Deaminase, a Glycosylase, and Gadd45. Cell *135*, 1201-1212.

Raimondo, S., Hemmer, B.L., Goodman, L.R., and Cripe, G.M. (2009). Multigenerational exposure of the estuarine sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) to 17ß-Estradiol. II. Population-level effects through two life cycles. Environ. Toxicol. Chem. *28*, 2409-2415.

Rattan, S. Brehm, E., Gao, L., Flaws, A. (2018). Di(2-ethylhexyl) phthalate exposure during prenatal development causes adverse transgenerational effects on female fertility in mice. Toxicol. Sci. 163, 420-429.

Ravanat, J.-L., Douki, T., Duez, P., Gremaud, E., Herbert, K., Hofer, T., Lasserre, L., Saint-Pierre, C., Favier, A., Cadet, J. (2002). Cellular background level of 8-oxo-7, 8-dihydro-2′-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. Carcinogenesis 23, 1911-1918.

Reátegui-Zirena, E.G., Fidder, B.N., Olson, A.D., Dawson, D.E., Bilbo, T.R., and Salice, C.J. (2017). Transgenerational endpoints provide increased sensitivity and insight into multigenerational responses of *Lymnaea stagnalis* exposed to cadmium. Environ. Pollut. *224*, 572-580.

Rey, O., Danchin, E., Mirouze, M., Loot, C., Blanchet, S. (2016). Adaptation to Global Change: A Transposable Element–Epigenetics Perspective. Trends in Ecology & Evolution *31*, 514-526.

Richards, C.L., Bossdorf, O., and Verhoeven, K.J.F. (2010). Understanding natural epigenetic variation: Commentary. New Phytol. *187*, 562-564.

Riesch, R., Plath, M., and Schlupp, I. (2012). The offspring size/fecundity trade-off and female fitness in the Atlantic molly (*Poecilia mexicana*, Poeciliidae). Environ. Biol. Fishes 94, 457-463.

Riggs, A.D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. Cytogenet. Cell. Genet. *14,* 9-25.

Riviere, G., Wu, G.-C., Fellous, A., Goux, D., Sourdaine, P., and Favrel, P. (2013). DNA methylation is crucial for the early development in the oyster *C. gigas*. Mar. Biotechnol. *15*, 739-753.

Rivière, G. (2014). Epigenetic features in the oyster *Crassostrea gigas* suggestive of functionally relevant promoter DNA methylation in invertebrates. Front. Physiol. *5*.

Rose, R.M., Warne, M.St.J., and Lim, R.P. (2004). Sensitivity of offspring to chronic 3,4-dichloroaniline exposure varies with maternal exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. *58*, 405-412.

Sadd, B.M., and Schmid-Hempel, P. (2007). Facultative but persistent trans-generational immunity via the mother's eggs in bumblebees. Curr. Biol. *17*, R1046-R1047.

Sánchez, M., Ferrando, M.D., Sancho, E., and Andreu, E. (2000). Physiological Perturbations in Several Generations of *Daphnia magna* Straus Exposed to Diazinon. Ecotoxicol. Environ. Saf. *46*, 87-94.

Sarapultseva, E.I., and Dubrova, Y.E. (2016). The long-term effects of acute exposure to ionising radiation on survival and fertility in *Daphnia magna*. Environ. Res. *150*, 138–143.

Sarda, S., Zeng, J., Hunt, B.G., and Yi, S.V. (2012). The Evolution of Invertebrate Gene Body Methylation. Mol. Biol. Evol. *29*, 1907-1916.

Sardo, A.M., Azeiteiro, U.M., Pereira, L., Morgado, F., Soares, A.M.V.M. (2005). Histological evaluation of the exposure to 3,4-Dichloroaniline in the estuarine mysid *Mesopodopsis slabberi,* under experimental conditions. Fresenius environmental bulletin *14,* 579-583.

Saxton, H.J., Goodman, J.R., Collins, J.N., and Black, F.J. (2013). Maternal transfer of inorganic mercury and methylmercury in aquatic and terrestrial arthropods: Maternal transfer of mercury in arthropods. Environ. Toxicol. Chem. *32*, 2630-2636.

Scanes, E., Parker, L.M., O'Connor, W.A., Gibbs, M.C., and Ross, P.M. (2018). Copper and ocean acidification interact to lower maternal investment, but have little effect on adult physiology of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata*. Aquat. Toxicol. *203*, 51-60.

Schill, R.O., Görlitz, H., Köhler, H.-R. (2003) Laboratory simulation of a mining accident: acute toxicity, hsc/hsp70 response, and recovery from stress in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) exposed to a pulse of cadmium. BioMetals *16*, 391-401.

Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwichowski, K.-U., Nagel, R., Köhler, H.-R., and Triebskorn, R. (2006). Bisphenol A in Artificial Indoor Streams: II. Stress Response and Gonad Histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). Ecotoxicology *15*, 143-156.

Schwindt, A.R. (2015). Parental effects of endocrine disrupting compounds in aquatic wildlife: Is there evidence of transgenerational inheritance? General and Comparative Endocrinology *219*, 152-164.

Seemann, F., Peterson, D.R., Witten, P.E., Guo, B.-S., Shanthanagouda, A.H., Ye, R.R., Zhang, G., and Au, D.W.T. (2015). Insight into the transgenerational effect of benzo[a]pyrene on bone formation in a teleost fish (Oryzias latipes). Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. *178*, 60-67.

Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenbergh, G.F., Watts, M., and Wenzel, A. (2003). Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. Ecotoxicol. Environ. Saf. *54*, 302-314.

Sellin, M.K., Eidem, T.M., and Kolok, A.S. (2007). Cadmium Exposures in Fathead Minnows: Are There Sex-Specific Differences in Mortality, Reproductive Success, and Cd Accumulation? Arch. Environ. Contam. Toxicol. *52*, 535-540.

Serdar, O. (2019). The effect of dimethoate pesticide on some biochemical biomarkers in *Gammarus pulex*. Environ. Sci. Pollut. Res. *26*, 21905-21914.

Simcic, T., and Brancelj, A. (2006). Effects of pH on electron transport system (ETS) activity and oxygen consumption in *Gammarus fossarum*, *Asellus aquaticus* and *Niphargus sphagnicolus*. Freshw. Biol. *51*, 686-694.

Simon, R., Jubeaux, G., Chaumot, A., Lemoine, J., Geffard, O., and Salvador, A. (2010). Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*). J. Chromatogr. A *1217*, 5109–5115.

Simpson, S.J., and Miller, G.A. (2007). Maternal effects on phase characteristics in the desert locust, *Schistocerca gregaria*: A review of current understanding. J. Insect Physiol. *53*, 869-876.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. *175*, 184-191.

Skinner, M.K., Manikkam, M., and Guerrero-Bosagna, C. (2010). Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. Trends Endocrinol. Metab. *21*, 214-222.

Smith, C.C., and Fretwell, S.D. (1974). The Optimal Balance between Size and Number of Offspring. Am. Nat. 108, 499-506.

Šrut, M., Drechsel, V., and Höckner, M. (2017). Low levels of Cd induce persisting epigenetic modifications and acclimation mechanisms in the earthworm *Lumbricus terrestris*. PLOS ONE *12*, e0176047.

Stoks, R., and Córdoba-Aguilar, A. (2012). Evolutionary Ecology of Odonata: A Complex Life Cycle Perspective. Ann. Rev. of Entomol. *57*, 249–265.

Strachecka, A., Borsuk, G., Olszewski, K., Paleolog J., Gagoś, M., Chobotow, J., Nawrocka A., Gryzińska, M., and Bajda, M. (2012). The Effect of Amphotericin B on the Lifespan, Body-surface Protein Concentrations, and DNA Methylation levels of honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Apicultural Science *56*, 107-114.

Stuhlbacher, A., and Maltby, L. (1992). Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). Arch. Environ. Contam. Toxicol. *22*, 319-324.

Suarez-Ulloa, V., Gonzalez-Romero, R., and Eirin-Lopez, J.M. (2015). Environmental epigenetics: A promising venue for developing next-generation pollution biomonitoring tools in marine invertebrates. Mar. Pollut. Bullet. *98*, 5-13.

Sukumaran, S., and Grant, A. (2013). Effects of genotoxicity and its consequences at the population level in sexual and asexual Artemia assessed by analysis of inter-simple sequence repeats (ISSR). Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. *757*, 8-14.

Sussarellu, R., Lebreton, M., Rouxel, J., Akcha, F., and Rivière, G. (2018). Copper induces expression and methylation changes of early development genes in *Crassostrea gigas* embryos. Aquat. Toxicol. *196*, 70-78.

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

Szabó, B., and Bakonyi, G. (2017). Multigenerational and Transgenerational Side-Effects of an Insecticide on Eggs of *Folsomia candida* (Collembola). Pol. J. Ecol. *65*, 110-121.

Takiguchi, M., Achanzar, W.E., Qu, W. Li, G., Waalkes, M.P., (2003). Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. Exp. Cell. Res. *286,* 355-365.

Taylor, E.J., Maund, S.J., and Pascoe, D. (1991). Toxicity of four common pollutants to the freshwater macroinvertebrates *Chironomus riparius* Meigen (Insecta:Diptera) and *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea:Amphipoda). Arch. Environ. Contam. Toxicol. *21*, 371-376.

Taylor, E.J., Maund, S.J., Bennett, D., and Pascoe, D. (1994). Effects of 3, 4-dichloroaniline on the growth of two freshwater macroinvertebrates in a stream mesocosm. Ecotoxicol. Environ. Saf. 29, 80-85.

Thybaud, E. Les enjeux de la recherche en toxicologie et écotoxicologie dans le cadre de la mise en œuvre de REACH. Consulté sur le site : https://www.mediachimie.org/sites/default/files/expert-sante_ch03_thybaud.pdf

Tran, T.T., Janssens, L., Dinh, K.V., and Stoks, R. (2018). Transgenerational interactions between pesticide exposure and warming in a vector mosquito. Evol. Appl. *11*, 906-917.

Trapp, J., Armengaud, J., Pible, O., Gaillard, J.-C., Abbaci, K., Habtoul, Y., Chaumot, A., and Geffard, O. (2015). Proteomic Investigation of Male *Gammarus fossarum*, a Freshwater Crustacean, in Response to Endocrine Disruptors. J. Proteome Res. *14*, 292-303.

Trapp, J., Armengaud, J., Salvador, A., Chaumot, A., and Geffard, O. (2014). Next-Generation Proteomics: Toward Customized Biomarkers for Environmental Biomonitoring. Environ. Sci. Technol. *48*, 13560-13572.

Trapp, J., Gouveia, D., Almunia, C., Pible, O., Degli Esposti, D., Gaillard, J.-C., Chaumot, A., Geffard, O., and Armengaud, J. (2018). Digging deeper into the pyriproxyfen-response of the amphipod *Gammarus fossarum* with a next-generation ultra-high-field orbitrap analyser: new perspectives for environmental toxicoproteomics. Front. Environ. Sci. *6*, art54.

Trijau, M., Asselman, J., Armant, O., Adam-Guillermin, C., De Schamphelaere, K.A.C., and Alonzo, F. (2018). Transgenerational DNA Methylation Changes in *Daphnia magna* Exposed to Chronic γ Irradiation. Environ. Sci. Technol. *52*, 4331-4339.

Tsui, M.T.K., and Wang, W.-X. (2004). Maternal transfer efficiency and transgenerational toxicity of methylmercury in D*aphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry *23*, 1504-1511.

Turja, R., Guimarães, L., Nevala, A., Kankaanpää, H., Korpinen, S., and Lehtonen, K.K. (2014). Cumulative effects of exposure to cyanobacteria bloom extracts and benzo[a]pyrene on antioxidant defence biomarkers in *Gammarus oceanicus* (Crustacea: Amphipoda). Toxicon *78*, 68-77.

Tweedie, S., Ng, H.-H., Barlow, A.L., Turner, B.M., Hendrich, B., and Bird, A. (1999). Vestiges of a DNA methylation system in Drosophila melanogaster? Nat. Genet. *23*, 389-390.

Uller, T. (2008). Developmental plasticity and the evolution of parental effects. Trends Ecol. Evol. *23*, 432-438.

Väinölä, R., Witt, J.D.S., Grabowski, M., Bradbury, J.H., Jazdzewski, K., and Sket, B. (2008). Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. Hydrobiologia *595*, 241-255.

Vandegehuchte, M.B., Kyndt, T., Vanholme, B., Haegeman, A., Gheysen, G., Janssen, C.R. (2009a). Occurrence of DNA methylation in *Daphnia magna* and influence of multigeneration Cd exposure. Environment International *35*, 700-706.

Vandegehuchte, M. B., Lemière, F., Janssen, C. R. (2009b). Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multigeneration Zn exposure. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicology & Pharmacology *150*, 343-348.

Vandegehuchte, M.B., Lemière, F., Vanhaecke, L., Vanden Berghe, W., and Janssen, C.R. (2010a). Direct and transgenerational impact on Daphnia magna of chemicals with a known effect on DNA methylation. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. *151*, 278-285.

Vandegehuchte, M.B., De Coninck, D., Vandenbrouck, T., De Coen, W.M., and Janssen, C.R. (2010b). Gene transcription profiles, global DNA methylation and potential transgenerational epigenetic effects related to Zn exposure history in *Daphnia magna*. Environ. Pollut. *158*, 3323-3329.

Vandegehuchte, M.B., and Janssen, C.R. (2011). Epigenetics and its implications for ecotoxicology. Ecotoxicology *20*, 607-624.

Varriale, A., and Bernardi, G. (2006a). DNA methylation and body temperature in fishes. Gene *385*, 111-121.

Varriale, A., and Bernardi, G. (2006b). DNA methylation in reptiles. Gene *385*, 122-127.

Verberk, W.C.E.P., Leuven, R.S.E.W., van der Velde, G., and Gabel, F. (2018). Thermal limits in native and alien freshwater peracarid Crustacea: The role of habitat use and oxygen limitation. Funct. Ecol. *32*, 926-936.

Vigneron, A., Geffard, O., Coquery, M., François, A., Quéau, H., and Chaumot, A. (2015). Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a *Gammarus fossarum* population inhabiting a low-level contaminated stream. Ecotoxicology *24*, 1239-1249.

Vigneron, A. (2015). Capacités d'adaptation des populations naturelles à la contamination des milieux aquatiques : cas d'étude du cadmium chez le crustacé *Gammarus fossarum.* Université Claude Bernard, Lyon.

Vigneron, A., Geffard, O., Quéau, H., Chaumot, A. (2016). Mothers and not genes determine inherited differences in cadmium sensitivities within unexposed populations of the freshwater crustacean *Gammarus fossarum*. Evo. Appl. *9*, 355-366.

Vigneron, A., Geffard, O., Quéau, H., François, A., and Chaumot, A. (2019). Nongenetic inheritance of increased Cd tolerance in a field *Gammarus fossarum* population: Parental exposure steers offspring sensitivity. Aquat. Toxicol. *209*, 91-98.

Villellas, J., Doak, D.F., García, M.B., Morris, W.F. (2015). Demographic compensation among populations: What is it, how does it arise and what are its implication? Ecology letters. *18*, 1139-1152.

Villota-Salazar, N.A., Mendoza-Mendoza, A., and González-Prieto, J.M. (2016). Epigenetics: from the past to the present. Front. Life Sci. *9*, 347-370.

Volkova, K., Reyhanian Caspillo, N., Porseryd, T., Hallgren, S., Dinnetz, P., Olsén, H., and Porsch Hällström, I. (2015). Transgenerational effects of 17α-ethinyl estradiol on anxiety behavior in the guppy, *Poecilia reticulata*. Gen. Comp. Endocrinol. *223*, 66-72.

Waddington, C.H. (1942) in Waddington, C.H. (2012). The Epigenotype. Int. J. Epidemiol. *41*, 10-13.

Walsh, T.K., Brisson, J.A., Robertson, H.M., Gordon, K., Jaubert-Possamai, S., Tagu, D., and Edwards, O.R. (2010). A functional DNA methylation system in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*: DNA methylation in the pea aphid. Insect Mol. Biol. *19*, 215-228.

Walter, R.B., Li, H.-Y., Intano, G.W., Kazianis, S., and Walter, C.A. (2002). Absence of global genomic cytosine methylation pattern erasure during medaka (*Oryzias latipes*) early embryo development. Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. *133*, 597-607.

Wang, Y., Wang, C., Zhang, J., Chen, Y., and Zuo, Z. (2009). DNA hypomethylation induced by tributyltin, triphenyltin, and a mixture of these in *Sebastiscus marmoratus* liver. Aquat. Toxicol. *95*, 93-98.

Wang, X., Wheeler, D., Avery, A., Rago, A., Choi, J.-H., Colbourne, J.K., Clark, A.G., Werren, J.H., 2013. Function and Evolution of DNA Methylation in *Nasonia vitripennis*. PLoS Genetics *9*, e1003872.

Wang, X., Li, Q., Lian, J., Li, L., Jin, L., Cai, H., Xu, F., Qi, H., Zhang, L., Wu, F., et al. (2014). Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* provide insight into the evolution of invertebrate CpG methylation. BMC Genomics *15*, 1119.

Wang, M., Nie, Y., Liu, Y., Dai, H., Wang, J., Si, B., Yang, Z., Cheng, L., Liu, Y., Chen, S., et al. (2019). Transgenerational effects of diesel particulate matter on *Caenorhabditis elegans* through maternal and multigenerational exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. *170*, 635-643.

Wautier, J., and Roux, A. (1959). Note sur les Gammares du groupe *Pulex* dans la région lyonnaise. Bull. Mens. Société Linn. Lyon *28*, 76-83.

Weiss, M., Macher, J.N., Seefeldt, M.A., Leese, F. (2014). Molecular evidence for further overlooked species within the *Gammarus fossarum* complex (Crustacea: Amphipoda). Hydrobiologia *721,* 165-184.

Welton, J.S., and Clarke, R.T. (1980). Laboratory Studies on the Reproduction and Growth of the Amphipod, *Gammarus pulex* (L.). J. Anim. Ecol. *49*, 581-592.

Westram, A.M., Jokela, J., Baumgartner, C., and Keller, I. (2011). Spatial Distribution of Cryptic Species Diversity in European Freshwater Amphipods (*Gammarus fossarum*) as Revealed by Pyrosequencing. PLoS ONE *6*, e23879.

Wijnhoven, S., van Riel, M.C., van der Velde, G. (2003) Exotic and indigenous freshwater gammarid species: physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water. Aquatic Ecology *37,* 151-158.

Windsor, F.M., Ormerod, S.J., and Tyler, C.R. (2018). Endocrine disruption in aquatic systems: up-scaling research to address ecological consequences: Endocrine disruption in aquatic systems. Biol. Rev. *93*, 626-641.

Wirbisky-Hershberger, S.E., Sanchez, O.F., Horzmann, K.A., Thanki, D., Yuan, C., and Freeman, J.L. (2017). Atrazine exposure decreases the activity of DNMTs, global DNA methylation levels, and dnmt expression. Food Chem. Toxicol. *109*, 727-734.

Xiang, H., Zhu, J., Chen, Q., Dai, F., Li, X., Li, M., Zhang, H., Zhang, G., Li, D., Dong, Y., et al. (2010). Single base–resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map. Nat. Biotechnol. *28*, 516-520.

Xiao, D., Zhao, J., Guo, X., Chen, H., Qu, M., Zhai, W., Desneux, N., Biondi, A., Zhang, F., and Wang, S. (2016). Sublethal effects of imidacloprid on the predatory seven-spot ladybird beetle *Coccinella septempunctata*. Ecotoxicology *25*, 1782-1793.

Xu, H., Yang, J., Wang, Y., Jiang, Q., Chen, H., and Song, H. (2008). Exposure to 17α-ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*). Aquat. Toxicol. *88*, 1-8.

Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J., and Geffard, O. (2009a). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. Aquat. Toxicol. *93*, 225-233.

Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., and Geffard, O. (2009b). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. Aquat. Toxicol. *94*, 114-122.

Xuereb, B. (2009). Développement de marqueurs de neurotoxicité et de perturbations endocrines chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. Université de Metz.

Yi, S.V., 2017. Insights into Epigenome Evolution from Animal and Plant Methylomes. Gen. Biol. Evol. *9*, 3189-3201.

Youngson, N.A., and Whitelaw, E. (2008). Transgenerational Epigenetic Effects. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. *9*, 233-257.

Yu, Z., Chen, X., Zhang, J., Wang, R., and Yin, D. (2013). Transgenerational effects of heavy metals on L3 larva of *Caenorhabditis elegans* with greater behavior and growth inhibitions in the progeny. Ecotoxicol. and Environ. Saf. *88*, 178-184.

Zhang, J., Fu, Y., Li, J., Wang, J., He, B., and Xu, S., 2009. Effects of subchronic cadmium poisoning on DNA methylation in hens. Environ. Toxicol. and Pharmacol. *27*, 345-349.

Zhang, Q.-Q., and Qiao, M. (2018). Toxic effects of pentachlorophenol and 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether on two generations of Folsomia candida. Ecotoxicol. Environ. Saf. *162*, 499-504.

Zheng, J.-L., Guo, S.-N., Yuan, S.-S., Xia, H., Zhu, Q.-L., and Lv, Z.-M. (2017). Preheating mitigates cadmium toxicity in zebrafish livers: Evidence from promoter demethylation, gene transcription to biochemical levels. Aquat. Toxicol. *190*, 104-111.

Annexe

Étude de l'effet de l'encagement *in situ* sur le niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN chez *Gammarus fossarum* réalisée par Maëlenn L'Hoir lors de son stage de Master 2

Matériels et méthodes

Des individus mâles calibrés ont été prélevés sur le site de la cressonnière du Bugey de Saint-Maurice-de-Rémens (II.1.1), puis directement encagés sur ce même site (3 systèmes d'encagement avec 15 organismes par système nourris de manière *ad libitum*). Après 7, 14 et 21 jours, des individus témoins (*i.e.* prélevés dans le site) et des individus encagés ont été acheminés au laboratoire pour être échantillonnés de manière individuelle, pesés, sacrifiés à l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN (voir II.5.1.1).

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R (version 3.5.1). Les niveaux de méthylation des organismes témoins et encagés ont été comparés à chaque date de prélèvement à l'aide du test de Mann-Whitney. Le seuil de significativité de tous les tests statistiques est égal à 0,05.

Résultats

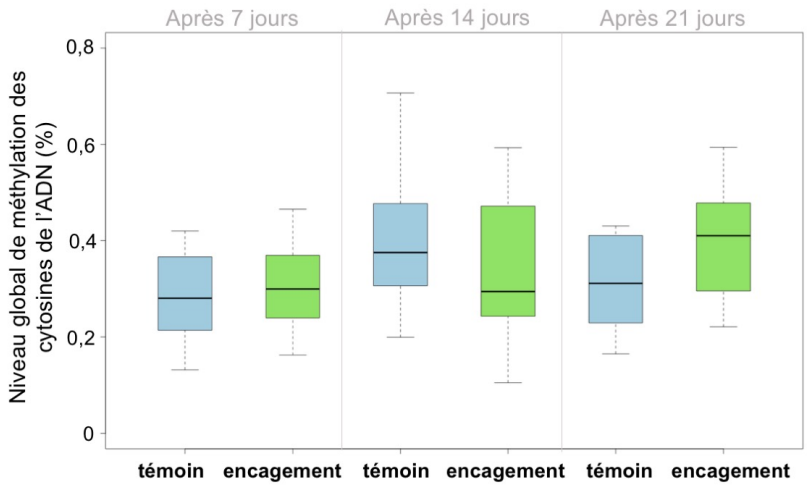


Figure A - 1: Influence de l'encagement des organismes *in situ* sur le niveau global de méthylation des cytosines de l'ADN, n = 20. Test de Mann-Whitney, p>0.05.

Quelle que soit la date de prélèvement considérée, les niveaux globaux de méthylation des cytosines de l'ADN entre les organismes prélevés directement dans le milieu naturel et ceux encagés ne sont pas significativement différents (Test de Mann-Whitney, p-value > 0.05).

Résumé

À l'heure actuelle, les démarches écotoxicologiques (*i.e*. bioessais de laboratoire, approches biomarqueurs, tests *in situ*) évaluent les effets des contaminants majoritairement sur des temps de réponse courts, qui ne correspondent pas à l'échelle temporelle de la dynamique des populations. En plus de la toxicité manifestée au cours de l'exposition chimique, des effets peuvent pourtant s'observer plus tardivement au cours de la vie des organismes, voire de leur descendance. Ces effets différés peuvent avoir une influence importante sur la démographie, la résilience et l'acquisition de tolérance des populations ainsi que leur vulnérabilité face à de nouvelles perturbations environnementales. Leur étude constitue ainsi un véritable enjeu pour améliorer la compréhension des réponses des populations au stress chimique dans les écosystèmes.

Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse a été d'explorer les effets intergénérationnels et transgénérationnels de l'exposition aux contaminants et leurs conséquences sur le fonctionnement des populations de l'espèce sentinelle *Gammarus fossarum* (Crustacé). Le parti-pris expérimental appliqué tout au long de ce travail combinant expérimentation multi-génération et modélisation en dynamique de population, a consisté à mettre en œuvre des expositions limitées à la génération parentale initiale (F0), puis à suivre le développement de trois générations successives en milieu non contaminé.

Compte-tenu de l'implication potentiellement importante des mécanismes épigénétiques dans l'apparition d'effets différés, la méthylation globale des cytosines de l'ADN a été explorée pour la toute première fois chez cette espèce. Cette marque épigénétique s'est avérée être sensible au stress thermique, chimique avec le cadmium et à la privation alimentaire dans des conditions contrôlées au laboratoire. Une variabilité importante du niveau de base du biomarqueur entre populations naturelles de *Gammarus fossarum* a également été observée.

Par ailleurs, suite à des expositions parentales de 3 semaines au cadmium et à la 3,4-dichloroaniline, nous avons mis en évidence l'existence d'effets en cascade sur les traits d'histoire de vie de *G. fossarum* jusqu'à la troisième génération de descendants, après plus d'un an d'expérimentation. Nos travaux suggèrent également un rôle prépondérant des compromis entre les traits d'histoire de vie et entre les générations dans l'émergence des effets différés. Ces compromis se traduisent par un maintien de la capacité démographique de la population suite à l'exposition parentale au cadmium et sont ainsi certainement contraints par la stratégie d'histoire de vie de *Gammarus fossarum*. Au bilan, ces résultats soulignent l'intérêt de mener des études au-delà de la première génération de descendants et de généraliser les études à long terme sur les espèces environnementales non-modèles de laboratoire pour améliorer la compréhension des réponses populationnelles à la contamination et la pertinence écologique de l'évaluation actuelle des risques.

Mots clés : effet différé, effet transgénérationnel, *Gammarus fossarum*, trait d'histoire de vie, modélisation de la dynamique des populations, impact démographique, stress chimique, épigénétique, méthylation des cytosines de l'ADN

Abstract

Most of the current ecotoxicological approaches (i.e. laboratory bioassays, biomarker, in situ tests) assess the effects of contaminants at the individual level on short response time, that do not match the time scale of population dynamics. In addition to toxicity occurring during the chemical exposure of individuals, effects can arise later along the lifetime of organisms and of their progeny. Such delayed effects can lead to significant impact on population demography, resilience and tolerance, as well as on population vulnerability to new environmental disruptions. Studying these effects is a real challenge to improve the understanding of population response to chemical stress in ecosystems.

In this context, the main purpose of this thesis was to explore intergenerational and transgenerational effects of parental contaminant exposure and their consequences on the functioning of the populations in the sentinel species *Gammarus fossarum* (Crustacea). To do so, challenging one-year lab experiment together with population dynamics modelling were performed. The experimental statement was to only expose the parental generation (F0) and then to monitor the development of successive generations in an uncontaminated environment.

Assuming a prevalent involvement of epigenetic mechanisms in the onset of delayed effects, this work explored for the first time the global genomic cytosine methylation level in *Gammarus fossarum*. The studied epigenetic mark was shown to be sensitive to heat stress, chemical stress (cadmium) and to food starvation in controlled laboratory conditions. A substantial variability in the basal level between several natural populations of *Gammarus fossarum* was also recorded.

In the light of the multi-generational experiments, cascading effects were observed on *G. fossarum* life history traits until the third offspring generation after the parental exposure to cadmium or 3,4-dichloroaniline. In addition, a significant role of trade-offs between life-history traits and between generations can be suggested in the emergence of delayed effects. These trade-offs translate into the maintenance of demographic population capacity after the parental cadmium exposure and could be consequently constrained by life history strategy of *Gammarus fossarum*. Hence, these results highlight the interest of expanding the studied response time beyond the first offspring generation and of studying the long-term effects of chemical stress in non-target environmental species. Such approaches can be suggested to improve the understanding of natural population responses to contamination and to upgrade the ecological relevance of the current risk assessment.

Keywords: delayed effect, transgenerational effect, *Gammarus fossarum*, life-history trait, population dynamics modelling, demographic impact, chemical stress, epigenetics, cytosine methylation in DNA