
Ecole doctorale ABIES
UFR Sciences Exactes et Naturelles
Université de Reims Champagne-Ardenne

THÈSE

Pour l'obtention du grade de docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : Physiologie, Biologie des organismes-populations-interactions

Présentée et soutenue publiquement le 6 octobre 2020 par

Fanny Louis

**Métabolisme énergétique : synthèse et gestion de l'énergie
cellulaire chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha***

Composition du jury

Rapporteurs :

Yann Voituren	Professeur	LEHNA, Université de Lyon I
Patrice Couture	Professeur	INRS, Québec

Examinatrices :

Catherine Mouneyrac	Professeure	MMS, Université Catholique de l'Ouest
Karine Salin	Chargée de recherche	LEMAR, IFREMER, Brest

Invitées :

Sandrine Pain-Devin	Maître de Conférences	LIEC, Université de Lorraine
Béatrice Rocher	Maître de Conférences, HDR	SEBIO, Université du Havre

Directrice :

Séverine Paris-Palacios	Maître de Conférences, HDR	SEBIO, Univ. de Reims Champagne-Ardenne
--------------------------------	----------------------------	---

Encadrante :

Elise David	Maître de Conférences	SEBIO, Univ. de Reims Champagne-Ardenne
--------------------	-----------------------	---

« La science présente beaucoup de danger, mais il faut lutter contre ces dangers non pas par moins de science mais par davantage de science, une science qui puisse aussi créer sa propre éthique. »

Jean d'Ormesson

À Titi et Marcel.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Alain Geffard et Stéphane Betoulle pour leur accueil et leurs conseils précieux fournis lors de ces 3 années passées au sein du laboratoire SEBIO à Reims.

Merci à mes deux encadrantes, Séverine et Elise pour ces 3 années passées à vos côtés et de m'avoir laissé l'opportunité de réaliser cette thèse avec vous. Merci Séverine pour tes conseils, ta bienveillance et ta bonne humeur. Merci Elise, tout d'abord pour m'avoir fait confiance tout au long de la thèse même si j'ai été un vrai boulet quelques fois. Merci d'avoir mis à maintes reprises le réveil à l'aube pour aller chercher les petites dreissènes à Commercy ! Il faut dire que ça en valait la peine rien que pour le café du matin et les madeleines fraîches à la sortie du resto' ! Merci aussi pour ta patience en biomol'. Il y a 3 ans ce n'était qu'une étiquette au-dessus d'un large et vaste trou noir qui s'est estompé peu à peu ! Merci également pour tes conseils, ton soutien et ta bienveillance et aussi pour tous les bonbons au gingembre que j'ai pu te taxer durant ces 3 années.

Je souhaiterais également remercier les différents membres du jury : Patrice Couture, Yann Voitureon, Karine Salin et Catherine Mouneyrac d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Un merci particulier aux deux membres invités : Béatrice Rocher et Sandrine Pain-Devin. Merci Béatrice pour ton accueil au laboratoire SEBIO du Havre où les poubelles de paillasses sont des petits pots décorés et où des jolis papillons règnent sur les paillasses ! Tu m'as appris beaucoup plus que simplement mesurer quelques activités enzymatiques. Tu es une personne passionnée par ton travail et ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Merci à toi Sandrine, tu as eu la gentillesse ou plutôt le courage de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mes premiers pas dans la recherche en écotox' ainsi que de poursuivre à vos côtés jusqu'à la fin du master. Tu as toujours été de bons conseils et d'un grand soutien, tu m'as fait grandir scientifiquement et personnellement, je t'en serai éternellement reconnaissante. Je te dis merci tout simplement, car sans toi, je ne serai pas en train d'écrire ces remerciements sur mon canap'.

Dans la même veine, merci Simon ! Merci pour tes conseils, ta bienveillance et ton soutien. Sans toi, c'est tout un chapitre de cette thèse qui n'existerait pas ! J'espère qu'on aura d'autres occasions de collaborer ensemble car ça reste toujours un réel plaisir de bosser avec toi.

Merci à l'ensemble de l'équipe SEBIO : Merci Laurence pour ton aide précieuse lors des sorties terrain sous la pluie, le vent, les 0°C... Merci pour ton aide au labo, tu es d'un enthousiasme incomparable et c'est un vrai plaisir de bosser avec toi. Merci Véro pour les heures et les heures passées devant l'HPLC. Merci Isa pour ton aide en histo. Merci Damien (l'homme à tout faire) pour tes conseils avisés et tes innombrables aides lors de la mise en place des manip et tout ce qui va avec. Merci à l'ensemble des MCF et Pr. : Aurélie (je te prévois un mini verre pour le pot), Odile, Marc, Méliissa, Emilie, Fabrice, Claudia, Romain (merci de m'avoir accompagnée par -2°C sur le terrain, il faut dire que tu n'as pas hésité à mouiller le slip pour quelques dreissènes !) pour votre gentillesse et votre bienveillance à tous. Merci Iris (tu as cru que je t'avais oubliée ?) pour les pauses clopes/café, pour les fous rires, les potins et tout le reste. Je suis heureuse de vous avoir connus toi, Jo et surtout Aedan qui, peu importe l'heure et même quand tu viens avec des croissants, nous sort : « Chip' Fanny ? ».

Merci à Stéphanie Grandemange, Vanessa Besancenot, Emilie Brunner et Nadège Touche de l'équipe du Cran à Nancy de m'avoir accueillie à plusieurs reprises dans leur labo et de m'avoir initiée aux techniques de western-blotting et d'oxygraphie. Merci Steph' de m'avoir hébergée (en croyant que j'allais te préparer de bons petits plats avant de te rendre compte que la cuisine ce n'était pas mon truc !) et aussi merci de m'avoir laissé emprunter l'oxygraphe.

Merci aux intermittents du spectacle que j'ai pu rencontrer au cours de ces 3 années : Antoine (Aurore et Chloé), Younès, Sophie (MCF à ce jour et Christophe), Clément (tu vas enfin pouvoir te débarrasser de la raquette du loser), Maxou (Lynda et toute la coloc' de folie), Elo (et Théo), Héloïse, Amélie, Quentin, Magalie sans oublier Marco (merci pour tes petites visites à la maison, c'est toujours un grand plaisir de voir ta petite tête). L'ambiance est la chose la plus importante pour travailler dans de bonnes conditions. Il faut dire que les bières, les parties de ping-pong et de foot, les soirées et tous les autres moments partagés à vos côtés ont été d'un soutien énorme pendant la thèse. Je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite !

Un million de mercis aux amis qui ne sont pas à côtés : un merci particulier à Marine (alias chaton), au début je devais courir dans les couloirs pour suivre ton rythme (fin je suis sûre que ce serait encore le cas) mais aujourd'hui c'est aussi grâce à toi que j'ai réussi à faire autant de choses. Tu étais une encadrante au top et tu es devenue au fil des années une amie qui m'est très chère et je te remercie d'avoir toujours été là. Merci Suz' d'être aussi toujours là, d'être venue nous voir, tu dois être la seule personne habitant dans le sud qui aime venir à Reims ! Merci Quentine, Papo et Eve (et Esteban !), Manon, Magui, Amel' (et Mia !).

« Ce n'est pas tant l'intervention de nos amis qui nous aide, mais le fait de savoir que nous pourrons toujours compter sur eux. »

Epicure.

Un énorme merci à ma famille : Claire, Maman et Jean, Papa et Laure, Mamie, Catherine et Roger, les gros (Morgan et Charly), les morues (Sophie et Lolo) et les loulous (Nathan, Sarah, Chloé et Emma). Merci à mes parents de m'avoir donné la chance de faire des études. Je pense qu'il faut un minimum de caractère pour s'en sortir et c'est grâce à vous et à votre éducation que vous avez fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. La famille est le bien le plus précieux que l'on puisse avoir.

Enfin, mes plus grands remerciements sont pour la personne qui m'accompagne au quotidien, Claire (et Odhor, bien évidemment). Je te remercie de faire plus de 300 km par jour pour que *« je n'ai plus peur du dimanche soir »*. Merci d'avoir supporté mon caractère de cochon lors du combo rédaction de thèse + confinement et au quotidien, tout simplement. Je ne vais pas m'étaler car tu sais déjà tout ça mais tu as toujours été d'un soutien inconditionnel, sans toi ces 3 années à Reims n'auraient pas été aussi *« faciles »* et ce manuscrit ne serait pas le même. Merci pour tout.

Résumé : La préservation de l'environnement est un sujet majeur de préoccupation des sociétés actuelles. Afin d'évaluer la qualité des écosystèmes aquatiques, la Directive Cadre sur l'Eau appelle au développement de nouveaux outils à la fois précoces dans le temps et intégrateurs de l'état de santé des organismes. Le métabolisme énergétique permet aux organismes d'assurer l'ensemble des fonctions physiologiques et peut être source de biomarqueurs d'intérêt en biosurveillance. L'objectif de ce travail était d'enrichir les connaissances sur le fonctionnement du métabolisme énergétique cellulaire chez une espèce d'eau douce couramment utilisée en écotoxicologie, *Dreissena polymorpha*, afin de proposer de nouveaux biomarqueurs associés à la production et à la régulation de l'ATP. Différents substrats, produits, enzymes et gènes associés ont été ciblés. Les modulations naturelles de ces réponses par les facteurs extrinsèques (saison) et intrinsèques (cycle de reproduction) ont été caractérisées lors d'un suivi saisonnier *in situ*. En parallèle, des expérimentations ont été réalisées en laboratoire afin d'étudier l'effet de différents stress (cadmium, température et hypoxie) sur ces réponses du métabolisme énergétique à différents stades de reproduction. La batterie de réponses mesurées dans l'ensemble des travaux a permis de mettre en avant certains marqueurs révélateurs des modifications de la qualité du milieu (*e.g* charge énergétique en adénylates, gènes *atp* et *cs*). A l'avenir, ces travaux devraient permettre une meilleure appréhension de la tolérance de cette espèce ainsi qu'une interprétation affinée des réponses du métabolisme énergétique dans une perspective de biosurveillance.

Mots clés : *Dreissena polymorpha*, métabolisme énergétique, ATP, biomarqueurs

Abstract: The environment preservation is a growing concern in our society. To assess aquatic ecosystems quality, the Water Framework Directive calls for the development of new tools that could be both early in time and integrative of the organism health. Energy metabolism enables all physiological functions, and thus it could be a source of relevant biomarkers in biomonitoring. The objective of this work was to enrich the knowledge on the energy metabolism management in a freshwater species commonly used in ecotoxicology, *Dreissena polymorpha*, in order to propose new biomarkers involved in the production of ATP and its regulation. Several substrates, products, enzymes and genes related to energy metabolism were targeted. Natural response variations influenced by extrinsic (season) and intrinsic (reproduction cycle) factors were characterised over a reproduction cycle *in situ*. In parallel, experiments were carried out in laboratory to study the effect of different stresses (cadmium, temperature, hypoxia) on energy metabolism responses with expositions at different periods of the reproductive cycle. The panel of responses measured into the overall work allowed to highlight several markers, which revealed changes in the environment quality (*e.g* adenylate energy charge). In the future, this work will provide a deeper understanding of tolerance mechanisms but also a sharpened interpretation of energy metabolism responses in a biomonitoring perspective.

Key words: *Dreissena polymorpha*, energy metabolism, ATP, biomarkers

Laboratoire SEBIO, UFR SEN, Campus Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims cedex 2, France.

Table des matières

Liste des figures.....	xii
Liste des tableaux	xvii
Liste des abréviations	xviii
Introduction	1
Chapitre 1.....	5
I. Biosurveillance en écotoxicologie	7
1. Évaluation de l'état de santé des masses d'eau	7
1.1. L'état écologique des masses d'eau.....	7
1.1.1. La qualité biologique	8
1.1.2. La qualité physico-chimique et hydro-morphologie.....	9
1.2. L'état chimique des masses d'eau	9
1.2.1 Les normes de qualité environnementale.....	10
1.2.2 L'utilisation des bioessais	11
1.2.3. Vers une nouvelle approche des bioessais	11
2. Les biomarqueurs	13
2.1 Définition.....	13
2.2. Les biomarqueurs développés en écotoxicologie	15
2.2.1. Les biomarqueurs de défense.....	17
2.2.2. Les biomarqueurs de dommages.....	17
2.3. La biosurveillance à travers les biomarqueurs : les éternels verrous ?.....	18
3. <i>Dreissena polymorpha</i> , une espèce sentinelle en écotoxicologie	19
3.1. Description de <i>D. polymorpha</i>	19
3.2 Ecologie et physiologie de l'espèce.....	21
3.2.1. Distribution de l'espèce	21
3.2.2. Caractéristiques intrinsèques : cycle de vie	22
3.2.3. Rôle écologique et impacts	23
3.2.4. Caractéristiques métaboliques.....	24
3.4. Utilisation de <i>D. polymorpha</i> en écotoxicologie	25
3.5. Utilisation du métabolisme énergétique chez <i>D. polymorpha</i> en écotoxicologie	28
II. Le métabolisme énergétique cellulaire	31
1. Les apports énergétiques	31
1.1. Les apports alimentaires	31
1.2. La métabolisation du glucose	32

1.2. La β -oxydation des acides gras	33
2. Lieu de production de l'énergie en condition aérobie, la mitochondrie	34
2.1. Structure mitochondriale	35
2.2. Fonctions mitochondriales	36
2.2.1. Cycle de Krebs	37
2.2.2. Phosphorylation oxydative	37
2.2.3. Rôle dans la mort cellulaire programmée : voie canonique	40
2.3. Bilan de la production d'énergie en milieu aérobie	41
3. Production de l'ATP en milieu anaérobie	42
4. La balance énergétique	43
4.1. Définition	43
4.2. Régulation du métabolisme énergétique	46
4.2.1. Régulation par les nucléotides adényliques	46
4.2.2. Rôles de l'AMPk et de l'AMPd	46
5. Effets des paramètres physico-chimiques naturels et anthropiques sur le métabolisme énergétique	47
5.1. Effets des stress associés aux paramètres environnementaux naturels	49
5.1.1. Effets du stress thermique	49
5.1.2. Effets du stress hypoxique	51
5.2. Effets des stress d'origine anthropique	53
III. Objectifs de la thèse	55
Chapitre 2.	57
I. Les travaux réalisés : suivi saisonnier et expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire	59
1. Suivi saisonnier des réponses du métabolisme énergétique chez <i>Dreissena polymorpha</i> ...	59
1.1. Choix du site d'échantillonnage	59
1.2. Plan d'échantillonnage et analyses	60
2. Les expositions en laboratoire	61
2.1. Stress métallique et thermique	61
2.1.1. Prélèvement des organismes et acclimatation	62
2.1.2. Schéma expérimental	62
2.2. Stress hypoxique et thermique séparés	64
2.2.1. Prélèvement des organismes et acclimatation	64
2.2.2. Schéma expérimental	65
II. Les marqueurs mesurés	67
1. Les réserves énergétiques	67

1.1. Les protéines	68
1.2. Extraction du glycogène et des lipides	68
1.2.1. Dosage des glucides	68
1.2.2. Dosage des lipides	68
2. Les activités enzymatiques	69
2.1. Préparation des échantillons	69
2.2. Les enzymes ciblées	69
2.2.1. L'activité de la citrate synthase.....	69
2.2.2. L'activité de la lactate déshydrogénase	70
2.2.3. L'activité du système de transport d'électrons (ETS).....	71
2.2.4. L'activité de la cytochrome c oxydase.....	72
2.2.5. La peroxydation lipidique	72
3. Les expressions géniques	73
3.1. Extraction des ARN totaux	75
3.2. RT-PCR en temps réel	76
3.3. Caractérisation de séquences partielles codant pour les gènes ciblés.....	77
3.3.1. Disponibilité des séquences chez <i>D. polymorpha</i>	77
3.3.2. Utilisation d'un couple d'amorces dégénérées	77
4.1. Extraction des protéines totales	80
4.2. Séparation électrophorétique et transfert sur membrane	80
4.3. Détection immunologique	81
5. Les nucléotides énergétiques	81
5.1. Extraction des nucléotides	81
5.2. Dosage des nucléotides	82
6. La respiration cellulaire	82
6.1. Isolation des cellules	82
6.2. Mesure de la respiration.....	82
7. Les analyses histologiques	84
7.1. Détermination du stade de développement des gonades	84
8. Les dosages de métaux par spectrométrie d'absorption atomique	85
8.1. Extraction.....	85
8.1.1. Matrice environnementale.....	85
8.1.2. Matrice biologique	85
8.2. Dosage du cadmium	86
III. Analyses statistiques.....	88

Chapitre 3	90
1. Contexte et objectifs	92
2. Principaux résultats	93
Publication n°1	95
3. Perspectives issues de cette étude	133
Chapitre 4	134
I. Effet du stress thermique et hypoxique sur les réponses du métabolisme énergétique	136
1. Contexte.....	136
2. Les fenêtres de tolérance chez <i>D. polymorpha</i>	136
2.1 Fenêtre de tolérance thermique.....	137
2.2 Fenêtre de tolérance à l'hypoxie.....	138
3. Objectifs de l'étude	141
4. Principaux résultats	141
Publication n°2	144
5. Conclusions	173
II. Effet d'un stress métallique à différentes températures sur les réponses du métabolisme énergétique en fonction du stade de reproduction	175
1. Contexte et objectifs	175
2. Principaux résultats	176
Publication n°3	179
3. Résultats supplémentaires : étude de la phosphorylation de l'AMP kinase par Western-Blotting.....	211
4. Conclusions	213
III. Perspectives issues de ces études	214
Chapitre 5	215
Contexte.....	217
I. Variabilité temporelle des réponses du métabolisme énergétique en conditions naturelles et contrôlées.....	219
1. Analyse des différents marqueurs mesurés	219
2. Bilan concernant les marqueurs identifiés.....	225
II. Intégration des réponses observées lors des expositions contrôlées en conditions de laboratoire.....	229
1. Réponses issues des deux expositions au Cd	231
1.1. Comportement des marqueurs suite à l'exposition des organismes au Cd en prenant en compte la période.....	232
1.2. Intégration des données sans prendre en compte l'effet de la période	235

2. Réponses issues de l'ensemble des expositions réalisées en conditions contrôlées de laboratoire.....	237
3. Conclusion sur l'intégration des données issues des expérimentations réalisées en conditions contrôlées de laboratoire	240
4. Comportement des marqueurs en conditions naturelles	243
III. Discussion sur l'intégration des données dans une perspective de biosurveillance	247
Chapitre 6.....	253
1. La charge énergétique en adénylates, un outil pertinent	255
2. <i>D. polymorpha</i> , une espèce adaptée au stress ?.....	257
3. Le métabolisme énergétique cellulaire : un processus finement régulé.....	260
4. Intérêt d'une approche multi-marqueurs	262
5. Conclusion.....	265
Références bibliographiques	271
Annexes.....	311

Liste des figures

- Figure 1.** Détermination de l'état écologique des masses d'eau en fonction de la qualité biologique, physico-chimique et de l'hydro-morphologie. D'après le guide technique relatif à l'évaluation de l'état des eaux de surface continentales (Ministère de la Transition énergétique et solidaire, 2019). NQE : norme de qualité environnementale. 8
- Figure 2.** Détermination de l'état chimique des masses d'eau en fonction des NQE. D'après le guide technique relatif à l'évaluation de l'état des eaux de surface continentales (Ministère de la Transition énergétique et solidaire, 2019). 10
- Figure 3.** Relations entre la méthode utilisée pour la conduite des bioessais et les paramètres de répétabilité, de variabilité, de contrôle et des coûts associés. D'après Amiard-Triquet (2015). 12
- Figure 4.** Relation entre les biomarqueurs ciblés et la précocité de réponse ainsi que la pertinence écologique qui leur sont associées. D'après Adams et al. (1989). 14
- Figure 5.** Représentation schématique des réponses d'un organisme face à la présence intracellulaire d'un xénobiotique sur les différents biomarqueurs de défense et de dommages couramment mesurés en écotoxicologie chez *D. polymorpha* sur les cinq dernières années (hors métabolisme énergétique). Les biomarqueurs en vert et en rouge sont respectivement des biomarqueurs de défense et de dommages (schéma cellulaire issu du site www.biorender.com). 16
- Figure 6.** *D. polymorpha* : (A) Photographie (crédit photo : D. Coacolo) ; (B) Schéma représentant les principaux organes des bivalves et la circulation des aliments ingérés via l'eau (d'après Claudie et Mackie, 1994; Willer and Aldridge, 2017). 20
- Figure 7.** Aire de répartition de *D. polymorpha* en 2008 (Gray, 2008). Les zones en vert et en rouge représentent respectivement les zones natives et non-natives. 21
- Figure 8.** Cycle de reproduction de *D. polymorpha* (d'après Ackerman, 1994 ; Claudi et Mackie, 1994 ; Potet, 2017). 23
- Figure 9.** Métabolisation d'une molécule de glucose par la glycolyse (vert) et la voie des pentoses phosphates (bleu) aboutissant à la production de pyruvate. Le pyruvate est soit convertit en ACoA en présence d'oxygène soit en lactate en son absence. Métabolites : G6P : glucose-6-phosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; F1,6PP : fructose 1,6-biphosphate ; DHAP : dihydroxyacetone-phosphate ; G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate ; 6PGL : 6-phosphogluconolactone ; 6PG : 6-phosphogluconate ; R5P : ribulose-5-phosphate ; X5P :

xylylose-5-phosphate. Enzymes : HK : hexokinase ; PGI : phosphoglucoisomérase ; PFK1 : phosphofructokinase 1 ; LDH : lactate déshydrogénase. TCA : cycle tricarboxylique.	33
Figure 10. β -oxydation mitochondriale des acides gras. D'après Adeva-Andany et al. (2019).	34
Figure 11. Schéma de la mitochondrie et de ses fonctions. ADNmt : ADN mitochondrial, PHOSOX : phosphorylation oxydative, ROS : espèces réactives de l'oxygène, TCA : cycle tricarboxylique, Ψ_m : potentiel de membrane. D'après Smith et al. (2012).	36
Figure 12. Schéma de la phosphorylation oxydative associée aux différents complexes de la chaîne respiratoire, de l'alternative oxydase, du coenzyme q (Q) et cytochrome c (C) se déroulant au niveau de la membrane interne de la mitochondrie.	40
Figure 13. Déclenchement de la mort cellulaire programmée par la voie canonique. Différents stress vont activer des signaux de mort cellulaire. Le cytochrome c est découplé de la chaîne respiratoire et sort dans le cytosol où il se lie au facteur de composition de l'apoptosome (Apaf-1). L'apoptosome devient actif après liaison à la pro-caspase 9. La caspase 3 est activée pour déclencher l'apoptose. D'après Osellame et al. (2012).	41
Figure 14. Schéma synthétique de la régulation du métabolisme énergétique.	45
Figure 15. A. Utilisation de l'ATP par les grandes fonctions vitales en fonction de l'intensité du stress subit par les organismes. B. Balance entre la production et la demande d'ATP en fonction de l'intensité du stress. Les états optimum, pejus et pessimum sont représentés sur les deux illustrations. D'après Sokolova et al. (2012).	48
Figure 16. Schéma synthétique des effets connus de différents stress sur le métabolisme énergétique. Sont indiqués respectivement en rouge, vert et violet les effets du stress thermique, hypoxique et métallique.	54
Figure 17. Carte et photos des sites de prélèvement des organismes à Commercy et Vertuzey (Meuse) (www.maps.google.fr).	59
Figure 18. Calendrier d'échantillonnage des organismes pour le suivi saisonnier des marqueurs étudiés. Les boîtes pleines bleues et oranges représentent respectivement les mois non échantillonnés et ceux pour lesquels la totalité des mesures n'a pu être réalisée.	60
Figure 19. Photo du dispositif expérimental mis en place pour les deux expérimentations réalisées dans le cadre de l'exposition aux stress métallique et thermique.	63
Figure 20. Schéma de l'extraction des protéines, des lipides ainsi que du glycogène chez <i>D. polymorpha</i>	67
Figure 21. Photographie de la migration par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% des ARN totaux extraits, après un bain de BET.	75

Figure 22. Etapes de caractérisation d'une séquence partielle dun gène à partir d'un couple d'amorces dégénérées.....	78
Figure 23. Exemple de résultat issu de la mesure de la respiration cellulaire suivie avec le logiciel OxygraphPlus. Les différents ajouts d'inhibiteurs ont été positionnés ainsi que les correspondances de chaque pente mesurée.	84
Figure 24. Photographies de coupes de gonades mâles et femelles aux différents stades de reproduction ; A: repos ; B: développement ; C: maturation ; D: pré-ponte et E: post-ponte.	85
Figure 25. Schéma simplifié du fonctionnement du spectrophotomètre atomique et des 4 étapes du cycle thermique : dissolution (A), carbonisation (B), atomisation (C) et nettoyage/séchage (D).	86
Figure 26. Fenêtre de tolérance thermique chez <i>D. polymorpha</i> d'après les données de la littérature.	138
Figure 27. Fenêtre de tolérance par rapport à la concentration en oxygène dissous (%) chez <i>D. polymorpha</i> d'après les données de la littérature.	140
Figure 28. Fenêtre de tolérance thermique chez <i>D. polymorpha</i> en fonction du temps d'exposition précisée d'après les résultats obtenus dans cette étude.	173
Figure 29. Fenêtre de tolérance à l'hypoxie chez <i>D. polymorpha</i> en fonction du temps d'exposition précisée d'après les résultats obtenus dans cette étude.	174
Figure 30. Analyse de l'activation de l'AMPk chez les organismes contrôles et exposés au Cd à deux températures pendant 24 heures et 7 jours par Western-Blotting. L'expression protéique de l'AMPk a été étudiée par Western-Blotting sur des extraits de protéines totales, chez les individus témoins ou les individus exposés à la contamination (Cd). La quantification a été réalisée par la mesure de la densitométrie des bandes, rapportée à celle d'un échantillon (Témoin 19 °C 7 jours). Les résultats concernant les échantillons Cd 19 °C 7 jours et Témoins 14 °C 7 jours sont présentés (A) mais suite à un mauvais transfert de membrane, les résultats sont potentiellement biaisés par la qualité de l'image et ne sont pas discutés. Les photos des différentes membranes sont présentées (A, B et C) ainsi que le ratio entre l'AMPk totale et phosphorylée (D). Aucune analyse statistique n'a été réalisée du fait du faible nombre de réplicats et de la mauvaise qualité de transfert pour certains échantillons.....	212
Figure 31. Variabilité des réponses des marqueurs de la balance énergétique et de sa régulation observée in situ lors du suivi saisonnier (ligne noire) et valeurs moyennes des réponses observées à l'issue des différentes phases d'acclimatation réalisées au laboratoire (T0 croix noire, +/- écart-type) lors d'expérimentations en laboratoire chez la même population de <i>D. polymorpha</i> . L'intervalle de confiance (95 %) associé à la mesure du	

marqueur in situ est également représenté (aire rose) pour chaque marqueur. Expression relative des gènes *ampk* (A) et *ampd* (B), concentrations en ATP (C), ADP (D) et AMP (E) et valeur de la charge énergétique en adénylates (CEA ; F). 220

Figure 32. Variabilité des réponses des marqueurs des réserves énergétiques observée in situ lors du suivi saisonnier (ligne noire) et valeurs moyennes des réponses observées à l'issue des différentes phases d'acclimatation réalisées au laboratoire (T0 croix noire, +/- écart-type) lors d'expérimentations en laboratoire chez la même population de *D. polymorpha*. L'intervalle de confiance (95 %) associé à la mesure du marqueur in situ est également représenté (aire rose) pour chaque marqueur. Concentrations en glycogène (A), lipides (B) et protéines (C). 221

Figure 33. Variabilité des réponses des marqueurs du métabolisme aérobie observée in situ lors du suivi saisonnier (ligne noire) et valeurs moyennes des réponses observées à l'issue des différentes phases d'acclimatation réalisées au laboratoire (T0 croix noire, +/- écart-type) lors d'expérimentations en laboratoire chez la même population de *D. polymorpha*. L'intervalle de confiance (95 %) associé à la mesure du marqueur in situ est également représenté (aire rose) pour chaque marqueur. Expression relative du gène *cs* (A) et activité CS (B) ; expressions relative des gènes *sdh* (C), *cyt b* (D), *cox* (E) ; activité COX (F) ; expression relative du gène *atp* (G) et activité ETS (H). 223

Figure 34. Variabilité des réponses des marqueurs de stress liés au métabolisme énergétique observée in situ lors du suivi saisonnier (ligne noire) et valeurs moyennes des réponses observées à l'issue des différentes phases d'acclimatation réalisées au laboratoire (T0 croix noire, +/- écart-type) lors d'expérimentations en laboratoire chez la même population de *D. polymorpha*. L'intervalle de confiance (95 %) associé à la mesure du marqueur in situ est également représenté (aire rose) pour chaque marqueur. Expression relative du gène *ldh* (A) et activité LDH (B) ; expressions relative du gène *aox* (C) et concentration en IMP (D). 224

Figure 35. ACP représentant la variabilité des réponses des marqueurs en condition contrôlées de laboratoire chez les organismes témoins (Control, bleu) et exposés au Cd et à la température (Cd, rouge) chez *D. polymorpha* toutes conditions confondues en considérant l'effet de la période. Les marqueurs « T0 stables » et « T0 saisonniers » sont illustrés respectivement dans les diagrammes A et C avec leur cercle des corrélations associés (B et D). 234

Figure 36. ACP représentant la variabilité des réponses des marqueurs en condition contrôlées de laboratoire chez les organismes témoins (Control, bleu) et exposés au Cd (Cd, rouge) chez *D. polymorpha* toutes conditions confondues en masquant l'effet de la période.

Les marqueurs « T0 stables » et « T0 saisonniers » sont illustrés respectivement dans les diagrammes A et C avec leur cercle des corrélations associés (B et D). 236

Figure 37. ACP représentant la variabilité des réponses des marqueurs en condition contrôlées de laboratoire chez les organismes témoins (Control, noir), exposés au Cd (Cd, rouge), à l'hypoxie (Hypoxia, vert) et à 25°C (orange) chez *D. polymorpha* toutes expérimentations confondues en masquant l'effet de la période. Les marqueurs « T0 stables » et « T0 saisonniers » sont illustrés respectivement dans les diagrammes A et C avec leur cercle des corrélations associés (B et D). 239

Figure 38. ACP représentant la variabilité des réponses des marqueurs mesurés lors du suivi saisonnier chez *D. polymorpha*. Les marqueurs « T0 stables » et « T0 saisonniers » sont illustrés respectivement dans les diagrammes A et C avec leur cercle des corrélations associés (B et D). 245

Figure 39. Schéma synthétique regroupant l'ensemble des travaux réalisés chez *D. polymorpha* au cours du travail de thèse. ①a. Les réponses du métabolisme énergétique ont été suivies lors d'un cycle saisonnier et, ①b lors de différentes expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire. ② A l'issue du suivi saisonnier, il a été observé que la population ciblée avait été exposée à un potentiel stress. ③ En parallèle, les réponses mesurées suite aux deux expositions au Cd (orange) réalisées à deux périodes du cycle de reproduction ont montré un effet période prépondérant et un impact négligeable du Cd sur le métabolisme énergétique conduisant à l'hypothèse d'une adaptation de la population face au stress métallique. Après l'exposition à un stress hypoxique (bleu) les individus semblaient être acclimatés à la limitation en oxygène tandis qu'après 7 jours d'exposition à 25 C (rouge), les dreissènes semblaient être dépassées. ④ La stabilité des fonctions mitochondriales montre une régulation fine et complexe du métabolisme énergétique, la prise en compte de l'échelle temporelle pour l'établissement des fenêtres de tolérance est donc nécessaire. ⑤ A partir de l'ensemble des résultats obtenus, certains marqueurs apparaîtraient prometteurs dans une perspective de biosurveillance. De nouvelles campagnes de prélèvement sur différents sites permettraient d'affirmer ce potentiel de biomarqueurs ainsi que d'évaluer la sensibilité de *D. polymorpha* face à d'autres stress. Les flèches grises, vertes et jaunes indiquent respectivement les résultats obtenus, les hypothèses émises et les perspectives issus de ces travaux. 269

Liste des tableaux

Tableau 1. Biomarqueurs de défense et de dommage étudiés chez <i>D. polymorpha</i> durant les 5 dernières années (2015-2020) et le stress étudié. ACP : acide phosphatase ; EROD : 7-ethoxy-resorufin O-deethylation ; GPx : glutathion peroxydase ; GST : glutathion s transférase ; HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques ; MXR : multixenobiotic resistance system ; NPs : nanoparticules ; SOD : superoxyde dismutase ; TAC : capacité anti-oxydante totale... 27	
Tableau 2. Marqueurs du métabolisme énergétique les plus étudiés chez <i>D. polymorpha</i> et le stress étudié. AEC : allocation énergétique cellulaire ; ETS : electron transport system (système de transport des électrons) ; IC : indice de condition ; NPs : nanoparticules ; SfG : scope for growth (allocation énergétique à la croissance et à la reproduction). 30	
Tableau 3. Effort de prélèvement des organismes et mesures effectuées lors à chaque date de prélèvement du suivi saisonnier. 61	
Tableau 4. Effort de prélèvement des organismes et mesures effectuées lors des expérimentations réalisées en novembre 2018 et en juin 2019. Les mesures réalisées uniquement en juin 2019 sont présentées en orange. 64	
Tableau 5. Effort de prélèvement des organismes et mesures effectuées lors de l'expérimentation hypoxie/thermie réalisée en novembre 2019. 65	
Tableau 6. Ensemble des couples d'amorces utilisés en RT-PCR en temps réel. Abr. : abréviation ; Conc. : concentration. NCBI : numéro d'accèsion de la séquence du gène dans les bases de données 74	
Tableau 7. Ensemble des valeurs mesurées chez <i>D. polymorpha</i> lors du suivi saisonnier (Terrain) ainsi qu'après la phase d'acclimatation au laboratoire (T0) aux périodes correspondantes (novembre 2018, juin 2019 et novembre 2019). Le pourcentage de variation entre le terrain et les T0 est représenté ainsi que les différentes <i>p</i> -values obtenues pour les tests statistiques effectués (test t ou kruskal-wallis) afin d'évaluer la significativité des différences entre les valeurs mesurées lors du suivi saisonnier et aux différents T0. L'aptitude potentielle des marqueurs à témoigner d'une variation de réponses lorsque les dreissènes sont soumises à un stress en laboratoire est également présentée (oui/non)..... 226	

Liste des abréviations

ACoA : Acétyl Co-enzyme A	DTNB : Acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)
ACP : Analyse en Composante Principale	DTT : Dithiothéitol
ADNmt : ADN mitochondrial	EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
ADP : Adénosine Di-Phosphate	EROD : Ethoxyrésorufine-o-dééthylase
AEC : Allocation Énergétique Cellulaire	ETM : Éléments Traces Métalliques
AMP : Adénosine Mono-Phosphate	ETS : Electron Transport System
AMPd AMP désaminase	F1,6PP : Fructose 1,6-biphosphate
AMPk : AMP-activated protein kinase	F6P : Fructose-6-phosphate
AMPkk : AMP-activated protein kinase kinase	FADH ₂ : Flavine adénine dinucléotideSDH
ANOVA : Analyse de la variance	G3P : Glycéraldéhyde-3-phosphate
AOX : Alternative Oxydase	G6P : Glucose-6-phosphate
ATP : Adénosine Tri-Phosphate	Gpx : Glutathion peroxydase
BET : Bromure d'éthidium	GSH : Glutathion réduit
BSA : Albumine de sérum bovin	GST : Glutathion-S-Transférase
CARHYCE : Caractérisation de l'Hydro-morphologie des Cours d'Eau	HIF-1 : Hypoxia Inducible Factor-1
Cat : Catalase	HK : Hexokinase
CCCP : Carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone	HNO ₃ : Acide nitrique
Cd : Cadmium	I2M2 : Indice Invertébrés Multi-Métrique
CEA : Charge Énergétique en Adénylates	IBD : Indice Biologique Diatomées
COX : Cytochrome c oxydase	IBGN : Indice Biologique Global Normalisé
CS: Citrate Synthase	IBMR : Indice Biologique Macrophytique en Rivière
CSP-3 : Caspase-3	IBR : Intégratied Biomarker Responses
Cytb : Cytochrome b	IC : Indice de Condition
DCE : Directive Cadre sur l'Eau	IMP : Inosine Mono-Phosphate
DCSMM : Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin	INT : Iodonitrotetrazolium chloride
DEB : Dynamic Energy Budget	IPR : Indice Poisson Rivière
DHAP : Dihydroxyacetone-phosphate	KOH : Hydroxyde de potassium
	KCL : Chlorure de potassium

LDH : Lactate déshydrogénase

LEMA : Loi sur l'Eau et les Milieux
Aquatiques

LOOH : Peroxydation lipidique

MgSO₄: Sulfate de magnésium

MRD : Metabolic Rate Depression

MT : Métallothionéines

MXR : Multi Xenobiotic Resistance

NADH : Nicotinamide adénine
dinucléotide

NADPH : Nicotinamide adénine
dinucléotide phosphate

NaOH : Hydroxyde de sodium

NQE : Norme de Qualité
Environnementale

OAA : Oxaloacétate

OCDE: Organisation de Coopération et de
Développement Économiques

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PEC : Predicted Environmental
Concentration

PFK1 : Phosphofructokinase 1

PGI : Phosphoglucoisomérase

PHOSOX : Phosphorylation Oxydative

PLS-DA : Partial Least Square
Discriminant Analysis

PNEC : Predicted No effect Concentration

PVDF : Polyvinyl-difluoride

PVP: Polyvinylpyrrolidone

REACH : Registration, Evaluation,
Authorization and Restriction of
Chemicals

ROS : Reactive Oxygen Species

R5P : Ribulose-5-phosphate

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SEEE :
Système d'Évaluation de l'État des Eaux

SfG : Scope for Growth

SHAM : Acide salicylhydroxamique

SOD : Superoxyde Dismutase

SYRAH : Système Relationnel d'Audit de
l'Hydro-morphologique

TAC : Total Antioxydant Capacity

TBH : Tert-butyl hydroperoxyde

TCA : Cycle tricarboxylique.

WOE : Weight Of Evidence

X5P : Xylylose-5-phosphate

XO : Xylénol Orange

6PGL : 6-phosphogluconolactone

6PG : 6-phosphogluconate

Introduction

L'environnement et sa préservation constituent aujourd'hui un sujet grandissant de préoccupation au sein de notre société. Dans les années 1970, la notion de services écosystémiques a été proposée par des auteurs comme Westman (1977) avant d'être reprise ensuite par Ehrlich et Mooney (1983). Néanmoins, cette notion n'est devenue un concept qu'en 1997 grâce à un article de Daily et al., le définissant comme l'ensemble des bénéfices fournis aux Hommes par les écosystèmes naturels. Les ressources en eau, la nourriture, la biodiversité ainsi que toutes les ressources naturelles qui contribuent au bien-être de l'humanité sont considérées comme des services écosystémiques essentiels. La dégradation en constante intensification des écosystèmes impacte inévitablement la qualité ainsi que la quantité de leurs services associés. Les activités anthropiques telles que l'industrie, l'agriculture, l'urbanisation, le transport, le tourisme et le quotidien de chacun sont à l'origine de la production de nombreux polluants de toutes formes qui, tôt ou tard, pénètrent dans l'ensemble des compartiments de la biosphère. Les polluants présents dans les environnements terrestres et aériens, par le biais de différents processus comme la pluie, le lessivage des sols, les rejets de stations d'épuration, se retrouvent *in fine* dans le compartiment aquatique.

La pollution des milieux aquatiques ainsi que la nécessité de veiller à leur protection et de limiter les apports en contaminants sont devenues un réel enjeu sociétal. De ce fait, différents dispositifs ont été mis en place et soutenus législativement. En Europe, la DCE (Directive Cadre sur l'Eau) concernant l'ensemble des masses d'eau continentales et côtières est appliquée en 2000 et la DCSMM (Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin), ciblant le milieu marin, en 2008. Ces directives s'appuient notamment sur l'utilisation de la physico-chimie ainsi que sur différents indices biologiques tels que l'IBGN (Indice Biologique Global Normalisé) ou encore l'I2M2 (Indice Invertébrés Multi-Métrique) depuis 2007 pour évaluer « l'état de santé » des masses d'eau. Afin de limiter la dispersion incontrôlée des substances chimiques, la réglementation REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) a été créée en 2006. Cette dernière se focalise sur l'utilisation de tests standardisés, appelés biotests ou bioessais, visant à évaluer l'effet écotoxicologique des substances chimiques sur des organismes vivants terrestres et aquatiques appelés espèces

modèles. Bien que ces biotests permettent l'évaluation rapide du potentiel impact des contaminants sur la biosphère, ils présentent certaines limites. Ces tests, simples, manquent de pertinence écologique, c'est-à-dire qu'ils ne représentent pas les conditions environnementales naturelles. Le développement de nouveaux outils précoces permettant la mise en évidence de la contamination des milieux est essentiel pour l'évaluation des effets des polluants sur les espèces non modèles en milieu naturel, avant que des répercussions n'apparaissent aux niveaux d'organisation supérieurs, pouvant mettre en péril le maintien des populations et donc la biodiversité de ces écosystèmes. Parmi ces outils, les biomarqueurs représentent de bons candidats pour ce type d'approche. Un biomarqueur défini comme « un changement mesurable au niveau comportemental, physiologique, biochimique ou moléculaire suite à l'exposition présente ou passée à des substances chimiques » (Depledge et Fossi, 1994), permet d'évaluer non seulement l'état de contamination du milieu, mais aussi ses effets sur les organismes.

En plus de la contamination, ces marqueurs sont également largement soumis aux facteurs intrinsèques des organismes (*e.g.* cycle de reproduction) et extrinsèques comme les fluctuations saisonnières (Faria et al., 2014 ; Viarengo et al., 2007). De nombreux biomarqueurs individuels et sub-individuels sont ainsi développés pour comprendre les mécanismes de réponse des organismes exposés à une contamination chimique chronique. La plupart d'entre eux s'attache à mettre en évidence des perturbations au niveau de fonctions physiologiques vitales pour l'organisme (reproduction, détoxification, immunité...) (Le gal et al., 1997). Il est toutefois nécessaire de considérer des marqueurs plus généralistes et intégratifs de l'impact des contaminants sur les organismes aquatiques permettant l'évaluation globale de leur état de santé. Le métabolisme énergétique apparaît alors comme un candidat de choix.

Le métabolisme énergétique joue un rôle primordial pour la survie de l'organisme et lui permet d'assurer les différentes fonctions physiologiques vitales. L'allocation énergétique aux différentes fonctions varie selon les besoins de l'organisme. La régulation de cette allocation énergétique est fondamentale pour conserver la fitness des individus, c'est-à-dire le maintien de leur capacité à se maintenir, se reproduire et de transmettre leurs gènes (Sokolova et al., 2012). En conditions de stress, l'organisme mobilise l'énergie nécessaire pour maintenir l'homéostasie et mettre en place des mécanismes de défense, pouvant ainsi restreindre l'allocation énergétique associée aux systèmes impliqués dans l'acquisition, la conversion et le stockage de l'énergie (Calow, 1991; Calow and Forbes, 1998). Cette gestion de l'énergie est

soumise aux variations des facteurs abiotiques (*e.g.* température) et biotiques (*e.g.* statut reproducteur). Les variations saisonnières impactent ainsi fortement la physiologie des organismes et peuvent diminuer leur tolérance face aux différents stress (Lannig et al., 2006). La température est un facteur environnemental clé affectant les organismes. Les variations de température ont un effet direct sur l'ensemble des réactions physiologiques et biochimiques ainsi que sur la stabilité des molécules (Hochaka and Somero, 2002). La demande en énergie élevée lors d'un stress thermique est souvent associée avec une réallocation énergétique vers les coûts de maintenance cellulaire au détriment de la croissance et de la reproduction (Kooijman, 2010). En plus des variations saisonnières, les polluants, et notamment les éléments traces métalliques, peuvent interférer fortement avec le métabolisme cellulaire et les voies de conservation de l'énergie (Sokolova, 2004). Les marqueurs du métabolisme énergétique incluant les différents processus de synthèse et de gestion de l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) devraient permettre d'obtenir une vue globale de la santé de l'organisme. En milieu aquatique, ces nouveaux marqueurs sont développés en écotoxicologie principalement chez des espèces marines. Le bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), communément appelé moule zébrée, est une espèce invasive des eaux douces de l'hémisphère Nord (Borcherding, 1991). *D. polymorpha* est considérée comme une espèce sentinelle en écotoxicologie par son rôle important de filtreur des eaux continentales (Benson, 2013; Smolders et al., 2002 ; Walz, 1978).

Le chapitre 1 de ce manuscrit présente le contexte général de ce travail. L'apport de l'écotoxicologie en biosurveillance sera détaillé avec l'utilisation des espèces modèles. L'espèce étudiée ici, *D. polymorpha*, est présentée ainsi que son utilisation dans la discipline. Enfin, le métabolisme énergétique et les différentes fonctions et marqueurs ciblés sont présentés. Les différentes techniques et méthodologies abordées pour mesurer ces marqueurs sont détaillées dans le chapitre 2 ainsi que les différentes expérimentations réalisées pour répondre au questionnement du projet doctoral. Réalisé afin d'améliorer les connaissances générales du fonctionnement du métabolisme énergétique chez *D. polymorpha* et d'identifier de potentiels marqueurs dans une perspective de biosurveillance, le chapitre 3 présente les résultats issus d'un suivi annuel d'une même population de dreissènes *in situ* et identifie les motifs de réponses des organismes en fonction des saisons et des différents paramètres physico-chimiques mesurés. Suite à cette première partie, les effets de différents stress ont été évalués en conditions contrôlées à différentes périodes du cycle de reproduction afin de caractériser l'influence des stades de reproduction sur les réponses du métabolisme

énergétique face à un stress simple ou multiple. Le chapitre 4 de ce manuscrit rapporte les résultats acquis suite à ces différentes expérimentations réalisées en condition contrôlées de laboratoire. Les données acquises lors du suivi saisonnier et des différentes expositions réalisées au laboratoire ont été traitées statistiquement et intégrées afin de mettre en avant de potentiels marqueurs dans une perspective de biosurveillance (chapitre 5). Enfin, le chapitre 6 discute l'ensemble de ce travail de thèse et ouvre vers de nouvelles perspectives. Ces travaux visent à permettre, à terme, d'affiner, à la fois, les connaissances physiologiques de cette espèce en écotoxicologie ainsi que l'interprétation des réponses des biomarqueurs potentiels dans une perspective de biosurveillance.

Ce projet doctoral MÉENDRE (Métabolisme énergétique : synthèse et gestion de l'énergie cellulaire chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*) a été cofinancé par une bourse doctorale de la région Grand-Est et de l'Université de Reims Champagne Ardenne.

Chapitre 1.

Synthèse bibliographique : Écotoxicologie et métabolisme énergétique

Ce chapitre expose le contexte général de ce travail avec l'insertion de la discipline dans un schéma réglementaire défini et l'utilisation d'espèces modèles, parmi lesquelles *Dreissena polymorpha*, en écotoxicologie. Les différentes approches du métabolisme énergétique abordées dans ce manuscrit sont approfondies ainsi que l'utilisation des acteurs de ce métabolisme clé dans l'évaluation des risques en biosurveillance.

I. Biosurveillance en écotoxicologie

1. Évaluation de l'état de santé des masses d'eau

La gestion durable de la ressource en eau repose sur un grand nombre de textes internationaux, européens et nationaux. La Directive européenne Cadre sur l'Eau de 2000 (DCE) et la Loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques de 2006 (LEMA) qui en découle sont deux textes centraux qui structurent la politique publique de la gestion de l'eau en France. En effet, les diverses activités anthropiques engendrent des pressions sur la faune et la flore et peuvent amener à la dégradation des écosystèmes aquatiques. L'évaluation de l'état de santé des masses d'eau selon la DCE comprend deux aspects : un état écologique et un état chimique. Elle est notamment basée sur un suivi régulier des paramètres physico-chimiques ainsi que de la faune et de la flore aquatiques via l'utilisation d'indicateurs de qualité (DCE 2000/60/CE). La DCE introduit une obligation de résultats avec des échéances impératives selon une démarche de progrès organisée en cycles de six ans. Trois cycles ont d'ores et déjà été annoncés. Le premier cycle du plan de gestion des eaux couvrait la période 2010-2015 avec pour objectif le maintien ou l'atteinte du bon état écologique des masses d'eau. Le second cycle est actuellement en cours (2016-2021) avec des objectifs dits « moins stricts ». Un troisième cycle est en préparation et est prévu de 2022 à 2027.

1.1. L'état écologique des masses d'eau

En 2015, en France, parmi les 10 706 masses d'eau : 8,5 % sont en très bon état écologique ; 36,3 % sont en bon état écologique ; 39,2 % sont en état écologique moyen ; 12,3 % sont en état écologique médiocre et 3,6 % sont en mauvais état écologique (www.eaufrance.fr).

Le Système d'Évaluation de l'État des Eaux (SEEE) est le système national de référence pour l'évaluation écologique des masses d'eau. Ce dernier consiste en l'évaluation séparée de plusieurs paramètres : la qualité biologique, la qualité hydro-morphologique et la qualité physico-chimique. Ces différents paramètres sont mis en commun pour établir l'état écologique d'un cours d'eau. Il existe 5 classes d'états allant du très bon au très mauvais état écologique (Figure 1 ; Arrêté du 27 juillet 2018).

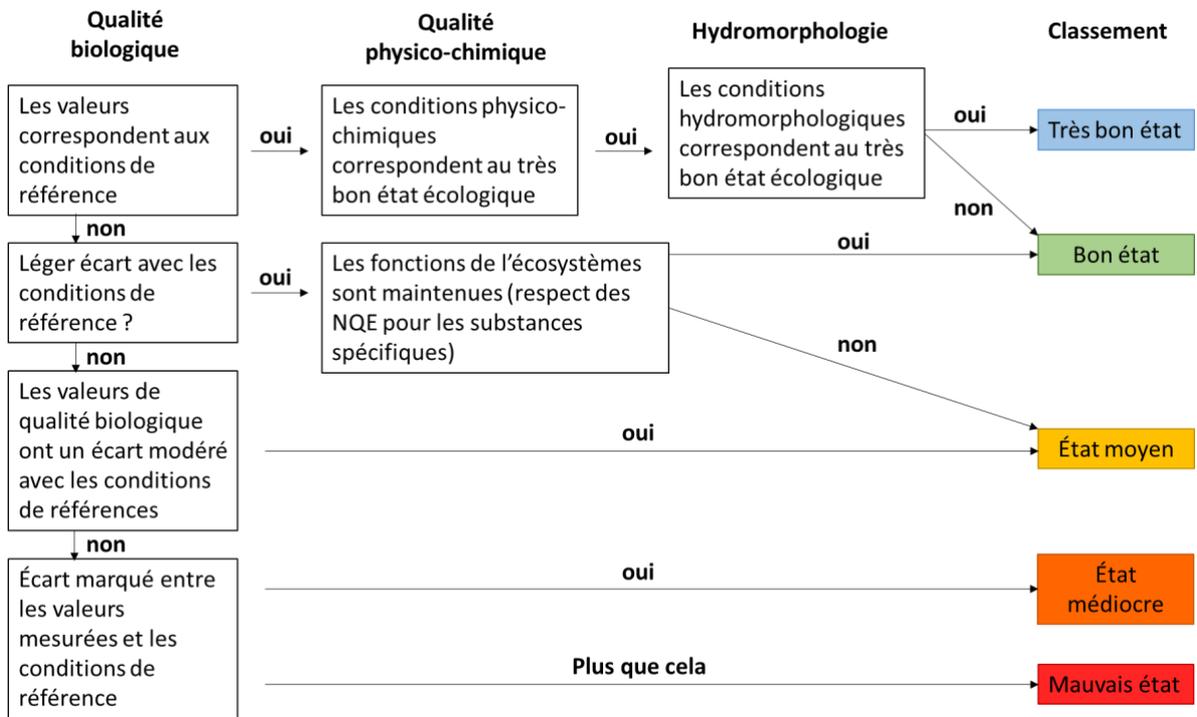


Figure 1. Détermination de l'état écologique des masses d'eau en fonction de la qualité biologique, physico-chimique et de l'hydro-morphologie. D'après le guide technique relatif à l'évaluation de l'état des eaux de surface continentales (Ministère de la Transition énergétique et solidaire, 2019). NQE : norme de qualité environnementale.

1.1.1. La qualité biologique

La qualité biologique est évaluée à travers différents éléments qui sont : la flore aquatique (macrophytes, diatomées), la faune benthique invertébrée (macro-invertébrés) et l'ichtyofaune. Plusieurs indices ont été créés afin d'évaluer la qualité de chacun de ces éléments et sont, à ce jour, validés par la Commission européenne (DCE, 2018/229/UE). Les indices IBMR (Indice Biologique Macrophytique en Rivière) et IBD (Indice Biologique Diatomées) permettent l'évaluation de la flore aquatique. En ce qui concerne la faune benthique, l'IBGN (Indice Biologique Global Normalisé), consistant en l'évaluation de l'abondance des espèces de macro-invertébrés et le classement des masses d'eau en fonction la sensibilité de chaque espèce, était utilisé dans le cadre de la DCE. A partir du troisième cycle DCE (2022-2027), l'I2M2 (Indice Invertébrés MultiMétrique) sera l'indice indiqué comme étant la méthode d'évaluation de la faune benthique. Cet indice est aujourd'hui utilisé comme outil diagnostique. Un dernier indice, l'IPR (Indice Poisson Rivière), est utilisé pour l'évaluation de la qualité biologique des masses d'eau.

1.1.2. La qualité physico-chimique et hydro-morphologie

La qualité physico-chimique est basée sur la prise en compte des paramètres généraux et la comparaison avec des valeurs seuils. Parmi ces paramètres, la température, le bilan oxygène, la salinité, l'état d'acidification ainsi que la concentration en nutriments sont mesurés. En plus de ces paramètres physico-chimiques, des polluants spécifiques de l'état écologique (PSEE) sont également dosés dans les milieux. Ces polluants, définis par la DCE, possèdent différents critères : « ils ne sont ni interdits ni ubiquistes ; sont rejetés en quantité abondante et possèdent des normes de qualité environnementale robustes » (DCE, 2018/229/UE).

En ce qui concerne l'hydro-morphologie des cours d'eau, deux outils existent à ce jour, l'indice SYRAH (système relationnel d'audit de l'hydro-morphologique) et l'indice CARHYCE (caractérisation de l'hydro-morphologie des cours d'eau ; Gob et al., 2014). SYRAH est basé sur des données SIG recensant les pressions anthropiques susceptibles d'affecter le cadre physique des cours d'eau (Valette et al., 2008). En complément, CARHYCE apporte des informations objectives sur les caractéristiques physiques du cours d'eau (Gob et al., 2014). Cet outil représente aujourd'hui le standard national (départements d'outre-mer y compris) déployé sur les réseaux de surveillance DCE.

1.2. L'état chimique des masses d'eau

En 2015, 62 % des cours d'eau étaient en bon état chimique en France (www.eaufrance.fr).

L'évaluation de l'état chimique des masses d'eau est basée sur le dosage de 45 substances choisies sur la base de leurs persistance, toxicité ou capacité de bioaccumulation (DCE, 2013/39/UE). Selon les résultats obtenus, si la concentration mesurée est inférieure à la norme de qualité environnementale (NQE) de la substance en question, la masse d'eau est considérée en bon état chimique. Dans le cas contraire, il suffit que la concentration d'une seule des 45 substances mesurées soit supérieure à sa NQE pour que la masse d'eau soit déclassée en mauvais état chimique (Figure 2).

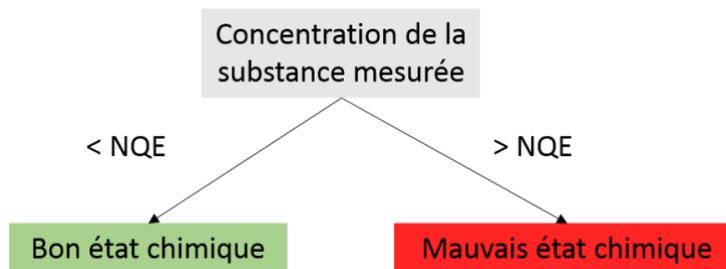


Figure 2. Détermination de l'état chimique des masses d'eau en fonction des NQE. D'après le guide technique relatif à l'évaluation de l'état des eaux de surface continentales (Ministère de la Transition énergétique et solidaire, 2019).

1.2.1 Les normes de qualité environnementale

L'état chimique d'une masse d'eau de surface est déterminé au regard du respect des normes de qualité environnementales (NQE). Ces normes représentent des seuils à ne pas dépasser afin de protéger l'environnement et la santé humaine. Il existe deux types de NQE établis dans la DCE : la NQE-CMA (la concentration maximale admissible) et la NQE-MA (la concentration moyenne annuelle à ne pas dépasser). Ces valeurs sont acquises pour des substances dites « prioritaires » qui se divisent en trois grandes classes : les éléments traces métalliques (ETM), les pesticides et les polluants industriels (DCE, 2013/39/UE). Les NQE sont établies à partir de l'évaluation du risque visant à identifier le danger et l'exposition des organismes aux différentes substances. La PEC (Predicted Environmental Concentration) et la PNEC (Predicted No effect Concentration) sont deux paramètres permettant le calcul du risque : $RQ \text{ (Risk Quotient)} = PEC/PNEC$. Lorsque le RQ est supérieur à 1, on considère qu'il existe un risque potentiel pour l'environnement. Les NQE pour l'eau, les sédiments et le biote sont ensuite établies, soit par des méthodes d'extrapolation suite à des résultats issus de bioessais, soit par modélisation. L'utilité des NQE pour le biote peut cependant être mise en cause, puisqu'elles sont basées sur des espèces dites « modèles » ne prenant pas en compte une large gamme de facteurs tels que le stade de développement, le sexe, la sensibilité ou la vulnérabilité des espèces et ne sont pas toujours représentatives des milieux étudiés. Les concentrations en substances mesurées dans les différents compartiments pourront se situer en dessous ou au-dessus de ce seuil mais la présence du risque sera dépendante de l'espèce considérée (Lepom et al., 2012).

1.2.2 L'utilisation des bioessais

Les NQE sont basées sur des données obtenues sur des organismes aquatiques représentatifs par le biais d'essais d'écotoxicité. Les espèces utilisées, dites modèles, pour l'établissement des valeurs seuils doivent représenter trois niveaux trophiques au minimum : les producteurs primaires (algues ou plantes aquatiques), les invertébrés (*e.g. Daphnia magna*) et les poissons (*e.g. Danio rerio*). La validité de ces tests est basée sur la méthodologie de l'étude grâce à des lignes directrices nationales (AFNOR) ou internationales (Europe ; OCDE ou ISO) (INERIS, 2011). Ces tests présentent des avantages car ils sont peu onéreux et permettent l'établissement des résultats sur des temps courts. La toxicité des substances testées est donc rapidement évaluée. Cependant, l'utilisation des bioessais présente certaines limites. Lors des essais d'écotoxicité aiguë, la mortalité est fréquemment ciblée avec la détermination des LC_x^1 (Lethal Concentration) ou encore les effets visibles EC_x^2 (Effect Concentration).

Néanmoins, la méthodologie appliquée reste peu réaliste par rapport aux environnements étudiés. En effet, les espèces modèles utilisées sont issues d'élevage en laboratoire, limitant notamment la diversité génétique. Les fenêtres de tolérance des organismes étant dépendantes à la fois de cette diversité génétique et des caractéristiques intrinsèques des organismes (vécu des organismes ; Sokolova, 2012), l'évaluation des substances peut être biaisée puisque la tolérance des organismes peut varier au sein d'une même population (Amiard-Triquet, 2015). La source de contamination est uniquement réalisée à travers le milieu. Les sources provenant de l'alimentation ou encore des sédiments ne sont pas prises en compte, négligeant ainsi, un apport plus ou moins important de la contamination selon les espèces (Wang, 2011). La troisième limite importante de ces essais porte sur l'évaluation isolée des substances. En milieu naturel, les organismes sont généralement en présence de cocktails de polluants. Les effets synergiques, additionnels ou encore antagonistes restent non intégrés dans l'établissement des NQE.

1.2.3. Vers une nouvelle approche des bioessais

De nouvelles approches sont d'ores et déjà en cours de développement notamment en ce qui concerne les bioessais *in situ* (Amiard-Triquet, 2015). Cette approche consiste à évaluer l'état global des organismes suite à une exposition à du milieu prélevé *in situ* (eau et sédiments). Les organismes exposés sont, en général, des espèces modèles comme *D. magna*

¹ Concentration pour laquelle x % des organismes sont morts

² Concentration pour laquelle x % des organismes présentent l'effet d'intérêt mesuré

(Maltby et al., 2000), *Chironomus sp.* (Li et al., 2013), des larves d'invertébrés (His et al., 1999), des amphipodes (Bundschuh et al. 2011) ou encore le poisson *Pimephales promelas*, recommandé par l'OCDE. Pour ces tests, les organismes sont exposés à l'eau, aux sédiments décantés ainsi qu'aux éluviats de sédiments (Geffard et al., 2005).

Une seconde approche consiste en l'exposition des organismes directement *in situ*. En premier lieu, une caractérisation chimique des milieux étudiés est réalisée. Par la suite, les organismes sont encagés et placés dans le milieu sur une période définie. Bien que les espèces modèles citées précédemment restent couramment utilisées dans ce type d'études, les espèces indigènes comme les invertébrés benthiques, les gastéropodes, les amphipodes ou encore les poissons sont également utilisées (Correia et al., 2013 ; De Castro-Català et al., 2013 ; Moreira et al., 2006 ; Perez and Wallace, 2004 ; Steward et al., 2010). Après exposition, des marqueurs comportementaux, physiologiques ou biochimiques sont mesurés afin de déterminer l'état de santé des organismes (Amiard-Triquet et al., 2015). Ces deux approches novatrices permettent l'augmentation de la pertinence écologique des résultats acquis, qui était jusqu'à aujourd'hui une limite importante des bioessais (

Figure 3). Cependant, ces méthodes ne sont pas encore en vigueur dans le cadre de la DCE et les bioessais classiques restent utilisés. En effet, bien que ces approches permettraient d'affiner l'évaluation écotoxicologique, l'utilisation des biomarqueurs reste délicate et comporte encore de nombreuses limites.

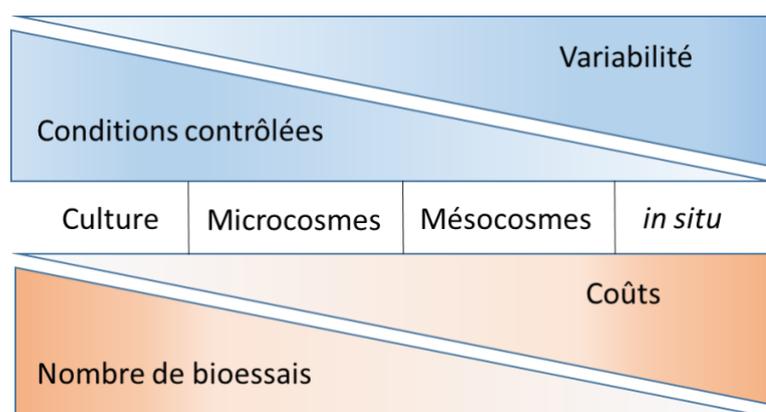


Figure 3. Relations entre la méthode utilisée pour la conduite des bioessais et les paramètres de répétabilité, de variabilité, de contrôle et des coûts associés. D'après Amiard-Triquet (2015).

2. Les biomarqueurs

La définition des termes comme « marqueur », « biomarqueur » ou encore « réponse » peut être différente selon la discipline dans laquelle ils sont employés. Afin d'éviter toute confusion dans la suite de ce manuscrit, le terme « marqueur » sera associé aux paramètres d'intérêt ciblés dans la thèse et le terme « biomarqueurs » sera utilisé dans un contexte écotoxicologique dans lequel les marqueurs ciblés présentent un intérêt dans les études de biosurveillance des milieux aquatiques et qui est d'ores et déjà établi dans la discipline. Pour le terme « réponse », ce dernier sera défini comme étant une mesure d'un marqueur chez un organisme dans toutes ses conditions de vie, qu'il soit en conditions contrôlées de laboratoire, en milieu naturel, soumis ou non à la présence d'une contamination.

L'utilisation des indices biologiques pour l'évaluation de l'état de santé des masses d'eau comporte des limites. En effet, lorsqu'un changement apparaît dans la valeur de l'indice, cela signifie que les effets sont d'ores et déjà visibles au niveau populationnel. Dans un contexte d'évaluation des risques environnementaux, l'écotoxicologie se tourne depuis une trentaine d'années vers le développement de biomarqueurs. Leur utilisation permet la détection précoce de changements mesurables à l'échelle sub-individuelle ou individuelle avant que des effets délétères n'apparaissent aux niveaux biologiques supérieurs (de Lafontaine et al., 2000 ; Depledge et Fossi, 1994 ; Newman, 2015 ; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003).

2.1 Définition

Un biomarqueur est défini comme étant « un changement mesurable au niveau comportemental, physiologique, biochimique ou moléculaire suite à l'exposition présente ou passée à des substances chimiques » (Depledge et Fossi, 1994). Cette définition a fait l'objet de nombreuses discussions depuis sa proposition (Kroon et al., 2017). Néanmoins, il est confirmé qu'un biomarqueur se doit de remplir certaines conditions. Mesuré après une exposition à une substance chimique, (i) le biomarqueur doit montrer des variations rapides ; (ii) la variation de réponse doit être connue ; (iii) le biomarqueur doit refléter l'état de santé global de l'organisme ; (iv) les niveaux de base doivent être connus et (v) la mesure du biomarqueur doit être peu onéreuse (van der Oost et al., 2003). Cependant, ces critères ne sont

pas toujours respectés. Les niveaux de base des biomarqueurs sont généralement méconnus dans le milieu naturel. Au-delà des effets de la contamination, les paramètres intrinsèques (*e.g.* cycle de reproduction) et extrinsèques (*e.g.* fluctuations saisonnières) modulent également les réponses des biomarqueurs étudiés (Pain et al., 2007). De plus, il est très difficile de cibler un seul biomarqueur remplissant tous les critères, notamment celui de la pertinence écologique. Il est rarement possible de regrouper à la fois une forte pertinence écologique et une forte précocité de réponse (Figure 4). L'objectif d'un biomarqueur est, *in fine*, de suivre en continu la qualité d'un milieu, d'identifier la source des perturbations observées au niveau populationnel, ou encore de permettre d'identifier une pollution spécifique (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). L'approche multi-marqueurs devient alors, indispensable dans l'évaluation des risques par l'utilisation des biomarqueurs en écotoxicologie.

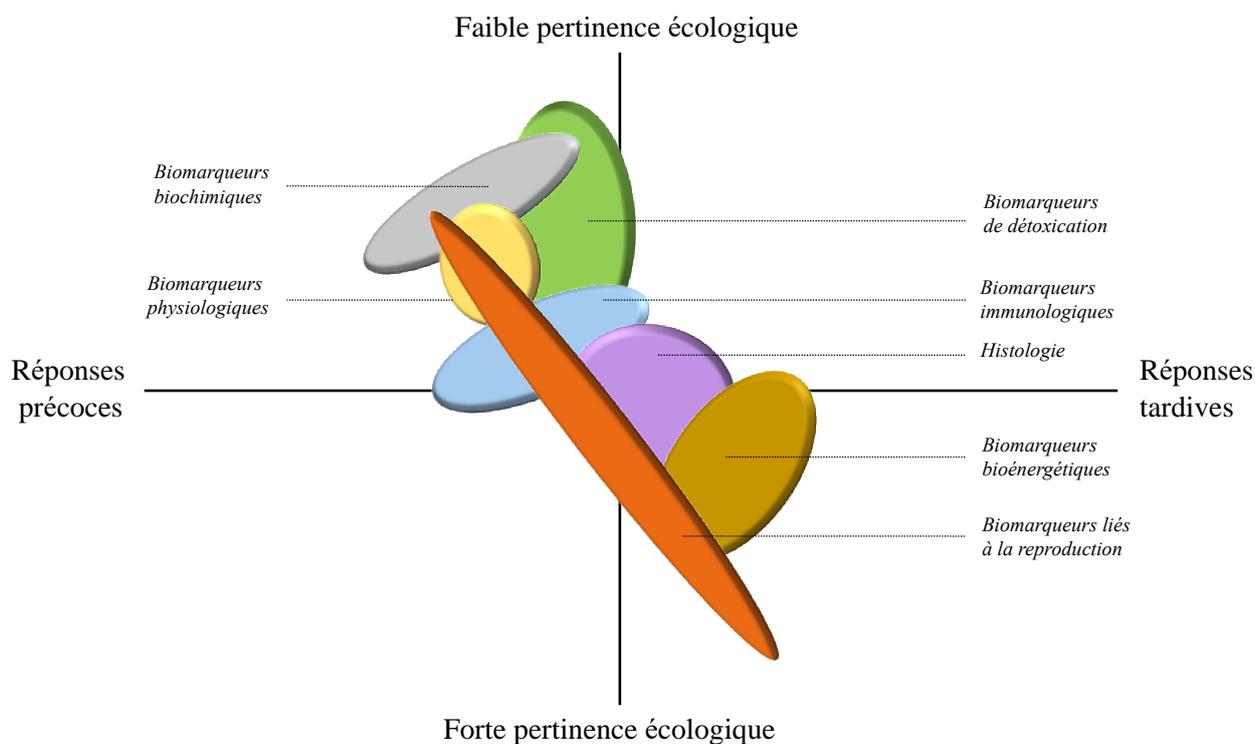


Figure 4. Relation entre les biomarqueurs ciblés et la précocité de réponse ainsi que la pertinence écologique qui leur sont associées. D'après Adams et al. (1989).

2.2. Les biomarqueurs développés en écotoxicologie

Par le passé, trois catégories de biomarqueurs étaient classiquement distinguées : les biomarqueurs d'exposition, les biomarqueurs d'effets et les biomarqueurs de sensibilité (NAS/NRC, 1989). Après de nombreuses réflexions, il s'avère difficile de relier directement la variation d'un biomarqueur à l'exposition ou l'effet d'une substance chimique unique (Forbes et al., 2006). Seules deux catégories sont alors, à ce jour, préférées en écotoxicologie : les biomarqueurs de défense et les biomarqueurs de dommages (de Lafontaine et al., 2000). Les biomarqueurs ciblés peuvent être spécifiques ou, plus souvent, non-spécifiques d'une contamination. Les plus classiquement ciblés dans les études écotoxicologiques de ces cinq dernières années sont présentés dans la figure 5. Les biomarqueurs liés au métabolisme énergétique ne sont pas présentés ici puisqu'ils seront discutés à part entière dans la deuxième partie de ce chapitre.

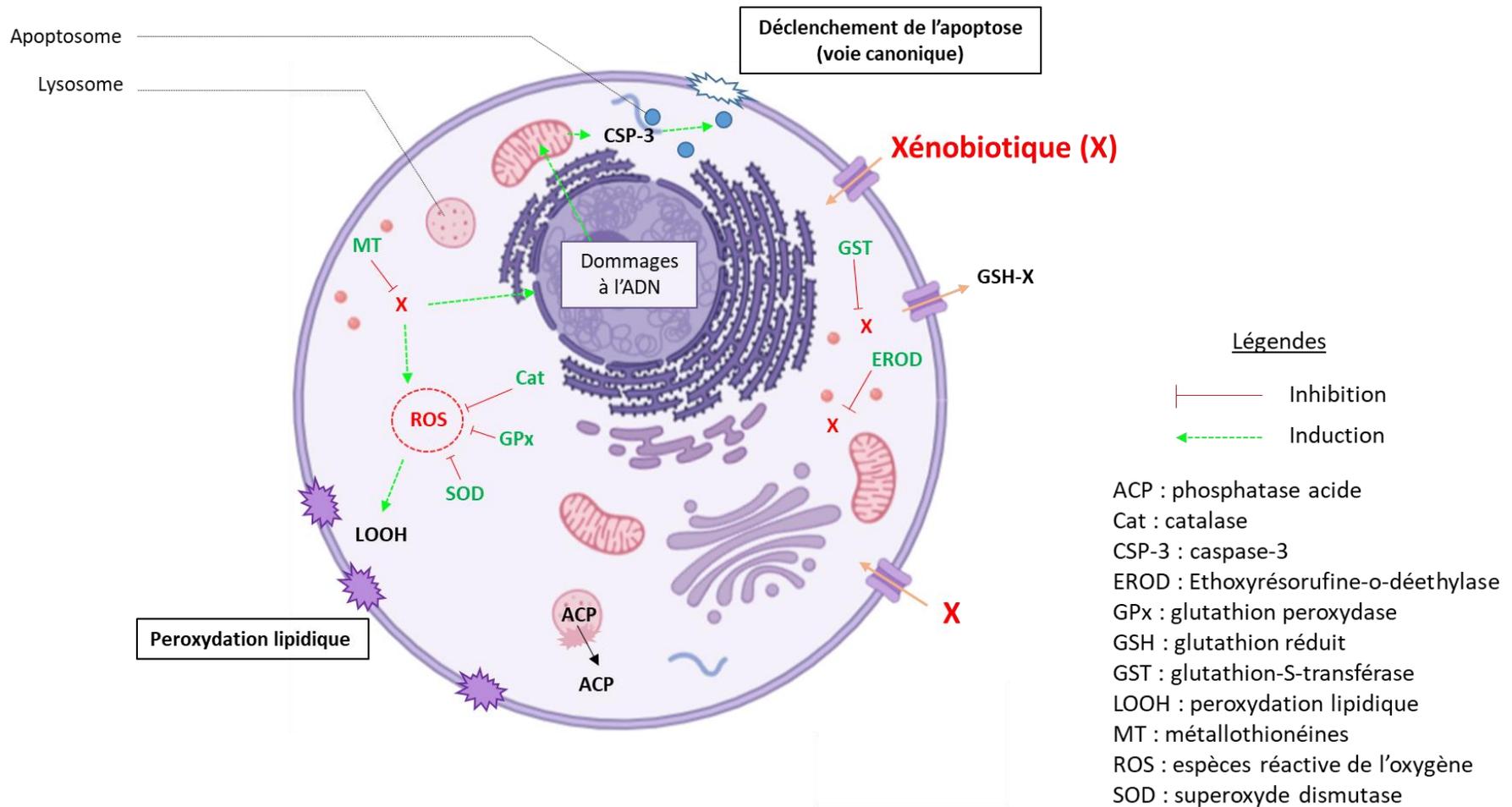


Figure 5. Représentation schématique des réponses d'un organisme face à la présence intracellulaire d'un xénobiotique sur les différents biomarqueurs de défense et de dommages couramment mesurés en écotoxicologie chez *D. polymorpha* sur les cinq dernières années (hors métabolisme énergétique). Les biomarqueurs en vert et en rouge sont respectivement des biomarqueurs de défense et de dommages (schéma cellulaire issu du site www.biorender.com).

2.2.1. Les biomarqueurs de défense

Les biomarqueurs de défense sont associés aux mécanismes compensatoires mis en place par les organismes lors d'un stress leur permettant de faire face à la présence de contaminants. Ils correspondent généralement à une capacité de détoxification des contaminants bioaccumulés dans les tissus et limitent leur assimilation et/ou facilitent leur métabolisation et leur excrétion (Newman, 2015). Ces mécanismes peuvent être soit constitutifs soit acquis ou améliorés au cours de la vie. En écotoxicologie, des biomarqueurs ont ainsi été développés en ciblant divers mécanismes de défense (Amiard-Triquet et al., 2012). Ces biomarqueurs peuvent être modulés différemment au sein d'une même population (Pain et al., 2007). Cette diversité de tolérance peut résulter d'une exposition chronique des organismes et aboutir à l'acclimatation voire l'adaptation des espèces (Vigneron, 2015). La contamination des milieux n'est pas le seul facteur influençant la capacité de défense des organismes. Les caractéristiques intrinsèques, la diversité phénotype et génétique, le taux de mutation ou encore la condition physiologique sont tout autant des paramètres à prendre en compte dans l'évaluation de la tolérance d'une population (Vigneron, 2015). Les biomarqueurs de défense ont été développés sur la base des connaissances du sens de variation des biomarqueurs ciblés permettant aux organismes de faire face à la contamination (Amiard-Triquet et al., 2012). Plusieurs biomarqueurs de défense sont d'ores et déjà bien connus et utilisés en écotoxicologie (Figure 5).

2.2.2. Les biomarqueurs de dommages

Les biomarqueurs de dommages ciblés en écotoxicologie sont principalement des marqueurs moléculaires ou cellulaires. Cette classe de biomarqueurs permet notamment de lever l'ambiguïté du terme « effet » qui caractérisait les classes de biomarqueurs d'effet et de sensibilité (Amiard-Triquet et al., 2012 ; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Les biomarqueurs de dommages reflètent l'effet d'une contamination lorsque les mécanismes de défense ne sont plus suffisants pour contrer les potentiels impacts néfastes liés à la contamination (Amiard-Triquet et al., 2012).

2.3. La biosurveillance à travers les biomarqueurs : les éternels verrous ?

L'utilisation des biomarqueurs, comme indiqué précédemment, nécessite la connaissance d'un certain nombre de paramètres. Le premier verrou à lever est celui concernant la relation entre les réponses des biomarqueurs mesurés et les effets aux niveaux supérieurs (Bartell 2006 ; Forbes et al., 2006). L'extrapolation reste délicate lorsque les biomarqueurs ciblés se situent à des niveaux d'organisation faibles. Ces niveaux d'organisation faibles représentent une gamme de biomarqueurs mesurés à petite échelle au niveau moléculaire ou cellulaire. De ce fait, l'extrapolation au niveau de l'organisme voire de la population reste délicate. L'approche multi-marqueurs permet, sur ce point, de cibler diverses fonctions biologiques afin d'obtenir une vision globale de l'état de santé de l'organisme. La mise en place de bioessais *in situ* pour l'évaluation des risques nécessite également la connaissance des variations naturelles des réponses des biomarqueurs. Dans ce cadre, la caractérisation des niveaux de base devient essentielle en cas d'études exclusivement *in situ*. De plus certains facteurs confondants tels que l'âge, le sexe, les caractéristiques intrinsèques ainsi que le cycle de reproduction des organismes jouent un rôle prépondérant dans l'interprétation des réponses des biomarqueurs mesurés, représentant ainsi un second verrou dans leur utilisation en biosurveillance (Amiard-Triquet et al., 2012). Le manque de connaissances sur la biochimie, la physiologie et le comportement des organismes aquatiques sentinelles utilisés, et sur l'amplitude des réponses attendues dans un contexte physiologique normal, limitent en effet souvent l'intérêt des biomarqueurs comme signal d'alarme d'un stress pouvant être dû à des causes biotiques ou abiotiques, d'origine naturelle ou anthropogénique (Garric et al., 2010). Aujourd'hui, l'utilisation d'un panel de biomarqueurs est de plus en plus répandue en écotoxicologie. Bien que les outils statistiques développés depuis quelques années permettent l'intégration de l'ensemble des réponses suivies, il reste cependant délicat d'interpréter clairement les réponses ciblées.

Afin de lever les différents verrous rencontrés dans l'utilisation des biomarqueurs en biosurveillance, de nombreux projets de recherche misent sur le développement de nouveaux biomarqueurs à la fois précoces et intégrateurs de l'état de santé des organismes. Des espèces, dites sentinelles, sont ciblées dans ces travaux car elles possèdent des critères communs leur permettant de refléter la qualité du milieu dans lequel elles vivent.

3. *Dreissena polymorpha*, une espèce sentinelle en écotoxicologie

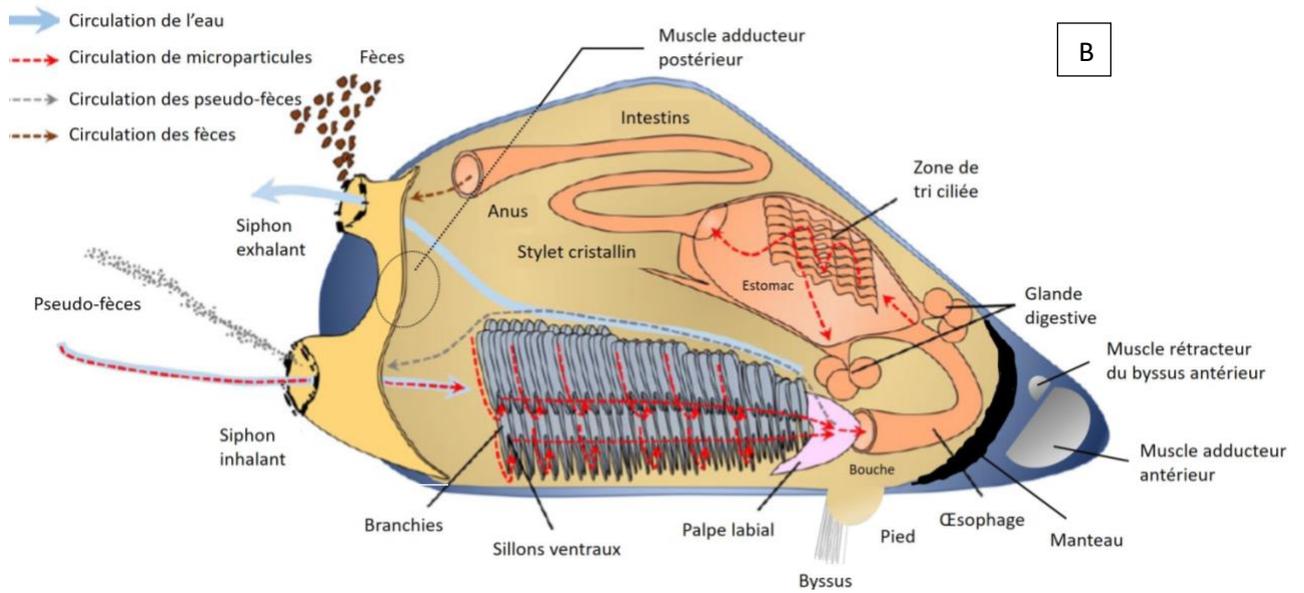
Dreissena polymorpha est l'espèce utilisée pour les différents travaux réalisés dans ce projet doctoral. Cette partie de la synthèse bibliographique présente globalement *D. polymorpha* et discute les connaissances du métabolisme déjà acquises chez cette espèce et son utilisation en écotoxicologie.

3.1. Description de *D. polymorpha*

Dreissena polymorpha, communément appelée moule zébrée, est une espèce invasive de bivalve d'eau douce (Figure 6). Ce bivalve fait partie de la famille des Dreissenidae appartenant à la sous classe des hétérodontes (Mackie, 1991). Comme chaque espèce de bivalves, *D. polymorpha* possède deux valves qui s'entre-ouvrent et se ferment grâce à la présence d'un ligament (charnière) et de muscles adducteurs. Cette espèce filtre les particules présentes dans la colonne d'eau pour se nourrir via ses siphons ; le siphon inhalant qui lui permet d'entraîner un flux d'eau à l'intérieur du corps mou et un siphon exhalant lui permettant d'éjecter l'eau. Ce flux, chargé de nombreuses particules, traverse les branchies avant de gagner l'appareil digestif. Les particules dont la taille est trop importante, sont rejetées via le siphon inhalant sous la forme de pseudo-fèces. Après digestion dans la glande digestive, les déchets métaboliques sont excrétés sous forme de fèces. L'ensemble des organes est entouré d'une enveloppe appelée le manteau qui est majoritairement adhérente à la coquille. *D. polymorpha* est une espèce qui vit fixée sur des substrats durs grâce à son byssus, et la présence d'un pied lui permet de se déplacer dans son environnement (Claudie et Mackie, 1994).



A



B

Figure 6. *D. polymorpha* : (A) Photographie (crédit photo : D. Coacolo) ; (B) Schéma représentant les principaux organes des bivalves et la circulation des aliments ingérés via l'eau (d'après Claudie et Mackie, 1994; Willer and Aldridge, 2017).

3.2 Ecologie et physiologie de l'espèce

3.2.1. Distribution de l'espèce

D. polymorpha est une espèce invasive originaire de la région Ponto-Caspienne en Europe de l'Est (Borcherding, 1991). Sa présence en Europe de l'Ouest a été reportée au 19^{ème} siècle. Son expansion vers les régions de l'Ouest de l'Europe a été effectuée de manière naturelle et anthropique via notamment la construction abondante de nouveaux canaux pour la navigation marchande (transport fixées sur les coques de bateau, ou dans les eaux de ballast) (Karatayev et al., 2015). En ce qui concerne son invasion en Amérique du Nord, elle fut beaucoup plus tardive qu'en Europe, vers la fin du 20^{ème} siècle (Ram et al., 2012). Sa dispersion sur le continent américain a principalement été provoquée par la vidange des ballasts des navires dans les grands lacs américains (Tachet et al., 2000). De nos jours, *Dreissena polymorpha* est retrouvée dans la plupart des cours d'eau douce de l'hémisphère Nord (Figure 7).

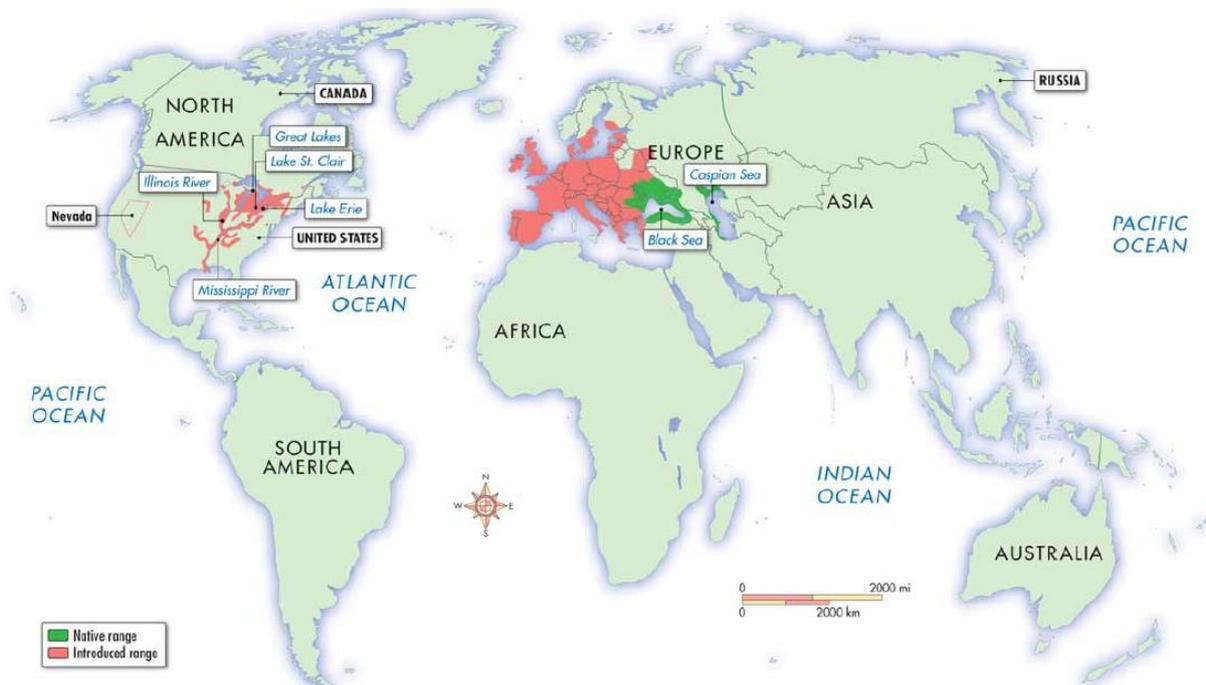


Figure 7. Aire de répartition de *D. polymorpha* en 2008 (Gray, 2008). Les zones en vert et en rouge représentent respectivement les zones natives et non-natives.

3.2.2. Caractéristiques intrinsèques : cycle de vie

Dreissena polymorpha est une espèce dioïque, les mâles et les femelles sont des individus distincts. Cependant, des cas rares d’hermaphroditisme ont déjà été rapportés (Claudi et Mackie, 1994; Ram et al., 1996 ; Sprung, 1995). Le ratio de distribution rencontré entre mâles et femelles est le plus souvent de 1 : 1 (Ram et al., 1996 ; Claudi et Mackie, 1994).

Le cycle de reproduction de cette espèce est annuel. En période hivernale (températures comprises entre 0 et 7 °C), les moules sont en repos. Avant le début du printemps, les individus débutent le développement de leurs gamètes jusqu’à leur maturation. Lorsque la température de l’eau avoisine 12 °C, la ponte des gamètes débute dans les populations. Le pic d’émission a été observé aux alentours de 15 °C (Claudi et Mackie, 1994 ; Borcharding, 1991). La période de reproduction s’étale sur plusieurs mois pouvant aller des mois de mars-avril aux mois d’août-septembre (Borcharding, 1991 ; Claudi et Mackie, 1994 ; Palais et al., 2011). La ponte des gamètes peut être influencée par plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques à l’organisme. Le déclenchement de la production de gamètes dépend principalement de la température du milieu et de la quantité de nourriture disponible, mais également du taux de sérotonine, un neurotransmetteur essentiel, ainsi que du taux de phéromones présentes dans le milieu (Borcharding, 1991 ; Ram et al., 1996 ; Stoeckmann, 2003). La prolifération de la moule zébrée dans les cours d’eau douce de l’hémisphère Nord résulte principalement de son taux de fécondité élevé caractéristique d’une stratégie *r* de reproduction (Ram et al., 1996). Une femelle mature peut émettre plus d’un million d’ovocytes chaque année. La taille des gamètes rejetés par les femelles est comprise entre 40 et 50µm de diamètre. Les gamètes mâles sont, eux, plus petits (environ 5µm) (Claudi et Mackie, 1994 ; Ram et al., 1996). Peu d’études ont jusqu’à présent été réalisées sur le fonctionnement des gamètes chez *D. polymorpha*. Certaines se sont penchées sur l’étude du stade de développement des gamètes mâles par cytométrie de flux mais aucune ne s’est intéressée, pour l’heure, au fonctionnement physiologique de ces derniers ni aux gamètes femelles (Magniez et al., 2017).

Le cycle de vie des dreissénidés comprend deux phases, une phase pélagique et une phase fixée (Figure 8). La phase pélagique correspond à la forme de vie larvaire. Après émission des gamètes mâles et femelles, l’ovocyte fécondé devient un embryon grâce aux réserves présentes dans l’œuf, et qui à son tour se transforme en larve nageuse appelée trocophore. L’évolution en larve véligère intervient lors de la formation du vélum qui permet

la locomotion et l'alimentation de cette dernière (Sprung, 1995). L'initiation de la formation de la coquille ainsi que le développement de plusieurs organes (ébauches branchiales, siphons, pied...) intervient à ce stade. Suite à la formation du pied, la larve entre alors en stade post-véligère et devient pédivéligère (Gosling, 2003). La vie pélagique des larves est généralement comprise entre 4 et 5 semaines (Claudi et Mackie, 1994). Lorsque le substrat est favorable, la larve se fixe grâce à la production de son byssus et c'est après cette étape d'attachement initial que commence la métamorphose qui marque le passage entre la phase pélagique et la phase fixée benthique (Claudi et Mackie, 1994). L'individu continuera de croître pour devenir un juvénile puis un adulte avec une durée de vie de 4 à 7 ans (Ackerman, 1994 ; Claudie et Mackie, 1994 ; McMahon, 2002).

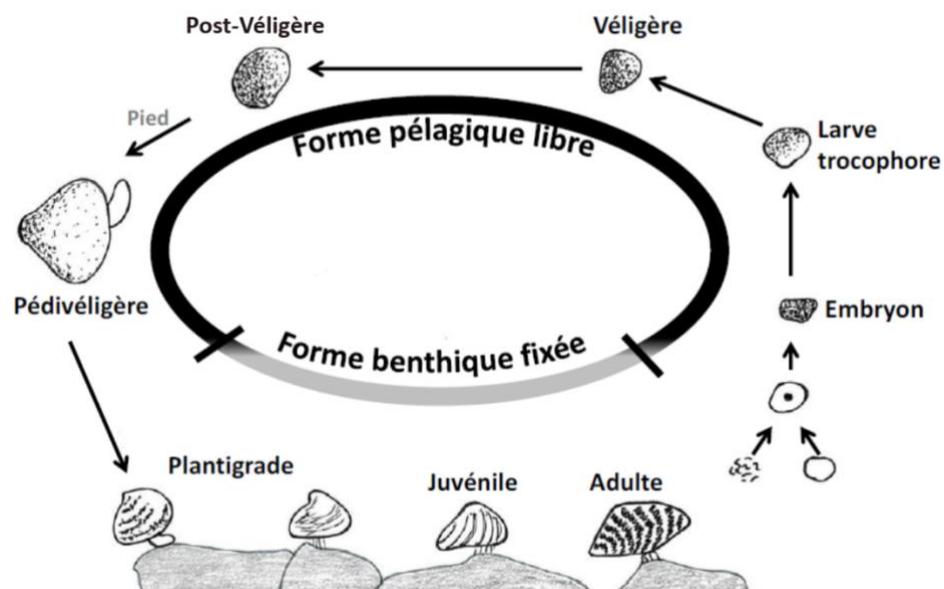


Figure 8. Cycle de reproduction de *D. polymorpha* (d'après Ackerman, 1994 ; Claudie et Mackie, 1994 ; Potet, 2017).

3.2.3. Rôle écologique et impacts

D. polymorpha est une espèce du groupe fonctionnel des filtreurs. Elle est présente en nombre important dans les écosystèmes aquatiques. La colonisation des écosystèmes par cette espèce n'a pas été sans impact, des changements ont été observés et rapportés après son établissement dans les milieux. Sa grande capacité de filtration est le principal facteur de son impact sur l'environnement puisqu'elle joue notamment sur les concentrations du phytoplancton dans la colonne d'eau. De plus, des changements physiques, chimiques et

biologiques ont été observés (Karatayev et al., 2002). En effet la présence en grand nombre de moules zébrées a principalement abouti en premier lieu à des déséquilibres chimiques dans les milieux à travers l'augmentation des nutriments, pouvant amener à des blooms phytoplanctoniques (Higgins et Zanden, 2010). La colonisation par les dreissènes des dispositifs industriels comme les portes des écluses, les canaux de sorties d'eau, les filtres ou encore les filets de pêche a engendré certaines problématiques notamment concernant la fonctionnalité de ces derniers ainsi que les coûts associés à leur restauration. L'ensemble de l'expansion de l'espèce peut et a engendré de forts impacts économiques pour le contrôle des populations (Prescott et al., 2014). Néanmoins, son caractère invasif dans les écosystèmes a également eu des effets positifs : la diminution de la turbidité de l'eau, son rôle important dans les cycles de l'azote et du phosphore ou encore l'apport de nourriture que représente *D. polymorpha* pour d'autres espèces présentes dans les milieux (Goedkoop et al., 2011 ; Sousa et al., 2014). Ces observations ont été réalisées dans l'ensemble des espaces colonisés, puisque *D. polymorpha* possède une forte plasticité physiologique (Ram et al., 2012).

3.2.4. Caractéristiques métaboliques

Les caractéristiques métaboliques de *D. polymorpha* ont fait l'objet de peu d'études en écotoxicologie. Les demandes métaboliques de cette espèce sont dépendantes de plusieurs facteurs comme la température, la disponibilité en nourriture ainsi que la période du cycle de reproduction (Sprung, 1995). En effet les coûts énergétiques augmentent avec la température, cela étant également corrélé avec la mise en place de la reproduction chez cette espèce (Fanslow, 2001 ; Stoekmann, 2003). Comme décrit dans la section 2.2.2. Les biomarqueurs de dommages, le cycle de reproduction de *D. polymorpha* est bien connu. Des études ont été menées sur certaines populations de moules zébrées le long d'un cycle de reproduction en suivant notamment les réserves énergétiques de ces dernières. Il a été montré que les réserves énergétiques, évaluées par les concentrations en protéines, glycogène et lipides, augmentaient en période hivernale et printanière pour ensuite être utilisées lors de la période de reproduction s'étalant des mois d'avril à septembre (Palais et al., 2011). Cette observation a également été établie au niveau subcellulaire avec une augmentation de l'activité mitochondriale en été à travers le système de transport d'électrons ou l'expression du gène de l'ATP synthase (Fanslow et al., 2011 ; Kerambrun et al., 2016). Globalement, *D. polymorpha* présente une activité métabolique plus active en période estivale qu'en période hivernale.

Cette espèce utilise une stratégie de reproduction appelée « *r* » faisant référence à l'effort de reproduction mis en place par les espèces invasives (Ram et al., 2012). Cette stratégie consiste en plusieurs paramètres, notamment la production élevée de gamètes mâles et femelles dans le but d'augmenter la probabilité de rencontre et ainsi assurer une forte fécondation et l'expansion de l'espèce. La reproduction chez les espèces invasives représente une part majoritaire de la dépense énergétique (Ram et al., 2012 ; Karatayev et al., 2013). Cependant, cette espèce est présente depuis le 19^{ème} siècle dans les cours d'eau douce d'Europe de l'Ouest. Comme présenté précédemment, elle possède une forte capacité d'acclimatation et s'est adaptée à son environnement, changeant aussi la gestion de son métabolisme énergétique. *Dreissena polymorpha* présente une plus forte capacité de tolérance que d'autres espèces non natives des milieux arrivées plus récemment en Europe de l'Ouest comme *Corbicula fluminea*, *Limnoperna fortune* ou comme sa consœur *Dreissena rostriformis bugensis* (Mc Mahon, 2002 ; Potet et al., 2018). Cette particularité serait principalement due au développement de mécanismes de défense au niveau individuel comme une coquille et un byssus plus résistants, ainsi que la mise en place de mécanismes de défense subcellulaires (Grutters et al., 2012 ; Louis et al., 2019 ; Nalepa et al., 2010). Ces caractéristiques, en plus d'autres facteurs, font de cette espèce une espèce sentinelle utilisée en écotoxicologie.

3.4. Utilisation de *D. polymorpha* en écotoxicologie

Dreissena polymorpha est considérée comme une espèce sentinelle en écotoxicologie et a fait l'objet de nombreuses études dans le but d'évaluer l'effet des diverses pressions environnementales sur les écosystèmes aquatiques. Chaque espèce sentinelle se doit de répondre à plusieurs critères que remplit la dreissène, justifiant son utilisation. Sa présence en grand nombre ainsi que sa large aire de répartition permettent des prélèvements plutôt aisés. Elle doit également être représentative de son milieu, c'est-à-dire refléter la qualité du milieu dans lequel elle vit. *D. polymorpha* ayant une forte capacité de filtration, elle accumule les particules présentes dans la colonne d'eau et est connue pour notamment accumuler les contaminants sans entraîner une mortalité au sein des populations (Binelli et al., 2015). L'effet des contaminants chimiques comme les métaux, les pesticides ainsi que les dérivés pharmaceutiques, sont les plus couramment étudiés en conditions contrôlées de laboratoire (Bacchetta and Mantecca, 2009 ; Contardo-Jara et al., 2011 ; Johns, 2011 ; Louis et al., 2019 ; Potet et al., 2018, 2016 ; Quinn et al., 2011; Yancheva et al., 2017). Le biomonitoring actif,

consistant au déploiement de l'espèce sur différents sites par la méthode de l'encagement, est également utilisé afin d'évaluer la qualité des milieux à travers l'état de santé des organismes (Marie et al., 2006 ; Smolders et al., 2004, 2002). *Dreissena polymorpha* a fait l'objet d'études *in situ* ayant pour objectif d'évaluer l'influence des fluctuations naturelles sur les réponses ciblées (Kerambrun et al., 2016; Pain et al., 2007; Pain-Devin et al., 2014; Palais et al., 2012, 2011). Dans l'ensemble de ces études de nombreuses réponses physiologiques et biochimiques ont été ciblées et sont utilisées en tant que biomarqueurs en écotoxicologie (Tableau 1).

Tableau 1. Biomarqueurs de défense et de dommage étudiés chez *D. polymorpha* durant les 5 dernières années (2015-2020) et le stress étudié. ACP : acide phosphatase ; EROD : 7-ethoxy-resorufin O-deethylation ; GPx : glutathion peroxydase ; GST : glutathion s transférase ; HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques ; MXR : multixenobiotic resistance system ; NPs : nanoparticules ; SOD : superoxyde dismutase ; TAC : capacité anti-oxydante totale.

Classe de biomarqueurs	Biomarqueur	Stress	Auteurs
Défense	GPx	NPs, pharmaceutiques, polystyrène, métaux	Garaud et al. (2015, 2016) ; Potet et al. (2016, 2018) ; Magni et al. (2017, 2018) ; Parolini et al. (2015, 2016) ; Kerambrun et al. (2016)
	GST	NPs, pharmaceutiques, polystyrène, métaux, gadolinium, désinfectants	Garaud et al. (2015, 2016) ; Potet et al. (2016, 2018) ; Magni et al. (2017, 2018) ; Parolini et al. (2015, 2016) ; Kerambrun et al. (2016) ; Hanana et al. (2017) ; Sapone et al. (2016) ; André and Gagné (2017) ; Louis et al. (2019)
	SOD	Pharmaceutiques, métaux, gadolinium	Magni et al. (2017, 2018) ; Hanana et al. (2017) ; Parolini et al. (2015, 2016) ; Kerambrun et al. (2016)
	Catalase	NPs, pharmaceutiques, polystyrène, métaux, gadolinium, désinfectants	Garaud et al. (2015, 2016) ; Potet et al. (2016, 2018) ; Magni et al. (2017, 2018) ; Parolini et al. (2015, 2016) ; Kerambrun et al. (2016) ; Magni et al. (2017, 2018) ; Hanana et al. (2017) ; Sapone et al. (2016) ; Louis et al. (2019)
	TAC	NPs, métaux	Garaud et al. (2016) ; Potet et al. (2016, 2018) ; Louis et al. (2019)
	Métallothionéines	Métaux	Farkas et al. (2017) ; Kerambrun et al. (2016)
	MXR	NPs	Garaud et al. (2015, 2016)
	EROD	Désinfectants, métaux	Sapone et al. (2016) ; Farkas et al. (2017)
	Immunomarqueurs (<i>ex-vivo</i>)	Métaux, protozoaires	Evariste et al. (2017) ; Le Guernic et al. (2020)
Dommages	ACP	Nps, métaux	Garaud et al. (2016) ; Potet et al. (2016, 2018) ; Louis et al. (2019)
	Peroxydation lipidique	NPs, pharmaceutiques, polystyrène, métaux, gadolinium	Garaud et al. (2016) ; Potet et al. (2016, 2018) ; Louis et al. (2019) ; Magni et al. (2017, 2018) ; Hanana et al. (2017) ; André and Gagné (2017) ; Parolini et al. (2015, 2016) ; Farkas et al. (2017)
	Lésions à l'ADN	Variations naturelles, HAPs, métaux, pharmaceutiques, polystyrène, neurotoxine	Vincent-Hubert (2015) ; Châtel et al. (2015) ; Parolini et al. (2015, 2016) ; Lepoutre et al. (2018) ; Magni et al. (2017)
	Caspase-3	NPs, métaux	Garaud et al. (2016) ; Potet et al. (2016, 2018) ; Louis et al. (2019)

3.5. Utilisation du métabolisme énergétique chez *D. polymorpha* en écotoxicologie

Le métabolisme énergétique chez *D. polymorpha* a également fait l'objet de plusieurs études. Les grandes fonctions vitales des organismes que sont la croissance, la reproduction, le métabolisme basal et la production de réserves sont dépendantes de l'énergie disponible au sein de cet organisme. Chez *D. polymorpha*, Sprung (1995) et Sprung et Rose (1988) se sont focalisés sur la filtration, la clairance, la croissance et l'effort de reproduction de cette espèce. L'indice de condition (IC), calculé sur la base du poids des tissus et de la coquille (ou volume de la coquille) est très souvent utilisé comme indicateur général de l'état de santé des organismes (Kerambrun et al., 2016 ; Palais et al., 2011). Une diminution de l'IC est principalement reliée à une perte de masse, qui peut être due à la libération des gamètes ou à une croissance plus faible (réallocation énergétique lors d'un stress). Afin d'évaluer au mieux l'énergie disponible dans les organismes, les réserves énergétiques, comprenant les protéines, les lipides ainsi que le glycogène sont également couramment mesurés. Lors d'un stress, la demande énergétique augmente forçant les organismes à puiser dans leurs réserves énergétiques afin d'assurer l'apport d'énergie nécessaire pour se maintenir. Les réserves ont fait l'objet d'études *in situ* le long d'un gradient de contamination (Smolders et al., 2004, 2002 ; Voets et al., 2006) ou lors d'un suivi annuel sur une même population (Palais et al., 2011). A partir de mesures énergétiques comprenant la filtration et la formation des réserves, certains indices ont été développés afin de déterminer l'allocation énergétique aux diverses fonctions. Parmi ces indices, l'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (SfG : Scope for Growth) est calculée à partir de plusieurs paramètres tels que la filtration, la clairance, l'assimilation et l'excrétion des organismes. Cet indice a été étudié chez *D. polymorpha* et il a été observé que cette allocation diminuait en présence de stress (métallique, sédiments) traduisant une allocation énergétique faible pour la croissance et la reproduction (Louis et al., 2019 ; Madon et al., 1998 ; Smolders et al., 2002). Cette diminution peut être liée à une réallocation énergétique vers le métabolisme de base des organismes. Un second indice est utilisé afin d'évaluer le coût énergétique associés à la maintenance cellulaire des organismes : l'Allocation Énergétique Cellulaire (AEC). Dans cette approche, les réserves énergétiques disponibles et la consommation d'énergie traduite par l'activité du système de transport d'électrons (ETS) sont mesurées au niveau cellulaire et intégrées dans ce modèle, indicateur de stress général (Fanslow et al., 2001). Tout comme pour le SfG, la présence de stress peut affecter le budget énergétique des organismes, entraînant une dépense énergétique

supplémentaire, et donc une diminution de la charge énergétique en adénylates (CEA ; Smolders et al., 2004).

L'exposition à des polluants peut aussi influencer la balance énergétique, en augmentant la demande énergétique. Les indices énergétiques ne sont plus beaucoup utilisés dans les études écotoxicologiques. Dans la littérature, l'activité ETS ainsi que l'expression des gènes codant pour l'ATP synthase et la cytochrome c oxydase sont les plus souvent étudiées afin d'évaluer l'activité aérobie des organismes tandis que l'activité LDH (lactate déshydrogénase) cible, elle, le métabolisme anaérobie (Garaud et al., 2016 ; Kerambrun et al., 2016 ; Louis et al., 2019 ; Potet et al., 2018, 2016). Cependant, les réponses des marqueurs du métabolisme énergétique sont dépendantes du cycle reproducteur rendant ainsi nécessaire la bonne connaissance de leur variation naturelle. Kerambrun et al. (2016) et Fanslow et al. (2001) ont observé respectivement une surexpression de l'ATP synthase et une augmentation de l'activité de l'ETS en période estivale comparée à la période hivernale. Bien que de nombreuses études ont montré un effet négatif de la pollution sur le budget énergétique des organismes, le fonctionnement de ce dernier chez *D. polymorpha*, est peu ciblé et le métabolisme ne fait que rarement l'objet même d'une étude (Tableau 2). Dans ce sens, les connaissances fondamentales sur la gestion du métabolisme énergétique chez *D. polymorpha* sont encore, à ce jour, largement méconnues.

Tableau 2. Marqueurs du métabolisme énergétique les plus étudiés chez *D. polymorpha* et le stress étudié. AEC : allocation énergétique cellulaire ; ETS : electron transport system (système de transport des électrons) ; IC : indice de condition ; NPs : nanoparticules ; SfG : scope for growth (allocation énergétique à la croissance et à la reproduction).

	Marqueur	Stress	Auteurs
Métabolisme énergétique	Croissance	milieu naturel,	Sprung, 1995 ; Sprung and Rose, 1988 ; Stoeckmann, 2003 ; Stoeckmann and Garton, 2001
	Filtration (respiration)	Nutritionnel, sédiments, métaux	Louis et al., 2019 ; Madon et al., 1998 ; Sprung, 1995 ; Sprung and Rose, 1988
	Clairance	Nutritionnel, métaux, sédiments	Berg et al., 1996 ; Smolders et al., 2004, 2002 ; Sprung, 1995 ; Sprung and Rose, 1988
	IC	Métaux, variations naturelles,	Kerambrun et al., 2016 ; Palais et al., 2011 ; Potet et al., 2016 ; Stoeckmann and Garton, 2001
	Lipides / triglycérides	Thermique, nutritionnel, métaux, NPs, variations naturelles	Garaud et al., 2016 ; Louis et al., 2019 ; Palais et al., 2011 ; Potet et al., 2018, 2016 ; Stoeckmann and Garton, 2001
	Glycogène	Variations naturelles, gradient de contamination	Palais et al., 2011 ; Smolders et al., 2004, 2002
	Protéines	Les protéines sont mesurées dans la majeure partie des études écotoxicologiques chez <i>D. polymorpha</i> : soit pour rapporter une activité enzymatique, soit pour avoir la valeur de protéines en tant que réserves énergétiques.	
	ETS	Métaux, NPs, variations naturelles	Fanslow et al., 2001 ; Garaud et al., 2016 ; Louis et al., 2019 ; Potet et al., 2018, 2016
	ATP synthase	Métaux et variations naturelles	Kerambrun et al., 2016
	Cytochrome c oxydase	Métaux et variations naturelles	Kerambrun et al., 2016
	AEC	Gradient de contamination	Fanslow et al., 2001 ; Smolders et al., 2004
SfG	Gradient de contamination, métaux, sédiments, nutritionnel	Louis et al., 2019 ; Smolders et al., 2002	

II. Le métabolisme énergétique cellulaire

Le métabolisme énergétique est à la base du fonctionnement de chaque organisme. Il regroupe l'ensemble des réactions de transformation et d'utilisation d'énergie, de synthèse (anabolisme) et de dégradation (catabolisme) des biomolécules. Le métabolisme énergétique fait référence à toutes les réactions impliquées dans la production d'adénosine triphosphate (ATP), l'énergie chimique libre, à partir de nutriments. Cette production d'ATP peut être entreprise en milieu aérobie (production de 36-38 molécules d'ATP pour une molécule de glucose), ou anaérobie (2 molécules d'ATP produites lors de la glycolyse). Dans des conditions normoxiques, les cellules ont classiquement recours à la respiration aérobie pour oxyder le glucose via une phosphorylation oxydative (PHOSOX) mitochondriale (Aminzadeh-Gohari et al., 2019).

1. Les apports énergétiques

1.1. Les apports alimentaires

L'ensemble des êtres-vivants acquièrent leur énergie via l'alimentation. Les dreissènes filtrent les particules présentes dans la colonne d'eau. Les particules ingérées vont ensuite être soit digérées et assimilées pour permettre la production d'énergie soit rejetées sous forme de pseudo-fèces. Selon l'abondance et la qualité des apports alimentaires, une certaine quantité d'énergie est formée. Selon la littérature, *D. polymorpha* possède un taux d'assimilation de la nourriture de 63 % (Baldwin et al., 2002). L'ensemble des processus biochimiques et physiologiques va dépendre de ce taux d'assimilation et de l'énergie disponible, par la suite, au niveau cellulaire. Cette énergie est allouée aux différentes fonctions vitales telles que le maintien du métabolisme basal, qui requiert une quantité minimale d'énergie, mais aussi la croissance, la reproduction, la formation de réserves comme le glycogène qui représente la principale source d'énergie stockée dans les organismes. La production de l'énergie sous forme d'ATP est liée à plusieurs facteurs, notamment la présence de substrats endogènes essentiels à la formation de cette molécule énergétique. Les apports alimentaires digérés et assimilés vont être soit directement métabolisés par l'organisme pour la production d'énergie soit stockés sous forme de réserves. Ces réserves permettent la synthèse d'ATP grâce à la

métabolisation du glucose et/ou à la bêta-oxydation des acides gras (Le Gal et al., 1997 ; Sokolova et al., 2012).

1.2. La métabolisation du glucose

La métabolisation du glucose est le processus qui se déroule dans le cytosol permettant la conversion du glucose en pyruvate indépendamment de la présence d'oxygène (Figure 9). La glycolyse est le principal processus de formation du pyruvate. Le devenir du pyruvate formé dépend des tissus et des conditions environnementales. Dans des conditions normoxiques, le pyruvate est converti en acétyl-coenzyme A (ACoA) dans les mitochondries, où il est entièrement oxydé en dioxyde de carbone *via* le cycle tricarboxylique (tricarboxylic acid cycle, TCA) ou cycle de Krebs. Dans des conditions hypoxiques ou anoxiques, l'activité glycolytique augmente, de sorte que le pyruvate, qui n'est plus métabolisé dans les mitochondries, est converti en lactate. Bien que ce processus soit énergétiquement moins efficace, il peut se produire à un rythme suffisant pour répondre aux besoins énergétiques de la cellule, au détriment d'une consommation accrue de glucose. Le glucose peut également être métabolisé par la voie des pentose-phosphates (PPP) ou voie de Warburg-Dickens-Horecker. Dans cette voie, le glucose-6-phosphate est décarboxylé pour former du ribose-5-phosphate dans une série de réactions qui conserve son énergie redox sous la forme de NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate). Bien que cela ne soit pas considéré comme une voie métabolique bioénergétique, c'est la source cytosolique principale de NADPH, un cofacteur pour de nombreuses réactions réductrices, notamment celles impliquées dans la biosynthèse des acides gras et la régénération du glutathion réduit (Bolaños et al., 2009). Le glucose, en concentration saturante, peut être stocké dans de nombreuses cellules sous forme de glycogène pour fournir du pyruvate lorsque la demande énergétique augmente. Bien que le glucose soit le substrat métabolique le plus important pour la plupart des organismes et notamment chez les bivalves, les acides gras ou les acides aminés peuvent également être des précurseurs bioénergétiques (Anacleto et al., 2013 ; Andrade et al., 2017; Cordeiro et al., 2016, 2017).

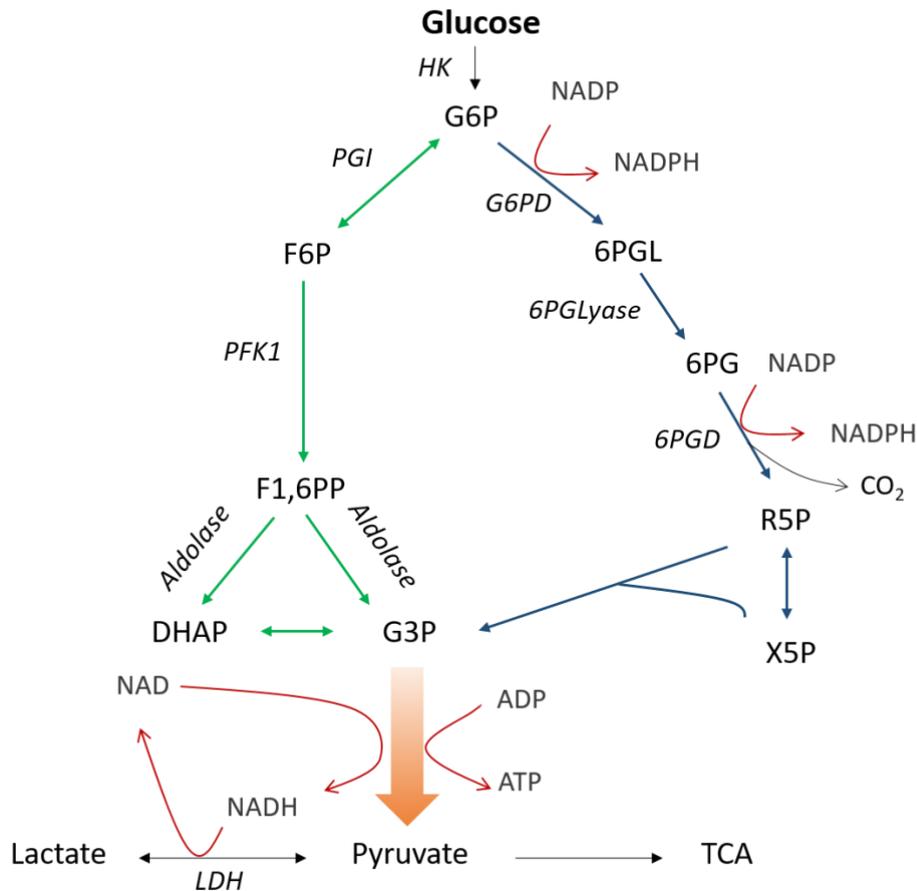


Figure 9. Métabolisation d'une molécule de glucose par la glycolyse (vert) et la voie des pentoses phosphates (bleu) aboutissant à la production de pyruvate. Le pyruvate est soit convertit en ACoA en présence d'oxygène soit en lactate en son absence. Métabolites : G6P : glucose-6-phosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; F1,6PP : fructose 1,6-biphosphate ; DHAP : dihydroxyacetone-phosphate ; G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate ; 6PGL : 6-phosphogluconolactone ; 6PG : 6-phosphogluconate ; R5P : ribulose-5-phosphate ; X5P : xylylose-5-phosphate. Enzymes : HK : hexokinase ; PGI : phosphoglucoisomérase ; PFK1 : phosphofructokinase 1 ; LDH : lactate déshydrogénase. TCA : cycle tricarboxylique.

1.2. La β -oxydation des acides gras

La β -oxydation des acides gras peut se dérouler dans les peroxysomes ainsi que dans les mitochondries. La β -oxydation mitochondriale des acides gras saturés (lipides) est une voie catabolique dépendante du système de transport carnitine contrairement à la voie peroxysomale (Figure 10). Elle implique également un certain nombre d'enzymes et génère de l'acétyl co-enzyme A (ACoA), du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et de flavine adénine dinucléotide (FADH₂) à partir d'esters d'acyl-CoA (Adeva-Andany et al., 2019). La β -oxydation représente un apport conséquent en substrats essentiels pour la production d'ATP

dans les organismes (Pan et al., 2017). Les lipides sont donc considérés comme des réserves énergétiques chez les bivalves et ont déjà fait l'objet de nombreuses études chez plusieurs espèces aquatiques notamment chez *D. polymorpha* (Dudognon et al., 2014 ; Palais et al., 2011 ; Plaistow et al., 2001). A l'issue de la β -oxydation, l'ACoA produit est ensuite incorporé au cycle tricarboxylique pour ensuite fournir les substrats nécessaires à la production d'ATP par la chaîne respiratoire.

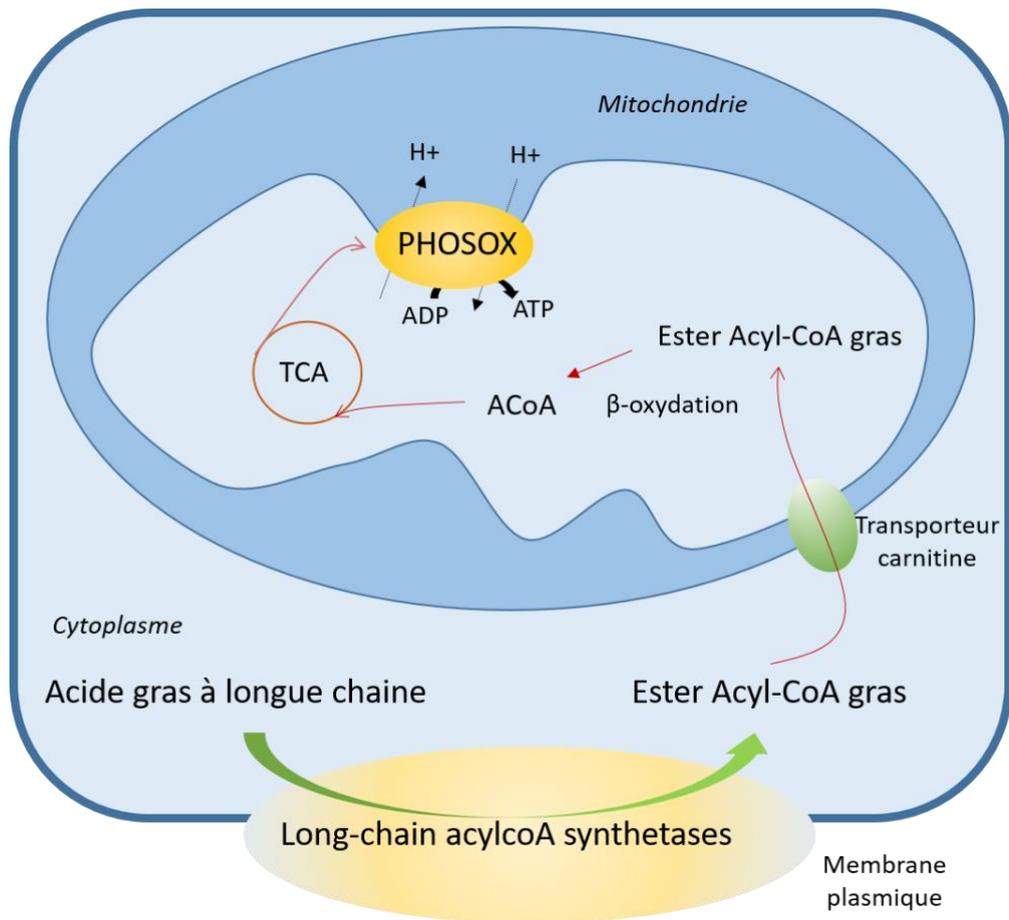


Figure 10. β -oxydation mitochondriale des acides gras. D'après Adeva-Andany et al. (2019).

2. Lieu de production de l'énergie en condition aérobie, la mitochondrie

La mitochondrie est un organelle présent dans les cellules eucaryotes qui est responsable de nombreuses fonctions clés d'un organisme. Elle est notamment le lieu de la dégradation des sucres (cycle tricarboxylique, TCA) et des acides gras à longue chaîne (β -oxydation), de la synthèse de stéroïdes et de lipides ainsi que de nombreuses autres fonctions.

Le principal rôle qu'il lui est alloué reste celui de la formation de l'ATP à partir de l'ADP *via* la PHOSOX mais la mitochondrie joue également un rôle essentiel dans la régulation de l'apoptose, le maintien de l'homéostasie de l'oxydoréduction cellulaire et la signalisation intracellulaire par l'intermédiaire du calcium (Duchen, 2004 ; Rizzuto et al., 2012 ; Sena et Chandel, 2012 ; Tait et Green, 2010). La mitochondrie a fait l'objet d'intenses recherches au cours des 50 dernières années puisqu'un dysfonctionnement mitochondrial a pu être relié à de nombreuses maladies chez l'Homme (Calvo and Mootha, 2010 ; Wisnovsky et al., 2016). La mitochondrie est une source d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par la chaîne respiratoire et pouvant provoquer divers dommages cellulaires. En excès, les ROS mitochondriaux ont en effet été montrés comme responsables de lésions de l'ADN dans certaines maladies neurologiques (Kovtun et al., 2007 ; Lin and Beal, 2006). De plus, un certain nombre de mutations génétiques héréditaires dans le génome nucléaire codant des protéines mitochondriales sont responsables de graves anomalies respiratoires (Calvo and Mootha, 2010). De ce fait, la mitochondrie est à ce jour la cible de nombreuses thérapies dans le domaine de la santé humaine (He et al., 2010 ; Wisnovsky et al., 2016).

En écotoxicologie, des connaissances approfondies sur cet organite et ses constituants chez des espèces sentinelles, permettront, à long terme, de mieux comprendre le mode d'action des polluants pour mieux en prévenir les effets. En effet, de nombreux polluants, notamment les éléments traces métalliques ou encore certains pesticides comme les SDHI (inhibiteurs de succinate déshydrogénase) ont pour cible principale certains composants de la mitochondrie (Sokolova et al., 2012).

2.1. Structure mitochondriale

Les caractéristiques structurales des mitochondries reflètent l'importance de maintenir une interface étroitement régulée avec d'autres compartiments subcellulaires. Les mitochondries sont entourées par une double membrane comprenant une membrane externe et une membrane interne. La membrane interne est imperméable, grâce à la présence de phospholipides formant une combinaison hydrophobe et dense (Smith et al., 2012). Un potentiel membranaire (ψ_m) est constamment maintenu à travers cette membrane interne et entretenu par la chaîne respiratoire. Afin de maintenir le gradient d'électrons, un transport actif des ions H^+ allant de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire est réalisé et crée un différentiel de pH à travers la membrane interne de la mitochondrie. Ces gradients de protons et de pH sont essentiels à la production de la force motrice qui est

indispensable pour la production d'ATP par la chaîne respiratoire (Smith et al., 2012 ; Wisnovsky et al., 2016 ; Figure 11).

Bien que les centaines de protéines qui constituent les mitochondries soient en partie codées par le génome nucléaire, ces organites contiennent également une petite quantité d'ADN endogène. C'est un génome circulaire présent dans la matrice mitochondriale (Kazak et al., 2012). Chez certains bivalves, l'ADN mitochondrial (ADNmt) peut être d'origine biparentale (Capt et al., 2019) mais une étude a montré que l'ADN mitochondrial hérité chez *D. polymorpha* était uni parental maternel (Soroka et al., 2018). Cet ADN code pour de nombreuses sous-unités protéiques ayant des rôles clés dans les fonctions mitochondriales.

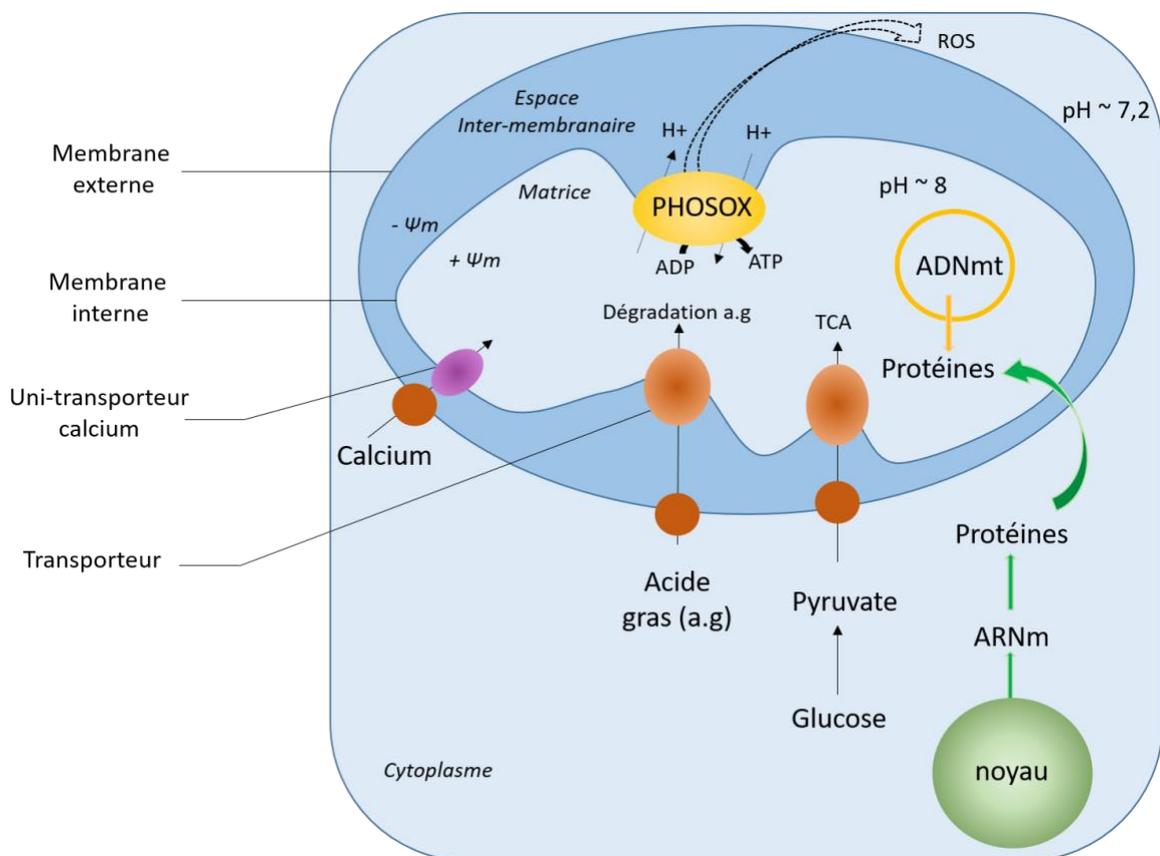


Figure 11. Schéma de la mitochondrie et de ses fonctions. ADNmt : ADN mitochondrial, PHOSOX : phosphorylation oxydative, ROS : espèces réactives de l'oxygène, TCA : cycle tricarboxylique, Ψ_m : potentiel de membrane. D'après Smith et al. (2012).

2.2. Fonctions mitochondriales

La mitochondrie assure un grand nombre de fonctions au sein des cellules. Dans ce manuscrit, seront abordées uniquement les fonctions ciblées dans la suite de ce travail. Le cycle tricarboxylique (tricarboxylic acid cycle, TCA) ou cycle de Krebs est détaillé ainsi que la phosphorylation oxydative, machinerie responsable de la production de l'énergie cellulaire

sous forme d'ATP. La mitochondrie ayant également un rôle clé dans la mort cellulaire programmée par la voie canonique, cette dernière est également présentée ici.

2.2.1. Cycle de Krebs

Le cycle tricarboxylique ou cycle de Krebs se déroule dans la matrice mitochondriale et aboutit à l'oxydation complète du pyruvate (Stobbe et al., 2012). La majorité de l'acétyl-CoA (ACoA) entrant dans le cycle de Krebs est issue de la décarboxylation oxydative du pyruvate par le complexe pyruvate déshydrogénase. Plusieurs molécules sont produites au cours du cycle : de l'ATP, du NADH et du FADH₂. Cette production de NADH et de FADH₂ est nécessaire au fonctionnement de la chaîne respiratoire. La première réaction du cycle de Krebs est la condensation de l'ACoA avec l'oxaloacétate pour former le citrate grâce à la citrate synthase. Cette enzyme joue un rôle clé dans la voie métabolique aérobie. Elle est codée par l'ADN nucléaire mais est ensuite transportée dans la matrice mitochondriale. La citrate synthase est utilisée en tant que marqueur de la densité mitochondriale ainsi que comme « proxy » du métabolisme aérobie (Eigentler et al., 2012). Bien que le rôle principal de la citrate synthase soit bien connu à ce jour dans le domaine de la santé humaine, il a été montré que cette enzyme avait un « effet moonlight » traduisant des rôles secondaires de cette dernière dans d'autres réactions (Castello et al., 2015).

2.2.2. Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative correspond à l'ensemble des réactions membranaires par lesquelles l'oxydation de coenzymes et métabolites aboutissent à la production d'ATP en présence d'oxygène (Guérin, 2004). Les électrons sont libérés lors de ces réactions d'oxydations tout au long du système de transport d'électrons (ETS) jusqu'à un accepteur final qui est l'oxygène moléculaire. Ce transfert d'électrons est couplé à l'extrusion de protons vers l'espace inter-membranaire générant le gradient de protons ainsi que la différence de potentiel membranaire. Une force motrice est générée, nécessaire à la production d'ATP (Duchen, 2004 ; Rizzuto et al., 2012 ; Sena et Chandel, 2012 ; Tait et Green, 2010). La phosphorylation oxydative est associée aux 5 complexes de la chaîne respiratoire (Figure 12).

- *Le complexe I ou NADH-coenzyme Q*

Le complexe I du système de transport d'électrons transporte les électrons du NADH issu du cycle de l'acide tricarboxylique à l'ubiquinone (coenzyme Q), tout en transférant quatre protons dans l'espace inter-membranaire.

- *Le complexe II ou succinate déshydrogénase*

La succinate déshydrogénase (SDH) ou complexe II est la plus petite unité de la chaîne respiratoire mitochondriale, elle relie le TCA et la chaîne respiratoire (Cecchini, 2003). La SDH fournit le FADH₂ nécessaire à la chaîne respiratoire au niveau du complexe II. Cette enzyme est liée à la membrane interne de la mitochondrie et fait partie intégrante de la chaîne respiratoire (Smith et al., 2012). La SDH est le seul complexe de la chaîne respiratoire qui est entièrement codé par de l'ADN nucléaire. De plus, la SDH ne pompe jamais de proton à travers la membrane interne de la mitochondrie lors de la phosphorylation oxydative (Jodeiri Farshbaf and Kiani-Esfahani, 2017).

- *Le complexe III ou coenzyme Q-cytochrome c réductase*

La coenzyme Q-cytochrome c réductase, ou complexe III de la chaîne respiratoire, catalyse le transfert des électrons de l'ubiquinol au cytochrome c. Il est composé de plusieurs sous-unités, notamment le cytochrome b (Cyt b) qui est codé par l'ADN mitochondrial.

- *Le complexe IV ou cytochrome c oxydase (COX)*

Le complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale transfère les électrons du cytochrome c réduit à l'oxygène moléculaire et contribue à la production d'un gradient de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie conduisant à la synthèse d'ATP. La COX est une enzyme importante qui maintient le gradient de protons à travers l'espace inter-membranaire des mitochondries (Hu et al., 2018).

- *Le complexe V ou ATP synthase*

L'ATP synthase utilise la force motrice du gradient de protons afin de produire l'ATP à partir de l'ADP. Elle constitue la dernière étape de la phosphorylation oxydative. On peut diviser ce complexe en trois parties : la partie catalytique (F1) se situant dans la matrice mitochondriale, la partie membranaire constituant le canal (F0), ainsi que les deux bras connecteurs, le périphérique et le central (Arnold, 1998). La réaction peut également être réversible et produire de l'ADP à partir de l'ATP (Guérin, 2004).

En plus de ces 5 complexes, l'alternative oxydase est une protéine située au niveau de la membrane interne des mitochondries. Sa fonction entre dans le mécanisme de transport d'électrons avec notamment l'oxydation de l'ubiquinol et la réduction d'oxygène en eau. Elle est à la fois un élément de la chaîne respiratoire et un terminal supplémentaire pour la sortie des électrons. Le flux d'électrons passant par l'AOX n'est pas couplé à une translocation de protons, ce qui représente une dépense d'énergie plus importante pour le transport d'électrons. En effet le passage par l'AOX permet de contourner les deux derniers sites de translocation de protons (les complexes III et IV) associés à la voie du cytochrome. Sa présence a déjà été démontrée chez les plantes et les animaux (Mc Donald and Vanlerberghe, 2004) et elle est

également répandue chez les champignons (Vanlerberghe and McIntosh, 1997) et les protistes (van Hellemond et al., 1988 ; Suzuki et al., 2004). L'AOX est un moyen d'intégrer les processus couplés au métabolisme du carbone et le transport d'électrons afin de maintenir la balance redox ainsi que l'homéostasie au sein de la mitochondrie (Mc Donald and Vanlerberghe, 2004 ; Vanlerberghe and Ordog, 2002).

En plus de moduler la production de ROS, l'AOX peut être un moyen de maintenir la respiration si jamais la voie du cytochrome est altérée. Cette voie comprend les deux complexes III et IV par lesquels les électrons sont transférés par la COX. Lorsqu'une altération apparaît, l'AOX permettrait de contourner ces deux complexes. Cette hypothèse est appuyée par des études dans lesquelles la voie du cytochrome a été inhibée de manière chimique ou génétique et a abouti à une induction de l'expression du gène de l'AOX chez les plantes, les champignons et les protistes (Dufour et al., 2000 ; Funes et al., 2004 ; Vanlerberghe and McIntosh, 1997 ; van Hellemond et al., 1988). La résistance de l'AOX au cyanure a déjà été démontrée chez plusieurs invertébrés, en particulier chez les vers marins tels que *Arenicola marina* (Völkel and Grieshaber, 1997), *Sipunculus nudus* (Buchner et al., 2001) ainsi que chez le bivalve *Arctica islandica* (Tschischka et al., 2001), la moule *Geukensia demissa* (Parrino et al., 2000) et l'huitre *Crassostrea gigas* (Sussarellu et al., 2013). Chez *Dreissena polymorpha*, des séquences partielles du gène codant l'alternative oxydase sont disponibles dans des banques de transcrits récemment construites dans des projets de recherche impliquant l'unité SEBIO.

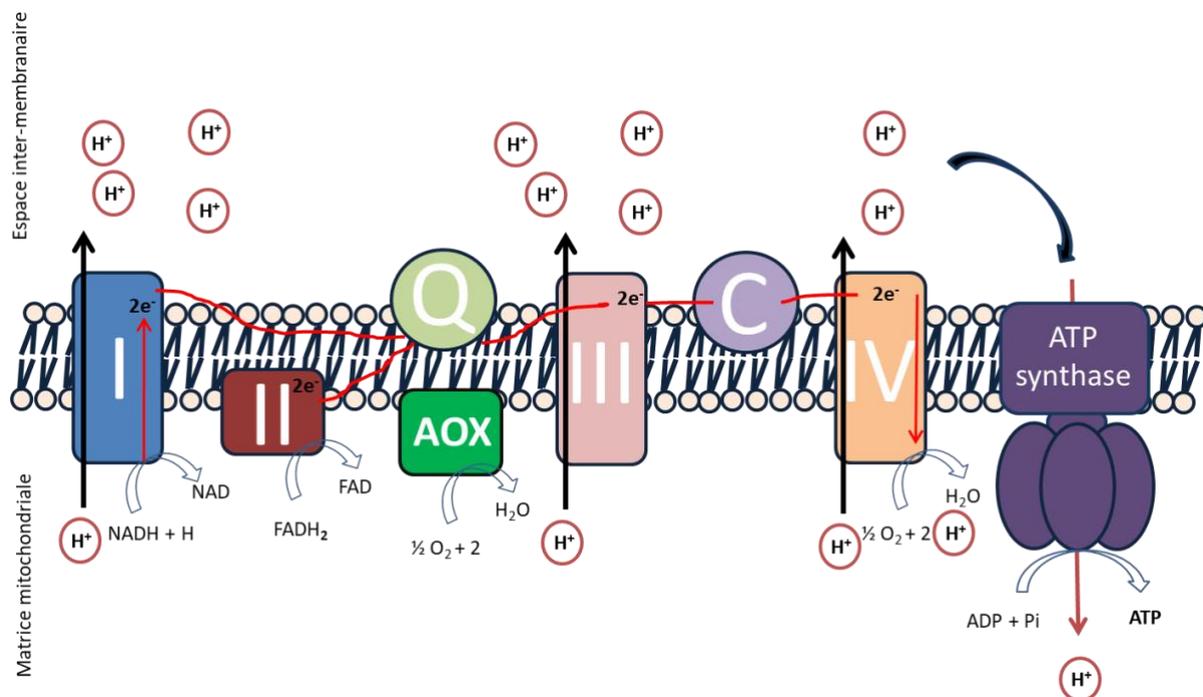


Figure 12. Schéma de la phosphorylation oxydative associée aux différents complexes de la chaîne respiratoire, de l'alternative oxydase, du coenzyme q (Q) et cytochrome c (C) se déroulant au niveau de la membrane interne de la mitochondrie.

2.2.3. Rôle dans la mort cellulaire programmée : voie canonique

La mitochondrie joue un rôle clé dans le déclenchement de l'apoptose (Smith et al., 2012). L'apoptose est un processus actif, coordonné et dépendant de l'énergie, alors que la nécrose est généralement le résultat d'une défaillance métabolique menant à l'effondrement énergétique, à la dégradation des gradients ioniques, au gonflement des cellules et à la désorganisation structurale (Osellame et al., 2012). La mort cellulaire programmée ou apoptose peut se produire via deux voies de signalisation : la voie extrinsèque ou non canonique, qui implique des récepteurs de surface cellulaire aboutissant à l'activation de la caspase 8, et la voie intrinsèque ou canonique, qui nécessite une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Li et al., 2000).

Dans la voie canonique, les protéines impliquées dans l'apoptose résident dans l'espace inter-membranaire et, en réponse aux différents signaux de l'apoptose, sont libérées dans le cytosol. Elles favorisent la mort cellulaire en activant les caspases et/ou en inactivant les inhibiteurs cytosoliques de ce processus. La voie canonique est un équilibre délicat entre les mitochondries et les divers facteurs cytosoliques qui régissent l'intégrité cellulaire (Osellame et al., 2012). Le cytochrome c est la protéine impliquée dans l'apoptose par voie canonique lorsqu'il est découplé de la chaîne respiratoire suite à la perméabilisation de la

membrane mitochondriale. Après son rejet, le cytochrome c va se lier au facteur Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor) qui entre dans la composition de l'apoptosome. L'apoptosome est un complexe de plusieurs protéines impliquées dans la voie apoptotique. La liaison de l'ATP au complexe Apaf-1 / cytochrome c entraîne l'oligomérisation et la formation des apoptosomes. Lorsque ces derniers sont formés, la pro-caspase 9 est mobilisée afin d'activer l'apoptosome. La caspase-9 est la seule capable de cliver et d'activer par la suite la caspase-3 qui va déclencher la mort cellulaire (Figure 13 ; Green et al., 2008).

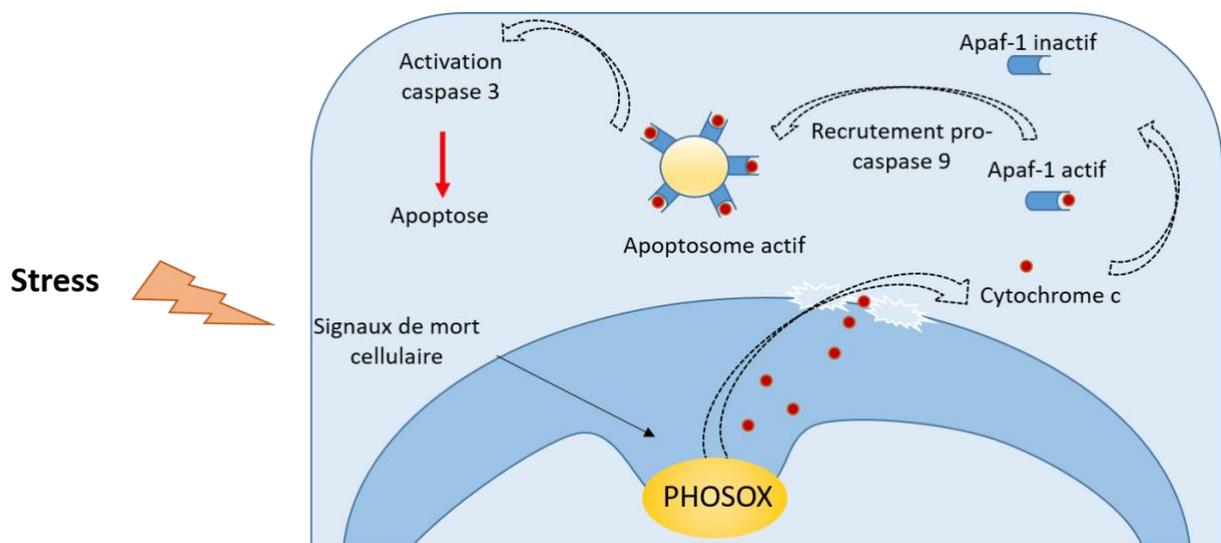


Figure 13. Déclenchement de la mort cellulaire programmée par la voie canonique. Différents stress vont activer des signaux de mort cellulaire. Le cytochrome c est découplé de la chaîne respiratoire et sort dans le cytosol où il se lie au facteur de composition de l'apoptosome (Apaf-1). L'apoptosome devient actif après liaison à la pro-caspase 9. La caspase 3 est activée pour déclencher l'apoptose. D'après Osellame et al. (2012).

2.3. Bilan de la production d'énergie en milieu aérobie

Le cycle de Krebs et la PHOSOX aboutissent à la production de 38 molécules d'ATP à partir de la dégradation complète d'une molécule de glucose. L'activité de ces deux processus dépend de plusieurs facteurs, tout d'abord la demande cellulaire en énergie, mais aussi la concentration en substrats présents dans la cellule et la présence d'oxygène. Ce dernier paramètre est essentiel au fonctionnement de la PHOSOX. Lorsqu'il est limitant pour la production d'ATP via la chaîne respiratoire, l'énergie peut être produite par une voie alternative en milieu anaérobie.

3. Production de l'ATP en milieu anaérobie

Le métabolisme anaérobie intervient lorsque la concentration en oxygène devient critique. Chez les bivalves, elle peut être le résultat d'une hypoxie ou d'un stress engendrant une forte demande en ATP (Sokolova and Pörtner, 2001). La quantité d'énergie produite en condition anaérobie est bien moindre qu'en présence d'oxygène puisque seulement 2 molécules d'ATP sont produites lors de la glycolyse (voir section 1.2). En réponse à un stress hypoxique, l'organisme va activer la glycolyse afin d'augmenter la présence de substrat pour la lactate déshydrogénase. Cette glycolyse intensive est notamment régulée par l'enzyme PFK-1 (phosphofructokinase) qui, en présence d'une forte concentration en ADP va lancer la cascade de réactions. En conditions hypoxiques, la mise en place rapide d'une glycolyse excessive n'est pas la seule réponse face au stress. L'expression de certains gènes, comme ceux codants pour le facteur HIF-1 (hypoxia inducible factor), est augmentée afin de mettre en place une capacité glycolytique globale de l'organisme pour compenser un manque d'énergie prolongé (Storey, 2004).

Lorsque les conditions hypoxiques ou anoxiques sont prolongées dans le temps, les organismes peuvent mettre en place des mécanismes d'acclimatation voire d'adaptation à ces conditions. Le métabolisme anaérobie des espèces diffère selon leurs conditions de vie. En effet, il a été montré que des espèces différentes de gastéropodes (*Littorina sp.*) présentaient un métabolisme anaérobie plus ou moins actif en fonction de leur milieu de vie (Sokolova et Pörtner, 2001). L'anaérobiose chez les mollusques conduit dans les tissus à d'importantes réserves de glycogène et d'acides aminés fermentescibles, et à la modification du catabolisme des sources énergétiques afin d'augmenter le rendement en ATP. Les espèces tolérantes aux conditions hypo/anoxiques présentent une capacité élevée de réponse face à la diminution d'ATP intracellulaire à travers une diminution drastique de la dépense énergétique (metabolic rate depression, MRD). En cas de privation d'oxygène, les organismes peuvent diminuer le taux d'utilisation de l'ATP à moins de 10 % par rapport à l'utilisation en conditions optimales (Storey, 2004). Afin d'éviter le déficit énergétique au sein des organismes, une enzyme clé du métabolisme anaérobie, la lactate déshydrogénase, est fortement sollicitée pour le maintien de la balance énergétique (Falfushynska et al., 2014).

4. La balance énergétique

4.1. Définition

La balance énergétique renseigne sur la différence entre l'énergie produite et l'énergie dépensée. L'équilibre de cette balance est donc atteint lorsque la production d'ATP équivaut à son utilisation. Néanmoins, il est essentiel que cette balance reste positive puisque cela permet aux organismes de stocker l'énergie formée sous forme de réserves (glycogène, lipides, protéines). Le gain d'énergie est alloué à cette formation de réserves, à la croissance des organismes, ainsi qu'au processus de reproduction (Campbell and Wisniewski, 2017). Le chiffrage de la balance énergétique est basé sur un ratio de concentrations de trois nucléotides énergétiques : ATP, ADP (Adénosine Di-Phosphate) et AMP (Adénosine Mono-Phosphate). Ce ratio, appelé charge énergétique en adénylates (CEA) est calculé selon la formule suivante (Atkinson, 1968) :

$$CEA = \frac{[ATP] + 0,5 \times [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

La charge énergétique en adénylates est souvent utilisée comme indicateur de l'énergie disponible au sein d'un organisme. Elle est comprise entre 0 ([AMP] >> [ATP]) et 1 ([ATP] >> [AMP]). Lorsqu'un organisme est considéré comme étant dans des conditions optimales, un équilibre s'établit au sein des cellules entre une dégradation et une régénération de l'ATP. Lorsque la valeur de la CEA se situe aux alentours de 0,8, la survie, la croissance et la reproduction de l'organisme sont assurées. En cas de perturbations ponctuelles, la CEA diminue et peut-être comprise entre 0,5 et 0,8. Dans ce cas, l'allocation énergétique à la croissance et la reproduction diminue jusqu'à être totalement orientée vers la maintenance basale cellulaire de l'organisme. Lorsque la valeur passe en dessous de 0,5 il est considéré que l'organisme subit des perturbations sévères mettant ainsi sa survie en question (Le Gal et al., 1997). Néanmoins la corrélation entre la CEA et l'intensité des perturbations subies n'est pas toujours observée. En effet lorsque les capacités de l'organisme sont dépassées, les valeurs de CEA sont très dispersées et de la mortalité peut être observée (Le Gal et al., 1997 ; Mayer et al., 2002).

Dans une cellule saine, la concentration en ATP est supérieure à celle en ADP qui est, elle, largement plus élevée que la concentration en AMP. L'adénylate kinase, qui catalyse la réaction de conversion réversible d'ADP en ATP, est très proche de l'équilibre en conditions

in vivo. Il y a peu de variations entre les quantités en ADP et en ATP cellulaires. Néanmoins, chaque petit changement du ratio ATP:ADP va entraîner une grande variation de la concentration en AMP. Chez un insecte en vol, une perte d'ATP de 10% aboutit à une augmentation de 250% de la concentration en AMP (Storey, 2004). La charge en adénylates joue un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme énergétique. L'ATP, l'ADP et l'AMP représentent, en effet, des effecteurs allostériques puissants de nombreuses enzymes clés du métabolisme énergétique (Storey, 2004 ; Figure 14).

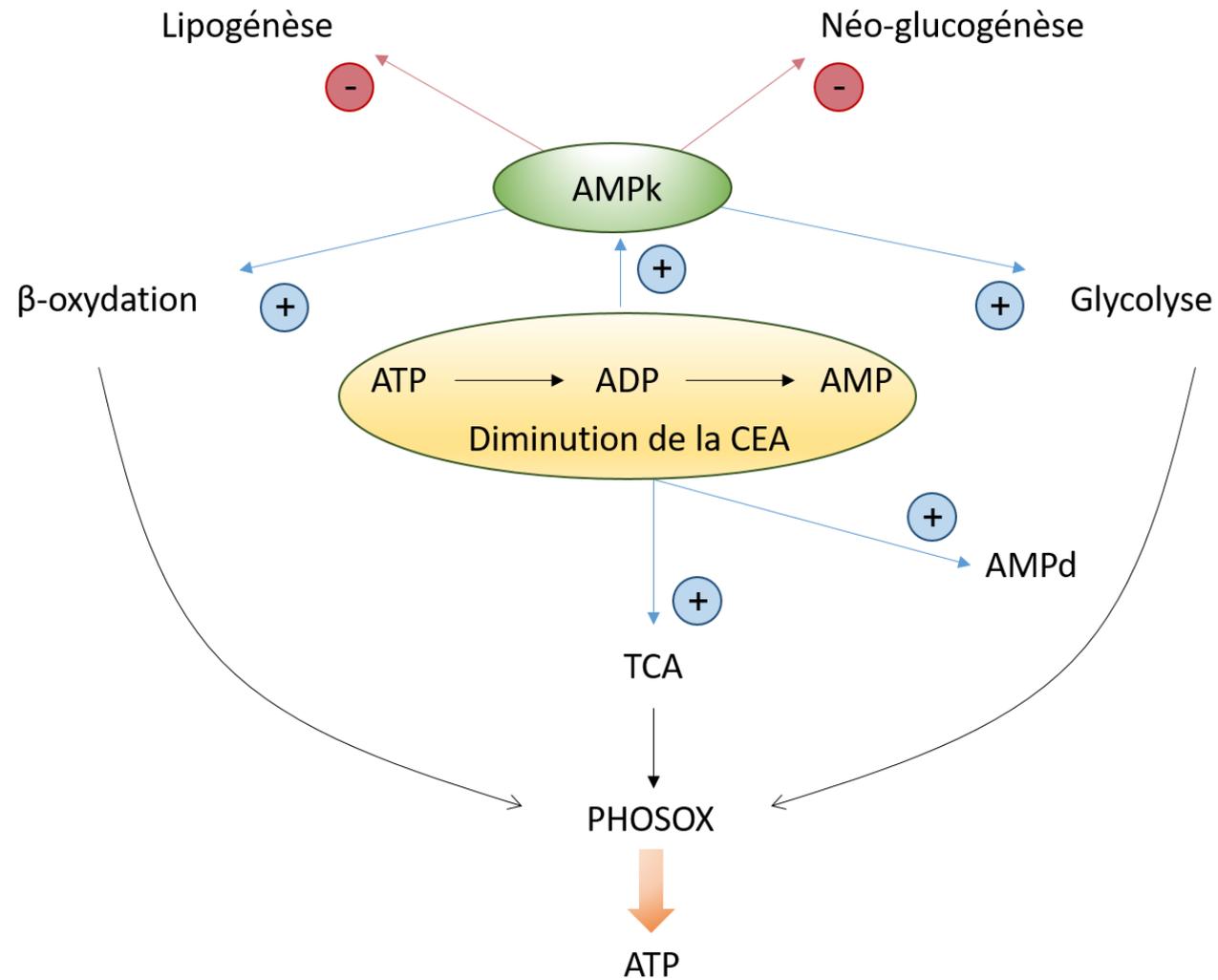


Figure 14. Schéma synthétique de la régulation du métabolisme énergétique.

4.2. Régulation du métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique est soumis à une régulation fine mettant en jeu un large éventail d'enzymes et de co-facteurs. Les premiers effecteurs sont les nucléotides adényliques qui vont être responsables de la régulation d'enzymes clés du métabolisme énergétique. En amont de ces réactions, l'AMPk (5'-AMP-activated protein kinase) et l'AMPd (AMP désaminase) sont des enzymes qui elles, régulent la concentration en nucléotides adényliques (figure 14).

4.2.1. Régulation par les nucléotides adényliques

Les nucléotides adényliques, ATP, ADP et AMP, sont des facteurs clés de la régulation du métabolisme énergétique (Atkinson, 1968). Les ratios ATP:ADP et ATP : AMP contrôlent le flux de réaction de manière allostérique. Lorsque ces ratios diminuent, les voies glycolytiques vont être activées à travers plusieurs enzymes comme la phosphofructokinase qui est activée par l'ADP et présente une forte affinité avec l'AMP. La néoglucogénèse va être dans ce cas inhibée au niveau de l'enzyme phosphoglycérate kinase qui utilise de l'ATP pour sa réaction (Pradet and Raymond, 1983). Le ratio ATP:ADP régule également certaines enzymes du cycle de Krebs notamment l'isocitrate déshydrogénase qui est activée par l'ADP et inhibée par l'ATP pour l'oxydation du substrat.

L'AMP joue également un rôle prépondérant dans la régulation de nombreuses enzymes du métabolisme énergétique. Lors d'une augmentation de sa concentration cellulaire, l'AMP active des enzymes clés de la production de l'ATP (Storey, 2004). L'AMP est notamment responsable de l'activation de kinases AMP dépendantes comme l'AMPk.

4.2.2. Rôles de l'AMPk et de l'AMPd

L'AMP kinase est souvent comparée à une jauge de carburant métabolique (Winder and Hardie, 1999) et joue un rôle crucial dans le métabolisme énergétique avec le maintien de la balance énergétique (Hardie et al., 2006). L'activation de l'AMPk par l'AMP comprend une cascade de protéines kinases qui a été hautement conservée tout au long de l'évolution. Une fois phosphorylée par l'AMPkk, l'AMPk phosphoryle à son tour les enzymes conduisant à l'activation des voies cataboliques pour augmenter la synthèse de l'ATP, et l'inhibition des voies anaboliques pour limiter sa consommation (Hardie et al., 2006 ; Hardie and Sakamoto, 2006 ; Jost et al., 2014). Par exemple, la phosphorylation de l'AMPk par l'AMPkk (5'-AMP-activated protein kinase kinase) décroît l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase, ce qui active la β -oxydation dans les mitochondries augmentant ainsi la production d'ATP. Lors d'une

diminution du ratio ATP:ADP, l'AMPk va activer la glycolyse par le biais du facteur mTOR. L'AMPk régule donc la consommation d'ATP à travers la régulation de divers processus comme la synthèse de glycogène, de cholestérol ou encore d'acides gras (Friedrich and Balschi, 2001).

Lors d'une diminution de la CEA, l'AMP désaminase (AMPd) est activée. L'AMPd catalyse l'hydrolyse irréversible de l'AMP en IMP et en ammoniac. Elle est commune dans les tissus des invertébrés. Elle est impliquée dans de nombreux processus biologiques comme la conversion de l'adénine en hypoxanthine ou guanine, le maintien de la balance énergétique, le métabolisme des acides aminés dérivés de l'azote et les réactions du cycle des nucléotides puriques (Dieni et al., 2008). Les nombreux régulateurs physiologiques de cette enzyme incluent les nucléotides, le phosphate inorganique, le phosphate de sucres, les phospholipides. Un fort taux en AMP dans les cellules peut être toxique, l'AMPd apparait donc comme une enzyme clé dans le métabolisme énergétique. La conversion de l'AMP en IMP, et donc une accumulation d'IMP intracellulaire peut traduire un stress subit par les organismes (Lushchak et al., 2008 ; Składanowska et al., 2005).

D'autres effecteurs entrent en jeu dans la régulation du métabolisme énergétique comme les cations Ca^{2+} et Mg^{2+} . En effet, le calcium et le magnésium participe au maintien de l'homéostasie au sein des mitochondries ainsi qu'au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire (Pilchova et al., 2017 ; Rossi et al., 2019).

5. Effets des paramètres physico-chimiques naturels et anthropiques sur le métabolisme énergétique

Lorsque les organismes sont soumis à un/des stress, l'énergie disponible allouée aux différentes fonctions vitales est en partie réquisitionnée pour augmenter l'apport énergétique basal pour le fonctionnement cellulaire (Figure 15A). Cet accroissement de la dépense énergétique est connu sous le nom de syndrome d'adaptation général (Le Gal et al., 1997 ; Selye, 1976). La quantité d'énergie disponible (ATP) est affectée en fonction de l'intensité du stress subit par les organismes. Selon le type et l'intensité du stress, l'organisme peut passer de l'état *optimum* à l'état *pejus* puis *pessimum* traduisant une demande d'énergie supérieure à la quantité disponible dans les cellules (Figure 15B). Cette diminution de la disponibilité en ATP peut être associée à des dommages structuraux et fonctionnels de la mitochondrie, ainsi qu'au niveau de tous les processus liés au bon fonctionnement de la PHOSOX (Sokolova et al., 2012).

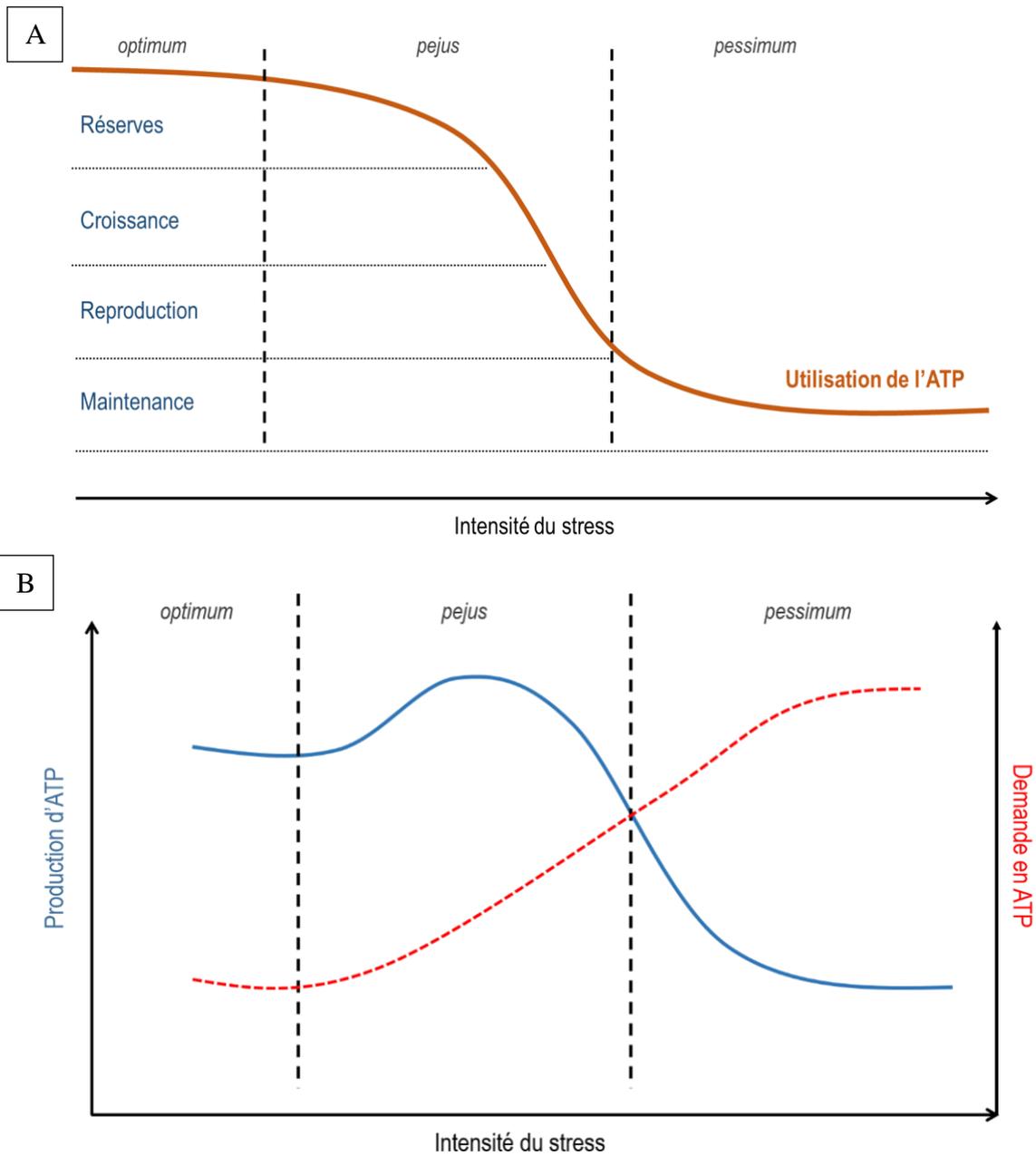


Figure 15. A. Utilisation de l'ATP par les grandes fonctions vitales en fonction de l'intensité du stress subi par les organismes. B. Balance entre la production et la demande d'ATP en fonction de l'intensité du stress. Les états *optimum*, *pejus* et *pessimum* sont représentés sur les deux illustrations. D'après Sokolova et al. (2012).

5.1. Effets des stress associés aux paramètres environnementaux naturels

5.1.1. Effets du stress thermique

Les organismes ectothermes, comme les bivalves, sont sensibles aux variations thermiques, menant directement à un changement des niveaux de base des processus physiologiques et biochimiques (Hochaka and Somero, 2002 ; Sokolova, 2004a). Le stockage de réserves énergétiques est une caractéristique commune des animaux qui utilisent ce stock pour sauvegarder des excès d'énergie assimilée et y puiser les ressources nécessaires lors de variations de disponibilité ou de demande en énergie. La réduction ou l'arrêt de stockage de réserves énergétiques peut être considéré comme un indicateur de la transition de l'*optimum* vers le *pejus* (état médiocre) et l'épuisement des réserves énergétiques peut être le signe d'une instabilité et de conditions de « *pessimum* » (état sub-létal). L'épuisement des réserves de glycogène et de lipides en réponses à des stress environnementaux comme une hausse de la température a été observé chez les animaux aquatiques (Allen and Downing 1986 ; Encomio and Chu 2000 ; Smolders et al. 2004 ; Li et al. 2007 ; Ivanina et al. 2011 ; Dickinson et al. 2012). Les réserves sont puisées dans le but de maintenir la balance énergétique à travers la CEA. Les indices du statut énergétique cellulaire (CEA, ratios de nucléotides) ont été proposés en tant que biomarqueurs du stress chez une variété d'organismes (Isani et al. 1997 ; Thebault et al. 2000 ; Hardie and Hawley 2001). Le statut énergétique cellulaire est fortement soumis aux variations mais son utilisation en biosurveillance reste encore débattue car les fortes variations des réponses ne sont visibles que lors d'un stress sévère (Sokolova et al. 2000, 2005 ; Melzner et al. 2006 ; Morley et al. 2009 ; Ivanina et al. 2010, 2011 ; Dickinson et al. 2012). Néanmoins, les protéines kinases, et notamment l'AMPk, ont été mises en avant par plusieurs études pour leur implication dans l'énergie cellulaire et la signalisation du stress. Des études réalisées sur des crustacés marins ont montré que l'activité de l'AMP kinase est un marqueur précoce du stress thermique (Frederich et al., 2009 ; Jost et al., 2012). Plus spécifiquement, on peut observer une augmentation de l'activité AMPk avant d'autres indicateurs du stress thermique (Heat Shock Proteins, accumulation de lactate) et le pic d'activité est observé lors d'expositions à des températures sub-létales. Chez les crustacés, une augmentation de l'activité AMPk traduit la transition entre l'état *optimum* et *pejus* de l'animal (Frederich et al., 2009).

L'augmentation de la température engendre une augmentation de la respiration chez les bivalves (Sokolova and Pörtner, 2003). La demande d'énergie élevée durant un stress thermique a souvent pour conséquence une réallocation énergétique vers la maintenance cellulaire au détriment de la croissance et de la reproduction (Kooijman, 2010). Les mitochondries sont directement impactées par les variations thermiques. L'accroissement de la température provoque non seulement une augmentation de la respiration mais également une fuite de protons plus importante et une dissociation progressive des mitochondries (Pörtner, 2001). Ces dommages mitochondriaux sont en partie dus aux altérations des membranes et principalement au niveau des membranes internes des mitochondries. En effet, la température peut affecter la composition en phospholipides membranaires aboutissant à une augmentation de la fluidité des membranes et une fuite des protons (Chung et al., 2018 ; Dudognon et al., 2014). L'activité du cycle tricarboxylique ainsi que celle de la PHOSOX augmentent avec la température (Sokolova, 2018). Les organismes intertidaux incluant les invertébrés et les poissons possèdent de fortes tolérance et plasticité du métabolisme mitochondrial lors d'une acclimatation thermique (Dahlhoff and Somero 1993 ; Cherkasov et al. 2010; Hilton et al. 2010). Les mitochondries du poisson *Bellapiscis medius* sont capables de maintenir un fort flux PHOSOX ainsi qu'une forte activité du système de transport des électrons lors de fortes températures (30°C) comparé à deux espèces sympatriques subtidales (*Forsterygion varium* and *F. malcolmi* ; Hilton et al. 2010). Le seuil de tolérance de température pour la PHOSOX ou l'activité ETS est plus élevée chez les organismes intertidaux (38-44°C) par rapport aux organismes subtidaux (32-35°C). Chez le crabe *Scylla serrata*, la température maximale est d'environ 37°C et ses mitochondries peuvent maintenir la régénération d'ATP entre 25 et 37°C (Paital and Chainy, 2014). Une diminution drastique de l'activité de la PHOSOX a été observée à partir de 40°C chez le crabe. Généralement, le stress thermique réduit l'efficacité du couplage mitochondrial et augmente la production de ROS comme cela a été montré chez les bivalves *Crassostrea virginica* et *Mya arenaria* (Abele et al. 2002 ; Sokolova 2004 ; Cherkasov et al. 2006, 2007, 2010). L'efficacité du couplage mitochondrial correspond à la capacité de production d'ATP en fonction de la consommation d'oxygène (Brijs et al., 2017). La diminution de cette efficacité en présence de fortes températures est principalement liée à une fuite de protons importante (Sokolova et al., 2012). Les variations de densité mitochondriale sont impliquées dans les réponses adaptatives à la température chez les ectothermes aquatiques. L'acclimatation ou l'adaptation aux températures froides entraîne une augmentation compensatoire de la densité mitochondriale (Sommer and Pörtner, 2002 ; Cherkasov et al. 2010). L'acclimatation saisonnière entraîne

également une augmentation du nombre de mitochondries en hiver et une diminution en été (Cherkasov et al., 2010). La prolifération de mitochondries en période hivernale peut participer à la compensation métabolique en maintenant la production d'ATP et en réduisant la distance de diffusion de l'oxygène dans les cellules (Tyler and Sidell 1984 ; Londrville and Sidell 1990). Alternativement, une diminution de la densité mitochondriale en été peut minimiser les dépenses énergétiques (Peck et al., 2002 ; Keller et al., 2004). Cette variation de densité mitochondriale peut être également associée à un remodelage de la composition de la membrane interne des mitochondries afin de limiter les fuites de protons en présence de températures élevées (Chung et al., 2018). En parallèle, l'exposition à des températures élevées influence les variations de la concentration en oxygène disponible pour l'organisme.

5.1.2. Effets du stress hypoxique

La transition vers l'anaérobiose partielle à des températures critiques chez les ectothermes est caractérisée par la quantité limitée d'oxygène disponible plutôt que par un dysfonctionnement mitochondrial en soi (Frederich et Pörtner, 2000 ; Sokolova et Pörtner, 2003 ; Eliason et al., 2011). Il a été démontré que le taux d'oxygène peut directement affecter la tolérance des organismes face aux stress via une moindre capacité aérobie et donc une moindre production d'ATP. L'hypoxie peut également indirectement affecter le métabolisme énergétique à travers une hausse de la génération de ROS conduisant à une augmentation du stress oxydatif. Paradoxalement, les principaux dommages de la mitochondrie chez les espèces sensibles surviennent lors de la réoxygénation avec la surproduction de ROS (Kalogeris et al., 2014 ; Korge et al., 2015). La production incontrôlée de ROS peut conduire à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la fuite du cytochrome c dans le cytosol induisant ainsi la cascade apoptotique cellulaire (Kalogeris et al., 2014). Peu d'études sont disponibles sur l'effet de l'hypoxie sur les espèces de bivalves d'eau douce, mais nombreuses sont celles qui se sont penchées sur des espèces fortement soumises aux variations d'oxygène vivant dans les milieux intertidaux. La plupart des organismes intertidaux ont développé la capacité de diminuer la consommation d'énergie par le métabolisme à travers la mise en place du MRD qui équivaut à un « arrêt métabolique » (Hochachka et al., 1996 ; Hochachka and Lutz, 2001). La diminution de l'utilisation de l'ATP pendant cet arrêt est notamment possible grâce à la déviation de l'allocation énergétique à des fonctions non vitales (croissance, reproduction) vers la maintenance basale de l'organisme (Sokolova et al., 2012). Lorsque les organismes se retrouvent en milieu anoxique, la ventilation cesse. Cet arrêt est également observé lors de l'exposition à d'autres facteurs de

stress qui déclenchent la fermeture de la coquille, tels que des salinités extrêmes, la dessiccation ou encore l'exposition aiguë à des contaminants (Hulbert et Else, 2005). La membrane plasmique cellulaire est une grande consommatrice d'ATP représentant 25 à 30% de l'utilisation de l'ATP pour le maintien du gradient ionique (Na^+ et K^+) à travers la membrane cellulaire. Contrairement à la membrane cellulaire, la perméabilité de la membrane mitochondriale reste inchangée durant un « arrêt métabolique » mais le potentiel membranaire diminue, réduisant le renouvellement de l'ATP et la fuite de protons (Hochachka et al., 1996; St-Pierre et al., 2000).

Les effets de l'hypoxie sur les organismes intertidaux sont spécifiques à chaque espèce et dépendent de son intensité. Chez *Crassostrea virginica*, une hypoxie extrême (0,5% d'oxygène dissous) entraîne une forte diminution de la capacité du système de transport d'électrons mais n'affecte pas le ratio de protons, conduisant à une diminution significative du couplage mitochondrial (Ivanina et al., 2012). Chez l'huitre *C. gigas*, une hypoxie modérée (20% d'oxygène dissous) provoque une diminution de la phosphorylation oxydative (Sussarellu et al., 2013) tandis que chez des espèces extrêmement tolérantes à l'hypoxie, 18h d'une quasi anoxie conduisent à une augmentation de l'activité de l'ETS et une suppression du flux de la PHOSOX (Ivanina et al., 2016). Néanmoins, une étude récente montre que l'ensemble des processus de production de l'ATP est surexprimé chez *C. gigas* exposée 24 heures à 1% d'oxygène dissous (Sokolov et al., 2019). Chez les bivalves d'eau douce, les réponses observées après une exposition à l'hypoxie ne sont pas identiques. En effet, l'activité PHOSOX, estimée à travers les activités SDH et ETS, diminue significativement en condition hypoxique chez le bivalve *Diplodon chilensis* (Yusseppone et al., 2018). Néanmoins, cet organisme d'eau douce a développé certaines stratégies d'acclimatation voire d'adaptation puisqu'aucun stress oxydant n'a été mesuré après l'exposition à l'hypoxie chez cette espèce grâce, peut-être, à la fois à l'augmentation de l'expression du système AOX mais aussi à la diminution de la PHOSOX (Yusseppone et al., 2018). La diminution de l'activité de la PHOSOX lors de l'hypoxie chez les mollusques tolérants peut-être également un mécanisme adaptatif de l'espèce afin d'éviter le gaspillage de l'ATP (Hochachka and Lutz, 2001 ; St-Pierre et al., 2000).

Les fluctuations environnementales naturelles peuvent être amplifiées avec les perturbations d'origine anthropique comme la pollution. Lorsqu'un ou plusieurs facteurs environnementaux dévient des *optima* spécifiques, cela peut aboutir à des perturbations physiologiques et à une diminution de la fitness des organismes ainsi que de leur tolérance face aux polluants (Ivanina et al., 2008).

5.2. Effets des stress d'origine anthropique

Contrairement aux fluctuations abiotiques (température ou oxygène) qui sont des facteurs de stress naturels dans les eaux douces, des concentrations élevées de polluants comme les éléments traces métalliques et les toxines organiques sont des facteurs de stress anthropiques. L'exposition des organismes aux métaux a un effet direct au niveau de la bioénergétique cellulaire notamment en interférant avec la voie de production de l'ATP. Les métaux comme le cadmium (Cd), le cuivre, le zinc ou encore le mercure, ont des effets néfastes sur les fonctions mitochondriales et la capacité à produire de l'ATP par voie aérobie en réduisant l'efficacité mitochondriale (Stohs and Bagchi, 1995 ; Li et al., 2003 ; Sappal et al., 2014 ; Sokolova, 2004 ; Sokolova et al., 2005). En effet, le Cd est capable de prendre la place des ions calciques au niveau des pompes membranaires mitochondriales, conduisant au déclenchement de la voie apoptotique canonique suite à l'accumulation de calcium à l'intérieur des mitochondries (Saddala et al., 2017). Une étude a également montré que le Cd peut affecter le métabolisme anaérobie chez *Crassostrea virginica* (Ivanina et al., 2010). Lors d'une exposition métallique à de faibles concentrations, la diminution de la capacité aérobie est principalement due à l'augmentation du métabolisme basal. En revanche, lors d'une exposition aigüe, les dommages au niveau mitochondrial ainsi que sur les capacités aérobies sont dominants (Sokolova and Lannig, 2008). La réduction de la capacité aérobie induite par l'exposition à un métal peut restreindre la fenêtre de tolérance thermique chez les ectothermes aquatiques (Sokolova and Lannig, 2008). En effet de nombreuses études ont décrit l'effet synergique de stress thermique et métallique croisés conduisant à une diminution d'activité du cycle tricarboxylique, des complexes I, II et IV, et à une augmentation de l'activité COX (Ivanina et al., 2008). Cette augmentation a notamment été observée après une exposition de *D. polymorpha* à différents métaux avec une surexpression du gène codant pour la COX (Achard-Joris et al., 2006). En général, l'activité PHOSOX est diminuée en présence de contaminants aboutissant à la diminution du ratio ATP:ADP et donc à une diminution de la CEA (Cherkasov et al. 2010 ; Ivanina et al., 2008, 2010 ; Kurochkin et al., 2011 ; Lanning et al., 2006 ; Sokolova, 2004 ; Sokolova et al., 2004, 2005).

Les variations des paramètres physico-chimiques naturels et la présence de polluants affectent donc fortement le métabolisme énergétique, processus clé du bon fonctionnement des organismes (Figure 16).

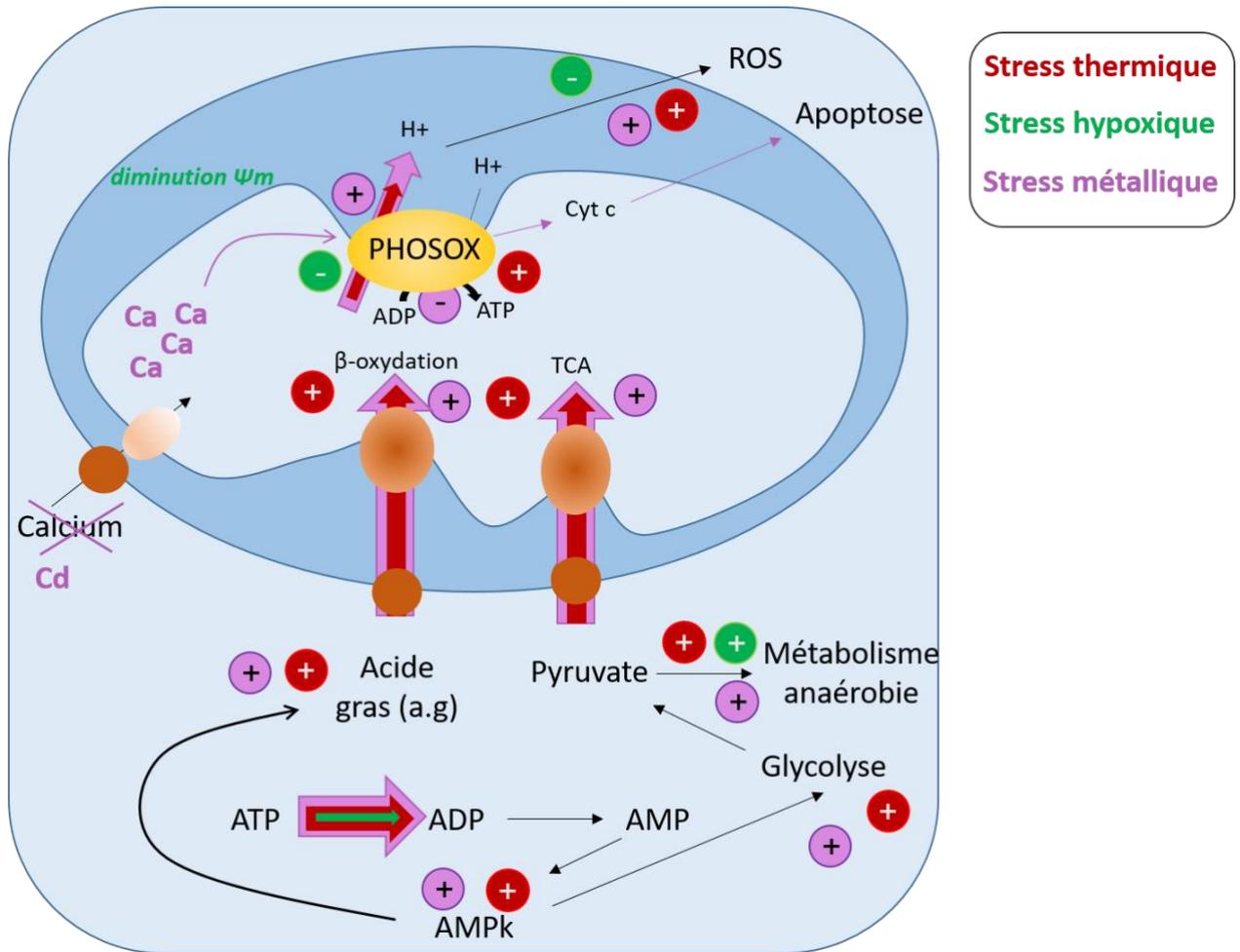


Figure 16. Schéma synthétique des effets connus de différents stress sur le métabolisme énergétique. Sont indiqués respectivement en rouge, vert et violet les effets du stress thermique, hypoxique et métallique.

III. Objectifs de la thèse

L'objectif de ce projet doctoral est de développer de nouveaux biomarqueurs du métabolisme énergétique cellulaire chez une espèce sentinelle modèle en écotoxicologie, la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Cet objectif global se divise en 3 grandes parties. Une première question a donc été posée : **quelles sont les influences des fluctuations temporelles naturelles *in situ* sur les réponses des différents marqueurs étudiés chez *D. polymorpha* ?** Pour y répondre, une population de dreissènes, dont le cycle de reproduction était connu, a été ciblée. Pour cela, plusieurs marqueurs associés à des processus clés du métabolisme énergétique ont été choisis. La régulation de la balance énergétique, la CEA ainsi que les processus aboutissant à la production de l'ATP ont été mesurés aux niveaux moléculaire et cellulaire afin de cerner au mieux la gestion du métabolisme énergétique chez *D. polymorpha*. Un suivi saisonnier a donc été entrepris dans le but de caractériser les variations naturelles de ces réponses chez cette espèce, étape clé pour le développement de potentiels biomarqueurs. En effet, l'acquisition de données le long d'un cycle de reproduction permet d'établir les niveaux de base de ces marqueurs dans le but d'affiner l'interprétation des réponses des espèces sentinelles utilisées pour l'évaluation de la toxicité des molécules d'intérêt. En découlent ensuite plusieurs questions sous-jacentes : **comment varient ces réponses lorsque les organismes sont soumis à un stress simple ou multiple en conditions contrôlées de laboratoire ? Et ces réponses au stress sont-elles influencées par le cycle de reproduction ?** Le but, ici, était de voir les variations de ces réponses en présence de stress simples ou en combinaison en fonction de deux périodes distinctes du cycle de reproduction. Ont été ciblées dans ce projet doctoral, la période de repos sexuel ainsi que la période de reproduction afin d'affiner l'interprétation des réponses des marqueurs du métabolisme énergétique en fonction de la période d'exposition. La prise en compte d'un facteur intrinsèque considéré comme confondant - le statut reproducteur - a répondu ainsi à un second critère de la mise au point de biomarqueurs. **La troisième partie consiste alors en l'intégration de l'ensemble des réponses mesurées dans ces travaux.** Dans un contexte multi-marqueurs, l'ensemble des données récoltées *in situ* et en laboratoire ont été compilées et comparées afin d'identifier de potentiels marqueurs pertinents dans une perspective de biosurveillance. L'objectif étant, à terme, de développer de nouveaux biomarqueurs métaboliques chez des espèces non cibles utilisées pour la biosurveillance des milieux aquatiques dulçaquicoles.

Chapitre 2.

Outils et méthodologie :

**Description des marqueurs ciblés et
des travaux réalisés**

I. Les travaux réalisés : suivi saisonnier et expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire

1. Suivi saisonnier des réponses du métabolisme énergétique chez *Dreissena polymorpha*

1.1. Choix du site d'échantillonnage

Les moules ont été prélevées sur le canal de la Meuse entre Commercy et Vertuzey (55) (Figure 17). La population de dreissènes ciblée a déjà fait l'objet de plusieurs études. Le cycle de reproduction ainsi que les fluctuations en réserves énergétiques ont été étudiées à travers des travaux réalisés par Frédéric Palais (2011). Des expositions en laboratoire ont également été réalisées sur cette population. Dans le cadre du projet PolQua, des organismes ont été exposés au cadmium pendant 7 jours (Louis et al., 2019).



Figure 17. Carte et photos des sites de prélèvement des organismes à Commercy et Vertuzey (Meuse) (www.maps.google.fr).

1.2. Plan d'échantillonnage et analyses

Les organismes ont été prélevés mensuellement ou bimensuellement au cours du cycle de reproduction (Figure 18). Le suivi a été effectué à partir du mois de mai 2018 jusqu'au mois de juin 2019 suivant le plan d'échantillonnage présenté dans la figure 18. Les moules zébrées ont été prélevées à la main à une hauteur d'eau de 150 cm maximum sur les cailloux ou sur des pontons. Le byssus de chaque individu a été sectionné au scalpel. Sur place, les organismes ont immédiatement été disséqués et congelés dans la carboglace. Les moules utilisées pour la détermination du stade de développement des gonades ont été transportées vivantes au laboratoire dans des bidons de 3 L remplis d'eau du milieu avec une oxygénation constante. Les paramètres physico chimiques tels que l'oxygène, la température, la conductivité et le pH ont été relevés sur le terrain et un échantillon d'eau a été rapporté au laboratoire pour la mesure des concentrations en ammonium, nitrates, nitrites, hydrocarbures, Cd et chlorophylle a, à chaque prélèvement.

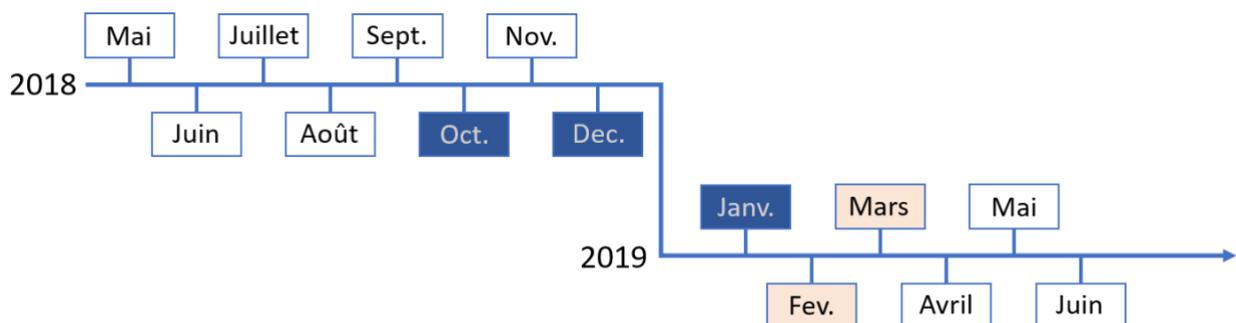


Figure 18. Calendrier d'échantillonnage des organismes pour le suivi saisonnier des marqueurs étudiés. Les boîtes pleines bleues et oranges représentent respectivement les mois non échantillonnés et ceux pour lesquels la totalité des mesures n'a pu être réalisée.

A chaque échantillonnage, 60 individus ont été prélevés correspondant à 12 réplicats pour chaque type de mesure (Tableau 3). Après leur prélèvement, les moules ont été disséquées et congelées dans de la carboglace (-80 °C) sur place afin d'éviter les modifications physiologiques associées au transport jusqu'au laboratoire. Suite aux aléas climatiques (sécheresse, gel), les échantillonnages prévus certains mois n'ont pas pu être réalisés. Ainsi, les mois d'octobre, décembre 2018, janvier, février et mars 2019 n'ont pas ou partiellement permis l'échantillonnage. Au mois de février 2019, seuls 4 individus ont été

prélevés, et utilisés pour les mesures d'expression génique. Le mois suivant (mars 2019), 16 individus au total ont été échantillonnés ; 4 pour les mesures d'expression génique, 4 pour les mesures d'activités enzymatiques, 4 pour les mesures de concentration en nucléotides et 4 pour la détermination de l'indice gonadique.

Tableau 3. Effort de prélèvement des organismes et mesures effectuées lors à chaque date de prélèvement du suivi saisonnier.

Année	2018						2019				
	mai	juin	juillet	août	septembre	novembre	février	mars	avril	mai	juin
Expression de gènes	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=4	n=4	n=12	n=12	n=12
Activités enzymatiques	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	/	n=4	n=12	n=12	n=12
Nucléotides énergétiques	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	/	n=4	n=12	n=12	n=12
Réserves énergétique	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	/	/	n=12	n=12	n=12
Indice gonadique	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	/	n=4	n=12	n=12	n=12
Phosphorylation AMPk	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Oxygraphie	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

A chaque prélèvement, un échantillon d'eau a été rapporté au laboratoire pour la mesure de la concentration en Cd dans le milieu.

2. Les expositions en laboratoire

En parallèle du suivi saisonnier, plusieurs expérimentations ont été réalisées en conditions contrôlées de laboratoire sur la même population de dreissènes. Afin d'évaluer l'effet du stade de reproduction sur les réponses du métabolisme énergétique lors d'un stress ou d'une combinaison de stress, deux expérimentations ont été réalisées.

2.1. Stress métallique et thermique

Des dreissènes ont été exposées au laboratoire à deux périodes distinctes du cycle de reproduction. Afin de cibler d'une part la période de repos sexuel (automne-hiver) des moules et d'autre part la période de formation des gonades (printemps-été) pour lesquelles un fort effort énergétique est investi, les mois de novembre (2018) et juin (2019) ont été choisis. Différents stress ont été ciblés dans le cadre de ce projet de thèse.

Une exposition à un stress métallique et un stress thermique a été réalisée dans les mêmes conditions aux deux périodes d'exposition. Le cadmium a été choisi comme

contaminant métallique. Une exposition au Cd avait été réalisée antérieurement au laboratoire avec la même population de dreissènes (Projet PolQua RT2E Rovaltain) apportant ainsi de premières données quant à l'impact de ce métal sur ces organismes. De plus, le Cd est un métal connu pour ses effets sur le métabolisme énergétique et spécifiquement sur les mitochondries chez d'autres modèles (Sokolova, 2004).

2.1.1. Prélèvement des organismes et acclimatation

Les individus ont été prélevés à la main dans le canal de la Meuse (Euville, France, E05°37'28'', N48°44'59'') en novembre 2018 et juin 2019. Les individus dont la taille était comprise entre 15 et 25 mm ont été sélectionnés et apportés au laboratoire dans de l'eau du milieu continuellement oxygénée. Les moules ont été réparties dans 4 aquariums de 4,5 L et acclimatées aux conditions du laboratoire pendant 15 jours dans des bains thermostatés à la température relevée sur le terrain (11 °C en novembre 2018 et 14 °C en juin 2019). L'eau du milieu a été progressivement remplacée par de l'eau de source (Cristaline®, source Aurèle) à raison d'un tiers par jour pendant 3 jours. Une photopériode artificielle a été mise en place mimant la photopériode naturelle de la saison, ainsi qu'une oxygénation continue. Après la période d'acclimatation, un bain thermostaté a été maintenu à la température du milieu et celle du second bain a été progressivement augmentée de 5 degrés en 3 jours. Les moules ont été nourries à raison de $15 \cdot 10^3$ cells.jour⁻¹.dreissène⁻¹.

2.1.2. Schéma expérimental

Une première exposition a été réalisée en novembre 2018 en période de repos des organismes et une seconde en juin 2019 lors de la période de reproduction. Les conditions d'expérimentation ont été identiques lors des deux périodes. Les moules ont été exposées pendant 7 jours à 10 µg.L⁻¹ de Cd ou gardées dans l'eau de source (témoin), à deux températures différentes : (i) température *in situ*, soit 11 °C en novembre 2018 ou 14 °C en juin 2019 et (ii) température *in situ* + 5 °C, soit 15 °C en novembre 2018 ou 19 °C en juin 2019 (Figure 19).

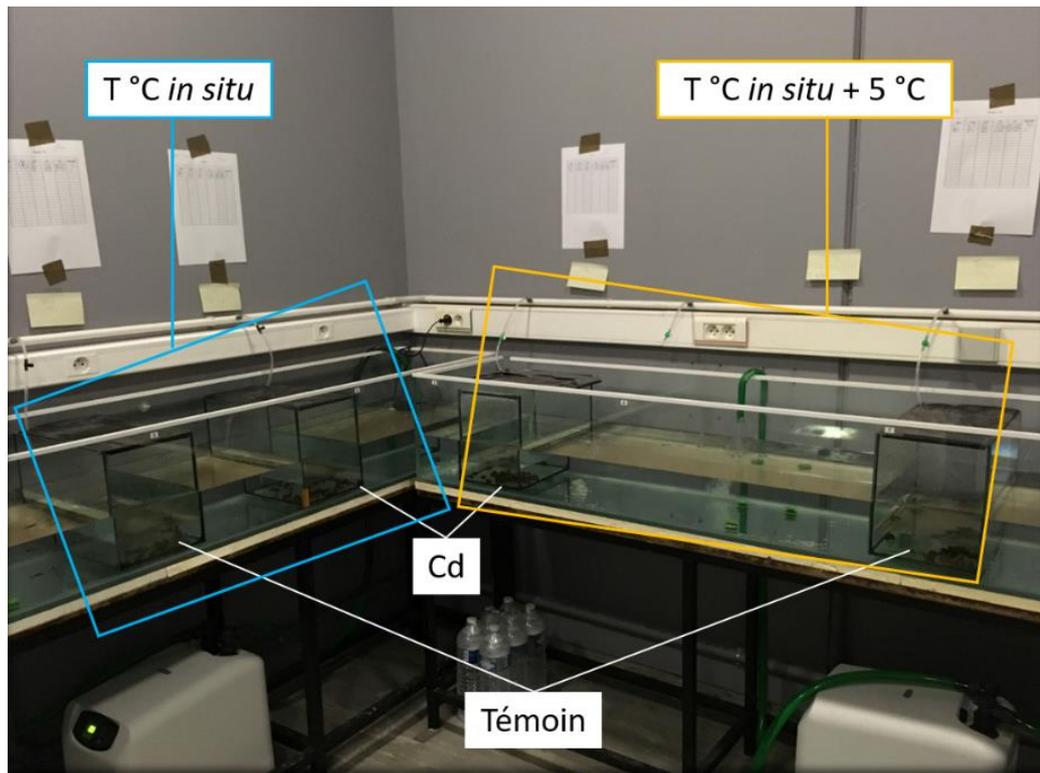


Figure 19. Photo du dispositif expérimental mis en place pour les deux expérimentations réalisées dans le cadre de l'exposition aux stress métallique et thermique.

Une solution mère de Cd a été préparée à une concentration de 10 mg.L^{-1} et acidifiée à 1 % avec du HNO_3 . L'eau des aquariums a été oxygénée tout le long de l'expérimentation. Les milieux ont été renouvelés chaque jour et des échantillons d'eau ont été prélevés et acidifiés afin de doser la concentration effective en Cd. Les organismes ont été nourris avec le même ratio que lors de l'acclimatation après chaque renouvellement des milieux.

Des moules ont été disséquées avant le lancement de l'exposition (T_0) afin de connaître un niveau de base des différents marqueurs mesurés mais aussi le stade de développement des gonades des individus ($n=10$). Un premier prélèvement a été effectué après 24 heures d'exposition et un second après 7 jours. Pour chaque mesure réalisée au laboratoire, 10 réplicats ont été analysés par condition. L'intégralité des marqueurs ciblés a été mesuré sur ces échantillons exceptée la respiration cellulaire (Tableau 4).

Tableau 4. Effort de prélèvement des organismes et mesures effectuées lors des expérimentations réalisées en novembre 2018 et en juin 2019. Les mesures réalisées uniquement en juin 2019 sont présentées en gras.

Prélèvement	Après acclimatation		24h				7j			
	<i>in situ</i>	<i>in situ</i> + 5 °C	<i>in situ</i>	<i>in situ</i> + 5 °C	<i>in situ</i>	<i>in situ</i> + 5 °C	<i>in situ</i>	<i>in situ</i> + 5 °C	<i>in situ</i>	<i>in situ</i> + 5 °C
Température	T0	T0	Témoins	Cd	Témoins	Cd	Témoins	Cd	Témoins	Cd
Condition	T0	T0	Témoins	Cd	Témoins	Cd	Témoins	Cd	Témoins	Cd
Expression de gènes	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Activités enzymatiques	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Nucléotides énergétiques	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Réserves énergétique	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Indice gonadique	n=10	n=10	/	/	/	/	/	/	/	/
Phosphorylation AMPk	/	/	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3
Oxygraphie	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

2.2. Stress hypoxique et thermique séparés

L'hypoxie et la température ont été les deux autres stress appliqués séparément mais en parallèle sur les dreissènes. Les individus ont été prélevés comme indiqué précédemment à une hauteur d'eau de maximum 150 cm. Lors d'un pic de température, les organismes peuvent donc être soumis à de fortes variations thermiques. La population de *D. polymorpha* ciblée est située dans un canal et donc soumise à un marnage pouvant atteindre quelques dizaines de centimètres. De ce fait, la concentration en oxygène disponible est soumise à de fortes variations qui, lors d'une augmentation de la température, peuvent être intensifiées.

2.2.1. Prélèvement des organismes et acclimatation

Les moules ont été prélevées à la main dans le canal de la Meuse (Sampigny, France, E5°30'35" / N48°49'31") en novembre 2019. Ce site se situe à proximité (5 km) du site où ont été prélevés les dreissènes pour le suivi saisonnier. Les individus dont la taille était comprise entre 15 et 25 mm ont été sélectionnés et apportés au laboratoire dans l'eau du site continuellement oxygénée. Les moules ont été placées dans un aquarium rempli avec 9 L d'eau apportée du site de prélèvement. Elles y ont été acclimatées pendant 15 jours dans une chambre thermostatée à la température relevée sur le terrain (10 °C). L'eau a été progressivement remplacée par de l'eau de source (Cristaline®, source Aurèle) à raison d'un tiers par jour pendant 3 jours. Une oxygénation continue a été mise en place. Les moules ont été nourries à raison de $15 \cdot 10^3$ cells.jour⁻¹.dreissène⁻¹. En parallèle, un aquarium a été placé

dans une chambre hermétique, rempli avec 4,5 L d'eau, avec un dispositif de bullage à l'azote afin de maintenir une oxygénation de 30 % dans le milieu maintenu à 10°C. Un thermoplongeur a été placé dans un second aquarium de 4,5 L afin d'augmenter la température à 25°C avec une oxygénation continue (92 % ± 4,3 en oxygène saturé). Enfin, un troisième aquarium de 4,5 L a été maintenu sous oxygénation constante (témoin) (98 % ± 2,4 en oxygène saturé) à la température initiale de 10 °C.

2.2.2. Schéma expérimental

A la fin de la période d'acclimatation, des individus ($n=10$ par type de mesure) ont été prélevés et disséqués afin de connaître le niveau de base des différents marqueurs mesurés (T0). Les autres moules ont ensuite été disposées aléatoirement dans les trois différents aquariums à raison de 80 individus par aquarium. Un premier prélèvement a été effectué après 24 heures d'exposition et un second après 7 jours. Pour chaque mesure réalisée au laboratoire, 10 réplicats ont été analysés par condition et 5 pools de 5 individus par condition ont été utilisés pour la mesure de la respiration cellulaire. A l'issue de l'expérimentation, les échantillons prélevés ont été conservés à -80 °C jusqu'à la mesure des différentes activités enzymatiques, expressions de gènes et des concentrations en nucléotides énergétiques (Tableau 5).

Une sonde multiparamétrique a été placée dans l'enceinte hermétique et des mesures continues des différents paramètres ont été réalisées dans l'aquarium maintenu en hypoxie constante. Les paramètres physico-chimiques (température, pH, conductivité et concentration en O₂) des deux autres conditions (25 °C et témoin) ont été relevés 10 fois par jour.

Tableau 5. Effort de prélèvement des organismes et mesures effectuées lors de l'expérimentation hypoxie/thermie réalisée en novembre 2019.

Prélèvement	Après acclimatation	24h			7j		
<i>Condition</i>	T0	Témoins	Hypoxie	25°C	Témoins	Hypoxie	25°C
<i>Expression de gènes</i>	$n=10$	$n=10$	$n=10$	$n=10$	$n=10$	$n=10$	$n=10$
<i>Activités enzymatiques</i>	$n=10$	$n=10$	$n=10$	$n=10$	$n=10$	$n=10$	$n=10$
<i>Nucléotides énergétiques</i>	$n=10$	$n=10$	$n=10$	$n=10$	$n=10$	$n=10$	$n=10$
<i>Réserves énergétique</i>	/	/	/	/	/	/	/
<i>Indice gonadique</i>	/	/	/	/	/	/	/
<i>Phosphorylation AMPk</i>	/	/	/	/	/	/	/
<i>Oxygraphie</i>	/	/	/	/	$n=5$	$n=5$	$n=5$

II. Les marqueurs mesurés

1. Les réserves énergétiques

Les mesures des réserves énergétiques ont été réalisées d'après la méthode de Plaistow et al. (2001). Les concentrations en protéines, lipides et glycogène ont été dosées dans les organismes entiers (Figure 20). Les différentes concentrations sont toutes présentées en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids frais. Après dissection, les tissus mous ont été placés dans un tampon phosphate (0,2 M) avec un ratio de 5:1. Une bille de 5 mm a été ajoutée à chaque échantillon avant l'homogénéisation des tissus au broyeur à billes (MM400 Retsch) durant 3 minutes à 30 Hz. L'ensemble de ces étapes a été réalisé sur glace (4 °C).

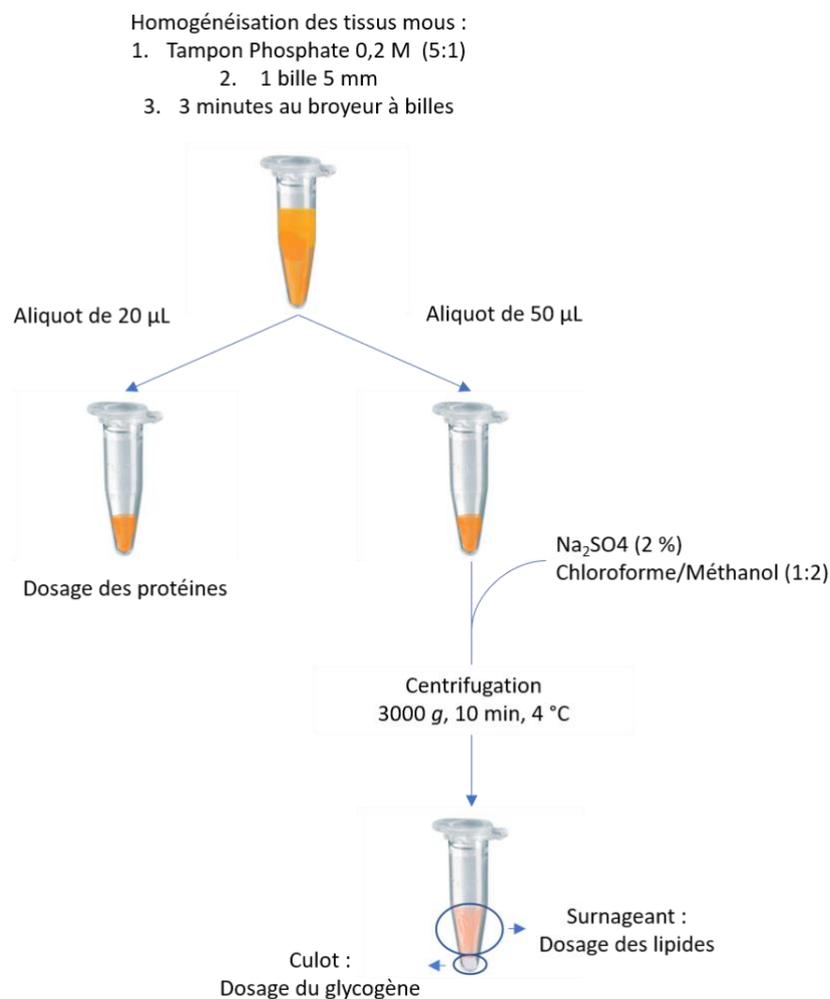


Figure 20. Schéma de l'extraction des protéines, des lipides ainsi que du glycogène chez *D. polymorpha*.

1.1. Les protéines

Les homogénats obtenus ont ensuite été dilués (entre 1/15^{ème} et 1/30^{ème} selon les échantillons) dans un tampon phosphate 0,2 M et 20 µL ont été ajoutés à 1 mL de réactif de Bradford. Après 20 minutes d'attente à l'obscurité, l'absorbance des échantillons a été mesurée à 595 nm. La concentration en protéines a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec une solution d'albumine de sérum bovin. Le reste des homogénats non dilués a été conservé à -80 °C pour le dosage des glucides et des lipides.

1.2. Extraction du glycogène et des lipides

Les glucides et les lipides ont été quantifiés d'après le protocole de Plaistow et al. (2001). Après décongélation des homogénats, du sulfate de sodium (Na₂SO₄, 2 %) a été additionné pour précipiter les sucres ainsi qu'une solution de chloroforme/méthanol (1:2, volume : volume) afin d'extraire les lipides, et les échantillons ont ensuite été placés à 4 °C pendant 30 min. Une centrifugation (3000 g, 10 min, 4 °C) a ensuite été réalisée. Le surnageant a été récupéré et placé à -80 °C pour le dosage des lipides. Après séchage du culot, contenant le glycogène, les échantillons ont été conservés à -80 °C.

1.2.1. Dosage des glucides

Le culot obtenu et séché antérieurement a été remis en suspension dans de l'eau déminéralisée (400 µL) et placé sur glace 15 minutes. Les culots resuspendus ont ensuite été broyés afin d'obtenir un homogénat à partir duquel 50 µL ont été prélevés et additionnés à de l'anthrone (2,45 mL). Après 17 minutes à 95 °C, la réaction entre l'anthrone et les sucres donne une coloration verte, stable pendant 30 minutes. Les échantillons ont été placés à 4°C pendant 5 minutes avant la lecture de l'absorbance à 630 nm. La concentration en glucides a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide d'une solution de glucose.

1.2.2. Dosage des lipides

Le surnageant obtenu à l'issue de l'extraction a été placé à 95 °C, puis 100 µL d'acide sulfurique (95 %) ont été additionnés aux échantillons avant de les replacer à 95 °C pendant 10 minutes. Une solution d'acide phosphorique (85 %) et de vanilline a ensuite été ajoutée (2,4 mL). Les lipides en milieu sulfo-phospho-vanilline développent une coloration rose dont l'absorbance est lue à 525 nm après 20 minutes d'incubation. La concentration en lipides des échantillons a été déterminée en utilisant une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide d'une solution d'huile d'olive standard.

2. Les activités enzymatiques

2.1. Préparation des échantillons

L'ensemble des activités enzymatiques a été mesuré dans la glande digestive des organismes. Les échantillons ont été broyés dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7,6) à l'aide d'un broyeur à bille (1 bille de 5mm par échantillon) (MM400 Retsch) pendant 30 secondes à 30Hz. Après une centrifugation (3000 g, 10 min, 4 °C), le surnageant a été récupéré pour les différentes mesures. Toutes les activités enzymatiques ont été mesurées sur un même individu. L'ensemble des analyses a été effectué avec un spectrophotomètre automatisé (Gallery, Thermofisher). Au sein de l'analyseur, les réactions ont été réalisées à température ambiante.

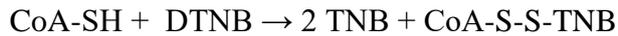
2.2. Les enzymes ciblées

Toutes les activités enzymatiques ont été exprimées en fonction de la quantité de protéines mesurée dans les glandes digestives des organismes. La concentration en protéines a été déterminée avec l'utilisation d'un réactif prêt à l'emploi U/CSF protein (ThermoScientific, Ref 981843). Cette mesure est basée sur la méthode du rouge de Pyrogallol, qui se lie aux groupements amines des protéines formant un complexe coloré dont on mesure l'absorbance à 600 nm. La concentration en protéines dans les échantillons a été calculée à partir d'une gamme réalisée à l'aide d'un standard fourni par le fabricant (Scal, ref. 981831). La concentration en protéines présentes dans les échantillons a été exprimée en g.L⁻¹.

Réactif U/CSF Protein : rouge de Pyrogallol (56 µM), molybdate de sodium (40 µM), acide succinique (50 mM), benzoate de sodium (3,5 mM), oxalate de sodium (1 mM) et méthanol (0,9 M).

2.2.1. L'activité de la citrate synthase

La citrate synthase (CS) catalyse la condensation du groupe acétyle de l'acétyl coenzyme A (ACoA) avec l'oxaloacétate (OAA) pour former le citrate. Cela représente la première étape du cycle de Krebs. La méthode de mesure a été adaptée de Sidell et al. (1987). Le principe est basé sur le suivi de la formation du coenzyme A, qui, en présence de DTNB va former un complexe jaune absorbant la lumière à 412 nm après fixation de ce dernier au groupement thiol du coenzyme. La réaction de formation du coenzyme A est initiée par l'ajout d'OAA dans le milieu.



Du tampon citrate (0,15 mM DTNB ; 0,2 mM ACoA ; Tris-HCL 0,1 M pH 8,1) a été ajouté (200 μL) à 5 μL d'échantillon. Une première mesure de cinétique a été réalisée pendant 3 minutes (11 points/18 s) à 412 nm. Afin d'activer la réaction, 4 mM d'OAA ont été additionnés au milieu. Après 30 secondes d'incubation, une seconde lecture a été réalisée afin de suivre l'activité citrate synthase en présence de substrat. Les mesures ont été réalisées à 412 nm. L'activité CS a été exprimée en U.g protéines⁻¹ et calculée comme suit :

$$\text{CS (U.g protéines}^{-1}\text{)} = \frac{\left(\frac{((\text{Pente}_{\text{éch.}+\text{OAA}} - \text{Pente}_{\text{blanc}+\text{OAA}}) - (\text{Pente}_{\text{éch.}} - \text{Pente}_{\text{blanc}}))}{13600 \cdot l} \right) \cdot \text{FD} \cdot 1000000}{\text{Concentration en protéines}}$$

Avec :

13600 = coefficient d'extinction molaire du DTNB à 420 nm ; l = le trajet optique (cm) ; 10^6 = facteur de conversion de mol.L⁻¹ en $\mu\text{mol. L}^{-1}$ et FD = facteur de dilution de l'échantillon.

2.2.2. L'activité de la lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase (LDH) a été ciblée pour évaluer le fonctionnement du métabolisme anaérobie. La LDH est une enzyme cytoplasmique de transfert de l'hydrogène qui joue un rôle important dans le cycle glycolytique ; elle catalyse la réduction réversible du pyruvate en lactate. La mesure de l'activité LDH a été réalisée à l'aide d'un kit de réactifs (Thermo Scientific, Kit LDH IFCC ref. 981782) visant à quantifier l'activité LDH dans le sérum humain.



Réactif A : methyl-D-glucamine (405 mM), lactate de lithium (63 mM), NaN_3 (< 0.1 %)

Réactif B : NAD (50 mM), NaN_3 (< 0.1 %)

Le protocole de mesure de l'activité LDH a été réalisé d'après Garaud et al. (2016) et Potet et al. (2016). Un ajout de 100 μL de réactif LDH IFCC A a été réalisé dans 15 μL d'échantillon suivi d'une incubation de 300 secondes. Une deuxième addition de 25 μL de réactif LDH IFCC B a été effectuée avec une deuxième incubation de 120 secondes. La réaction a été suivie 243 secondes (10 points ; 1 point toutes les 27 s) à 340 nm. A partir des 10 points de mesure, la pente de la cinétique a été calculée pour chaque échantillon. Un blanc

a également été mesuré partir du tampon d'homogénéisation. L'activité LDH a été calculée comme suit :

$$\text{LDH } (\mu\text{mol NADH.g protéines}^{-1}.\text{h}^{-1}) = \frac{\left(\frac{(\text{pente éch.} - \text{pente blanc})}{6220 \times 1} \right) \times 3600 \times \text{FD} \times 1000000}{\text{Concentration en protéines}}$$

Avec :

6220 = coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm ; 3600 = conversion des minutes en heure ; 1 = le trajet optique (cm) ; 10^6 = facteur de conversion de mol.L^{-1} en nmol.mL^{-1} ; FD = facteur de dilution de l'échantillon.

2.2.3. L'activité du système de transport d'électrons (ETS)

Le système de transport d'électrons ou ETS (Electron Transport System) permet le transfert des électrons via les différents cytochromes, flavoprotéines et ions métalliques de la chaîne respiratoire pour atteindre les molécules d'oxygène et ainsi former de l'ATP grâce à la réduction de l'oxygène en eau. L'essentiel de la consommation d'oxygène (96 %) dans un organisme est réalisé par la chaîne respiratoire. La mesure de l'activité ETS permet d'évaluer le potentiel de réduction de l'oxygène dans les cellules.

Le protocole de mesure de l'activité ETS a été réalisé d'après la méthode établie par Owens et King (1975) modifiée par de Coen et Janssen (1997) et adaptée par Garaud et al. (2016) et Potet et al. (2016) à l'automate. Le principe de cette mesure consiste à suivre la réduction du p-iodonitrotetrazolium (INT) qui joue le rôle d'accepteur final d'électron de la chaîne respiratoire mitochondriale. La réduction de l'INT forme du formazan (INT réduit). La présence de triton dans le milieu, un perméabilisant membranaire, va permettre la solubilisation du formazan et ainsi le suivi en continu de sa formation à 480 nm. Ici, l'échantillon (5 μL) a été incubé durant 2 minutes avec 15 μM de MgSO_4 , 0,16 % de Triton X-100, 0,3 g.L^{-1} PVP (polyvinylpyrrolidone), 1 mM de NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) et 0,15 mM de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) dans un tampon phosphate 80 mM (pH 8,5). Afin d'initier la réaction, 0,133 g.L^{-1} d'INT ont été ajoutés. Après 3 minutes d'incubation, la cinétique de formation du formazan a été suivie à 480 nm durant 12 minutes (1 point/90 s). L'activité ETS est calculée en sachant que pour 2 μmol de formazan formées, 1 μmol d' O_2 est consommée (équivalent oxyenthalpique de 480 kJ.mol^{-1} d'oxygène ; De Coen et Janssen, 1997).

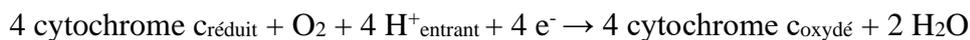
$$\text{Activité ETS (mmol O}_2\text{.g protéines}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)} = \frac{\left(\left(\left(\frac{\text{Pente}_{\text{éch.}} - \text{Pente}_{\text{blanc}}}{15900 * 1} \right) * 1000 \right) * \text{FD} \right) * 60 * 0,5}{\text{Concentration en protéines}}$$

Avec :

15900 = coefficient d'extinction molaire du formazan à 480 nm ; 60 = conversion des secondes en minutes ; 1 = le trajet optique (cm) ; 10^3 = facteur de conversion de mol.L⁻¹ en mmol. L⁻¹ ; FD = facteur de dilution de l'échantillon ; 0,5 = conversion de μmol de formazan en μmol d'oxygène (De Coen et Janssen, 1997).

2.2.4. L'activité de la cytochrome c oxydase

L'enzyme cytochrome c oxydase (COX) catalyse la dernière réaction d'oxydation de la chaîne respiratoire. Elle transfère les électrons du cytochrome c réduit à l'hydrogène produisant des molécules d'eau. Le principe de mesure de l'activité COX est basé sur l'oxydation du cytochrome c, d'après Trounce et al. (1996).



Le cytochrome c a été réduit au préalable avec un ajout d'ascorbate (6 %). La réduction du cytochrome a été vérifiée par la mesure des absorbances à 550 et 565 nm. Lorsque que le ratio A550/A565 se situe entre 10 et 20, le cytochrome c est réduit. L'échantillon et le cytochrome c réduit (0,8 mM) ont été incubés 30 secondes avec du tampon Tris-HCL (0,1 M, pH 8,1). La réaction est ensuite suivie pendant 3 minutes (11 points/18 s) à 550 nm. L'activité COX a été exprimée en U.g protéines⁻¹ et calculée comme suit :

$$\text{COX (U.g protéines}^{-1}\text{)} = \frac{\left(\frac{\text{Pente}_{\text{éch.}} - \text{Pente}_{\text{blanc}}}{7040 * 1} \right) * \text{FD} * 1000000}{\text{Concentration en protéines}}$$

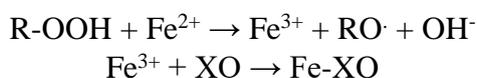
Avec :

7040 = coefficient d'extinction molaire du cytochrome c réduit à 550 nm ; 1 = le trajet optique (cm) ; 10^6 = facteur de conversion de mol.L⁻¹ en $\mu\text{mol. L}^{-1}$ et FD = facteur de dilution de l'échantillon.

2.2.5. La peroxydation lipidique

La mesure des hydroperoxydes lipidiques (LOOH) est basée sur la méthode de Jiang et al. (1991) et adaptée par Potet et al. (2016). Le principe repose sur l'oxydation du fer (Fe^{2+})

→ Fe³⁺) par les hydroperoxydes en milieu acide. Les ions ferriques (Fe³⁺) formés, complexés avec le xylénol orange (o-cresosulfonephthalein-3,3'-bismethylimino-diacetic acid ; XO), créent un complexe violet selon la réaction suivante :



Une première incubation de 3 minutes a été réalisée avec l'échantillon dilué au 1/5^{ème} et 180µL de XO (0,8 M) après laquelle une première lecture d'absorbance a été effectuée à 620 nm afin de la soustraire aux absorbances finales. Le réactif Fe²⁺ (150 mM) a été ajouté au milieu et une seconde incubation de 20 minutes a été réalisée. L'absorbance finale a été ensuite mesurée en triplicats. La solution utilisée pour réaliser les deux réactifs (XO et Fe²⁺) était composée d'acide sulfurique (40 mM), de glycérol (1,37 mM) et d'acide formique (20 mM) dilués dans une solution de chlorure de sodium (0,9 %). Afin de calculer la concentration en hydroperoxydes dans les échantillons, une courbe d'étalonnage a été réalisée à l'aide d'une solution de tert-butyl hydroperoxyde (TBH).

3. Les expressions géniques

Plusieurs gènes codant pour des enzymes clés du métabolisme énergétique ont été ciblés (Tableau 6). Afin de normaliser les valeurs d'expression relative de chacun, les gènes codant pour l'actine et la protéine ribosomale S3 ont été utilisés comme gènes de ménage d'après Navarro et al. (2011). L'ensemble des mesures d'expression des gènes a été réalisé sur la glande digestive des organismes.

Tableau 6. Ensemble des couples d'amorces utilisés en RT-PCR en temps réel. Abr. : abréviation ; Conc. : concentration. NCBI : numéro d'accèsion de la séquence du gène dans les bases de données

Gènes	Abr.	NCBI	Amorces F	Amorces R	Taille (pb)	Conc. (nM)
Actine	<i>act</i>	AF082863	CCTCACCCCTCAAGTACCCCAT	TTGGCCTTTGGGTTGAGTG	153	300
Alternative oxydase	<i>aox</i>	Q9P959	GTGAACCATAACCCTCGCCTC	TGTAGTGACTGCGGATGGTC	154	300
AMP désaminase	<i>ampd</i>	Q9DBT5	ACCCAGCCAGTGTTGTTTCA	TTTGCTCGTGGACTCAACGT	195	300
AMP kinase sous unité alpha	<i>ampk</i>	Q8BRK8	TGCTAAATGAAAGAGGTGACGC	CATGTGGTGGCATATACGATGT	117	300
ATP synthase	<i>atp</i>	JQ781135	GACTCCACCTCCCGTATCCT	TCCTCTGAAAGCTCGTCCAT	143	600
Catalase	<i>cat</i>	EF681763	ACGGCTATGGAAGCCACACG	AGGTGCGGCATCGCATAGTC	157	600
Citrate synthase	<i>cs</i>	MN579511	GTGCCCTGTCAGACCCTTAC	CTGTCCTGCCTTGAGTGTGT	182	300
Cytochrome b	<i>cytb</i>	DQ072120.1	CGCCACTTTAAAGCGATTTTT	TGGGTCAGCAAATAGATCTGG	244	150
Cytochrome c oxydase 1	<i>cox</i>	AAL55513	AGGCCCTGCGATAGATTTTT	AAAGGGACCCGGTAAAATTG	132	300
Hypoxia inducible Fator 1	<i>hif</i>	Q309Z6	GGGTAGTACATTTCTATTGGGCT	TCAACGATGCGGATGAGGTG	197	300
Lactate déshydrogénase	<i>ldh</i>	Q7TNG8	TGCCCAAACACTACATTGCCAAAT	ATTGGGATTGGCAAACGGGA	181	150
Protéine ribosomale S3	<i>s3</i>	AJ517687	CAGTGTGAGTCCCTGAGATAACAAG	AACTTCATGGACTTGGCTCTCTG	155	150
Succinate déshydrogenase	<i>sdh</i>	Q9YHT2	TAGACCGTCCAGTTTAGCGC	CCTCTGCCACACATGTACGT	171	150

3.1. Extraction des ARN totaux

Les échantillons de glandes digestives (50 à 100 mg) ont été homogénéisés dans 1 mL de Tri-Reagent (Molecular Research Center Inc.) à l'aide d'un broyeur à billes (MM400 Retsch) avec une bille en inox de 3 mm (2 fois 30 s à 30 Hz). Après 5 minutes à température ambiante pour permettre la lyse des cellules, du chloroforme (200 μ L) a été ajouté et le mélange centrifugé (12000 g, 10 min, 4 °C). La phase aqueuse contenant les ARN a été récupérée et de l'isopropanol (500 μ L) y a été additionné pour précipiter les ARN. Après une nouvelle centrifugation (12000 g, 8 min, 4 °C), le culot a été rincé à l'éthanol 75 % afin d'éliminer les résidus de phénol. Après une dernière centrifugation (7500 g, 5 min, 4 °C), le culot a été séché à l'air libre puis dissous dans un volume approprié d'eau sans ribonucléases (RNase free).

La concentration en ARN dans les échantillons a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre pour micro-volumes (GenovaNano, Bibby Scientific). La pureté des extractions a été vérifiée par la valeur du ratio A260/A280 devant être compris entre 1,7 et 2 pour que les extraits soient considérés comme purs. La qualité des ARN a ensuite été vérifiée par une migration sur gel d'agarose 1 % (40 min à 120 Volts) dans un tampon Tris-Borate-EDTA 0,5X. Après 15 minutes dans un bain de bromure d'éthidium (BET), les gels ont été révélés sous UV (Figure 21).

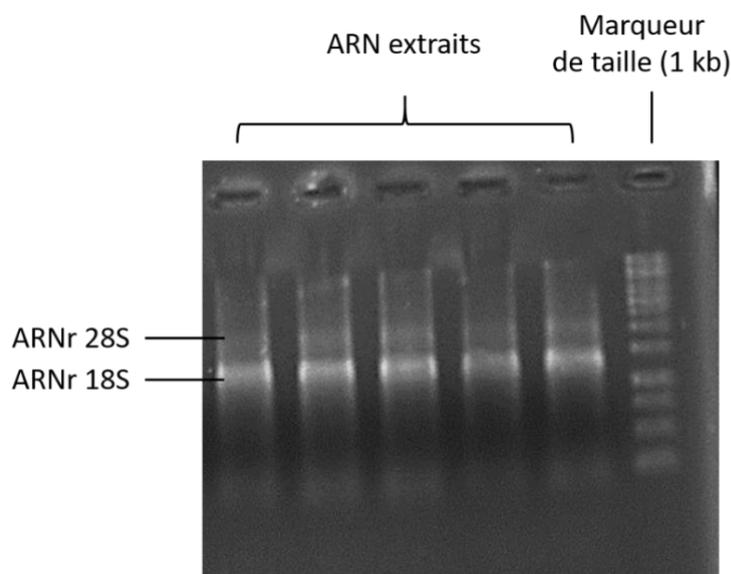


Figure 21. Photographie de la migration par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % des ARN totaux extraits, après un bain de BET.

3.2. RT-PCR en temps réel

La technique de RT-PCR en temps réel est réalisée en 2 étapes : la transcription inverse des ARN extraits, suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne pour chaque gène étudié. La première étape permet la synthèse d'ADNc (complémentaires) double brin. La réaction a été effectuée à partir de 400 ng d'ARN totaux, à l'aide du kit Verso cDNA Synthesis (Thermo Scientific), dans un thermocycleur (Eppendorf) pendant 30 minutes à 42 °C puis 2 minutes à 95 °C afin d'inactiver l'enzyme. La seconde étape permet l'étude du niveau d'expression des gènes par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les ADNc ont été préalablement dilués au 10^{ème} avant d'être ajoutés à un mix réactionnel contenant de l'Absolute Blue qPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific) (7,5 µL), 150 nM à 600 nM d'amorces sens et anti-sens selon les gènes étudiés (1,5 ou 3 µL) et de l'eau (1,5 ou 3 µL) pour un volume final de 15 µL. L'amplification a été effectuée au CFX96 Touch™ Thermal Cycler (Biorad), par une étape de dénaturation initiale à 95 °C pendant 15 minutes, suivie de 40 cycles de 10 secondes à 95 °C et 1 minute à 60 °C chacun.

A la fin de chaque cycle, l'incorporation de SYBR Green a été mesurée par l'appareil. Le niveau relatif d'expression de chaque gène repose sur la détermination du nombre de cycles au bout duquel le seuil de détection de fluorescence a été franchi (Ct, Cycle Threshold).

L'expression relative des gènes cibles a été calculée à partir de la méthode dite du $-\Delta\Delta^{Ct}$ (Pfaffl, 2001) tout en prenant en compte l'efficacité de la PCR. Pour chaque couple d'amorces, une gamme standard d'ADNc dilués du 10^{ème} au 1000^{ème} a été réalisée, pour calculer l'efficacité d'amplification selon la formule suivante :

$$E=(10^{(1/a)}) - 1$$

Avec : a représentant le coefficient directeur de la droite des Ct en fonction du logarithme de la quantité d'ADNc.

Un rapport R représentatif de la quantité initiale de molécules cibles de chaque gène a été calculé de la manière suivante :

$$R=\frac{\text{Seuil}}{(1+E)^{Ct}}$$

L'expression relative (X) de chaque gène a ensuite été calculée :

$$X = \frac{R_{(\text{gène cible})}}{\text{Moyenne géométrique } R_{(\text{gènes de ménage})}}$$

3.3. Caractérisation de séquences partielles codant pour les gènes ciblés

Seules les amorces spécifiques des gènes codant pour le cytochrome b (*cytb*), l'ATP synthase (*atp*), la cytochrome c oxydase (*cox*) ainsi que pour les gènes de ménage étaient disponibles au sein du laboratoire. D'autres séquences partielles ont été dessinées grâce à une banque d'ADNc ou par l'utilisation d'amorces dégénérées.

3.3.1. Disponibilité des séquences chez *D. polymorpha*

Les couples d'amorces spécifiques correspondant aux gènes codant pour la lactate déshydrogénase (*ldh*), l'AMP kinase (*ampk*), l'AMP désaminase (*ampd*), l'alternative oxydase (*aox*), l'hypoxia inducible factor (*hif*) et la succinate déshydrogénase (*sdh*) ont été dessinés à partir de séquences issues d'un séquençage du transcriptome réalisé chez *D. polymorpha* par Arnaud Tanguy (Station Biologique de Roscoff) dans le cadre du projet PolQua (RT2E Fondation Rovaltain). Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer3 à partir des séquences disponibles dans la base de données existante. Les produits d'amplification ont été vérifiés par séquençage.

3.3.2. Utilisation d'un couple d'amorces dégénérées

Une séquence partielle de l'ARN messager codant pour la citrate synthase a été caractérisée à l'aide d'amorces dégénérées (Figure 22).

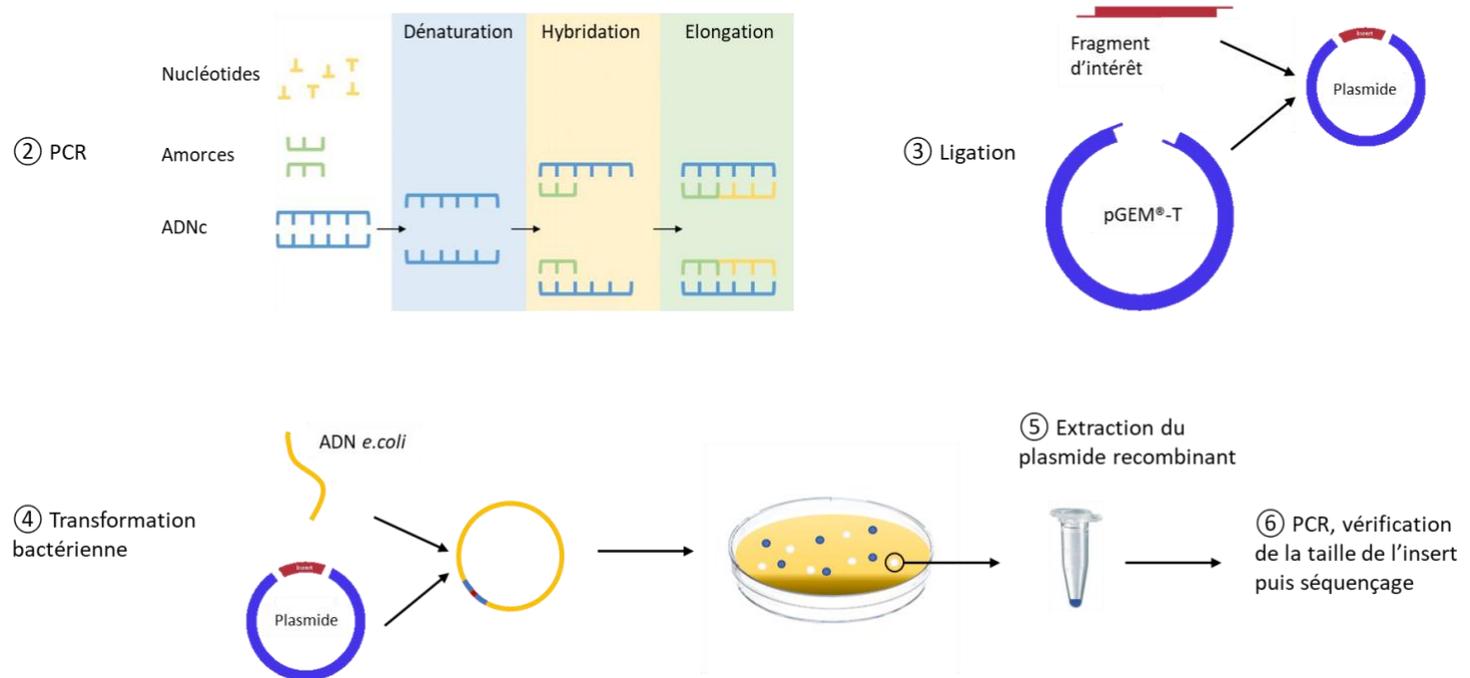
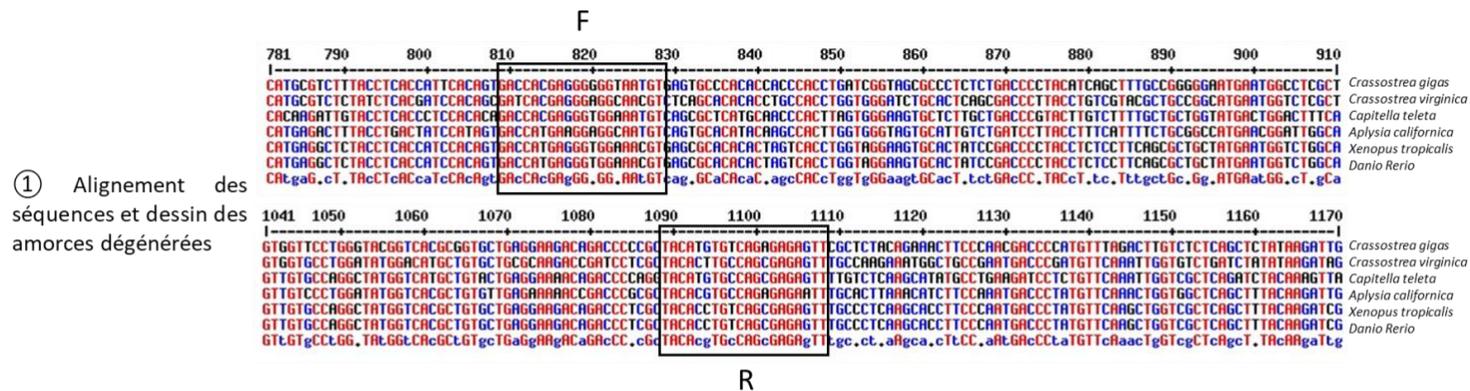


Figure 22. Etapes de caractérisation d'une séquence partielle d'un gène à partir d'un couple d'amorces dégénérées.

Les étapes sont les suivantes :

① Alignement des séquences : plusieurs séquences disponibles dans les bases de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) ont été alignées grâce au logiciel Multialin. Ici, 6 séquences codantes d'espèces différentes (*Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Capitella teleta*, *Aplysia californica*, *Xenopus tropicalis* et *Danio Rerio*) ont été utilisées. Le dessin d'amorces dégénérées a ensuite été effectué sur les régions les plus conservées.

② Une PCR a été réalisée afin d'amplifier le fragment d'intérêt suivie d'une migration sur gel d'agarose 1,5 %. Le produit d'amplification a été purifié.

③ Une ligation a été réalisée afin d'intégrer le fragment d'ADN d'intérêt dans un vecteur (pGEM®-T) à l'aide du kit pGEM®-T (Promega) en suivant le protocole du fabricant.

④ Une transformation bactérienne a ensuite été effectuée pour introduire le plasmide contenant le fragment d'ADN d'intérêt dans des bactéries. Pour cela, 5 µL de produit de ligation ont été ajoutés à 200 µL de bactéries compétentes (*Escherichia coli* souche DH5α) et placés 30 minutes sur glace. Le mélange a ensuite été placé 90 secondes à 42 °C puis 3 minutes sur glace. Ces étapes ont permis de réaliser un choc thermique facilitant l'entrée du plasmide dans les bactéries. Après 1 heure d'incubation à 37 °C sous agitation dans du milieu SOC (Tryptone, levure, NaCl 5 M, KCl 2 M, glucose 1 M MgCl₂ 1 mM, eau), les bactéries ont été étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu Luria Bertani-agar (LB) (Tryptone, levure, NaCl, agar, eau), de l'ampicilline (100 mg.L⁻¹), du X-gal (20 mg.mL⁻¹) et de l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 100 mM). Les boîtes ont été ensuite placées une nuit à 37 °C. Les colonies blanches qui possèdent le plasmide recombinant ont ensuite été prélevées et placées à 37 °C une nuit sous agitation dans du milieu LB liquide avec ampicilline.

⑤ L'extraction du plasmide recombinant a été réalisée grâce à une « minipréparation ». Les cellules bactériennes ont été remises en suspension dans une première solution (Tris, 50 mM, pH 8 ; EDTA, 10 mM, pH 8 ; RNase 400 µg.mL⁻¹). Les membranes des cellules bactériennes ont ensuite été lysées avec une seconde solution (NaOH, 0,2 N ; SDS 1 %). Après 5 minutes d'incubation, une dernière solution (acétate de potassium, 5 M, acide acétique glacial) a été additionnée afin de précipiter les différents déchets cellulaires. Une première centrifugation a

été réalisée (5 min, 13000 g, 4 °C) pour récupérer le surnageant contenant l'ADN, qui a été précipité à l'éthanol 100 % pendant une nuit à -20 °C. Après une seconde centrifugation (30 min, 13000 g, 4 °C), le culot d'ADN a été rincé avec de l'éthanol 70 %. Après une dernière centrifugation (5 min, 13000 g), le culot a été séché et repris dans 50 µL d'eau.

⑥ Les fragments d'ADN d'intérêt insérés dans le plasmide ont été ensuite amplifiés par PCR avec les amorces universelles T7 et SP6 dont le plasmide porte les séquences. Après migration des produits sur un gel d'agarose à 1,5 % dans un tampon Tris-Borate-EDTA 0,5X (40 min à 120 Volts), la taille des fragments obtenus a été vérifiée et les produits ont ensuite été envoyés à séquencer (plateforme de séquençage Biofidal). Les séquences ont été vérifiées par l'outil BLASTX puis déposées dans les bases de données GenBank. A partir de la séquence partielle du gène d'intérêt, des amorces spécifiques ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3.

4. Étude de l'activation de l'AMP kinase par western-blotting

4.1. Extraction des protéines totales

Les glandes digestives des moules ont été homogénéisées dans un tampon de lyse contenant 10 mM TrisHCl pH 7,4 ; 5 mM EDTA ; 1% de Triton X-100 et des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. L'homogénat a ensuite été centrifugé 10 minutes à 3000 g. La concentration protéique a été déterminée dans le surnageant à l'aide d'une solution commerciale (Biorad) par spectrophotométrie à 595 nm d'après la méthode de Bradford, à partir d'une gamme standard d'albumine bovine sérique (BSA) à différentes concentrations connues.

4.2. Séparation électrophorétique et transfert sur membrane

Les protéines (25 µg) ont été dénaturées à 95°C pendant 5 minutes dans 62,5 mM TrisHCl pH 6,8 contenant 2 % de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), 8 % de glycérol, 75 mM de dithiothéitol (DTT) et du bleu de bromophénol. Elles ont ensuite été déposées sur un gel d'acrylamide (5 %) dans 0,25 M TrisHCl pH 6,8 contenant 0,1 % de SDS. Le gel de séparation a été préparé avec 10 % d'acrylamide, dans 0,375 M TrisHCl pH 8,8 contenant 0,1 % de SDS. La migration a été réalisée à 140 V pendant 1 heure 30 dans un tampon contenant 0,05 M Tris, 0,384 M Glycine et 0,1 % SDS. Les protéines ont été transférées du gel vers une membrane de polyvinyl-difluoride (PVDF, Biorad) dans un milieu semi-sec entre deux piles

d'éponge et de papier Whatman imbibés de tampon de transfert contenant 0,05 M Tris, 0,384 M Glycine, 0,1 % SDS et 20 % d'éthanol, durant 7 minutes à 1,3 A. Un marqueur de poids moléculaire connu et pré-coloré (ThermoFischer) a permis de calibrer la membrane.

4.3. Détection immunologique

A l'issue du transfert, la membrane a été incubée pendant 2 heures sous agitation avec une solution bloquante composée de 5 % de lait dilué dans un tampon TrisHCl 50 mM pH 7,5 contenant 150 mM NaCl et 0,1 % de Tween-20 (TBS Tween) afin de bloquer les sites aspécifiques. Des anticorps monoclonaux produits chez le lapin dirigés contre l'AMPk total alpha 1 et 2 (ab207442, Abcam) et phospho-AMPk (ab133448, Abcam) ont été dilués au millième dans du TBS-Tween contenant 2,5 % d'agent bloquant et ont été placés sur la membrane pour la nuit à 4°C sous agitation. Après trois lavages de 10 minutes dans du TBS-Tween, la membrane a été incubée pendant 45 minutes sous agitation en présence des anticorps anti-immunoglobulines de lapin couplés à la peroxydase, à raison de 0,04 U.mL⁻¹ dans du TBS 0,1 % Tween contenant 2,5 % d'agent bloquant. Avant la révélation, la membrane a été lavée trois fois 15 minutes avec du TBS Tween. L'activité peroxydase a été révélée à l'aide d'un substrat chimioluminescent commercial Clarity™ ECL Substrate (Biorad). L'exposition des membranes a été réalisée grâce au ChemiDoc (Biorad) permettant ainsi de mettre en évidence une bande correspondant spécifiquement à la protéine reconnue par l'anticorps primaire. L'intensité des bandes ainsi révélées a été quantifiée par densitométrie à l'aide du logiciel ImageLab (Biorad).

5. Les nucléotides énergétiques

5.1. Extraction des nucléotides

Les nucléotides énergétiques (ATP, ADP, AMP et IMP) ont été extraits d'après la méthode décrite par Sokolova et al. (2005). Une fois les moules prélevées, elles ont directement été congelées entières (coquille comprise) à -80 °C. Après dissection sur carboglace, l'ensemble des tissus mous a été lyophilisé pendant 48 heures. Après broyage des tissus secs, 10 à 20 mg ont été placés dans une solution d'acide perchlorique (0,6 M) à 4 °C durant 30 minutes. L'acide et le froid permettent d'éviter la dégradation des nucléotides. Les échantillons ont ensuite été broyés à l'aide d'un broyeur à billes (MM400 Retsch) avec une bille de 5 mm pendant 3 min à 30 Hz puis centrifugés (3000 g, 10 min, 4 °C). Le surnageant a été récupéré et l'étape décrite ci-dessus répétée une seconde fois. L'extrait total a ensuite été

neutralisé à un pH compris entre 5 et 6,5 avec 5 mM d'hydroxyde de potassium (KOH) et 1 M d'une solution de bicine. Le KOH permet de précipiter le perchlorate de potassium. Le surnageant a été récupéré après une seconde centrifugation. Les extraits ont ensuite été filtrés (0,45 µm) et conservés à -80 °C.

5.2. Dosage des nucléotides

Les concentrations en nucléotides ont été mesurées par HPLC avec une colonne C18 (Nucleosil) selon le protocole de Fisher (1995) et adapté par Sokolova et al. (2000). La séparation des nucléotides a été effectuée pendant 15 minutes avec un flux de 0,8 mL.min⁻¹ en utilisant une phase mobile composée d'un tampon phosphate (1 M) et 5 % de méthanol (pH 6). Les différents pics ont été suivis à 254 nm. La concentration en nucléotides a été calculée grâce à l'utilisation de standard (Sigma) d'ATP, d'ADP, d'AMP et d'IMP de 20, 10, 2 et 10 µM, respectivement.

6. La respiration cellulaire

6.1. Isolation des cellules

Afin d'avoir suffisamment de cellules pour effectuer une mesure, plusieurs individus ont été utilisés pour constituer des réplicats incluant chacun les glandes digestives de 5 individus. Après dissection, les glandes ont été broyées délicatement sur un filtre (100 µm) à l'aide d'un piston et d'un tampon d'isolement (2 mM Hépès, 200 mM Mannitol, 0,1 mM EDTA, 40 mM saccharose, 0,5 % BSA, pH 7,4). Après récupération de l'homogénat, une centrifugation a été réalisée afin de sédimenter les cellules (450 g, 5 min). Le culot de cellules a ensuite été remis en suspension dans 1 mL de milieu L-15 15 % (Leibovitz) et placé dans la chambre hermétique de l'appareil. Un aliquot de cette suspension a été utilisé pour le comptage cellulaire (10µL) afin de rapporter les mesures de consommation d'oxygène au comptage cellulaire réalisé pour chaque réplicat.

6.2. Mesure de la respiration

La respiration cellulaire a été évaluée à l'aide d'une électrode de Clark (oxygraphe, Hansatech Instruments). L'électrode de Clark est composée d'une cathode et d'une anode reliées par un électrolyte (chlorure de potassium, KCl). L'ensemble est séparé des échantillons par une membrane perméable au dioxygène. Le dioxygène qui diffuse à travers la membrane est réduit en eau par les électrons libérés au niveau de la cathode et le courant qui s'établit

entre les deux électrodes est proportionnel à la concentration en dioxygène dans les échantillons.

Les mesures de respiration cellulaire ont été réalisées avec le logiciel OxygraphPlus (Hansatech Instruments) à partir du traitement des différentes pentes observées suite à l'ajout de différents inhibiteurs (Figure 23). La consommation de l'oxygène a été mesurée après avoir placé la suspension cellulaire dans l'enceinte. Une première pente correspondant à la respiration endogène a été mesurée. Afin d'observer le pourcentage de respiration réalisée par l'alternative oxydase, un inhibiteur de celle-ci (SHAM, acide salicylhydroxamique) a été ajouté au milieu (200 μM). Après la mesure de la seconde pente, un inhibiteur de l'ATP synthase a été additionné afin de provoquer une accumulation de protons au niveau de l'espace inter-membranaire. Une troisième pente a alors été mesurée. Cette accumulation de protons a ensuite été dissipée grâce à un découpleur de la chaîne respiratoire, le CCCP (carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone). Après cet ajout, lorsque la pente observée était plus importante que la précédente, les mitochondries étaient perméables aux ions. Lorsque la pente ne variait pas avant et après ajout du CCCP, la chaîne respiratoire mitochondriale était alors déjà découplée dans les extraits cellulaires. La respiration endogène a été exprimée en $\text{nmoles O}_2 \cdot 10^6 \text{ cellules}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. L'efficacité de couplage mitochondrial a été déterminée par le ratio « respiration endogène / (respiration endogène après ajout de l'oligomycine) ».

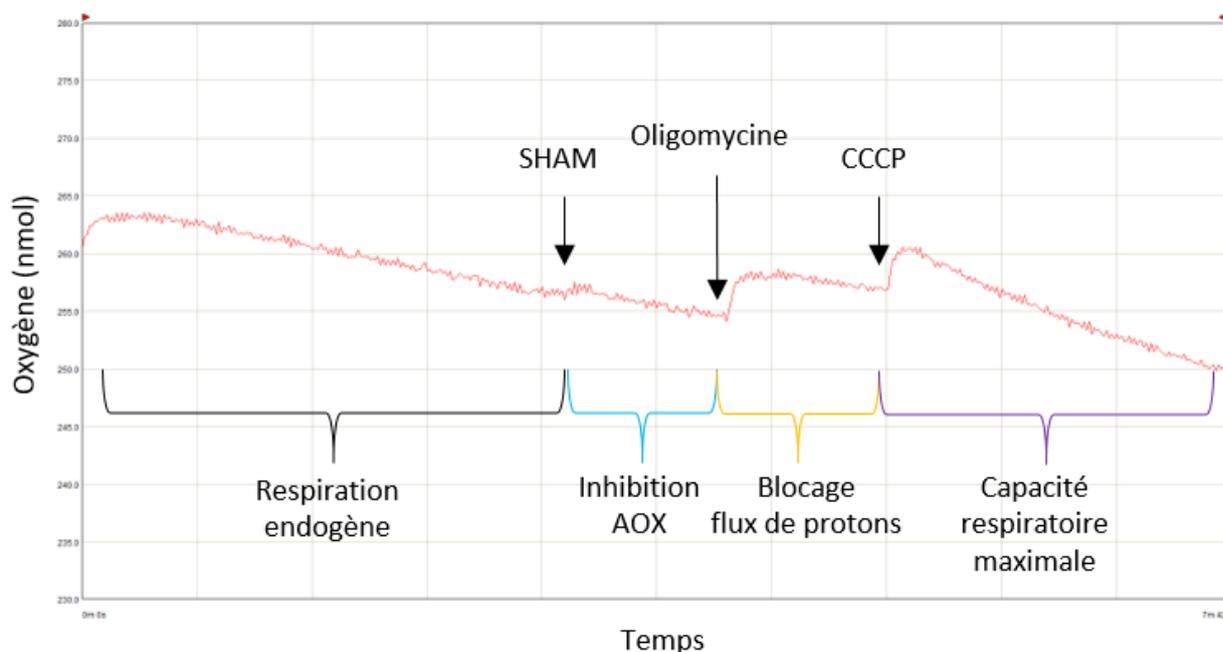


Figure 23. Exemple de résultat issu de la mesure de la respiration cellulaire suivie avec le logiciel OxygraphPlus. Les différents ajouts d'inhibiteurs ont été positionnés ainsi que les correspondances de chaque pente mesurée.

7. Les analyses histologiques

7.1. Détermination du stade de développement des gonades

L'identification du sexe et la détermination du stade de développement des gonades ont été menées à partir des tissus gonadiques. Les tissus disséqués ont été fixés pendant 24 à 48 heures dans une solution aqueuse de Bouin et traités pour l'histologie. Après déshydratation dans des bains successifs d'alcool (éthanol), les tissus ont ensuite été incorporés dans de la paraffine puis coupés (7 μm) et colorés au rouge solide + micro-indigo-carmin. Les échantillons ont ensuite été examinés au microscope, le sexe des individus déterminé, et à chaque individu a été affecté l'un des stades de développement suivants : au repos (A), en développement (B), maturation (C), pré-ponte (D) ou post-ponte (E) (Figure 24). Les scores associés ont été utilisés pour le calcul d'un indice de maturité sexuelle. Les stades de développement des gonades ont été adaptés à partir de la classification décrite par Gist et al. (1997).

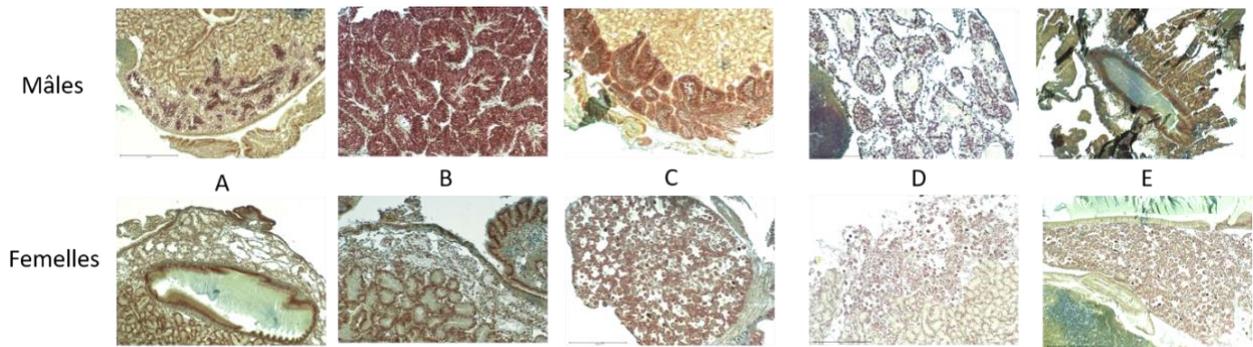


Figure 24. Photographies de coupes de gonades mâles et femelles aux différents stades de reproduction ; A: repos ; B: développement ; C: maturation ; D: pré-ponte et E: post-ponte.

8. Les dosages de métaux par spectrométrie d'absorption atomique

Le cadmium présent dans les matrices environnementales et biologiques a été mesuré par spectrométrie d'absorption atomique (SAA). Le principe de cette méthode est basé sur l'atomisation spécifique des échantillons afin de permettre le dosage du métal d'intérêt. Les atomes dissociés absorbent une partie de la lumière émise par la lampe permettant au spectrophotomètre de mesurer la part de rayonnement absorbé en fonction de la quantité émise.

8.1. Extraction

8.1.1. Matrice environnementale

Les échantillons d'eau prélevés ont été acidifiés avec du HNO₃ 65 % (1:7,5 ; v:v) et directement analysés en spectrométrie d'absorption atomique.

8.1.2. Matrice biologique

Les tissus de moule ont été placés 48h à l'étuve afin de les déshydrater. Les échantillons ont ensuite été digérés dans de l'acide nitrique (HNO₃, 65 %) avec un ratio de 30:1 et placés une nuit à 80 °C. Ils ont ensuite été portés à sec pendant 2 h à 120 °C. Le dépôt ainsi obtenu a alors été dissous dans 400 µL de HNO₃ 65 % et dilué dans de l'eau déminéralisée pour un volume final de 3 mL.

8.2. Dosage du cadmium

La concentration en Cd dans les échantillons a été déterminée après l'établissement d'une gamme d'étalonnage réalisée avec une solution de Cd. Les échantillons ont été incorporés par injecteur dans un tube en graphite (four) balayé par un gaz inerte (Argon) pour éjecter les foudées de la carbonisation et le nuage d'atomes produit lors de l'atomisation. Le tube a ensuite été chauffé par effet Joule suivant un cycle thermique comprenant 4 étapes : dissolution (A), carbonisation (B), atomisation (C) et nettoyage/séchage (D) (Figure 25). Le logiciel associé trace directement la courbe d'étalonnage et déduit ensuite la concentration présente dans les échantillons.

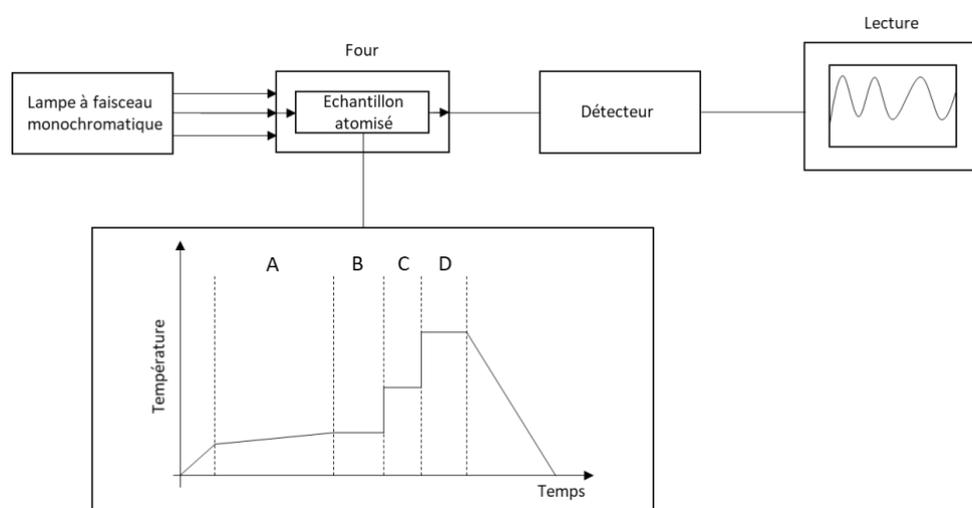


Figure 25. Schéma simplifié du fonctionnement du spectrophotomètre atomique et des 4 étapes du cycle thermique : dissolution (A), carbonisation (B), atomisation (C) et nettoyage/séchage (D).

III. Analyses statistiques

Les données acquises ont été traitées statistiquement afin de comparer l'ensemble des réponses étudiées. Des tests statistiques paramétriques (tests t de Student, ANOVA) ou non paramétriques (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis), avec une évaluation préalable de la normalité (Shapiro) et de l'homoscédasticité des données (Bartlett, Levene) ont été effectués pour évaluer de potentielles différences entre les réponses selon les conditions testées ou selon les différentes dates de prélèvement durant le cycle de reproduction. Des tests post-hoc (Tukey HSD, Kruskal) ont ensuite été réalisés afin de comparer les groupes expérimentaux deux à deux. Des ANOVA à 2 facteurs ont également été réalisées pour évaluer l'effet des différents facteurs testés sur les réponses ciblées.

Dans le but de considérer l'ensemble des données acquises, des analyses multivariées ont été réalisées soit par le biais d'analyses discriminantes par les moindres carrés partiels (PLS-DA, Partial Least Square Discriminant Analysis) soit par analyses en composantes principales (ACP). Des modèles PLS-DA ont été utilisés lorsque le nombre de variables dépassait le nombre d'individus. Ces analyses factorielles permettent de sélectionner, voire de hiérarchiser les variables en fonction de leur importance dans la séparation des groupes (VIP, Variable Importance Projection). L'utilisation d'ACP within/between a permis de soustraire le facteur « période du cycle de reproduction » testé afin de visualiser uniquement les effets des stress subits par les organismes sur les réponses du métabolisme énergétique. Des analyses de corrélations entre biomarqueurs et de co-inertie ont été réalisées. L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé à l'aide du logiciel R (version 3.5.0). Un seuil de $p \leq 0.05$ était considéré comme significatif.

Chapitre 3.

**Suivi des variations saisonnières des
marqueurs du métabolisme
énergétique chez *Dreissena*
polymorpha : Étude *in situ***

1. Contexte et objectifs

Les organismes aquatiques, comme les bivalves, sont particulièrement soumis aux fluctuations saisonnières. Les variations naturelles des paramètres extrinsèques, liés au milieu (température, nourriture, oxygène) et intrinsèques à l'organisme (cycle de reproduction, âge, taille) influencent l'ensemble des réponses du métabolisme des bivalves ectothermes (Sokolova et al., 2012). L'effet de ces paramètres est déjà bien connu chez les espèces marines de par leur fort intérêt économique. Les études réalisées ont notamment montré un lien étroit entre les fluctuations saisonnières et la gestion du métabolisme énergétique. Les variations des paramètres abiotiques peuvent, en effet, modifier l'allocation énergétique pour les différentes fonctions vitales des animaux, en favorisant le métabolisme aérobie afin de répondre à la demande énergétique (Hochaka and Somero, 2002; Salin et al., 2015; Sokolova and Pörtner, 2001; Sokolova et al., 2012). Les variations saisonnières de nombreux biomarqueurs sont bien documentées chez *D. polymorpha* mais peu d'entre eux sont impliqués directement dans le métabolisme énergétique. Cependant, certaines études ont montré des variations des réponses de ce métabolisme selon la saisonnalité avec, en général, une augmentation de l'activité métabolique en période estivale et une diminution après la saison de reproduction (automne-hiver), à travers l'activité ETS ou encore l'expression de gènes de la PHOSOX (Fanslow et al., 2001; Kerambrun et al., 2016; Navarro et al., 2013). Un suivi saisonnier des réserves énergétiques a également fait l'objet d'une étude chez cette espèce et a révélé une gestion de ces réserves étroitement corrélée avec le cycle de reproduction chez *D. polymorpha* (Palais et al., 2011).

Néanmoins, de nombreuses informations quant à la gestion de l'énergie chimique libre disponible (ATP), la régulation de la balance énergétique ou encore le fonctionnement mitochondrial restent méconnus chez cet organisme sentinelle. Afin d'approfondir les connaissances sur cette espèce ainsi que d'initier un premier pas vers le développement de biomarqueurs, les réponses des différents processus métaboliques clés ciblés dans ce projet doctoral ont été mesurées tout au long d'un suivi saisonnier *in situ*. Pour cela, des marqueurs de la balance énergétique et de sa régulation, de la densité mitochondriale, les réserves énergétiques ainsi que le métabolisme aérobie et anaérobie ont été mesurés de mai 2018 au mois de juin 2019 sur une population de dreissènes du canal de la Meuse à Commercy. La campagne de prélèvements a été menée selon un rythme mensuel ou bimensuel en fonction des périodes et de l'accessibilité des organismes.

2. Principaux résultats

La plupart des marqueurs du métabolisme énergétique ciblés ici présente un schéma de réponses attendu au regard des études antérieures menées chez cette espèce ainsi que chez d'autres bivalves marins. Globalement, le métabolisme est plus actif en période estivale qu'en période hivernale. L'activité de la phosphorylation oxydative augmente lorsque les moules entrent en période de reproduction. A la fin de l'automne, cette activité diminue et les dreissènes reforment leur stock de réserves. Les marqueurs de la balance énergétique (nucléotides adénylés et IMP) et de sa régulation (AMPk and AMPd) présentent des motifs de réponses différents. La charge énergétique en adénylate diminue drastiquement à partir du mois d'avril 2019 traduisant un potentiel stress subi par la population de dreissènes étudiée. Le développement des gonades a également été suivi tout au long du cycle annuel. En 2018, le cycle de reproduction était similaire à ce qui a déjà été observé sur cette même population (Palais et al., 2011). La période de développement des gamètes s'étend de l'hiver au printemps avant la ponte des gamètes qui peut durer jusqu'au mois de septembre qui s'en suit une courte période de repos. Cependant, en 2019, un décalage dans la durée de la maturation des gamètes a été observé entre les individus mâles et femelles. Plusieurs événements climatiques exceptionnels ont été enregistrés lors de l'étude. En effet, des périodes de canicules ainsi que de crues ont été recensées durant l'été 2018 et le début de l'année 2019. L'ensemble de ces phénomènes, associés à un potentiel stress subi par les moules détecté à partir d'avril 2019, peut être une cause de ce décalage de ponte entre les individus mâles et femelles. A chaque date de prélèvement, les paramètres physico-chimiques généraux de l'eau ont été mesurés. L'étude de la corrélation entre ces paramètres et l'ensemble des réponses des marqueurs étudiés a permis de discerner l'influence des variations saisonnières des paramètres abiotiques sur les réponses du métabolisme énergétique : la plupart des marqueurs ciblés sont fortement corrélés positivement ou négativement avec les paramètres physico-chimiques de l'eau. D'un autre côté, certains marqueurs comme l'expression relative des gènes codant pour les différents complexes de la PHOSOX et l'*ampd* ainsi que la concentration en ATP ne sont pas corrélés et donc a priori pas influencés par les fluctuations saisonnières des paramètres physico-chimiques suivis. Ils pourraient alors constituer de bon biomarqueurs potentiels à caractériser dans une perspective de biosurveillance.

L'ensemble des résultats de cette étude a été valorisé sous la forme d'un article publié dans le journal Science of the Total Environment.

**Seasonal monitoring of cellular energy metabolism
in a sentinel species, *Dreissena polymorpha* (bivalve):
Effect of global change?**

Science of the Total Environment, Volume 725, July 2020

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138450>

Authors: Fanny Louis^{a*}, Béatrice Rocher^b, Iris Barjhoux^a, Florence Bultelle^b, Odile Dedourge-Geffard^a, Véronique Gaillet^a, Isabelle Bonnard^a, Laurence Delahaut^a, Sandrine Pain-Devin^c, Alain Geffard^a, Séverine Paris-Palacios^a, Elise David^a

^aUniversité de Reims Champagne-Ardenne, INERIS, SEBIO UMR I-02, Reims, France

^bUniversité du Havre, INERIS, SEBIO UMR I-02, Le Havre, France

^c Université de Lorraine, CNRS, LIEC, Metz, France

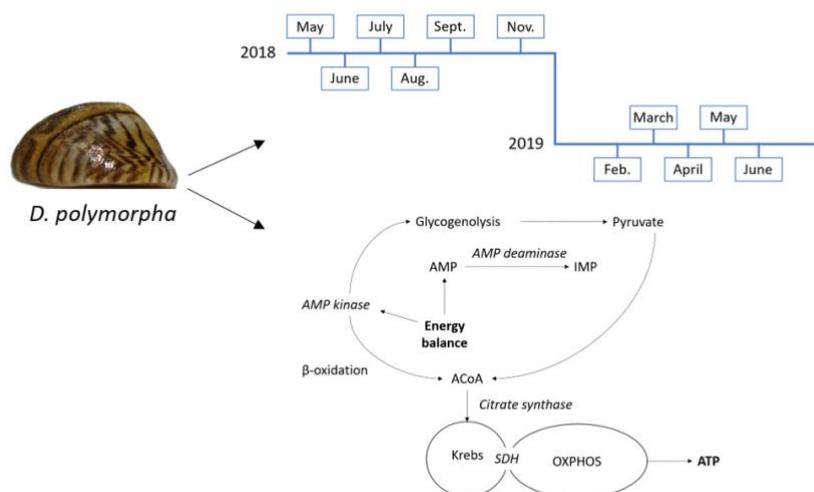
*Corresponding author: Fanny LOUIS, fanny.louis@univ-reims.fr

SEBIO, UFR SEN, Campus Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims cedex 2, France

Highlights:

- Energy metabolism disturbances were observed from April to June 2019
- Asynchronous spawning between male and female organisms was noticed in 2019
- Markers are potentially proposed in a biomonitoring perspective

Graphical abstract:



Keywords: energy, ATP, *Dreissena polymorpha*, biomarkers

Abstract: Aquatic organisms such as bivalves are particularly sensitive to seasonal fluctuations associated with climate changes. Energy metabolism management is also closely related to environmental fluctuations. Changes in both biotic and abiotic conditions, such as the reproduction status and temperature respectively, may affect the organism energy status. A bivalve sentinel species, *Dreissena polymorpha* was sampled along its one-year reproduction cycle *in situ* (2018–2019) to study natural modulations on several markers of energy metabolism regarding seasonal variations *in situ*. A panel of different processes involved in energy metabolism was monitored through different functions such as energy balance regulation, mitochondrial density, and aerobic/anaerobic metabolism. The typical schema expected was observed in a major part of measured responses. However, the monitored population of *D. polymorpha* showed signs of metabolism disturbances caused by an external stressor from April 2019. Targeting a major part of energy metabolism functions, a global analysis of responses suggested a putative impact on the mitochondrial respiratory chain due to potential pollution. This study highlighted also the particular relevance of *in situ* monitoring to investigate the impacts of environmental change on sentinel species.

1. Introduction

Depending on scenarios, a 0.3 to 0.7 °C increase is predicted in the mean Earth surface temperature by 2019 to 2035 (IPCC, 2014). The global climate change also includes the appearance of “exceptional” climatic events. These occurrences also bring important floods or droughts and may have an impact on aquatic populations. Since cellular energy production is dependent on multiple factors such as temperature, food availability or oxygen content (Sokolova et al., 2012), these events could significantly affect the metabolism management of organisms. Indeed, all biochemical and physiological processes are closely related to the amount of energy available within organisms (Frieder et al., 2017; Somero, 2010). Energy metabolism management is also closely related to natural environmental fluctuations. Seasonal temperature variations may lead to the establishment of adaptation and acclimation processes such as metabolic restructuring. Indeed, the aerobic metabolism can be favoured in order to improve the energy available for fitness-related functions including growth and reproduction (Hochaka and Somero, 2002; Salin et al., 2015; Sokolova and Pörtner, 2001; Sokolova et al., 2012). Environmental factors directly modulate cellular and mitochondrial energy management and the energy allocation to vital functions such as maintenance, growth, reproduction and reserves storage (Amiard and Amiard-Triquet, 2008; Hong et al., 2020; Verslycke et al., 2004). In invasive species, reproduction represents a large part of energy allocation (Louis et al., 2019). Seasonal modulations of water physicochemical parameters influence the gonadal maturation and spawning regulation. Fluctuations in energy investment priorities between vital functions have already been observed during the spawning in marine bivalves (Cheung, 1993; Louis et al., 2019; Petes et al., 2008). In this way, natural fluctuations monitoring could be a potential lead to understand energy metabolism management and ATP production in the model species, *Dreissena polymorpha*, along one reproduction cycle.

Mitochondria are the key organelles involved in multiple essential cellular processes (Lane, 2005; Sokolov et al., 2019). They provide >90% of cellular ATP and serve as a cellular centre connecting energy metabolism, stress response, signalling and cell survival (Lane, 2007; Monlun et al., 2017; Naquet et al., 2016). Studies on different model species have demonstrated that mitochondria are particularly sensitive to environmental stressors (Kurochkin et al., 2011; Sokolov et al., 2019; Sokolova et al., 2012). In such context, mitochondria are considered as a stress target and/or the coordinating centre of the adaptive cellular response (Eisner et al., 2018; Sokolova and Lannig, 2008). Positive thermal stress is

known to reduce ATP production leading thus to an increase of oxidative phosphorylation (OXPHOS) activity and of reactive oxygen species (ROS) production associated with oxidative damage in bivalve species (Cherkasov et al., 2010; Hraoui et al., 2020; Sokolova et al., 2005). The environmental temperature increase has been associated with a higher respiration rate, leading to a strong proton leak and a gradual mitochondria dissociation in *Crassostrea virginica* (Sokolova and Pörtner, 2001; Sokolova et al., 2005). An increase of mitochondrial damage could also engage the pathway of apoptosis in order to eliminate damage and ensure survival (Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2017).

For freshwater risk assessment, integrative biomarkers are required in an active biomonitoring perspective. As the energy metabolism is crucial for all physiological reactions, several studies were realised to develop new energy markers in different model species. The energy cost of metabolism management against environmental disturbances has been discussed in several reviews (Calow, 1991; Calow and Forbes, 1998; Sokolova et al., 2012). The scope for growth and/or the cellular energy charge was investigated in *Dreissena polymorpha* along a pollution gradient (Smolders et al., 2004) or after a metal stress (Louis et al., 2019). These studies pointed out a decrease of the energy allocation to growth and reproduction in presence of stress. Furthermore, the measurement of energy reserves is a useful tool to provide information about the global organism's energy available for maintenance, growth and reproduction (Palais et al., 2011; Sprung, 1995). The adenylate energy charge (AEC) is used as a biomarker of the global health status of the organisms (Le Gal et al., 1997; Smolders et al., 2004). After a chemical contamination, Sokolova et al. (2000, 2005) highlighted the decrease of the AEC in the oyster (*Crassostrea virginica*) and in the White Sea periwinkles (*Littorina spp.*).

The zebra mussel, *Dreissena polymorpha* is an invasive filter feeder bivalve widespread in European freshwaters. Due to several biological characteristics such as its abundance, wide geographical distribution and high filtration activity, *D. polymorpha* has been used as a model species for freshwater biomonitoring for several years (de Lafontaine et al., 2000; Faria et al., 2009, Faria et al., 2011; Kerambrun et al., 2016; Pain and Parant, 2007; Palais et al., 2011). At the cellular level, mitochondria activities are usually reflected by the electron transport system (ETS). Potet et al. (2016) have observed an increase of ETS activity under a metal stress and a decrease after a thermal or dietary stress in *D. polymorpha*. At the molecular level, some units of the OXPHOS were followed (ATP synthase and cytochrome c

oxidase). It was shown that the relative gene expression level of ATP synthase increased in summer (Kerambrun et al., 2016).

In this study, cellular energy production (ATP) and management were monitored during one reproduction cycle *in situ*. The whole energy metabolism was targeted through different functions such as energy balance regulation, mitochondrial density and aerobic/anaerobic metabolism. Digestive gland was principally targeted for gene expression and enzymatic activities. Indeed, this organ, similarly to vertebrate liver, play a key role in detoxification mechanisms and has already been noticed as a target for bioaccumulation and biomarker analysis in molluscs (Faggio et al., 2018; Rodrigo and Costa, 2017). Furthermore, most of literature focused on digestive glands concerning biomarker analyses analysis (Faria et al. 2014; Potet et al., 2016, 2018; Louis et al., 2019). In parallel, energy reserves, condition index and the gonadal stage were analysed. As the respiratory chain may be a major source of ROS production, lipid peroxidation content was also measured. Our approach allows a better understanding of the physiology of *Dreissena polymorpha*, under changing natural fluctuations. Energy metabolism studies in *Dreissena polymorpha* are still too few and are only taking in account one or 2 parameters concerning energy management (Louis et al., 2019; Weber et al., 2020). A previous study of our laboratory aimed to characterise the reproduction cycle of the same population of dreissenids. Indeed, Palais et al. (2011) studied *D. polymorpha* gonadal development stage as well as reserves storage for one year. Since this sentinel species is commonly used for *in situ* monitoring, it is essential (1) to characterise the response pattern of monitored markers along the years and (2) to develop new and complemental markers of energy metabolism.

2. Material and Methods

2.1. Organisms collection

Specimens were hand-collected in the Meuse channel (Euville, France, E05°37'28", N48°44'59") for one reproduction cycle from May 2018 to June 2019 with a monthly or bimonthly frequency. This site was chosen since data about physiology responses were available on this population of *D. polymorpha* as well as the reproduction cycle characterisation along one year (Palais et al., 2011). Organisms with a length between 15 and 25mm were selected in a depth of 1.5m maximum. Organisms were measured and weighted in order to determine the condition index using the following formula: CI = fresh weight / volume (length × height × width). For gene expression and enzymatic activity

analysis ($n = 12$ for each sampling time), digestive glands were dissected and snap frozen. For reserve contents measurement ($n = 12$), the whole organism was dissected and snap frozen. Whole body mussels were frozen for energy nucleotide contents analysis ($n = 10$). All of these procedures were done in the field, except for organisms intended to the gonadal development analysis that were quickly transported to the laboratory in field water ($n = 12$). All marker measurements were realised without taking into account organisms' gender. Dissections and freezing were performed at the sampling site in order to avoid mRNA and protein degradation and to limit marker measurements bias.

2.2 Environmental parameters

At each sampling time, physicochemical parameters were recorded. Water samples (10 L) were carried to the laboratory and processed for analysis in black container. Ammonium (NH_4), nitrates (NO_2), nitrites (NO_3) and chlorophyll a (chl a) contents were measured by spectrophotometric analyses. Chemical oxygen demand and suspended matter were measured by electrochemical and gravimetric methods, respectively. The temperature was recorded every 10min from June 2018 to June 2019 using two probes (TidbiT v2 Temp) installed on the site. The average temperature was calculated for each month.

2.3 Gene expression

Total RNA was extracted from digestive gland using TriReagent (Euromedex) following manufacturer's protocol. RNA integrity was estimated by UV revelation after electrophoresis on 1% agarose gel in TBE (Tris Borate EDTA 0.5%) buffer. RNA purity was estimated by the measurement of the ratio of absorbance at 260 and 280nm. Reverse transcription was performed on 400ng of total RNA using Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) according to manufacturer's instructions. The reaction was conducted at 42°C for 30min using a PCR Mastercycle (Eppendorf).

Gene expression levels were carried out by real-time quantitative PCR using Absolute Blue qPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. Specific primers are given in Table 1. Energy balance regulation was studied through *ampk* (AMP-activated protein kinase) and *ampd* (AMP deaminase) gene expressions. Concerning the OXPHOS, three genes were selected: beta subunit ATP synthase (*atp*), cytochrome b (*cytb*), cytochrome c oxidase (*cox*) and succinate dehydrogenase (*sdh*). Another unit of the respiratory chain, the alternative oxidase (*aox*) was recorded. Gene expression levels were also measured for citrate synthase (*cs*) and lactate dehydrogenase (*ldh*), an

anaerobic metabolism enzyme. The optimal primer quantity was evaluated across a range of concentrations between 150 and 600nM. Dilutions of the cDNA mixture between 1:10 and 1:1000 were tested to calculate the PCR efficiency. The PCR steps consisted in 15 min initial denaturation at 95°C followed by 40 cycles of heat denaturation at 95°C for 10sec, annealing at 60°C for 60sec and were carried out in a CFX Manager (BioRad) on 1/10^e of ADNc. The relative gene expression level was calculated using the Pfaffl method (Pfaffl, 2001) taking into account the PCR efficiency and normalized by the geometric mean of the two housekeeping genes (actine and ribosomal protein S3) according to Navarro et al. (2011).

Table 1. Summary of the primers used for gene expression measurements. Abbreviations, NCBI accession numbers of the original sequences of the target genes in D. polymorpha.

Gene	Abbreviation	NCBI	F primers	R primers
Actin	<i>act</i>	AF082863	CCTCACCTCAAGTACCCCAT	TTGGCCTTTGGGTTGAGTG
Alternative oxidase	<i>aox</i>	Q9P959	GTGAACCATACCCTCGCCTC	TGTAGTGACTGCGGATGGTC
AMP deaminase	<i>ampd</i>	Q9DBT5	ACCCAGCCAGTGTGTTTCA	TTTGCTCGTGGACTCAACGT
AMP kinase α subunit	<i>ampk</i>	Q8BRK8	TGCTAAATGAAAGAGGTGACGC	CATGTGGTGGCATATACGATGT
ATP synthase	<i>atp</i>	JQ781135	GACTCCACCTCCCGTATCCT	TCCTCTGAAAGCTCGTCCAT
Citrate synthase	<i>cs</i>	MN579511	GTGCCCTGTCAGACCCTTAC	CTGTCCTGCCTTGAGTGTGT
Cytochrome b	<i>cytb</i>	DQ072120.1	CGCCACTTTAAAGCGATTTTT	TGGGTCAGCAAATAGATCTGG
Cytochrome c oxidase	<i>cox</i>	AAL55513	AGGCCCTGCGATAGATTTTT	AAAGGGACCCGGTAAAATTG
Lactate dehydrogenase	<i>ldh</i>	Q7TNG8	TGCCAAACTACATTGCCAAAT	ATTGGGATTGGCAAACGGGA
Ribosomal protein S3	<i>s3</i>	AJ517687	CAGTGTGAGTCCCTGAGATACAAG	AACTTCATGGACTTGGCTCTCTG
Succinate dehydrogenase	<i>sdh</i>	Q9YHT2	TAGACCGTCCAGTTAGCGC	CCTCTGCCACACATGTACGT

2.4 Enzymatic activities

The set of enzymatic activities was individually measured in each mussel. The digestive glands were weighted and crushed in 50mM phosphate buffer containing protease inhibitors (pH 7.6, supplemented with 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1mM L-serineborate) at 8:1 (v/w) ratio. Samples were then centrifuged (3000g, 10min, 4°C). The supernatant was collected for the enzymatic activity measurement. Assays were performed with an automated spectrophotometer (Galery, ThermoScientific) and with a spectrofluorimeter (SAFAS, Xenius). ETS, lactate dehydrogenase (LDH) as well as proteins content and lipid peroxidation were measured according to Garaud et al. (2016) and Potet et al. (2016). Caspase-3 activity was measured according to Garaud et al. (2016) in cytosolic extract.

For cytochrome c oxidase (COX) activity, supernatant was diluted to 1:45 in 100mM Tris buffer (pH 8.1). Reduced cytochrome c at 1mM (Merck) supplemented with 16% of ascorbate (Merck) was added to the previous dilution. Cytochrome c oxidation was then monitored for 3min at 550nm. For citrate synthase (CS) activity, supernatant was diluted to 1:55 in 0.1M Tris buffer (pH 8.1) supplemented with 0.15mM DTNB (Merck) and 0.2mM acetyl co enzyme A (Merck). The activity was first monitored 3min at 420nm. A second measure was performed after the addition of 4mM oxaloacetate (Merck). Enzymatic activity was expressed in U.g⁻¹ proteins (molar extinction coefficient (ε) reduced cytochrome c = 7040M⁻¹.cm⁻¹, ε oxaloacetate = 14140M⁻¹.cm⁻¹).

2.5 Energy reserve contents

Organisms were weighted and crushed in 50mM phosphate buffer (pH 8) at 5:1 (v/w) ratio. Protein, lipid and glycogen contents were measured on the homogenate. Protein content was determined by the Bradford's method. Lipid and glycogen contents were measured according to the method of Van Handel (1985) and adapted by Plaistow et al. (2001). Results were expressed in mg.g⁻¹ of fresh weight (FW).

2.6 Energy nucleotide contents

Nucleotides extraction was realised as described by Sokolova et al. (2005). Briefly, frozen mussels were quickly dissected and lyophilized for 48h. Samples were then crushed in 0.6M perchloric acid (Merck) solution, centrifuged (3000g, 10min, 4°C) and the supernatant was collected. The pH of each extract was adjusted to 5 - 6.5 with 5mM potassium hydroxide and 1M bicine solution. Precipitated potassium perchlorate was removed by a second centrifugation. Extracts were then filtered (0.45μM) and stored at -80°C. Concentrations of ATP, ADP, AMP and IMP were measured with an HPLC system and Nucleosic C18 column (Nucleosil) according Sokolova et al. (2005). The separation was performed at a flow rate of 0.8ml.min⁻¹ using a mobile phase of 1M phosphate buffer with 5% methanol (pH 6) for 15min. Nucleotide contents were monitored at 254nm and nucleotide quantifications were calculated using ATP, ADP, AMP and IMP standards (Sigma) of 20, 10, 2 and 10μM, respectively.

Adenylate energy charge (AEC) was calculated from the tissue concentrations of adenylates as follows:

$$AEC = \frac{[ATP] + 0.5 \times [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

2.7 Gonadal development analysis

Dissected organisms (without byssus and shell) were fixed in Bouin's aqueous solution for 24h followed by successive alcohol dehydration baths from 50° to 100°. After dehydration, samples were placed in a butanol solution in order to permeate all tissues. Samples were then paraffin-embedded and 7µM sections were prepared from the foot to gonads of organisms. Sections were stained with picro indigo carmine and solid nuclear red and observed with a microscope to sex the gonads and to assign them to a development stage (Gist et al., 1997; Palais et al., 2011). This method was based on the size and the number of present oocytes as well as spermatogenesis steps.

2.8 Statistical analysis

Marker responses were analysed by a one-way ANOVA to assess time effect. Parametric (Tukey) or non-parametric (Kruskal-Wallis) post-hoc tests were processed on markers and obtained *p*-values were adjusted for multiple comparisons by a correction method (Benjamini and Hochberg). Normality and homoscedasticity of the data were tested with Shapiro and Bartlett tests respectively. Correlations were performed on the total data set. A clustered map was built on a complete linkage using Euclidean distance measures between different variables. The obtained values can be seen as a robust approximation of the Pearson correlation. A global analysis of biomarker results was also performed with a Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) to identify the overall capacity of biomarkers to discriminate the months and to define the most relevant markers among the battery. Relevance of marker responses was based on the individual role of each marker in the overall model, estimated by the VIP (Variable Importance in the Projection). Only markers with a $VIP > 1$ were considered significant in the model (PLS-DA). Since only four organisms could be sampled in February (used for gene expression) and 16 in March 2019 (4 for gene expression, 4 for enzymatic activity, 4 for nucleotide contents and 4 for histology), the results obtained for these months are presented in the different figures but the data were excluded for statistical analysis. A threshold of $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analyses were performed using R software (R Development Core Team, 3.5.0).

3. Results

3.1 Environmental parameters

Water physicochemical features are reported in Table 2 and Fig. 1. Water temperature varied seasonally, the lowest values were recorded in fall (November) and the highest values were recorded in summer (August). Strong daily temperature variations were observed in August (5°C min - 30°C max) and November (-2°C min – 20°C max). In 2019, suspended matter values were higher than in 2018 as well as the mean of nitrates contents. May and June 2019 chl a levels were not detected. All physicochemical parameters measured along the study complied with the framework directive on water (2000/60/CE, 2000).

Table 2. Environmental parameters recorded in situ or in water samples: water physico-chemistry and contamination measurements; dO₂: dissolved oxygen; SM: suspended matter;

Month	Temperature (°C)	Conductivity (µS.cm ⁻¹)	dO ₂ (mg.L ⁻¹)	SM (mg.L ⁻¹)	COD (mg.L ⁻¹)	NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)	Chl a (µg.L ⁻¹)	Hydrocarbon (mg.L ⁻¹)
May-18	22.7	497	9.1	ND	15.5	0.14	18	0.14	0.2	ND
June-18	22.9	485	9.8	ND	17.4	0.08	15	0.10	0.4	ND
July-18	24.2	505	9.4	4	18.9	0.13	12	0.10	0.6	0.002
August-18	21.6	410	7.1	5	14.2	0.11	8	0.09	6.7	ND
September-18	17.8	410	9	8	14.2	0.13	7	0.07	2.7	ND
November-18	6.3	740	13	5	8.88	0.08	11	0.01	4.1	0.001
February-19	5.8	521	13.2	20	16.2	0.09	26	0.09	9.8	ND
March-19	9.3	491	10.7	24	16.5	0.12	19	0.19	1.9	ND
April-19	12.5	520	10.4	20	40.5	0.09	21	0.02	1.5	ND
May-19	15.8	547	9.7	25	11.7	0.19	14	0.04	ND	ND
June-19	20.4	527	9.6	20	13.8	0.1	13	0.09	ND	ND

COD: chemical oxygen demand; NO₂⁻: nitrites; NO₃⁻: nitrates; NH₄⁺: ammonium; Chl a: chlorophyll a; ND: not detected.

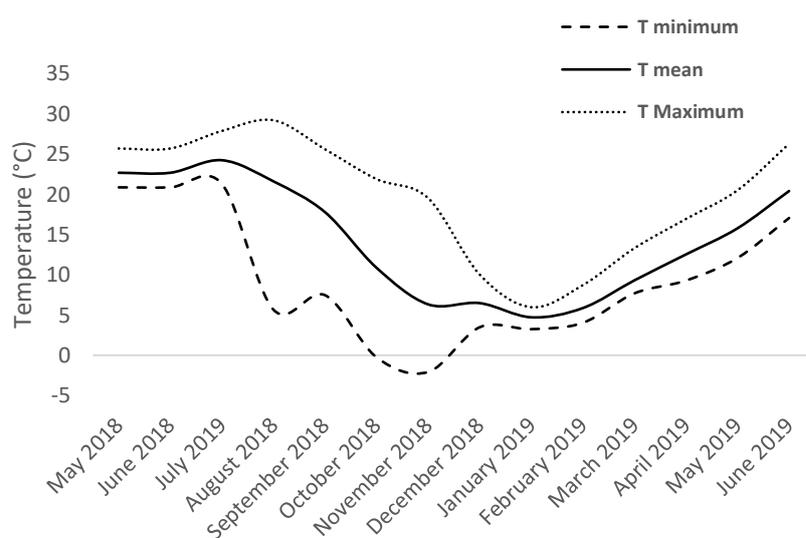


Fig. 1. Temperature continuously measured on sampling site. Means, minimum and maximum temperatures are presented.

3.2 Reproduction cycle

Gonadal development stages are presented in Fig. 2. Since only one male was observed in November 2018 in histological analysis, the male gonadal index could not be determined. In 2018, males spawned their gametes between July and September (Fig. 2A) and females between May and August (Fig. 2B). The spawning events were synchronous for both sexes in 2018. Females' gonadal development seemed to be more premature than males' development in 2019. A shift was observed between males and females' gonadal stage between April and June 2019. Indeed, the spawning of oocytes began in April when males were halfway between maturation and pre-spawn stage. In addition, in June 2019, all the females had spawned their gametes whereas no male had spawned theirs. It is also necessary to take into account the sampling randomness resulting in a sex ratio rarely equals to 1:1.

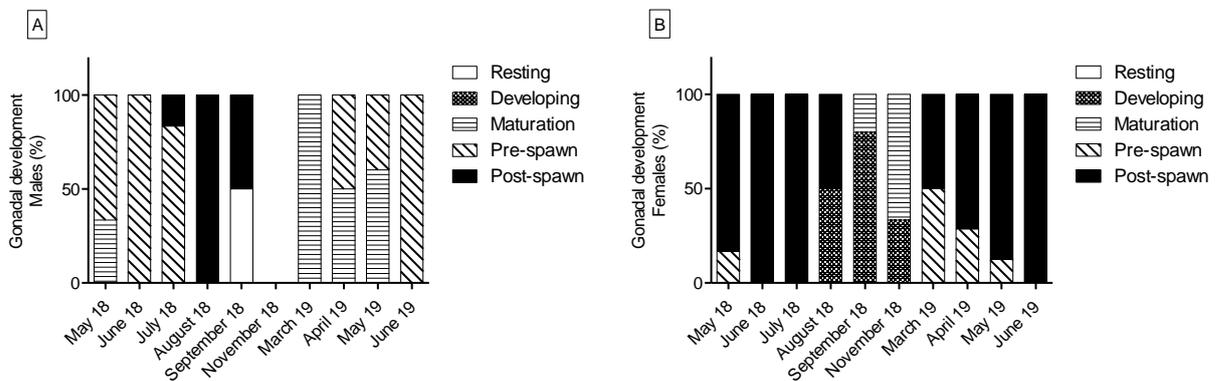


Fig. 2. Gonadal development stage for males (A) and females (B) according to the months. Different development stages are presented in terms of percentage of each stage ($n=12$).

3.3 Global health status

Condition index (CI) (Fig. 3A), lipid and protein contents (Fig. 3C-D) showed globally the same response variations. CI values decreased just after the spawning (July and August 2018) and then gradually increased until the next reproduction period (from September 2018 to April 2019). Lipid contents also decreased in reproduction period (from August to November 2018) and increased from April 2019. Although protein content variations were less marked, it decreased during the gametes spawning and then increased again. Concerning glycogen reserves (Fig. 3B), a significant decrease was observed in August 2018 followed by a significant increase until November 2018 ($5-10\text{mg.gFW}^{-1}$). From April 2019, glycogen content reached the same level as in August 2018 ($< 2\text{mg.gFW}^{-1}$).

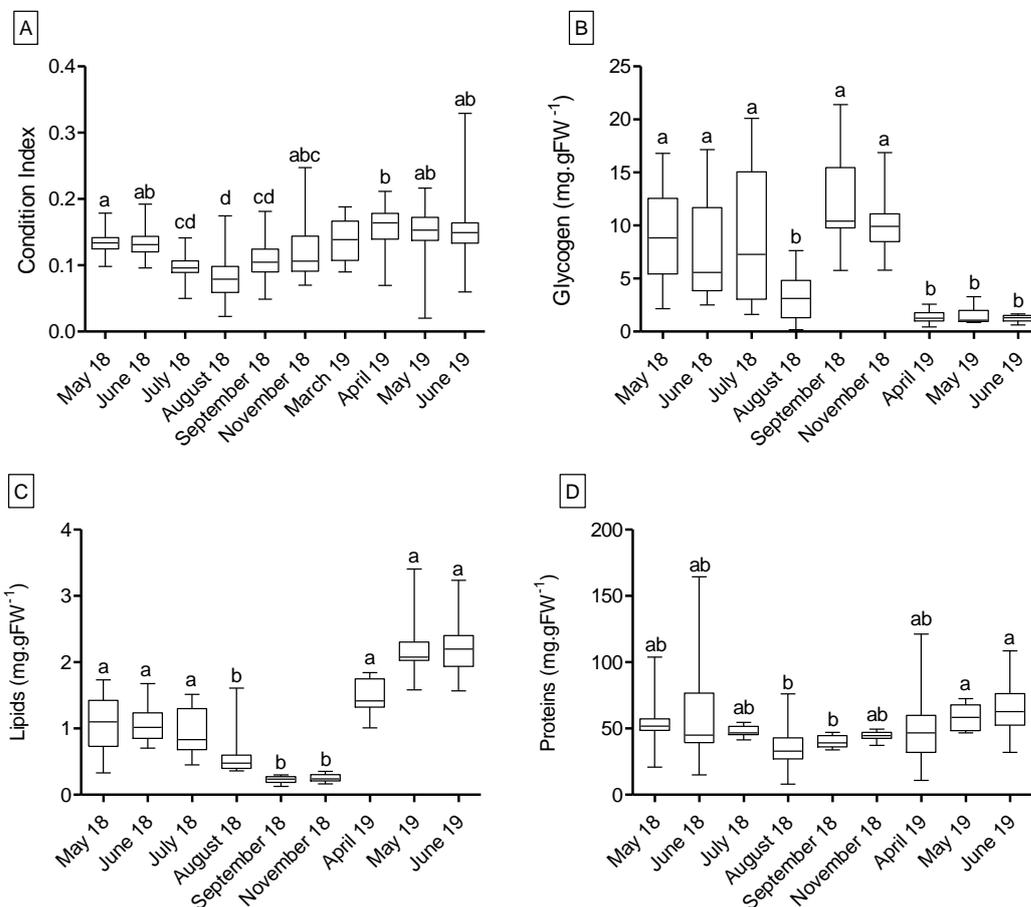


Fig. 3. Condition index ($n=60$) (A), glycogen (B), lipids (C) and proteins (D) content ($n=12$) according to the months. Data are presented as median \pm SD, min, max. Different letters indicate significant differences between months ($p < 0.05$).

3.4 Mitochondria efficiency

Mitochondria efficiency was assessed in our study by the OXPHOS and the citrate synthase activity and transcriptional level. CS activity increased during the pre-reproduction and reproduction periods while trend to decrease during post reproduction and rest (Fig. 4A). Concerning COX activity, a significant decrease since April 2019 was observed (Fig. 4B). The ETS activity showed a 2-fold increase in June 2018 and came back to lower level in July and August (Fig. 4C). A gradually increase was then observed from September 2018 to June 2019. Globally, relative gene expression levels exhibit two distinct patterns. OXPHOS

subunits genes (*cox*, *atp* and *cytb*) reach their highest levels during the pre-reproduction and reproduction periods while they exhibited a marked decrease during post reproduction and rest periods (Fig. 5A-B-C). On the contrary, citrate synthase gene expression (*cs*) level was significantly higher during the rest period (Fig. 5D). No difference of *sdh* relative gene expression level could be noticed along the year (Fig. S1).

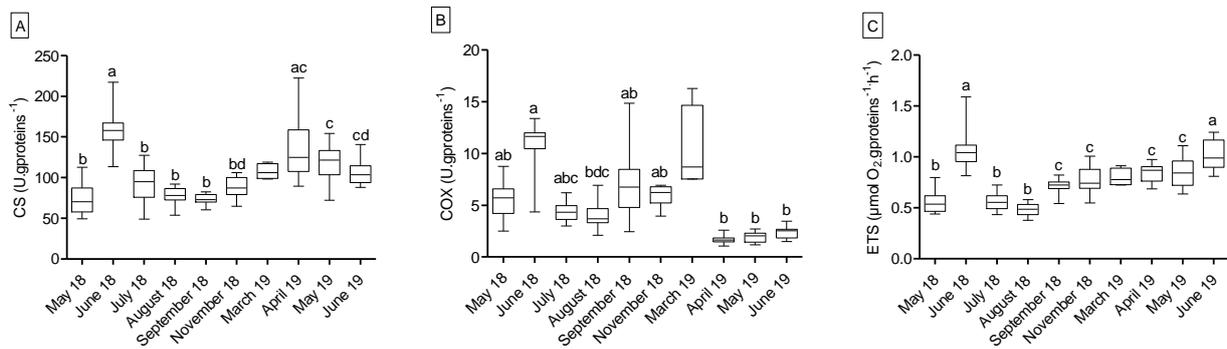


Fig. 4. CS (A), COX (B) and ETS (C) activities according to the months. Data are presented as median \pm SD, min, max ($n=12$). Different letters indicate significant differences between months ($p < 0.05$).

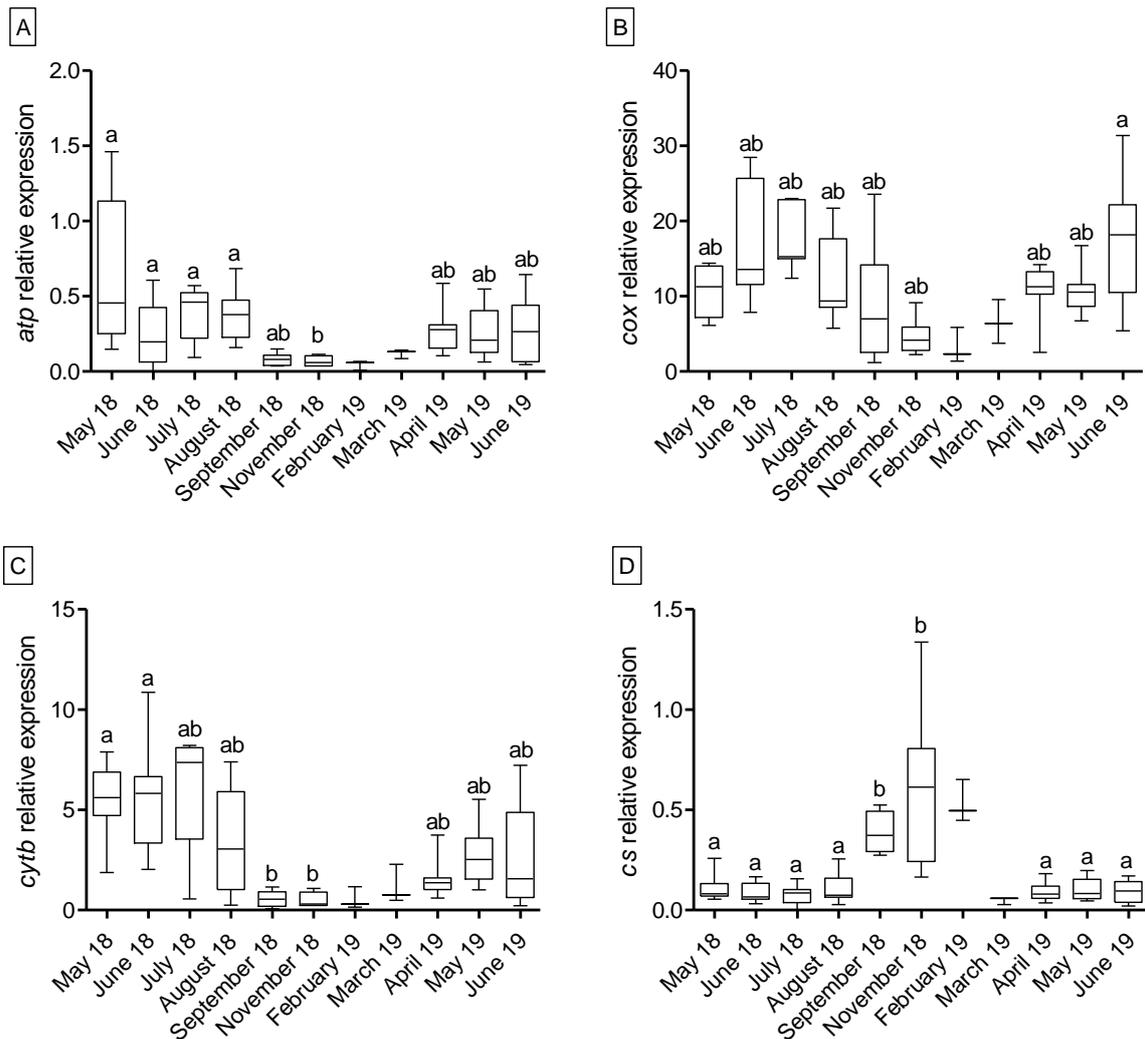


Fig. 5. *atp* (A), *cox* (B), *cytb* (C) and *cs* (D) relative gene expression levels according to the months. Data are presented as median \pm SD, min, max (n=12). Different letters indicate significant differences between months ($p < 0.05$).

3.5 Energy balance

Energy balance regulation was studied through *ampk* and *ampd* gene expressions (Fig. 6). The transcript levels of *ampk* (Fig. 6A) gradually increased from May 2018 to November 2018 and decreased significantly in April 2019. Levels stayed low until June 2019. Although no significant difference could be observed, the expression of *ampd* gene (Fig. 6B) showed the same pattern of variation. ATP and ADP contents presented a similar progression over the year than *ampk* and *ampd* gene expression levels (Fig. 7, part I: A-B). Energy nucleotides concentration was stable from May 2018 to September 2018. A strong increase was observed in November 2018 followed by an important reduction of ATP and ADP contents in April 2019. The pattern of AMP and IMP contents were similar but they slightly differed from the

previous markers (Fig. 7, part I: C-D). Indeed, the concentration of these nucleotides were stable from May 2018 to August 2018 and gradually increased until April 2019 where they reached a steady state ($p < 0.05$). A correlation was observed between ATP content and the expression of *ampk* involved in energy balance regulation but also with *cs* gene expression, glycogen and lipid contents (Table S1). The AEC remained stable from May 2018 to November 2018 (0.5-0.7). Nevertheless, a significant decrease was observed in April 2019 (0.13-0.32) (Fig. 7, part II).

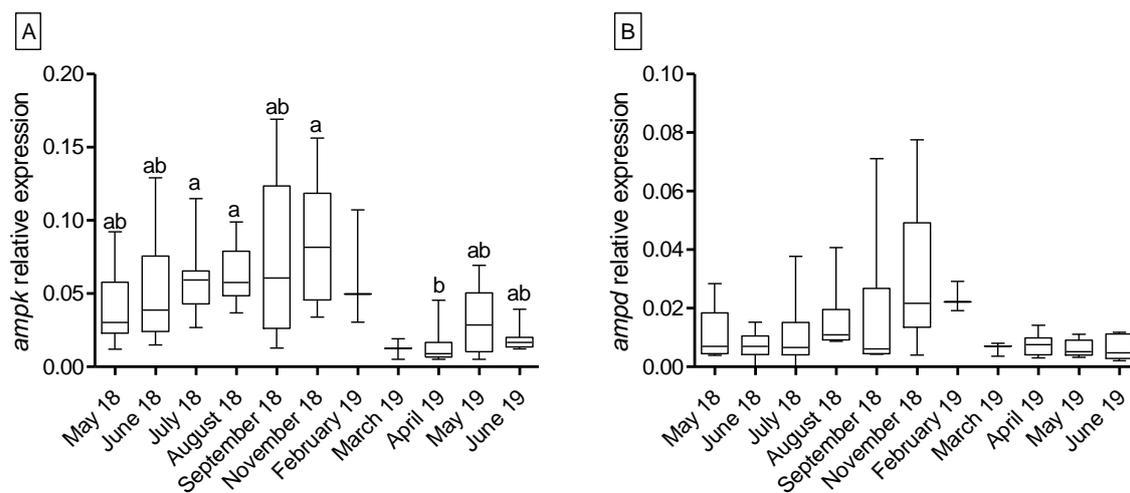


Fig. 6. *ampk* (A) and *ampd* (B) relative gene expression levels according to the months. Data are presented as median \pm SD, min, max ($n=12$). Different letters indicate significant differences between months ($p < 0.05$).

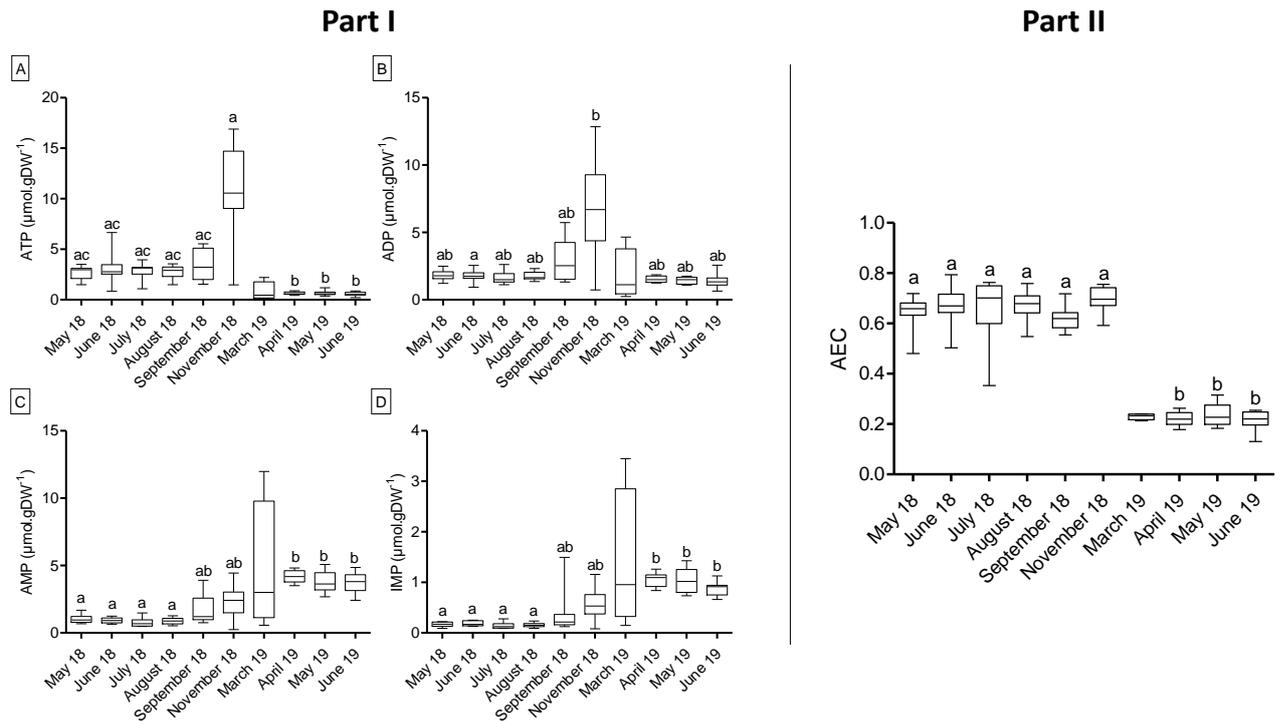


Fig. 7. Part I: ATP (A), ADP (B), AMP (C) and IMP (D) contents. Part II: adenylate energy charge (AEC). Results are presented according to the months and data are expressed as median \pm SD, min, max ($n=12$). Different letters indicate significant differences between months ($p < 0.05$).

3.6 Stress markers

Anaerobic metabolism was assessed through *ldh* gene expression and LDH activity, both presenting a similar pattern of responses (Fig. 8 A-B). Values were higher in pre-reproduction and reproduction periods than during post-reproduction and rest periods. A gradual increase of *aox* relative gene expression was observed from May 2018 to August 2018 and it decreased until June 2019 (Fig. 8C). On the contrary, lipid peroxidation (LOOH) content was stable from May 2018 to November 2018, while it displayed a significant increase from April 2019 compared to July and August 2018 (Fig. 8D). LOOH concentration was negatively correlated with condition index, energy reserves (lipids and glycogen). Positive correlations were also observed between LOOH and LDH activity and AMP/IMP contents (Table 3). Caspase-3 (CSP3) activity was measured only on 7 sampling times (May, June, July, August and November 2018 and May and June 2019). Its activity increased significantly from November 2018 to June 2019 (Fig. 8E). Negative correlation between CSP3 activity and *cytb* gene expression was noticed while positive correlation with stress

markers like LOOH measurements ($r^2 = 0.57$, $p < 0.05$) and IMP/AMP contents were observed (Table 3).

Table 3. Pearson's correlations between the lipid peroxidation and the caspase-3 activity with

	Lipid peroxidation	Caspase-3 activity
	r^2	
Lipids	0.59	n.s
Glycogen	0.4	n.s
[AMP]	0.71	0.91
[IMP]	0.68	0.88
Condition Index (CI)	0.57	n.s
LDH activity	0.55	n.s
<i>cytb</i> gene expression	n.s	0.51

the target markers for the total dataset. Only significant correlations for LOOH content and/or caspase activity are presented.

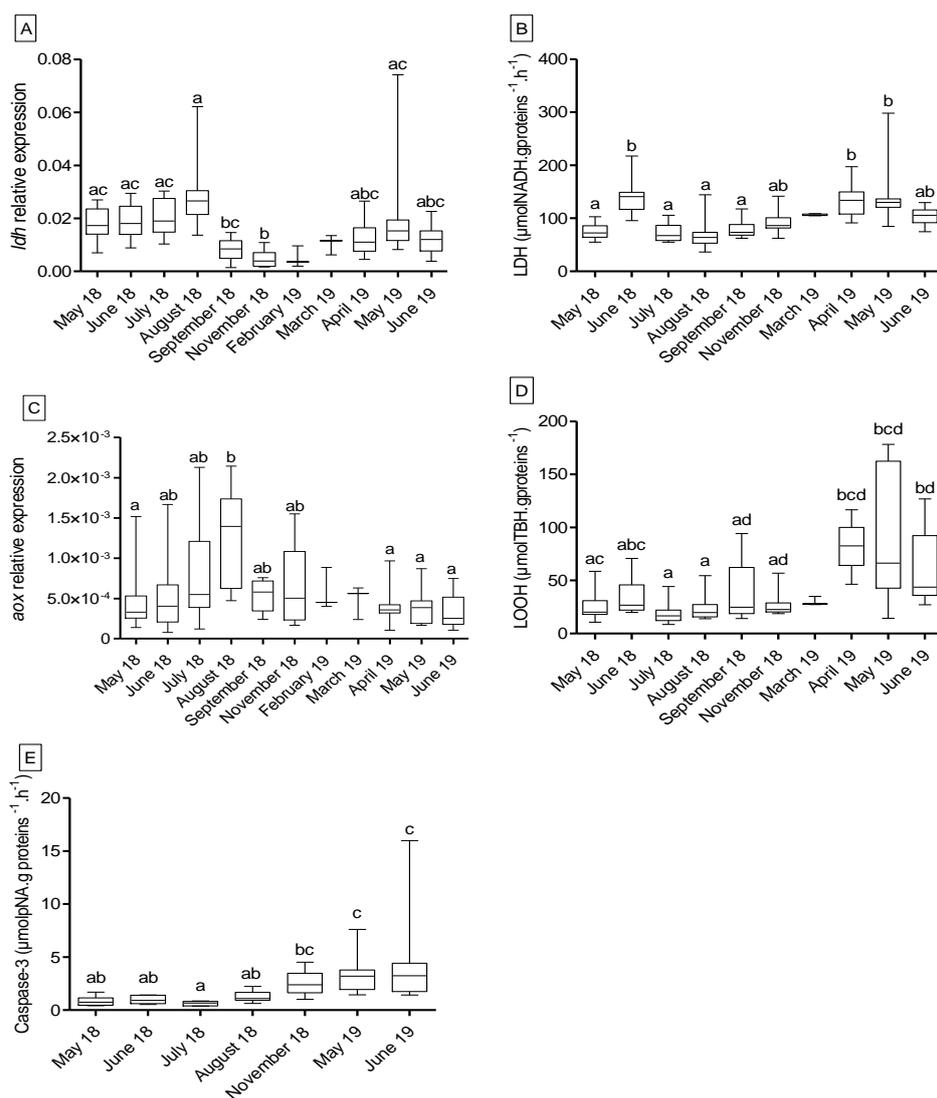


Fig. 8. *ldh* relative gene expression level (A), LDH activity (B), *aox* relative gene expression level (C), lipid peroxidation (LOOH) (D) and caspase-3 activity (E) according to the months. Data are expressed as median \pm SD, min, max ($n=12$). Different letters indicate significant differences between months ($p < 0.05$).

3.7 Global analysis

A PLS-DA model was built and explained 68.2% of between-month variance with the two first axis. The first three VIP markers were *atp*, *cs* and *ldh* gene expressions (Table S2). Caspase-3 activity was excluded of the total data set.

The PLS model built explained 70.6% of between physico-chemical parameters variance with the two first axis. PLS allowed us to identify the importance of each parameter on biological responses. A clustered map was then built. The rows and columns were reordered according to hierarchical clustering method to identify interesting patterns.

According to the cluster results (Fig. 9), stress markers as LOOH and IMP content, condition index and LDH activity were strongly positively correlated with suspended matter, nitrate and oxygen contents and negatively correlated with temperature and the content of ammonium. Conversely, *aox* gene expression was negatively correlated with suspended matter and oxygen content and positively correlated with temperature and the content of ammonium. Furthermore, cluster results highlighted that environmental parameters such as nitrites and chl a content had no effect on biological responses along the reproductive cycle. Some biological responses as *sdh*, *cox*, *cs*, *ampd*, *atp* relative gene expression and ATP content were not influenced by measured environmental parameters.

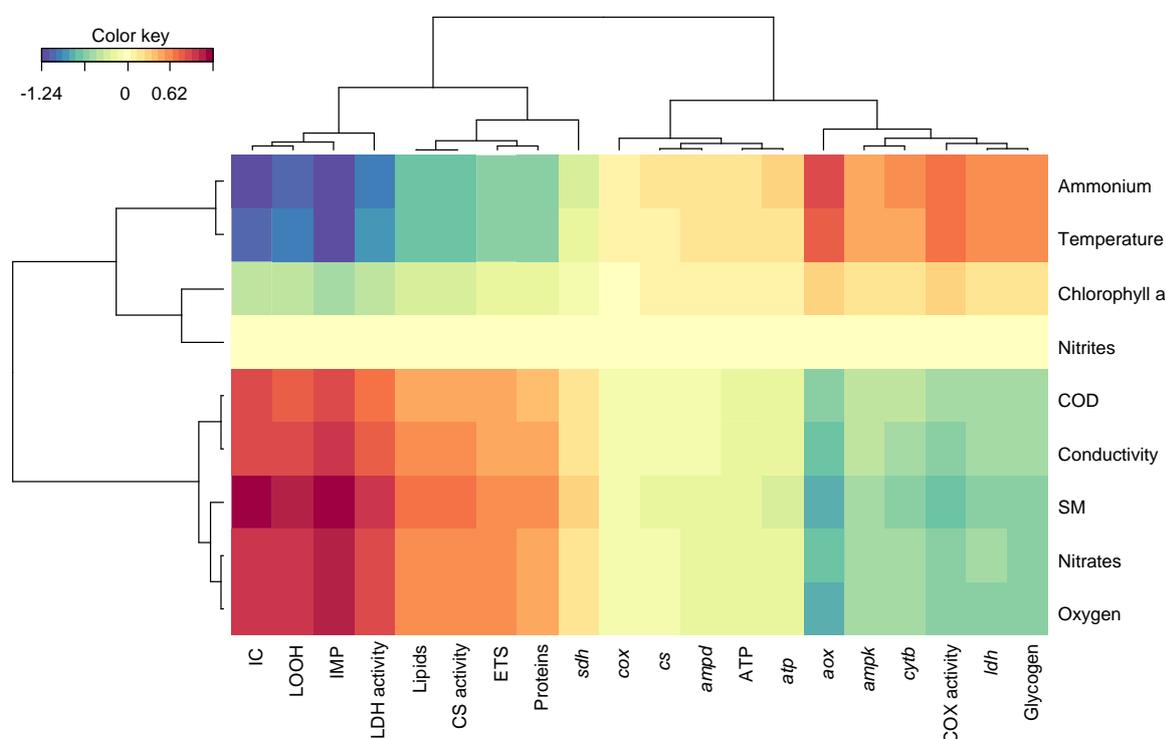


Fig. 9. Hierarchical cluster analysis (complete linkage using Euclidean distance measures) applied on the PLS model. The values in the similarity matrix can be seen as a robust approximation of the Pearson correlation. The rows and columns were reordered according to some hierarchical clustering method to identify interesting patterns. SM: suspended matter; COD: chemical oxygen demand.

4. Discussion

The aim of this study was to understand the effect of natural fluctuations and intrinsic variations on global energy metabolism in the model species *Dreissena polymorpha in situ*.

4.1 Global status

According to our observations, *D. polymorpha* exhibited a typical annual reproductive cycle with a gonad development phase during fall, a maturation and spawning phase in spring–summer and, if present, a resting phase at the end of the summer (males). These observations are consistent with the reproductive patterns previously described in *D. polymorpha* populations (Binelli et al., 2004; Juhel et al., 2006; Mackie and Ontario, 1990; Palais et al., 2011). In 2019, the expected reproductive cycle was observed but the reproduction period was asynchronous between males and females. No reason was bringing out to explain this observation. Indeed, natural media are continuously submitted to several perturbations. This asynchronous spawning could be a consequence of a potential pollution or an accumulation of different exceptional events like drought or flood periods. Concerning energy reserves, lipid content followed the reproduction cycle with a significant decrease in August 2018 concurrently with gamete emission, similarly to what is reported by Kwan et al. (2003), Hassan et al. (2018) and Hong et al. (2020). Since females were mostly represented in our samples for histology analysis, the high lipid content observed until April 2019 might be explained by the accumulation of lipid nutrients in the oocytes (Palais et al., 2011). According to our results, glycogen content increased after spawning of the gametes and decreased in April 2019. Tourari et al. (1988) shown that glycogen was largely used for the formation of the gametes and the gonadal tissues during gametogenesis and is especially converted into lipid materials in maturing oocytes in *Dreissena polymorpha*. These observations were also highlighted in oysters through an increase of glycogen content in pre-reproduction period followed by a net decrease during the spawning one (Hong et al., 2020). However, in our study, glycogen storage was significantly lower from April to June in 2019 compared to the same period in 2018. Reproduction cycle and glycogen content observations did not follow

the schema described for *Dreissena polymorpha* and others bivalves' species (Hong et al., 2020; Palais et al., 2011; Ram et al., 1996, 1993). Glycogen might have been used simultaneously for the gamete development and spawning as well as for other cellular energy demands since glycogen is a main source of energy in organisms (Anacleto et al., 2013; Andrade et al., 2017; Cordeiro et al., 2016, 2017).

4.2 Energy metabolism

Globally, energy metabolism appeared to be more active during the pre-reproduction and the reproduction periods than during the post-reproduction and rest periods. The respiratory chain units (i.e. *cox*, *atp*, and *cytb* gene expressions) presented the same pattern of responses as the anaerobic metabolism markers (*ldh* gene expression and LDH activity). Study of the ETS activity during two years on *D. polymorpha* showed similar responses with an increase of the activity from May to June of each year (Fanslow et al., 2001). According to our results of *ampk* relative expression level, a significant decrease was observed from April 2019 compared to November 2018. An accumulation of AMP was simultaneously measured in the organisms. As the AMPk is activated by high AMP concentrations (Chauhan et al., 2020; Fredrich and Balschi, 2002), the decrease of *ampk* relative expression might be the result of a negative feedback. This negative feedback could also be applied to the *ampd* relative gene expression modulation as this enzyme is activated by AMP intracellular concentration too (O'Brien et al., 2017; Składanowski et al., 2005). Higher production of ATP should be observed consequently to counterbalance AMP accumulation and maintain a positive energy balance. However, in our study, a significant decrease in ATP content was observed from April 2019 while ETS activity seemed to remain stable. The oxygen consumed in the mitochondria is directly linked to the flow of electrons and the synthesis of ATP by the ATPsynthase. However, part of this flow can be shunted by an alternative route, which bypasses the respiratory chain before complex III. Hence, especially in the presence of low levels of COX activity, the electron transport system contributes less to the driving force of the protons, and from there to the production of ATP. Thus from March to April 2019, the AOX activity could maintain the ETS level in parallel with a decrease in the ATP level. All these observations suggesting thus an imbalance of the energy metabolism.

The observed increase in IMP and AMP concentrations may activate glycogen phosphorylase and further enhance glycolysis and the tricarboxylic acid (TCA) cycle when the demand for ATP production increases (Han et al., 2016). Decreased glycogen content

observed could be a consequence of the accumulation of IMP and AMP in organisms. CS catalyses condensation of the acetyl group of acetyl-CoA with oxaloacetate forming citrate. It represents the first step of the TCA cycle (Eprintsev et al., 2018). Products provided by TCA cycle are then used by the respiratory chain in order to produce ATP. In our study, CS activity increased during the pre-reproduction and reproduction periods as well as *atp*, *cytb* and *cox* relative gene expression levels. These results were already observed through an *atp* and *cox* relative expression increasing during spring and/or summer (Kerambrun et al., 2018; Navarro et al., 2011). These results suggest an increase in the respiratory chain functioning during pre-reproduction and reproduction periods. Although it is difficult to compare a gene expression with the activity of the corresponding enzyme, a global suppression of the metabolic rate was observed when all biological responses are considered. Indeed, COX activity and ATP content decreased significantly while ETS activity and LOOH measurements increased from April 2019 to June 2019. Meanwhile, the caspase-3 (CSP3), a protease involved in apoptosis, was significantly more active. In addition, CSP3 activity was also correlated with the expression of OXPHOS-related genes and IMP concentrations. Caspase activation and apoptosis are associated with a decline in ATP levels and a production of reactive oxygen species (ROS) (Ricci et al., 2004; Sharma et al., 2017). The changes in metabolic processes and CSP3 activity suggest an activation of apoptosis pathway likely resulting from a global stress.

4.3 A global response overview

The multivariate analysis allowed us to consider the modulations of the whole panel of markers. This method showed that some markers were positively or negatively correlated with environmental parameters. The contents of IMP and LOOH, and LDH activity are modulated by stressing conditions (Falfushynska et al., 2014; Lushchak, 2011). LDH activity is a marker of global stress whereas lipid peroxidation is used as an indicator of oxidative stress. AMP deaminase protein catalyses the hydrolysis of AMP to form IMP and ammonia. AMPd and AMPk proteins play a role in the energy balance and its regulation. An intracellular AMP content increase reflects an enhanced use of ATP. To avoid the accumulation of AMP, the AMPd converts it into IMP thus suggesting that some stress is challenging the organisms (Lushchak, 2011). In our study, these markers were correlated to all analysed environmental factors except for chl a and nitrite contents. Moreover, lipid peroxidation was positively correlated with IMP and lipid concentrations. The global health status of the organisms seemed to be affected *in situ* through the induction of stress markers like IMP and LOOH.

According to our global analysis, suspended matter and nitrate concentrations seemed to be associated with an impact on energy metabolism of *D. polymorpha*.

4.4 Exceptional events: a long-term impact?

There was a significant increase in the frequency and the intensity of meteorological and hydrological events (EEA, 2007). In the Meuse department, drought periods were recorded in summer 2018 and 2019. The year 2018 was characterized by an exceptional drought that led to placing the entire department in a situation of alert that was extended from August to December. This prefectural decree was renewed in summer 2019 (Decree of the 8th August 2019 on the water use). Drought events may have more effects than flood periods on aquatic organisms due to their duration and large spatial impacts (Hrdinka et al., 2012). The decrease in the water column height leads to a more drastic increase in water temperature (van Vliet and Zwolsman, 2008). According to our *in situ* observations in summer 2018, the temperature stayed above 25°C during three weeks in July and August. *D. polymorpha* is an ectotherm organism with a lethal temperature in acute stress between 35°C and 37°C (Spidle et al., 1995). Several studies reported optimal temperatures for the reproduction, the development and the survival of *D. polymorpha* between 10°C and 20°C (bij de Vaate et al., 2002; Ram et al., 1993; Sprung, 1995). Drought periods observed may also have an impact on the physiology of organisms. Seasonal acclimation to different temperatures changes the tolerance window for invertebrates due to a switch in energy metabolism management in order to assure vital functions related to the fitness (Jost et al., 2015; Lannig et al., 2006; Sokolova et al., 2000). Based on our results, in 2018, temperature varied up to 20°C (November) and 25°C (August) in one day. Populations of *D. polymorpha* are usually hand-sampling close to the shore. These populations are also submitted to the strong variations that may have an impact on physiology of mussels, changing thus their global status. Temperature is also known to have a synergic effect together with contaminants (Cherkasov et al., 2010; Lannig et al., 2006; Soon and Zheng, 2019). Energy cost caused by natural fluctuations and exceptional events repetition might make organisms more vulnerable to anthropic pollution at long term and impact population dynamics.

4.5 Water physicochemistry and biological responses: a potential pollution?

Physicochemical parameters like pH, temperature and ion concentrations (NO₃⁻, PO₄³⁻) are known to regulate the distribution of *D. polymorpha* populations (McMahon, 2002; Ramcharan et al., 1992). The values recorded for pH and temperature in the Meuse channel

from May 2018 to June 2019 were consistent with the ecological requirements of the species (Ramcharan et al., 1992). However, a peak of nitrate and phosphate concentrations (31mg.L^{-1} and 0.126mg.L^{-1} respectively) was noticed in December 2018 in the Meuse channel 20km from the sampling site. These concentrations remained stable until February 2019 ($31\text{-}25.96\text{mg.L}^{-1}$ NO_3^- and $0.120\text{-}0.114\text{mg.L}^{-1}$ PO_4^{3-}) (French Water Agency data and Table 2). According to the Water Framework Directive, a maximum concentration of 50mg.L^{-1} of nitrates is defined as a threshold for a “good” ecological status by the regulation (2000/60/CE, 2000). However, studies showed that effects on aquatic fishes might be observed at lower concentrations after 30 days of exposure (Camargo et al., 2005). Alonso and Camargo (2003) exposed the mollusc *Potamopyrgus antipodarum* to N-NO_3^- to evaluate the LC_{10} at 24, 48, 72 and 96h. The calculated LC_{10} values were divided by 2 between 24h (1128 ppm) and 96h (585 ppm) of exposure. Similar observations were highlighted after a 14-days chronic exposure with a LC_{50} divided by 10 between 1 and 14 days (Benítez-Mora et al., 2014). Camargo et al. (2005) concluded that LC measured values may be divided by a factor 18 to 20 between acute and chronic exposures. However, to our knowledge, no data are available on the effect of nitrates in *D. polymorpha*. Simultaneous presence of nitrates and orthophosphates is known to reflect a pesticides pollution (Majumdar and Gupta, 2000). Based on the DCE legislation, the limit of pesticides emission is 0.5mg.L^{-1} in freshwaters (2000/60/CE, 2000). In December 2018, total pesticides concentration was 0.495mg.L^{-1} (French Water Agency data). Several pesticides targeting the mitochondria, and especially the respiratory chain, are extensively found in freshwaters. Nevertheless, more information would be necessary to approve the hypothesis of a potential pesticide impact on organism’s mitochondria.

5. Conclusion

This study bring deeper knowledge in the management of energy metabolism in a sentinel species, *D. polymorpha*, in order to develop new potential biomarkers in a biomonitoring perspective. According to our results, three genes involved in ATP production could constitute potential biomarkers. Indeed, *sdh*, *atp* and *cs* genes expression were not influenced by natural seasonal fluctuations. Complementary studies are necessary to confirm their relevance as potential biomarkers. Targeting a major part of energy metabolism and globally analysing their responses allowed us to suggest a putative impairment of mitochondrial respiratory chain, likely resulting from an *in situ* perturbation. Indeed, the monitored population of *D. polymorpha* seemed to be impacted by an external stress from April 2019. Natural environments are subjected to multiple stressors and it is impossible to

know the origin of the perturbations. However, flood and drought periods associated with high temperature variations in only one day or during several days may sensitize the organisms to potential chemical stress and could affect vital functions. The asynchronous gonadal development between males and females observed in 2019 as well as the metabolic depletion could be a consequence of exceptional climatic events associated with the pollution. Beyond the characterisation of the energy metabolism management in *D. polymorpha* along one reproduction cycle, this study highlighted the relevance of *in situ* monitoring in particular to investigate the impact of global change on sentinel species.

Acknowledgment

We wish to thank Danièle Pauly for her valuable help for caspase-3 activity measurements as well as the LIEC in Metz for its welcome. This work was supported by the Grand-Est region and the University of Reims Champagne Ardenne through MEENDRE project.

Supplementary data:

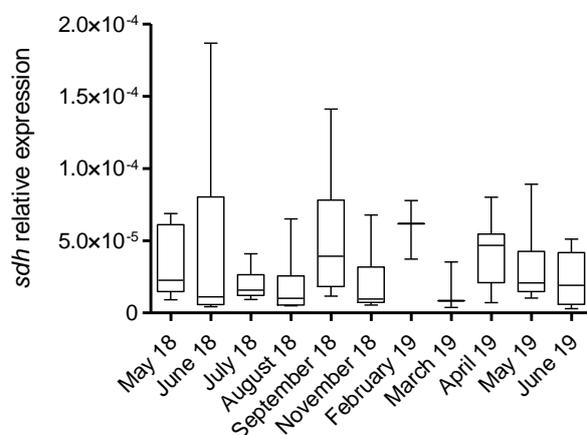


Fig. S1. *sdh* gene expression level according to the months. Data are expressed as median \pm SD, min, max ($n=12$). Different letters indicate significant differences between months ($p < 0.05$).

Table S1. Correlations of temperature and ATP content according to target markers of the total data set using multiple linear regression. Only significant correlations were presented.

	Temperature		[ATP]	
	<i>p</i> value	r^2	<i>p</i> value	r^2
<i>cox</i> gene expression	0.0159	0.43		
<i>atp</i> gene expression	0.0148	0.44		

<i>cytb</i> gene expression	0.001	0.66		
<i>ldh</i> gene expression	0.004	0.56		
<i>cs</i> gene expression	0.036	0.34	0.013	0.50
<i>ampd</i> gene expression			0.015	0.48
Lipids			0.019	0.50
Glycogen			0.025	0.47

Table S2. VIP values of PLS DA model built on biology responses. Only values ≥ 0.9 were presented.

Variable	VIP value
<i>atp</i>	1.23
<i>ldh</i>	1.19
<i>cs</i>	1.17
IC	1.12
<i>cytb</i>	1.05
ATP	1.03
LDH	1.02
IMP	1.02
ETS	1.02
LOOH	1.02
Lipids	0.99
<i>ampd</i>	0.99
<i>aox</i>	0.97
Proteins	0.92
<i>ampk</i>	0.91
<i>cox</i>	0.90

References

- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., 1997. Les biomarqueurs de dommages. In: Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, Chap 3. Lavoisier.
- Alonso, A., Camargo, J.A., 2003. Short-Term Toxicity of Ammonia, Nitrite, and Nitrate to the Aquatic Snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70, 1006–1012. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0082-5>
- Anacleto, P., Maulvault, A.L., Barrento, S., Mendes, R., Nunes, M.L., Rosa, R., Marques, A., 2013. Physiological responses to depuration and transport of native and exotic clams at different temperatures. *Aquaculture* 408–409, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.035>
- Andrade, J.T.M., Cordeiro, N.I.S., Montresor, L.C., Luz, D.M.R., Luz, R.C.R., Martinez, C.B., Pinheiro, J., Paglia, A.P., Vidigal, T.H.D.A., 2017. Effect of temperature on behavior, glycogen content, and mortality in *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae). *J Limnol* 77. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1658>
- Benítez-Mora, A., Aguirre-Sierra, A., Alonso, Á., Camargo, J.A., 2014. Ecotoxicological assessment of the impact of nitrate (NO₃⁻) on the European endangered white-clawed crayfish *Austropotamobius italicus* (Faxon). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 101, 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.12.025>
- bij de Vaate, A., Jazdzewski, K., Ketelaars, H.A.M., Gollasch, S., Van der Velde, G., 2002. Geographical patterns in range extension of Ponto-Caspian macroinvertebrate species in Europe. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 1159–1174. <https://doi.org/10.1139/f02-098>
- Binelli, A., Bacchetta, R., Mantecca, P., Ricciardi, F., Provini, A., Vailati, G., 2004. DDT in zebra mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruptions. *Aquatic Toxicology* 69, 175–188. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.05.005>
- Calow, P., 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100, 3–6. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90110-F](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90110-F)
- Calow, P., Forbes, V.E., 1998. How do physiological responses to stress translate into ecological and evolutionary processes? *Comparative Biochemistry and Physiology*

- Part A: Molecular & Integrative Physiology 120, 11–16.
[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10003-X](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10003-X)
- Camargo, J.A., Alonso, A., Salamanca, A., 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58, 1255–1267.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.044>
- Chauhan, A.S., Zhuang, L., Gan, B., 2020. Spatial control of AMPK signaling at subcellular compartments. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 1–16.
<https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1727840>
- Cherkasov, A.S., Taylor, C., Sokolova, I.M., 2010. Seasonal variation in mitochondrial responses to cadmium and temperature in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin) from different latitudes. *Aquatic Toxicology* 97, 68–78.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.004>
- Cheung, S.G., 1993. Population dynamics and energy budgets of green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) in a polluted harbour. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 168, 1–24. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(93\)90113-3](https://doi.org/10.1016/0022-0981(93)90113-3)
- Cordeiro, N.I.S., Andrade, J.T.M., Montresor, L.C., Luz, D.M.R., Araújo, J.M., Martinez, C.B., Pinheiro, J., Vidigal, T.H.D.A., 2017. Physiological response of invasive mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) submitted to transport and experimental conditions. *Braz. J. Biol.* 77, 191–198. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.15315>
- Cordeiro, N.I.S., Andrade, J.T.M., Montresor, L.C., Luz, D.M.R., Martinez, C.B., Darrigran, G., Pinheiro, J., Vidigal, T.H.D.A., 2016. Effect of starvation and subsequent feeding on glycogen concentration, behavior and mortality in the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae). *J. Limnol.* <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1465>
- de Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic toxicology* 50, 51–71.
- Directive 2000/60/EC du Parlement Européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (2000).
- EEA, 2007; Air pollution in Europe. Technical report 5/2007, European Environment Agency, Copenhagen, Denmark

- Eisner, V., Picard, M., Hajnóczy, G., 2018. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nat Cell Biol* 20, 755–765. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0133-0>
- Eprintsev, A.T., Fedorin, D.N., Dobychnina, M.A., Igamberdiev, A.U., 2018. Regulation of expression of the mitochondrial and peroxisomal forms of citrate synthase in maize during germination and in response to light. *Plant Science* 272, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.017>
- Faggio, C., Tsarpali, V., Dailianis, S., 2018. Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Science of The Total Environment* 636, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.264>
- Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Yurchak, I., Ivanina, A., Stoliar, O., Sokolova, I., 2014. Habitat pollution and thermal regime modify molecular stress responses to elevated temperature in freshwater mussels (*Anodonta anatina*: Unionidae). *Science of The Total Environment* 500–501, 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.112>
- Fanslow, D.L., Nalepa, T.F., Johengen, T.H., 2001. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia* 448, 61–70.
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.012>
- Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Piña, B., Barata, C., 2011. Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquatic Toxicology* 101, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.004>
- Faria, M., Ochoa, V., Blázquez, M., Juan, M.F.S., Lazzara, R., Lacorte, S., Soares, A.M.V.M., Barata, C., 2014. Separating natural from anthropogenic causes of impairment in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) populations living across a pollution gradient. *Aquatic Toxicology* 152, 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.020>
- Frederich, M., Balschi, J.A., 2002. The Relationship between AMP-activated Protein Kinase Activity and AMP Concentration in the Isolated Perfused Rat Heart. *Journal of Biological Chemistry* 277, 1928–1932. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107128200>

- Frieder, C.A., Applebaum, S.L., Pan, T.-C.F., Hedgecock, D., Manahan, D.T., 2017. Metabolic cost of calcification in bivalve larvae under experimental ocean acidification. *ICES Journal of Marine Science* 74, 941–954. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsw213>
- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 10, 935–944. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1146363>
- Gist, D.H., Miller, M.C., Brence, W.A., 1997. Annual reproductive cycle of the zebra mussel in the Ohio River: a comparison with Lake Erie. *Arch. Hydrobiol.* 138, 365–379.
- Han, H.-S., Kang, G., Kim, J.S., Choi, B.H., Koo, S.-H., 2016. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med* 48, e218–e218. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>
- Hassan, M.M., Qin, J.G., Li, X., 2018. Gametogenesis, sex ratio and energy metabolism in *Ostrea angasi*: implications for the reproductive strategy of spermcasting marine bivalves. *Journal of Molluscan Studies* 84, 38–45. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyx041>
- Hochaka and Somero, 2002. Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 30, 215–216. <https://doi.org/10.1002/bmb.2002.494030030071>
- Hong, H.-K., Jeung, H.-D., Kang, H.-S., Choi, K.-S., 2020. Seasonal variations in the hemocyte parameters, gonad development, energy storage and utilization of the giant honeycomb oyster *Hytotissa hyotis* (Linnaeus 1758) in Jeju Island off the south coast of Korea. *Aquaculture Reports* 17, 100299. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100299>
- Hraoui, G., Bettinazzi, S., Gendron, A.D., Boisclair, D., Breton, S., 2020. Mitochondrial thermo-sensitivity in invasive and native freshwater mussels. *J Exp Biol* 223, jeb215921. <https://doi.org/10.1242/jeb.215921>
- Hrdinka, T., Novický, O., Hanslík, E., Rieder, M., 2012. Possible impacts of floods and droughts on water quality. *Journal of Hydro-environment Research* 6, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.jher.2012.01.008>
- IPCC, 2014. In: Pachauri, R.K., Meyer, L.A. (Eds.), *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the*

Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland. Core Writing Team

- Jost, J.A., Keshwani, S.S., Abou-Hanna, J.J., 2015. Activation of AMP-activated protein kinase in response to temperature elevation shows seasonal variation in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 182, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.11.025>
- Juhel, G., Davenport, J., O'Halloran, J., Culloty, S.C., O'Riordan, R.M., James, K.F., Furey, A., Allis, O., 2006. Impacts of microcystins on the feeding behaviour and energy balance of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*: A bioenergetics approach. *Aquatic Toxicology* 79, 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.07.007>
- Kerambrun, E., Delahaut, L., Geffard, A., David, E., 2018. Differentiation of sympatric zebra and quagga mussels in ecotoxicological studies: A comparison of morphometric data, gene expression, and body metal concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 154, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.051>
- Kerambrun, E., Rioult, D., Delahaut, L., Evariste, L., Pain-Devin, S., Auffret, M., Geffard, A., David, E., 2016. Variations in gene expression levels in four European zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, populations in relation to metal bioaccumulation: A field study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 134, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.018>
- Kurochkin, I.O., Etkorn, M., Buchwalter, D., Leamy, L., Sokolova, I.M., 2011. Top-down control analysis of the cadmium effects on molluscan mitochondria and the mechanisms of cadmium-induced mitochondrial dysfunction. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 300, R21–R31. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00279.2010>
- Kwan, K.H.M., Chan, H.M., De Lafontaine, Y., 2003. Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence River. *Environmental Monitoring and Assessment* 88, 193–219. <https://doi.org/10.1023/A:1025517007605>
- Lane N. 2005. *Power, sex, suicide: mitochondria and the meaning of life*. New York (NY): Oxford University Press. p. 368.
- Lane, N., 2007. Mitochondria: Key to Complexity, in: Martin, W.F., Müller, M. (Eds.), *Origin of Mitochondria and Hydrogenosomes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 13–38. https://doi.org/10.1007/978-3-540-38502-8_2

- Lannig, G., Cherkasov, A.S., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent effects of cadmium on mitochondrial and whole-organism bioenergetics of oysters (*Crassostrea virginica*). *Marine Environmental Research* 62, S79–S82. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.04.010>
- Le Gal, Y., Lagadic, L., Le Bras, S., Caquet, TH., 1998. Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. In: *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*, Chap 12. Lavoisier.
- Louis, F., Devin, S., Giambérini, L., Potet, M., David, E., Pain-Devin, S., 2019. Energy allocation in two dreissenid species under metal stress. *Environmental Pollution* 245, 889–897. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.079>
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Mackie, G.L., Ontario (Eds.), 1990. *The Zebra mussel, Dreissena polymorpha: a synthesis of European experiences and a preview for North America*. Ontario Environment, Ottawa.
- Majumdar, D., Gupta, N., 2000. Nitrate pollution of groundwater and associated human health disorders. *Indian Journal of Environmental Health* 13.
- McMahon, R.F., 2002. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: *r* selection versus resistance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 1235–1244. <https://doi.org/10.1139/f02-105>
- Monlun, M., Hyernard, C., Blanco, P., Lartigue, L., Faustin, B., 2017. Mitochondria as Molecular Platforms Integrating Multiple Innate Immune Signalings. *Journal of Molecular Biology* 429, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.10.028>
- Naquet, P., Giessner, C., Galland, F., 2016. Metabolic adaptation of tissues to stress releases metabolites influencing innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 38, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.10.005>
- Navarro, A., Faria, M., Barata, C., Piña, B., 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environmental Pollution* 159, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.018>
- O'Brien, W.G., Ling, H.S., Zhao, Z., Lee, C.C., 2017. New insights on the regulation of the adenine nucleotide pool of erythrocytes in mouse models. *PLoS ONE* 12, e0180948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180948>

- Pain, S., Parant, M., 2007. Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. *Chemosphere* 67, 1258–1263. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.017>
- Palais, F., Mouneyrac, C., Dedourge-Geffard, O., Giambérini, L., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2011. One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83, 1062–1073. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.060>
- Petes, L.E., Menge, B.A., Harris, A.L., 2008. Intertidal mussels exhibit energetic trade-offs between reproduction and stress resistance. *Ecological Monographs* 78, 387–402. <https://doi.org/10.1890/07-0605.1>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 45e–445. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Plaistow, S.J., Troussard, J.-P., Cézilly, F., 2001. The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *International Journal for Parasitology* 31, 346–351. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00115-1)
- Potet, M., Devin, S., Pain-Devin, S., Rousselle, P., Giambérini, L., 2016. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environmental Pollution* 218, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.025>
- Potet, M., Giambérini, L., Pain-Devin, S., Louis, F., Bertrand, C., Devin, S., 2018. Differential tolerance to nickel between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* populations. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19228-x>.
- Ram, J.L., Crawford, G.W., Walker, J.U., Mojares, J.J., Patel, N., Fong, P.P., Kyojuka, K., 1993. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 265, 587–598.
- Ram, J.L., Fong, P.P., Garton, D.W., 1996. Physiological aspects of zebra mussel reproduction: maturation, spawning, and fertilization. *American Zoologist* 36, 326–338.

- Ramcharan, C.W., Padilla, D.K., Dodson, S.I., 1992. Models to Predict Potential Occurrence and Density of the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 2611–2620. <https://doi.org/10.1139/f92-289>
- Ricci, J.-E., Muñoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H., Green, D.R., 2004. Disruption of Mitochondrial Function during Apoptosis Is Mediated by Caspase Cleavage of the p75 Subunit of Complex I of the Electron Transport Chain. *Cell* 117, 773–786. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.008>
- Rodrigo, A.P., Costa, P.M., 2017. The Role of the Cephalopod Digestive Gland in the Storage and Detoxification of Marine Pollutants. *Front. Physiol.* 8, 232. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00232>
- Salin, K., Auer, S.K., Rey, B., Selman, C., Metcalfe, N.B., 2015. Variation in the link between oxygen consumption and ATP production, and its relevance for animal performance. *Proc. R. Soc. B* 282, 20151028. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1028>
- Sharma, A.K., Singh, V., Gera, R., Purohit, M.P., Ghosh, D., 2017. Zinc Oxide Nanoparticle Induces Microglial Death by NADPH-Oxidase-Independent Reactive Oxygen Species as well as Energy Depletion. *Mol Neurobiol* 54, 6273–6286. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0133-7>
- Składanowski, A.C., Stepnowski, P., Kleszczyński, K., Dmochowska, B., 2005. AMP deaminase in vitro inhibition by xenobiotics. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19, 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.08.005>
- Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution* 129, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.027>
- Sokolov, E.P., Markert, S., Hinzke, T., Hirschfeld, C., Becher, D., Ponsuksili, S., Sokolova, I.M., 2019. Effects of hypoxia-reoxygenation stress on mitochondrial proteome and bioenergetics of the hypoxia-tolerant marine bivalve *Crassostrea gigas*. *Journal of Proteomics* 194, 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.009>
- Sokolova, I., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research* 37, 181–201. <https://doi.org/10.3354/cr00764>

- Sokolova, I., Pörtner, H., 2001. Physiological adaptations to high intertidal life involve improved water conservation abilities and metabolic rate depression in *Littorina saxatilis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 224, 171–186. <https://doi.org/10.3354/meps224171>
- Sokolova, I.M., Bock, C., Pörtner, H.-O., 2000. Resistance to freshwater exposure in White Sea *Littorina spp.* I: Anaerobic metabolism and energetics. Journal of Comparative Physiology B 170, 91–103.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. Marine Environmental Research 79, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>
- Sokolova, I.M., Sokolov, E.P., Ponnappa, K.M., 2005. Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). Aquatic Toxicology 73, 242–255. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.016>
- Somero, G.N., 2010. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers.” Journal of Experimental Biology 213, 912–920. <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>
- Soon, T.K., Zheng, H., 2019. Climate Change and Bivalve Mass Mortality in Temperate Regions, in: de Voogt, P. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 251. Springer International Publishing, Cham, pp. 109–129. https://doi.org/10.1007/398_2019_31
- Spidle, A.P., May, B., Mills, E.L., 1995. Limits to tolerance of temperature and salinity in the quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52, 2108–2119. <https://doi.org/10.1139/f95-804>
- Sprung, M., 1995. Physiological energetics of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in lakes III. Metabolism and net growth efficiency. Hydrobiologia 304, 147–158.
- Tourari, A.L., Crochard, C., Pihan, J.C., 1988. Action de la température sur le cycle de reproduction de *Dreissena polymorpha* (Pallas). Etude “*in situ*” et au laboratoire. Haliotis 18, 85–98.
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A.T., Norberg, E., 2017. The role of mitochondria in metabolism and cell death. Biochemical and Biophysical Research Communications 482, 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.088>
- van Handel, E., 1985. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. Vol 1 No. 3, 302-304

- van Vliet, M.T.H., Zwolsman, J.J.G., 2008. Impact of summer droughts on the water quality of the Meuse river. *Journal of Hydrology* 353, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.01.001>
- Verslycke, T., Roast, S.D., Widdows, J., Jones, M.B., Janssen, C.R., 2004. Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: *Mysidacea*) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 306, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.12.022>
- Weber, A., Jeckel, N., Wagner, M., 2020. Combined effects of polystyrene microplastics and thermal stress on the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Science of The Total Environment* 718, 137253. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137253>

3. Perspectives issues de cette étude

Les fluctuations de processus métaboliques clés de la gestion de l'énergie ont été caractérisées au cours d'un cycle annuel complet en conditions naturelles. Cette démarche permettra, par la suite, d'affiner l'interprétation des réponses des dreissènes lors de l'évaluation de l'effet d'un stress en conditions contrôlées de laboratoire. En effet, le suivi saisonnier constitue une première étape pour le développement de nouveaux biomarqueurs. Le second pas vers ce développement vise à évaluer le potentiel de réponse des marqueurs ciblés lorsque les organismes sont soumis à un stress ou des stress environnementaux. Dans ce sens, cette seconde étape pourrait permettre de valider l'intérêt du métabolisme énergétique dans les études écotoxicologiques ainsi que la pertinence des marqueurs choisis ici dans une perspective de biosurveillance.

Chapitre 4.

Réponses du métabolisme énergétique en conditions contrôlées de laboratoire

Ce chapitre présente l'ensemble des expositions réalisées en conditions contrôlées de laboratoire. Il est constitué de deux grandes parties. La première présente les effets de stress hypoxique d'une part et thermique d'autre part sur les réponses du métabolisme énergétique. La seconde partie expose les résultats issus de deux expositions au cadmium réalisées à des périodes contrastées du cycle de reproduction chez *D. polymorpha*.

I. Effet du stress thermique et hypoxique sur les réponses du métabolisme énergétique

1. Contexte

Les fluctuations des paramètres physico-chimiques en milieu naturel représentent un réel défi pour les organismes aquatiques ectothermes (Sokolova et al., 2012). Le suivi saisonnier réalisé a permis d'observer de fortes variations thermiques journalières du milieu pouvant atteindre des amplitudes de plus de 20°C (Publication n°1). Dans un contexte de réchauffement climatique, la hausse des températures peut conduire à des phénomènes d'eutrophisation des milieux aboutissant à un déclin de la concentration en oxygène disponible pour les organismes. Depuis plusieurs années, les zones hypoxiques sont en constante augmentation dans les écosystèmes aquatiques et notamment dans les eaux continentales, provoquant des effets délétères sur les organismes qui y vivent, dont les invertébrés (Diaz and Rosenberg, 2008 ; Stramma et al., 2008 ; Vaquer-Sunyer and Duarte, 2008). Les effets des stress thermiques et hypoxiques sont bien documentés chez les espèces marines intertidales constamment exposées aux fortes variations de température et d'oxygène. Parmi les espèces d'eau douce, la tolérance de *D. polymorpha* face à ces paramètres abiotiques a fait l'objet de quelques études mais reste peu connue (Aldridge et al., 1995 ; Alexander Jr et McMahon, 2004 ; Johnson et McMahon, 1998 ; Karatayev et al., 2018, 2007 ; Redders et bij de Vaate, 1992). L'approfondissement des connaissances sur la plasticité physiologique de la dreissène pourrait permettre à terme, d'appréhender les effets potentiels du réchauffement climatique sur cette espèce soumise à de fortes fluctuations naturelles dans son environnement.

2. Les fenêtres de tolérance chez *D. polymorpha*

D. polymorpha possède une large fenêtre de tolérance vis-à-vis de certains paramètres physico-chimiques. Cette tolérance est notamment le résultat d'une forte diversité génétique intra- et inter-populationnelle (Astanei et al., 2005 ; Gomes et al., 2020 ; Hebert et al., 1989). La tolérance de la dreissène aux variations des facteurs environnementaux a été rapportée dans plusieurs études afin de comprendre au mieux et d'anticiper la colonisation des milieux par cette espèce (Cohen, 2005 ; Garton et al., 2014 ; Hallstan, 2010 ; Karatayev et al., 1998).

Les variations des paramètres physico-chimiques auxquelles sont soumises les dreissènes jouent directement sur la capacité des individus à s'acclimater aux conditions environnementales voire des populations à s'adapter.

2.1 Fenêtre de tolérance thermique

La tolérance aux variations de la température est le paramètre le plus étudié chez *D. polymorpha*. Sa large fenêtre de tolérance (Figure 26) fait que cette espèce peut être retrouvée à des latitudes très diverses. La gamme de températures considérée comme optimale chez la dreissène est variable selon le paramètre physiologique étudié (filtration, respiration, etc.) (Aldridge et al., 1995 ; Karatayev et al., 2007 ; Redders et bij de Vaate, 1992). Bien que le taux de filtration optimal chez *D. polymorpha* se situe entre 10 et 22 °C (Reeders et bij de Vaate, 1992), lorsque les différentes fonctions physiologiques sont prises en compte comme la croissance, l'alimentation ou encore le développement larvaire, la gamme de température optimale est comprise entre 10 et 15 °C (Aldridge et al., 1995 ; Elderkin and Klerks, 2005 ; Karatayev et al., 1997, 2007 ; Redders et bij de Vaate, 1992). En deçà et au-delà de ces températures, l'organisme passe dans un état physiologique dégradé (ou pejus).

Une forte variabilité des données concernant la tolérance thermique de la dreissène est observée dans la littérature, en fonction de la méthodologie utilisée pour l'évaluer. Néanmoins, des limites de tolérance ont été proposées avec une température minimum de 0 °C et une température maximum comprise entre 28 et 32 °C (Elderkin and Klerks, 2005 ; Karatayev et al., 1997 ; Spidle et al., 1995). Cependant, White et al. (2015) ont montré une augmentation de la mortalité chez *D. polymorpha* lorsque les moules étaient exposées pendant plusieurs jours à plusieurs semaines à des températures inférieures (25°C).

Le dépassement des températures dites sub-létales, entraîne d'un côté comme de l'autre, le basculement de l'organisme dans un état critique (ou pessimum), remettant ainsi en cause sa survie (Sokolova et al., 2012). La valeur limite haute de tolérance peut cependant varier selon plusieurs facteurs lors d'expérimentations contrôlées en laboratoire, comme la température d'acclimatation, la disponibilité et la qualité de la nourriture. Cependant, le paramètre le plus influent sur cette tolérance est la saison à laquelle les organismes sont exposés au stress thermique. Il a été montré que la tolérance était plus importante en période estivale qu'en période hivernale (Elderkin and Klerks, 2005 ; Hernandez, 1995 ; Karatayev et al., 1998 ; Morse, 2005). De plus, lors de ces différentes études, la tolérance au choc

thermique positif augmentait avec la température d'acclimatation. En effet, plus la température d'acclimatation était élevée, plus les organismes survivaient au stress subi. Il a également été observé que la tolérance des individus variait selon leurs conditions de vie (abondance de la nourriture, prédation, présence de pollution...). L'exposition chronique à de fortes températures force les organismes à s'acclimater à ces conditions (Aldridge et al., 1995).

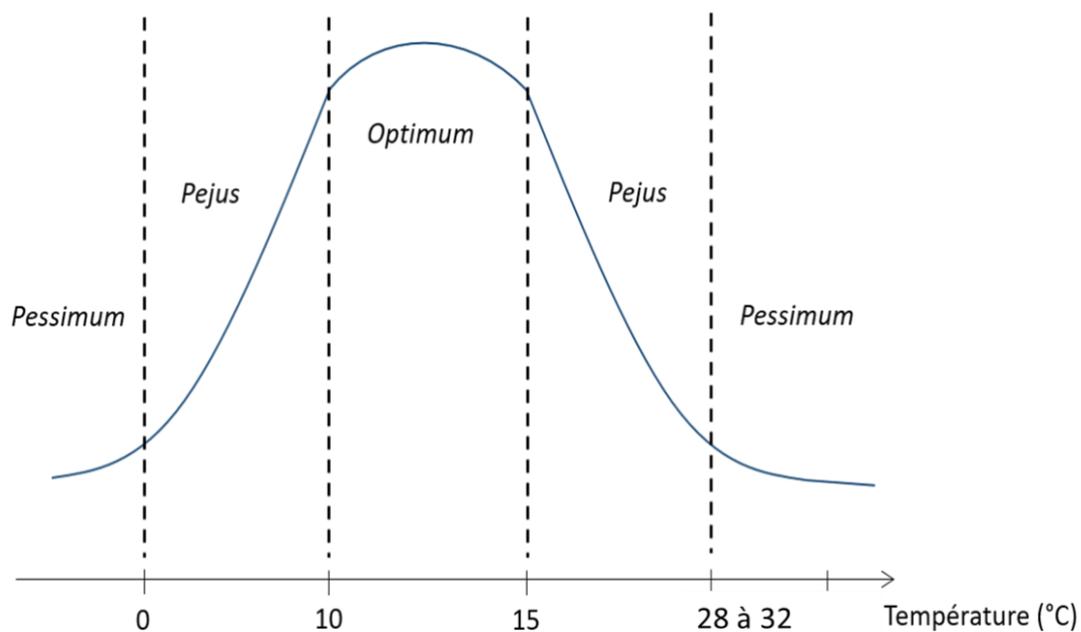


Figure 26. Fenêtré de tolérance thermique chez *D. polymorpha* d'après les données de la littérature.

Lorsque *D. polymorpha* est soumise à un stress thermique, ses fonctions métaboliques, comme la consommation d'oxygène ou la tolérance à l'hypoxie sont également affectées (Chapitre 1, 5.1.1 et 5.1.2 ; Alexander Jr et McMahon, 2004 ; Johnson et McMahon, 1998).

2.2 Fenêtré de tolérance à l'hypoxie

Les conditions hypoxiques et anoxiques sont le résultat d'une combinaison de processus dont les deux principaux sont l'eutrophisation des milieux et le réchauffement climatique (Altieri and Gedan, 2015 ; Diaz, 2001 ; Diaz and Rosenberg, 2008 ; Scavia et al., 2014). Les eaux douces sont particulièrement touchées par ces phénomènes. Depuis plusieurs dizaines d'années, la surface de zones hypoxiques relevées dans les écosystèmes a augmenté exponentiellement provoquant ainsi des effets délétères sur les organismes, y compris les

invertébrés (Diaz and Rosenberg, 2008 ; Stramma et al., 2008 ; Turner et al., 2008 ; Vaquer-Sunyer and Duarte, 2008). Bien que l'effet de la concentration en oxygène soit surtout très étudié chez les espèces intertidales soumises aux fortes variations de l'oxygène disponible, plusieurs recherches ont également été menées chez *D. polymorpha* afin d'établir sa gamme de tolérance (Figure 27 ; Alexander Jr et McMahon, 2004 ; Johnson et McMahon, 1998 ; Karatayev et al., 2018).

La moule zébrée peut être considérée comme une espèce peu adaptée aux conditions hypoxiques. L'hypoxie est un facteur jouant un rôle prépondérant dans l'absence de la dreissène en eaux profondes (Alexander Jr et McMahon, 2004 ; Tachet et al., 2000). Les conditions optimales en oxygène sont comprises entre 80 et 100 % de saturation (Garton et al., 2014). *D. polymorpha* est capable de réguler son taux de prise d'oxygène lors d'un stress hypoxique modéré (50-80 % de saturation en O₂ ; Alexander Jr et McMahon, 2004). Il n'y a pas de données disponibles à ce jour dans la littérature en deçà de ces valeurs ainsi qu'au-delà de 100 % de saturation (hyperoxie) issues d'expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire. Certaines études ont tout de même montré que *D. polymorpha* était capable de survivre plusieurs mois en conditions hypoxiques. Ainsi, il a été observé, que suite à un encagement de dreissènes à 5 mètres de profondeur, 76 % des individus survivaient après 3 mois d'exposition à environ 20 % d'oxygène dissous (Yu and Culver, 1999). Cependant, dans les conditions naturelles, les mêmes auteurs ont montré qu'aucune dreissène n'était présente au-delà de 2,8 mètres de profondeur. Une étude ayant suivi des populations de *D. polymorpha* dans le milieu naturel a montré une densité d'individus plus élevée aux faibles profondeurs où la saturation en oxygène dissous est supérieure à 40 % (Mihuc et al., 1999). Une autre récente étude a notamment montré l'absence de *D. polymorpha* dans les zones hypoxiques mesurées dans le lac Erie aux États-Unis (Karatayev et al., 2018). En conditions anoxiques, les dreissènes pourraient survivre entre 3 et 6 jours en fonction de la température (Matthews and McMahon, 1999). Il n'y a que peu d'études disponibles présentant des résultats de l'effet de l'hypoxie combinée à la température sur *D. polymorpha*. Néanmoins, il a été montré que plus la température était élevée moins les individus étaient tolérants à l'hypoxie (Alexander Jr et McMahon, 2004). *Dreissena polymorpha* vivant à faible profondeur, elle peut être exposée à des épisodes d'hypoxie plus transitoires que dans les zones plus profondes. Cependant, les épisodes hypoxiques étant plus fréquents en été, les populations peuvent être simultanément exposées à de fortes variations de la température (Karatayev et al., 2018).

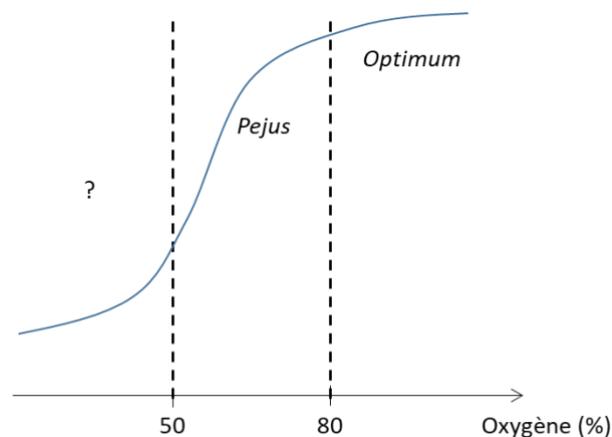


Figure 27. Fenêtre de tolérance par rapport à la concentration en oxygène dissous (%) chez *D. polymorpha* d'après les données de la littérature.

La température ainsi que la disponibilité en oxygène sont deux facteurs abiotiques principalement soumis aux fluctuations saisonnières et météorologiques. Les espèces aquatiques invasives comme *D. polymorpha* sont dotées d'une forte plasticité physiologique et d'une grande capacité d'acclimatation et d'adaptation. La tolérance d'un organisme dépend notamment des mécanismes mis en place pour survivre lors d'un épisode caniculaire ou hypoxique. Comme cela a été décrit dans le premier chapitre de ce manuscrit, une variation de la température peut entraîner une augmentation (lors d'une baisse de température) ou une diminution (lors d'une température élevée) de la densité mitochondriale (Sommer and Pörtner, 2002 ; Cherkasov et al. 2010). A fortes températures, la baisse du nombre de mitochondries permet principalement d'éviter les pertes énergétiques (Peck et al., 2002 ; Keller et al., 2004). Afin de limiter ces pertes principalement associées aux fuites de protons, la composition lipidique des membranes internes des mitochondries peut varier afin de maintenir la capacité mitochondriale et la production d'ATP (Cheung et al., 2018). Une étude menée chez la perchaude a notamment montré qu'un des processus d'acclimatation à des températures élevées consistait en une diminution d'acides gras polyinsaturés dans les membranes (Fadhlaoui and Couture, 2016). Au-delà de ces remodelages membranaires, l'efficacité des défenses contre le stress oxydatif est également un procédé d'acclimatation des individus aux fortes températures ainsi qu'aux épisodes d'hypoxie (Sokolova, 2018). En effet, les capacités de résilience des mitochondries aux différents stress sont notamment associées à une sur-régulation des défenses anti-oxydantes, une modulation de l'efficacité mitochondriale, ainsi qu'une forte activité des protéases impliquées dans la dégradation des

protéines altérées au sein des mitochondries (Salin et al., 2015 ; Sokolova, 2018). Chez des espèces tolérantes à l'hypoxie, de nombreux mécanismes sont mis en place pour compenser le manque d'oxygène. Hochachka et al. (1996) divisent cette réponse en deux phases successives dans le temps : une phase de défense comprenant l'activation des signaux cellulaires, l'arrêt des pompes Na⁺ K⁺ ATPases, de la néoglucogénèse et de la synthèse protéique. La suppression du turnover de l'ATP ne se produit qu'en conditions hypoxiques extrêmes. La seconde phase est appelée « phase de secours » elle est notamment caractérisée par la surexpression de certains gènes codant pour des facteurs de transcription tels que le gène *hif* qui joue lui-même un rôle primordial dans la régulation de l'expression de nombreux gènes afin de minimiser les pertes énergétiques. Néanmoins, la mise en place de l'ensemble de ces processus est très coûteuse en énergie et n'est pas la seule source de dépenses énergétiques. La présence de pollution en plus des variations des paramètres physico-chimiques peut aboutir, à court ou long terme selon les conditions de vie, à un déséquilibre de la balance énergétique pouvant affecter fortement la survie des organismes (Sokolova et al., 2012).

3. Objectifs de l'étude

Cette étude propose d'évaluer l'effet d'un stress thermique d'une part et d'un stress hypoxique d'autre part sur les réponses du métabolisme énergétique chez *D. polymorpha*. Pour cela, la population de dreissènes étudiée lors du suivi saisonnier a été de nouveau choisie. Une exposition de 7 jours à 25°C ou à 30 % d'oxygène dissous (à la température relevée *in situ* au moment du prélèvement : 10 °C) a été réalisée au laboratoire. Un premier point de prélèvement a été effectué après 24 heures et un second après 7 jours d'exposition. L'objectif de cette étude était (1) d'enrichir les connaissances sur le métabolisme énergétique cellulaire chez cette espèce sentinelle afin (2) d'affiner l'interprétation des réponses de ce métabolisme en présence de stress physico-chimiques.

4. Principaux résultats

Cette étude a permis de mettre en évidence différents profils de réponses en fonction du stress subi par les dreissènes. Après une exposition courte à 25°C (24h), une augmentation de l'expression relative des gènes associés à la régulation de la balance énergétique (*ampk*), à la PHOSOX (*cox* et *atp*) a été observée. Cependant, cette augmentation des réponses est limitée dans le temps. Après 7 jours d'exposition à 25°C, l'expression des gènes *cox* et *atp* est

revenue à un niveau similaire à celui des individus témoins avec, en parallèle, une diminution du ratio ATP:ADP, évoquant un épuisement des organismes face au stress. En conditions hypoxiques, l'inverse a été observé. L'activité métabolique a été considérablement réduite et une diminution significative de la CEA a été observée après 24 heures d'exposition avant un retour à un niveau similaire aux témoins à la fin de l'expérimentation. Après 7 jours d'exposition, les mesures de respiration cellulaire ont montré à la fois une tendance à la baisse de la respiration endogène ainsi qu'une diminution significative de l'efficacité mitochondriale par rapport aux contrôles. Néanmoins, l'analyse globale des données (PLS-DA) a permis d'observer un potentiel arrêt métabolique mis en place par la dreissène en réponse au stress hypoxique. Certains marqueurs se sont révélés sensibles aux deux stress à court terme comme les indices énergétiques tels que l'AEC et le ratio ATP:ADP. De plus, un effet combiné de la température et de la durée de l'exposition a été observé pour l'expression du gène *hif*. Ce caractère à la fois intégrateur du stress et du temps fait de ce marqueur un bon candidat potentiel pour son utilisation dans des études de biosurveillance.

L'ensemble des résultats de cette étude fait l'objet d'un article soumis au journal Science of the Total Environment (Publication n°2).

**Energy metabolism responses in a sentinel species
(*Dreissena polymorpha*) under controlled thermal
and hypoxic stresses**

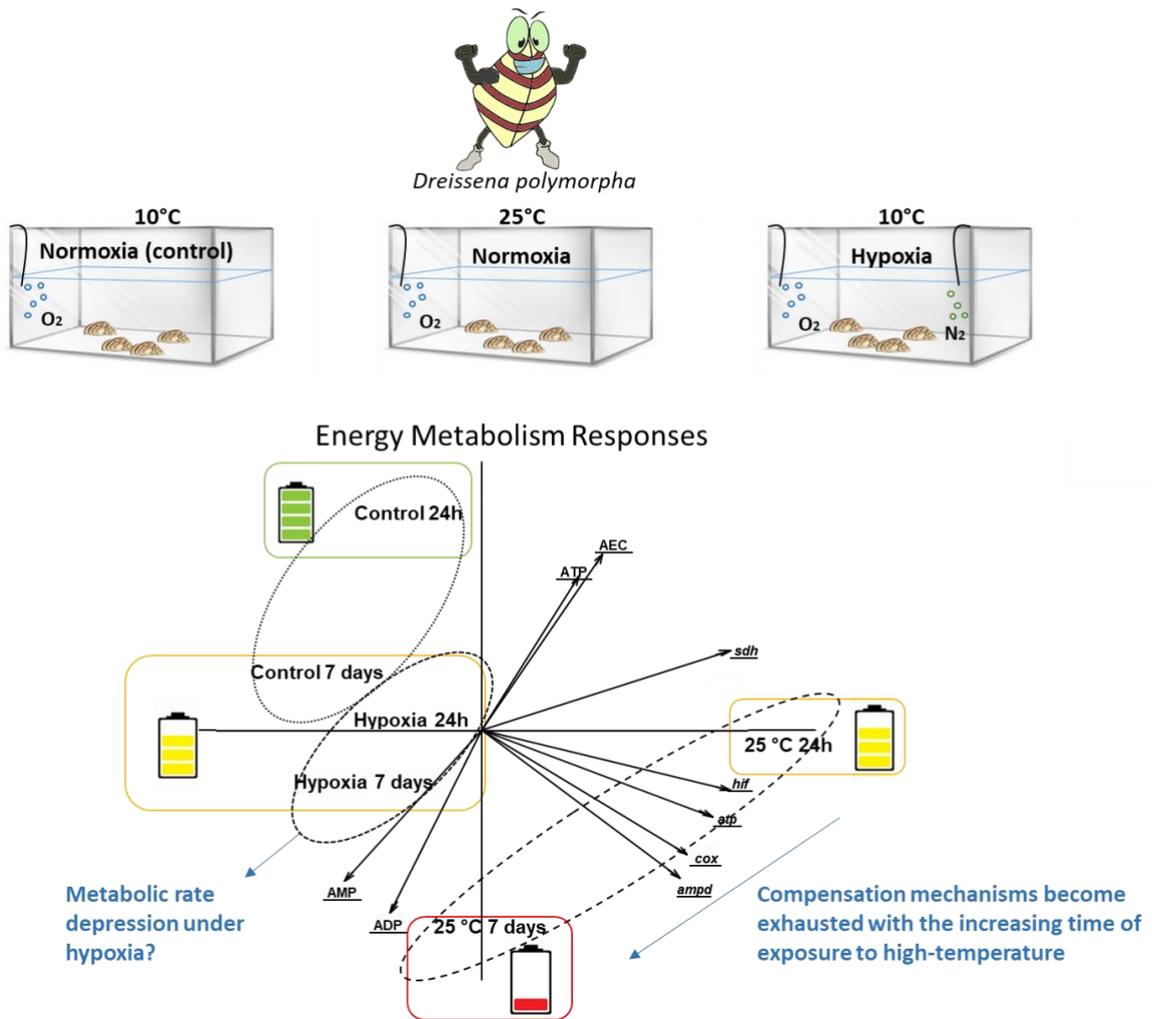
En révision dans le journal Science of the Total Environment

Authors: Fanny Louis¹, Damien Rioult¹, Béatrice Rocher², Véronique Gaillet¹, Laurence Delahaut¹, Séverine Paris-Palacios¹, Elise David¹

¹Université de Reims Champagne-Ardenne, INERIS, SEBIO UMR I-02, Reims, France

²Université du Havre, INERIS, SEBIO UMR I-02, Le Havre, France

Graphical abstract:



Keywords: Energy metabolism, ATP, hypoxia, temperature, *Dreissena polymorpha*

Highlights:

- Energy metabolism was enhanced in mussels exposed to 25°C.
- *D. polymorpha* showed a potential metabolic rate depression under hypoxia.
- Compensatory mechanisms to high temperature exposure were limited in time.

Abstract: Mitochondria are key intracellular targets of hypoxia and temperature variations due to their role in ATP generation. These environmental factors are the main ones challenging ectotherm organisms' survival. The aim of this study was to refine responses interpretation of metabolism management under these two different stresses. *Dreissena polymorpha*, is a bivalve commonly used as a sentinel species in freshwater ecotoxicological studies. Mussels were maintained during seven days under high temperature (25°C) or hypoxia (30% of dissolved oxygen) to study the effect of abiotic factors on several markers of energy metabolism. Different metabolic processes involved in energy management were monitored through energy nucleotides regulation and aerobic/anaerobic metabolism. Contrasted patterns of responses were observed between the two stresses in *D. polymorpha*. Signs of global metabolism activation (energy nucleotides regulation, OXPHOS) were noticed in high temperature exposed mussels after short-term exposure (24h) while longer exposure (7 days) resulted in a decline of ATP:ADP ratio. A global analysis of the whole data set (Partial Least Square Discriminant Analysis) showed that a metabolic rate depression probably occurred in mussels exposed to hypoxia. This study brought new knowledge on the responses to environmental parameters fluctuations and the relation between exposure duration and tolerance in a sentinel species in a general context of global change.

1. Introduction

Fluctuations in environmental oxygen (O₂) availability represent a major challenge to aerobic aquatic organisms. In aquatic environments, hypoxic and anoxic conditions frequently result from media eutrophication and global warming (Altieri and Gedan, 2015; Diaz and Rosenberg, 2008; Scavia et al., 2014). Freshwaters are particularly exposed to these phenomena. Since several decades, hypoxic areas increased in aquatic ecosystems, causing deleterious effects on organisms including invertebrates (Diaz and Rosenberg, 2008; Stramma et al., 2008; Vaquer-Sunyer and Duarte, 2008). Available oxygen concentrations in cells are directly related to energy metabolism efficiency. Under hypoxia, mitochondrial respiratory chain efficiency is affected, leading to a decrease of electron transport system activity and ATP synthesis (Hochachka and Lutz, 2001; Sokolova et al., 2012). The disrupted activity of cellular ATPases could interfere with the maintenance of the ion gradients in the cell and could lead to an oxidative stress (Sokolova et al., 2012). Oxidative burnout could then result in a membrane disruption followed by a leak of cytochrome c inducing apoptosis (Kalogeris et al., 2014). In marine environments, since intertidal species are particularly exposed to hypoxic and re-oxygenation periods, they are able to reduce energy consumption through a metabolic rate depression, which is equivalent to a "metabolic arrest" (Hochachka et al., 1996). The decreased ATP consumption under hypoxic conditions relies on energy allocation to basal maintenance of bivalves at the expense of non-vital functions like growth or reproduction. Conversely, global metabolism is enhanced under moderate thermal stress in bivalves (Sokolova et al., 2012). Indeed, oysters' respiration increases with temperature as well as oxidative phosphorylation (OXPHOS) activity associated with increased ROS production and a mitochondrial uncoupling (Sokolova et al., 2012).

Although hypoxia impacts have been largely studied in intertidal marine molluscs such as oysters (*Crassostrea sp.*) or mussels (*Mytilus edulis*) due to their economic interest (Sanders et al., 2014; Sokolova et al., 2012), hypoxia tolerance and effects remain poorly described in freshwater bivalve species. *Dreissena polymorpha* is currently considered as a hypoxia-sensitive species (Alexander Jr and McMahon, 2004). Oxygen saturation in media optimally lies between 80 and 100% for *D. polymorpha* (Garton et al., 2013). This species is able to adapt its oxygen uptake during a moderate hypoxia (50-80% O₂ saturation) (Alexander Jr and McMahon, 2004). Oxygen availability in the water can also be affected by temperature variations. Reported tolerance-limit temperatures in *Dreissena polymorpha* stand around 30°C (Garton et al. 2013). However, White et al. (2015) showed high mortality of caged *D.*

polymorpha which increased with exposure duration when mussels were placed at $25 \pm 3^\circ\text{C}$. High temperatures could challenge oxygen uptake by organisms, leading thus to physiological partial anaerobic conditions (Eliason and Farrell, 2014; Frederich and Pörtner, 2000; Sokolova and Pörtner, 2001). Moreover, hypoxia-tolerance is temperature-dependent and decreases with increasing temperatures since temperature plays a key role in oxygen uptake mechanisms (Elderkin and Klerks, 2005; Karatayev et al., 1997; Spidle et al., 1995). Temperature variations could reach mussels' lethal limit in summer. These high temperatures can generate hypoxia periods in freshwater ecosystems (Karatayev et al., 2018). Alexander and McMahon (2004) showed that oxygen consumption in *Dreissena polymorpha* increased with temperature from 5 to 15°C and decreased beyond. These observations suggest a potential synergistic effect of hypoxia and thermal stress on mussels' physiology.

In a global change context, exceptional events such as drought periods will become more frequent and could affect all aquatic organisms such as *Dreissena polymorpha*. The purpose of this work was to study the separated effect of hypoxic and thermal stress on energy metabolism responses in this sentinel species. Several markers of cellular energy production and management were measured after short-term (24h) and middle term (7 days) of thermal stress (25°C vs. 10°C for controls) and hypoxic (30% dissolved O_2 vs. 100% for controls) exposure. The whole cellular energy metabolism was targeted. Different functions such as energy nucleotides regulation (energy nucleotides concentration, AMP-activated protein kinase and AMP deaminase), a proxy of mitochondrial density (citrate synthase) and aerobic/anaerobic metabolism (oxidative phosphorylation and lactate dehydrogenase) were studied through gene expressions and/or enzymatic activities. In addition, cellular respiration was measured after 7 days of exposure. The study of natural abiotic parameters effects, such as hypoxia and temperature on the energy metabolism in *D. polymorpha* aimed at apprehending the effect of natural parameter fluctuations in a sentinel species' responses.

2. Material and methods

2.1 Mussels collection and acclimation

Dreissena polymorpha specimens were hand-collected in the Meuse channel (Euville, France, E $05^\circ37'28''$, N $48^\circ44'59''$) in November 2019. Mussels with a length comprised between 15 and 25mm were selected and quickly transported to the laboratory in aerated field water. Mussels were acclimated for 15 days at field temperature (10°C). Individuals were placed in 9L tank with continuously aerated water. Water from the field was progressively

replaced by spring water (Cristaline®, Aurèle spring, 1/3 per day). Mussels were fed with 15000cells.ml⁻¹ of fresh algae (*Chlorella vulgaris*) per mussel per day during the acclimation period.

2.2 Exposure design

Three water baths were prepared before the exposure beginning. Two of them were maintained at the field temperature (10°C), and one of these two was placed in a hermetic chamber with a controlled continuous nitrogen supply in order to maintain 30% of dissolved oxygen in water. In the third water bath, temperature was increased up to 25°C and water was continuously aerated. After 15 days of acclimation, mussels were either (i) maintained in acclimation conditions (10 ± 0.8°C; 94.2 ± 2.6% O₂), (ii) exposed for 7 days to 30% of dissolved oxygen at the field temperature (10 ± 0.4°C; 30 ± 1.2% O₂), or (iii) exposed to 25°C in normoxia (25 ± 1.1°C; 92.1 ± 3.2% O₂). Mussels were unfed during the exposure in order to avoid oxygen supply in the hermetic chamber. A first sampling step was conducted after 24h of exposure and a last one at after 7 days. For cellular oxygen consumption measurement, mussels were sampled only after 7 days of exposure (*n*=5). At each sampling time, digestive glands were dissected and snap-frozen for gene expression and enzymatic activity analysis (*n*=10 for each measurement). Mussels were frozen entirely for energy nucleotide contents analysis (*n*=10).

2.3 Gene expression

Total RNA was extracted from digestive gland using TriReagent (Euromedex) following manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed on 400ng of total RNA using Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) according to manufacturer's instructions. The reaction was conducted at 42°C for 30min using a PCR Mastercycle (Eppendorf).

Gene expression levels were measured by real-time quantitative PCR using Absolute Blue qPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Specific primers are given in supplementary data (Table S1). Energy balance regulation was assessed through *ampk* (AMP-activated protein kinase) and *ampd* (AMP deaminase) genes expressions. Concerning the OXPHOS, four genes were selected, encoding: beta subunit ATP synthase (*atp*), cytochrome b (*cytb*), cytochrome c oxidase (*cox*) and succinate dehydrogenase (*sdh*). Another unit of the respiratory chain, the alternative oxidase (*aox*) was also targeted. Gene expression levels were also measured for citrate synthase (*cs*),

lactate dehydrogenase (*ldh*) and hypoxia inducible factor-1 α (*hif*). The PCR steps consisted in 15min initial denaturation at 95°C followed by 40 cycles of heat denaturation at 95°C for 10s, annealing at 60 °C for 60s, and were carried out in a CFX Manager (BioRad) on 1/10 diluted complementary DNA (cDNA). The relative gene expression level was calculated using the Pfaffl method (Pfaffl, 2001) taking into account the PCR efficiency and normalized by the geometric mean of two housekeeping genes (encoding actin and ribosomal protein S3) according to Navarro et al. (2011).

2.4 Enzymatic activities

The whole set of enzymatic activities was measured in each mussel individually. The digestive gland was weighed and crushed in phosphate buffer containing protease inhibitors (50mM pH 7.6 with 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1mM L-serineborate) at 8:1 (v/w) ratio, and centrifuged (3000g, 10min, 4°C). The supernatant was collected for the enzymatic activity measurements. Assays were performed with an automated spectrophotometer (Galery, ThermoScientific). Activities of electron transport system (ETS) and lactate dehydrogenase (LDH) and proteins content were measured according to Garaud et al. (2016) and Potet et al. (2016). Cytochrome c oxidase (COX) and citrate synthase (CS) activities were measured according to Louis et al. (2020).

2.5 Energy nucleotides contents

Nucleotides extraction was realised with perchloric acid as described by Sokolova et al. (2005) and adapted by Louis et al. (2020). Extracts were then filtered (0.45 μ m) and stored at -80°C. Concentrations of ATP, ADP, AMP and IMP were measured with an HPLC system and Nucleosic C18 column (Nucleosil) according to Sokolova et al. (2000). The separation was performed at a flow rate of 0.8ml.min⁻¹ using a mobile phase of 1M phosphate buffer with 5% methanol (pH 6) for 15min. Nucleotides contents were monitored at 254nm and nucleotides quantifications were calculated using ATP, ADP, AMP and IMP standards (Sigma) of 20, 10, 2 and 10 μ M, respectively.

Adenylate energy charge (AEC) was calculated from the tissue concentrations of adenylates as follows:

$$AEC = \frac{[ATP] + 0.5 \times [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

2.6 Cellular oxygen consumption

Mussels were sampled after 7 days of exposure. In each condition, cellular respiration was performed on 5 replicates. Digestive glands from 5 mussels per replicate were collected, pooled and slightly crushed on 100µm cell strainer with 20mL of buffer (2mM Hépès, 200mM mannitol, 0.1mM EDTA, 40mM saccharose supplemented with 0.5% BSA before pH 7.4 adjustment). After centrifugation (500g, 5min), cells pellet was suspended in 1mL of Leibovitz-L15 medium 15% (Gibco) and then placed in a glass chamber containing Clarke-type oxygen electrode (Hansatech Instruments). Oxygen uptake was recorded using the OxygraphPlus software (Hansatech Instruments). Endogen respiration was first measured. A specific inhibitor of ATP synthase, oligomycin ($2.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added to provoke a protons accumulation. Mitochondrial coupling efficiency was determined through the ratio: endogen respiration / respiration after oligomycin injection. After oxygen consumption measurements, cells were collected and counted with Trypan Blue in a counting chamber. For each replicate, the respiration rates were normalized by the number of viable cells.

2.8. Statistical analysis

Markers responses were analysed by a two-way ANOVA to assess time and condition effects. Parametric (Tukey) or non-parametric (Kruskal-Wallis) post-hoc tests were processed on markers. Previously, normality and homoscedasticity of the data were assessed with Shapiro and Bartlett tests respectively. A global analysis of biomarkers results was also performed with a Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) to identify the overall capacity of biomarkers to discriminate the different conditions and periods as well as to define the most relevant markers among the whole set. Relevance of marker responses was based on the individual role of each marker in the overall model, estimated by the VIP (Variable Importance in the Projection). Only markers with a $\text{VIP} > 1$ were considered significant in the model. A threshold of $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analyses were performed using R software (R Development Core Team, 3.5.0).

3. Results

3.1 Energy balance

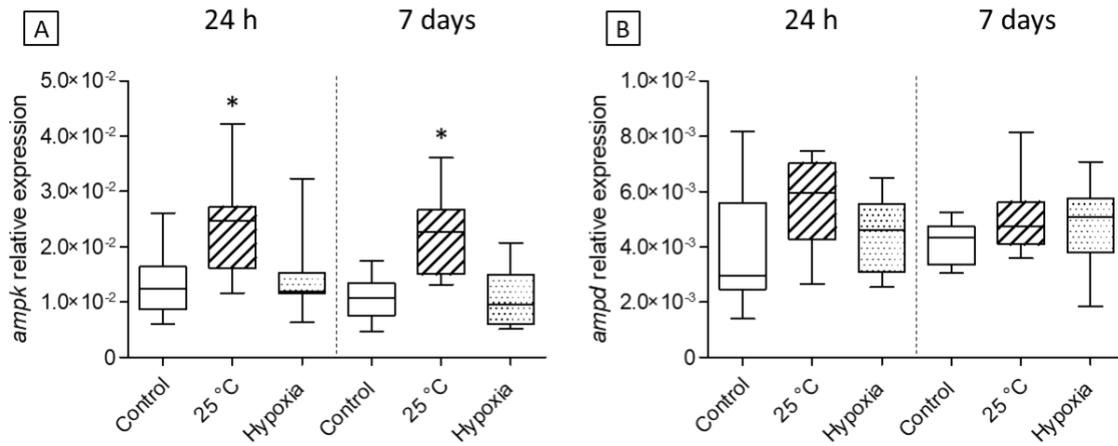


Figure 1. Energy nucleotides regulation through *ampk* (A) and *ampd* (B) gene expression levels measured in control, high temperature and hypoxia-exposed mussels after 24h and 7 days of exposure. Asterisks indicate significant difference between conditions ($p < 0.05$; $n=10$).

Energy nucleotides regulation was assessed through *ampk* and *ampd* genes expression levels (Fig. 1). At both exposure times, *ampk* gene expression level increased significantly in thermal-stress exposed individuals while no variation was noticed between hypoxia-exposed mussels and controls (Fig. 1A). No significant difference was highlighted for *ampd* gene expression (Fig.1B).

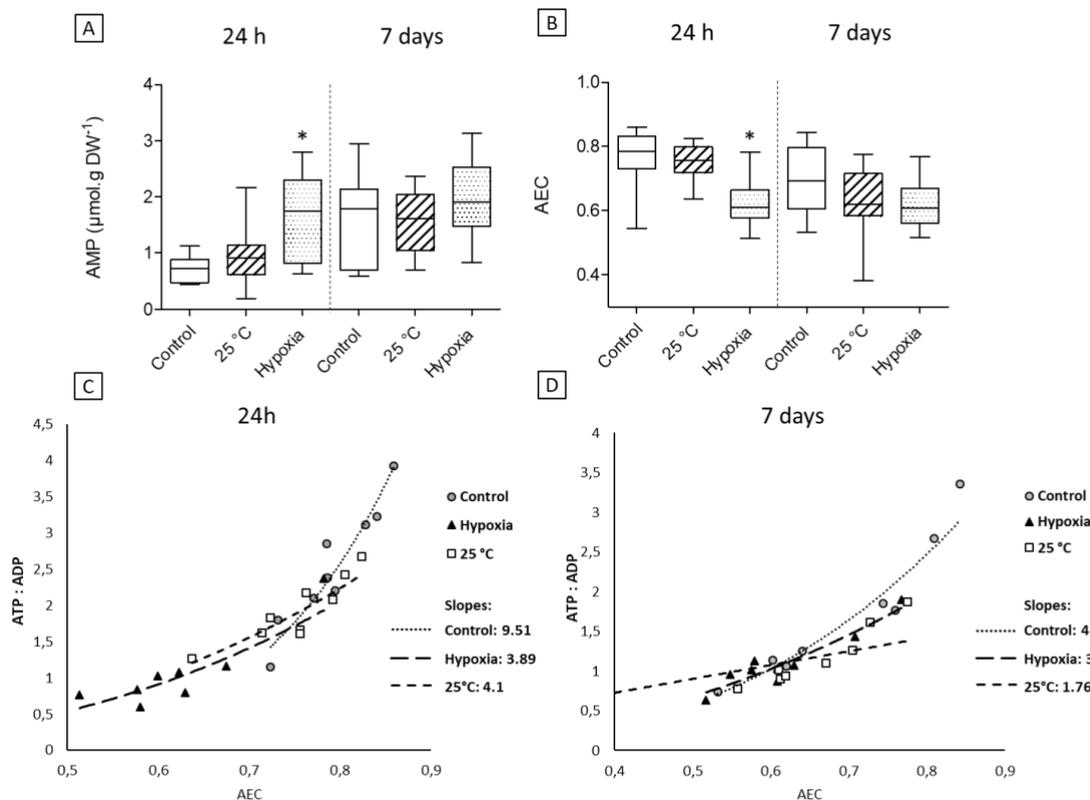


Figure 2. Energy balance state measured in control, high temperature and hypoxia-exposed mussels after 24h and 7 days of exposure (A: AMP content and B: AEC). Asterisks indicate significant difference with controls ($p < 0.05$; $n=10$). (C) and (D) ATP:ADP ratios represented according to AEC values (C: 24h and D: 7 days) in *D. polymorpha*. Each point represents an individual sample. Lines represent power regressions and the slope of each curve is indicated in the legend.

Concerning energy nucleotides, AMP content significantly increased after 24h of hypoxia, leading to a decrease of AEC (Fig. 2 A-B). AEC values remained stable in high temperature exposed mussels and controls after 7 days. ATP:ADP ratios were plotted versus AEC after 24h (Fig. 2C) and 7 days of exposure (Fig. 2D). A power regression was drawn for each condition and the slope of each equation was calculated. According to these results, control slopes were higher than those in hyperthermia- and hypoxia-exposed mussels at both sampling times. After seven days of exposure, slopes in control and thermal stress-exposed mussels decreased compared to 24h (Fig. 2D). In hypoxia-exposed organisms, no variation was observed between the two times of exposure.

3.2 Oxidative phosphorylation

OXPHOS genes expression levels and activities were analysed after 24h and 7 days of exposure (Fig. 3 and Table 1). Measured activities (ETS, COX and CS) remained stable along the experiment between all conditions (Table 1). Relative expression levels of *cox* and *atp* genes increased significantly after 24h in thermal stress-exposed mussels compared to controls and hypoxia-exposed ones. After 7 days of exposure, they decreased and returned to the level of control (Fig. 3 A-B). No variation in *sdh* and *cytb* relative gene expression levels was observed between conditions at each sampling time (Table 2). Endogenous cellular oxygen consumption measured in mussel digestive glands after 7 days of exposure showed no variation between conditions (Fig. 3C). Mitochondrial coupling efficiency was significantly lower in hypoxia-exposed mussels than in controls (Fig. 3D).

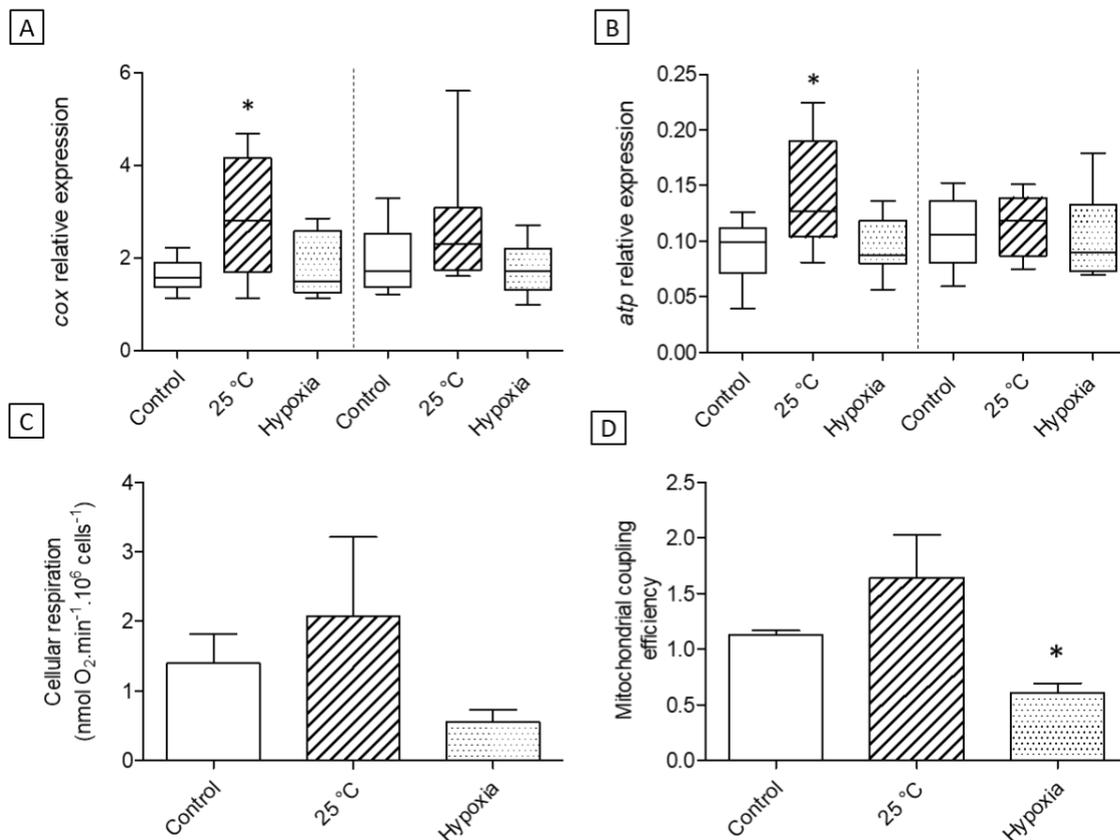


Figure 3. OXPHOS markers measured in controls, high temperature- and hypoxia-exposed mussels after 24h and 7 days of exposure. *cox* (A) and *atp* (B) relative gene expression level (n=10). Endogenous cellular oxygen consumption (C) and mitochondrial coupling efficiency (D) measured after 7 days in *D. polymorpha* (n=5). Asterisks indicate significant difference between conditions ($p < 0.05$).

3.3 Anaerobic metabolism and stress markers

The expression levels of three genes involved in general stress and/or hypoxia response were analysed (Fig. 4). After 24h of high temperature exposure, mussels showed a significant increase of hypoxia-inducible factor (*hif*) relative gene expression level compared to controls but its expression returned to control level after 7 days (Fig. 4A). Although no difference was observed for *aox* relative gene expression, inter-individual variability was higher in exposed mussels than control after 24h ($p < 0.05$, Bartlett test) (Fig. 4B). Lactate dehydrogenase (*ldh*) gene expression level remained stable in all conditions (Fig. 4C). Concerning IMP content, variability of content increased in high temperature-exposed mussels after 24h ($p < 0.01$, Bartlett test; Fig. 4D).

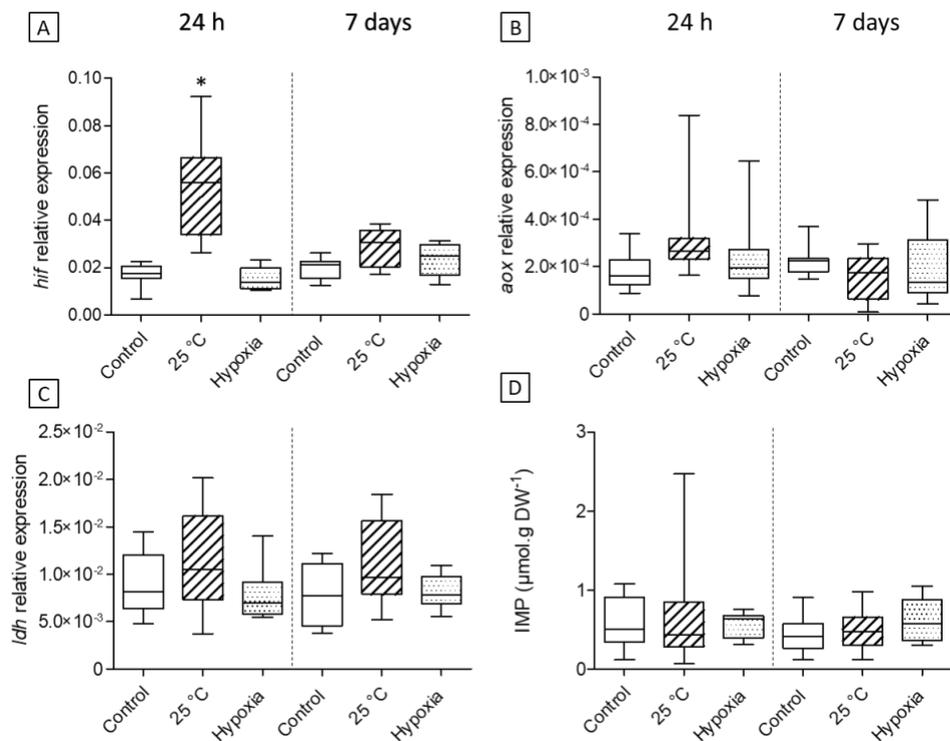


Figure 4. Anaerobic and stress markers measured in controls, high temperature- and hypoxia- exposed mussels after 24h and 7 days of exposure ($n=10$). Relative genes expression levels of *hif* (A), *aox* (B), *ldh* (C) and IMP content (D). Asterisks indicate significant difference between conditions ($p < 0.05$).

3.4 Global responses overview

The whole set of markers was used to build a PLS-DA model (Fig. 5). The model explained 70% of the total variance of the dataset. The primary axis was mainly defined by OXPHOS, anaerobic metabolism and energy nucleotides regulation markers. The secondary axis was mainly characterized by energy balance with ATP and AEC on the top and AMP and ADP on the bottom. These four markers were VIP (Variable Importance in Projection) markers as well as *sdh*, *atp*, *ampd*, *hif* and *cox* relative gene expressions and discriminate the overall data set. All conditions were clearly separated by the model. Exposure times were also separated in each condition along the secondary axis with higher ADP and AMP content in tissues after 7 days of exposure whatever the condition. Mussels exposed to short-term thermal stress showed the highest levels of gene expression. The responses of hypoxia-exposed organisms were grouped close to the two-axis intersection, suggesting a low metabolism activity.

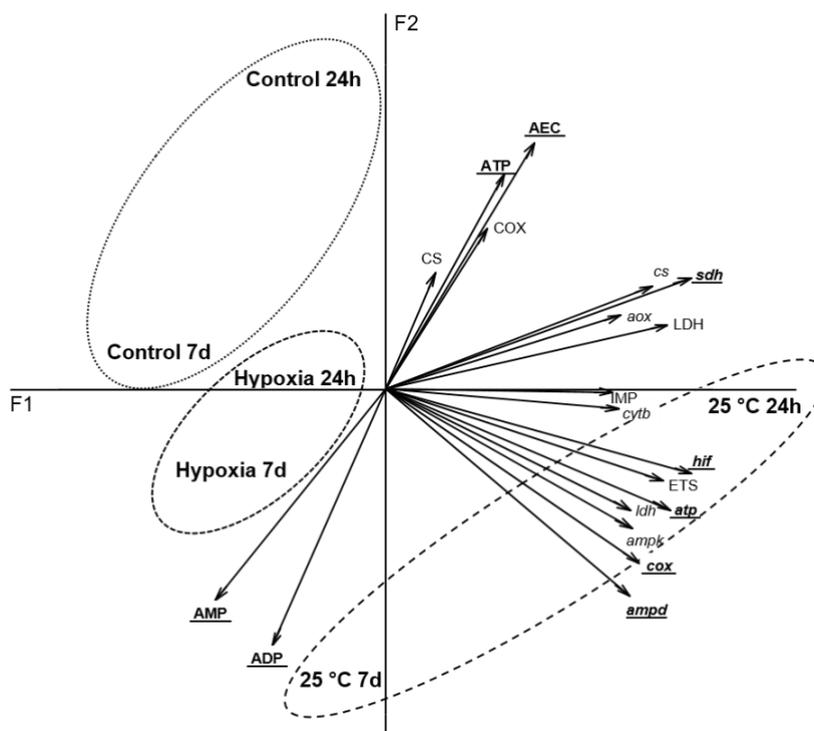


Figure 5. Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) and its superposed correlation circle representing markers responses for controls and mussels exposed to high temperature or hypoxia. The F1-F2 axes represent 49% and 21% of the total variance of the data set respectively. Bold and underlined markers indicate VIP markers.

Table 1. Effects of condition (temperature and hypoxia) and duration (24h and 7 days) on energy metabolism marker responses in D. polymorpha. The effects were statistically calculated by an ANOVA 2 factors. Significant effects ($p < 0.5$) are presented in bold and underlined.

A Two-way ANOVA was performed on the overall data set (Table 1). This approach allowed the observation of the stress effect on each marker in a global view. Of note, there were no combinatory effect between thermal stress and time of exposure except for *hif*, *cs* and *aox* gene expression levels. Energy-related indices (AEC, ATP/ADP ratio) were sensitive to

	Two-way ANOVA					
	Condition		Time		Condition*Time	
	Hypoxia	25 °C	Hypoxia	25 °C	Hypoxia	25 °C
Metabolites						
ATP	$F_{1,30} = 11.56 p < 0.01$	$F_{1,31} = 2.08 p = 0.15$	$F_{1,30} = 0.01 p = 0.98$	$F_{1,31} = 2.37 p = 0.13$	$F_{1,30} = 0.29 p = 0.53$	$F_{1,31} = 1.07 p = 0.31$
ADP	$F_{1,30} = 4.10 p = 0.02$	$F_{1,31} = 1.21 p = 0.28$	$F_{1,30} = 4.10 p = 0.02$	$F_{1,31} = 7.89 p < 0.01$	$F_{1,30} = 2.96 p = 0.09$	$F_{1,31} = 1.03 p = 0.32$
AMP	$F_{1,30} = 8.85 p < 0.01$	$F_{1,31} = 0.41 p = 0.53$	$F_{1,30} = 7.13 p = 0.01$	$F_{1,31} = 13.95 p < 0.01$	$F_{1,30} = 1.46 p = 0.23$	$F_{1,31} = 0.67 p = 0.41$
IMP	$F_{1,30} = 1.17 p = 0.19$	$F_{1,31} = 0.44 p = 0.51$	$F_{1,30} = 0.89 p = 0.35$	$F_{1,31} = 2.08 p = 0.15$	$F_{1,30} = 0.80 p = 0.37$	$F_{1,31} = 0.12 p = 0.73$
Energy-related indexes						
AEC	$F_{1,30} = 20.81 p < 0.01$	$F_{1,31} = 3.48 p = 0.07$	$F_{1,30} = 3.49 p = 0.07$	$F_{1,31} = 14.22 p < 0.01$	$F_{1,30} = 2.65 p = 0.11$	$F_{1,31} = 0.21 p = 0.65$
ATP/ADP	$F_{1,30} = 19.65 p < 0.01$	$F_{1,31} = 7.37 p = 0.01$	$F_{1,30} = 2.56 p = 0.11$	$F_{1,31} = 12.08 p < 0.01$	$F_{1,30} = 3.08 p = 0.08$	$F_{1,31} = 0.01 p = 0.95$
Enzyme activities						
CS	$F_{1,36} = 0.75 p = 0.39$	$F_{1,35} = 0.24 p = 0.62$	$F_{1,36} = 0.31 p = 0.57$	$F_{1,35} = 1.03 p = 0.31$	$F_{1,36} = 0.09 p = 0.76$	$F_{1,35} = 1.71 p = 0.19$
COX	$F_{1,33} = 0.27 p = 0.61$	$F_{1,35} = 0.01 p = 0.96$	$F_{1,33} = 0.77 p = 0.38$	$F_{1,35} = 0.74 p = 0.39$	$F_{1,33} = 0.07 p = 0.89$	$F_{1,35} = 0.04 p = 0.84$
ETS	$F_{1,36} = 0.42 p = 0.52$	$F_{1,35} = 0.96 p = 0.33$	$F_{1,36} = 0.02 p = 0.88$	$F_{1,35} = 0.27 p = 0.60$	$F_{1,36} = 0.01 p = 0.98$	$F_{1,35} = 0.49 p = 0.48$
LDH	$F_{1,36} = 0.39 p = 0.53$	$F_{1,35} = 1.48 p = 0.23$	$F_{1,36} = 0.48 p = 0.49$	$F_{1,35} = 3.60 p = 0.06$	$F_{1,36} = 0.15 p = 0.69$	$F_{1,35} = 2.62 p = 0.11$
mRNA expression						
<i>ampd</i>	$F_{1,32} = 1.29 p = 0.26$	$F_{1,35} = 7.04 p = 0.01$	$F_{1,32} = 0.48 p = 0.49$	$F_{1,35} = 0.51 p = 0.48$	$F_{1,32} = 0.01 p = 0.93$	$F_{1,35} = 0.06 p = 0.80$
<i>ampk</i>	$F_{1,32} = 0.87 p = 0.87$	$F_{1,35} = 23.97 p < 0.01$	$F_{1,32} = 0.69 p = 0.41$	$F_{1,35} = 0.24 p = 0.62$	$F_{1,32} = 0.03 p = 0.85$	$F_{1,35} = 0.01 p = 0.93$
<i>cs</i>	$F_{1,32} = 0.06 p = 0.81$	$F_{1,35} = 0.72 p = 0.40$	$F_{1,32} = 0.09 p = 0.77$	$F_{1,35} = 8.82 p = 0.01$	$F_{1,32} = 0.38 p = 0.54$	$F_{1,35} = 5.13 p = 0.02$
<i>ldh</i>	$F_{1,32} = 0.24 p = 0.63$	$F_{1,35} = 4.82 p = 0.03$	$F_{1,32} = 0.21 p = 0.65$	$F_{1,35} = 0.39 p = 0.53$	$F_{1,32} = 0.49 p = 0.49$	$F_{1,35} = 0.51 p = 0.47$
<i>cytb</i>	$F_{1,32} = 0.26 p = 0.61$	$F_{1,35} = 4.45 p = 0.04$	$F_{1,32} = 3.95 p = 0.04$	$F_{1,35} = 1.12 p = 0.29$	$F_{1,32} = 0.19 p = 0.67$	$F_{1,35} = 0.08 p = 0.77$
<i>cox</i>	$F_{1,32} = 0.01 p = 0.97$	$F_{1,35} = 8.69 p = 0.01$	$F_{1,32} = 0.58 p = 0.45$	$F_{1,35} = 0.01 p = 0.94$	$F_{1,32} = 0.91 p = 0.34$	$F_{1,35} = 1.53 p = 0.22$
<i>atp</i>	$F_{1,32} = 0.01 p = 0.91$	$F_{1,35} = 6.43 p = 0.01$	$F_{1,32} = 1.43 p = 0.24$	$F_{1,35} = 0.03 p = 0.85$	$F_{1,32} = 0.15 p = 0.70$	$F_{1,35} = 2.61 p = 0.11$
<i>aox</i>	$F_{1,32} = 0.12 p = 0.73$	$F_{1,35} = 0.23 p = 0.63$	$F_{1,32} = 0.01 p = 0.96$	$F_{1,35} = 0.99 p = 0.32$	$F_{1,32} = 1.23 p = 0.27$	$F_{1,35} = 4.89 p = 0.03$
<i>sdh</i>	$F_{1,32} = 1.19 p = 0.28$	$F_{1,35} = 1.07 p = 0.31$	$F_{1,32} = 2.61 p = 0.12$	$F_{1,35} = 5.96 p = 0.02$	$F_{1,32} = 0.57 p = 0.45$	$F_{1,35} = 1.02 p = 0.32$
<i>hif</i>	$F_{1,32} = 0.35 p = 0.55$	$F_{1,35} = 38.55 p < 0.01$	$F_{1,32} = 9.36 p < 0.01$	$F_{1,35} = 10.18 p < 0.01$	$F_{1,32} = 2.35 p = 0.13$	$F_{1,35} = 14.81 p < 0.01$

the different stress and to the duration of thermal exposure. Hypoxia was associated with condition effects on adenylate nucleotides while sole effect of time was noticed in hypoxia- and high temperature-exposed mussels on ADP and AMP contents. Relative gene expression levels were particularly sensitive to temperature. Indeed, all gene expressions except *cs*, *aox* and *sdh* ones were affected by high temperature condition. Concerning enzymatic activities, no effect of condition and exposure duration was highlighted. No hypoxia effect was noticed on targeted genes. However, a time effect was observed in *cytb* and *hif* gene expression levels. No combined effect of hypoxia and time duration was noticed in all markers responses.

4. Discussion

The aim of this study was to characterise and compare energy metabolism responses after a thermal or a hypoxic stress in *Dreissena polymorpha*. Energy metabolism management is critical for individual survival and is involved in species tolerance to environmental conditions and their adaptation and/or acclimatization capacities (Pörtner, 2010; Sokolova, 2018; Sokolova et al., 2012). Although several studies already focused on thermal stress effects on *D. polymorpha* energy metabolism (Aldridge et al., 1995; Alexander Jr. et al., 1994; Elderkin and Klerks, 2005; Spidle et al., 1995; White et al., 2015), hypoxia effects are still poorly known in this species (Alexander Jr and McMahon, 2004; McMahon, 1996). To the best of our knowledge, we present for the first time a study dealing with several functional processes related to energy metabolism in a freshwater sentinel species exposed to hypoxia or high temperature.

4.1 Thermal stress

Temperature increase induced a metabolic activity enhancement after 24h of exposure. Energy nucleotides regulation, highlighted by *ampk* and *ampd* relative gene expression, increased in thermal-stress exposed mussels at the two sampling times. AMPk enzyme is activated by an upstream kinase through free AMP accumulation. This process occurs very quickly as soon as ATP supply decreases (Ke et al., 2018). Here, no AMP accumulation was observed in 25°C exposed mussels. However, *ampd* gene expression level tended to increase associated with an increase of inter-individual variability of IMP content after 24h of thermal stress. These observations may result in a conversion of AMP into IMP in part of the organisms and avoiding thus its accumulation (O'Brien et al., 2017). AMPk enzymatic activation under thermal stress has already been shown in *D. polymorpha* (Jost et al., 2015). Indeed, its activity is season-dependant and increases with temperature. In winter, AMPk

activity quickly reached a steady state from a water temperature of 12°C (Jost et al., 2015). Studies in bivalve and crustacean species showed that AMPk is an early indicator of heat stress since its activity increases before other cellular heat stress indicators such as heat shock proteins or lactate accumulation (Frederich et al., 2009; Jost et al., 2015). The activation of AMPk allows the maintenance of a positive energy balance, in particular by preserving ATP:ADP ratio (Hardie and Evans, 2019; Ke et al., 2018). According to our results, the slope of the curve plotting ATP:ADP ratio versus AEC, was lower in heat-exposed mussels compared to controls. However, no decrease of AEC was observed, suggesting such conservation of the energy balance equilibrium.

Oxidative phosphorylation relative gene expressions increased in high temperature exposed mussels after 24h. The increased relative expression of these transcripts has already been shown under heat stress in the redband trout (Garvin et al., 2015) as well as in natural environments during spring and summer in *D. polymorpha* (Kerambrun et al., 2016; Louis et al., 2020). Since no variation was observed in ETS and COX activities, the increased expression of the genes encoding these enzymes may contribute to the activity maintenance. Indeed, the discrepancies between gene expression and activities could also be due to different levels of regulation of these pathways. Hypoxia markers, such as *hif* relative gene expression, also increased with temperature. The transcriptional factor *hif-1 α* is not only known to be regulated by oxygen but also by hyperthermia which plays a key role in its up-regulation in cells (Chun et al., 2003). In addition, *ldh* relative gene expression also trended to increase suggesting an overwhelmed aerobic capacity since mussels need to recruit anaerobic metabolism. The global increase of metabolism is known to reflect the transition from *optimum* to *pejus* range of environmental conditions (Sokolova et al., 2012). With increasing temperature, aerobic scope is favoured supported by the anaerobic metabolism to ensure the energy demand (Mascaró et al., 2019; Pörtner, 2010). Some authors showed that the mobilization of anaerobic metabolism under thermal stress resulted from a limited capacity of oxygen uptake and transport rather than in mitochondrial dysfunction, in the rock crab *Cancer irroratus* (Frederich and Pörtner, 2000) and in periwinkle *Littorina saxatilis* (Sokolova and Pörtner, 2003). Although no significant difference in *aox* relative gene expression was noticed here, a tendency to increase was observed after 24h suggesting a potential impact of the temperature on the redox balance. AOX accepts electrons directly from ubiquinol bypassing complexes III and IV without transferring protons. Thus, the use of AOX complex leads to a lowered ATP production capacity, which is consistent with the decrease tendency of ATP

content under high temperature. In addition, AOX is involved in mitochondrial redox balance by neutralising ROS (Mc Donald et al., 2009), mainly produced by the mitochondrial respiratory chain. However, no increase of OXPHOS activity and cellular damage associated with ROS production (data not shown) were revealed after 7 days at 25°C. The unchanged ROS level may result from both absence of oxidative stress and ROS counterbalancing by AOX. After seven days of exposure, all markers showed similar level to control, except for *ampk* gene expression, suggesting that *D. polymorpha* is able to implement compensatory mechanism during middle-term exposure to high temperature.

Although most of markers presented levels similar to controls after 7 days of high temperature exposure, our results seem to show an overwhelmed global energy metabolism. Indeed, the slope of the curve representing ATP:ADP ratio versus AEC drastically decreased compared to control. In addition, ADP and AMP tended to accumulate, and the PLS-DA model confirmed their potency in discriminating the data set. The accumulation of ADP and AMP could be partially linked to the mussels' fasting during the experimentation. Although cellular respiration measured in heat-exposed organisms did not differ from control after 7 days, compensatory mechanisms seemed to be no longer able to respond to the energy demand, suggesting a further transition to *pessimum* range. Indeed, the cumulative effect of thermal stress in time affects the overall organisms' performance making organisms overwhelmed (Mascaró et al., 2019). According to our present results, after 7 days of thermal stress at 25°C, a beginning of transition between *pejus* to *pessimum* range seemed to appear challenging thus organisms' fitness and survival (Sokolova et al., 2012). This hypothesis is supported by White et al. (2015) study which showed an increase of mortality when *D. polymorpha* was exposed more than 10 days to high temperatures (25-28°C).

4.2 Hypoxic stress

Overall, mussels' responses to hypoxia showed an impairment of energy balance. After 24h of exposure, the AEC decreased significantly compared to control, mainly due to lower ATP content in hypoxia-exposed mussels. The reduced ATP level and consequently AEC, have been previously associated with a decrease of the OXPHOS as revealed by ETS activity (Sokolova, 2018). However, in our study, no variation of ETS activity was noticed in hypoxia-exposed organisms at the two times suggesting that the increased energy demand was not compensated. Of note, anaerobic markers were not upregulated in mussels exposed to hypoxia and no variation was observed in enzymatic activity responses either. After seven

days of hypoxia, cellular respiration rate was lower and mitochondrial coupling efficiency significantly decreased compared to controls, suggesting proton leak (Sokolova, 2018).

Adaptive mechanisms facing hypoxia depend on species tolerance (Sokolov et al., 2019; Sokolova, 2018). Yusseppone et al. (2018) exposed a freshwater hypoxia-tolerant clam, *Diplodon chilensis*, to a moderate hypoxia (2mg.L⁻¹ O₂ ~ 30% dissolved oxygen). Authors showed no variation in most of analysed energy metabolism markers except for *sdh* gene expression, which decreased after 10 days under hypoxia. In addition, *aox* gene expression increased only under anoxia conditions. The authors concluded that *D. chilensis* used an energy conservation strategy through a metabolic rate depression (MRD) under hypoxia. Although no significant increase was observed here in *aox* gene expression level, its responses variability increased after 24h of hypoxia. After 7 days of exposure, no variation was observed in *sdh* relative gene expression. These results are consistent with observations of the literature and suggest that *D. polymorpha* could tolerate such hypoxic conditions (30% O₂) at least one week. However, a recent study showed that *Dreissena polymorpha* distribution is correlated with hypoxic areas. Authors showed that only few and young mussels were found in hypoxic zones suggesting a sensitivity to long-term hypoxic conditions (Karatayev et al., 2018).

The global responses analysis allowed us to consider the whole panel of markers measured in each condition. After 24h of hypoxia, mussels' responses were close to the axis intersection, showing a slight decline of global energy metabolism. After 7 days of exposure, global responses remained nearby this intersection, suggesting thus a sustained low metabolic rate after 7 days under hypoxia. Hypoxia effect has already been studied in *D. polymorpha* (Alexander Jr and McMahon, 2004) and displayed a metabolic rate decrease under hypoxia (50% dissolved O₂) when mussels were acclimated to high temperatures (15 and 25°C). Since its living environment is not submitted to huge oxygen variations, *D. polymorpha* has been considered as a poorly hypoxia-adapted species (McMahon, 1996). Nevertheless, studies realised on hypoxia tolerant species such as *C. gigas* and *C. virginica* showed a decrease of mitochondrial coupling related to a MRD under hypoxic conditions (Ivanina et al., 2012; Kurochkin et al., 2011; Sussarellu et al., 2013), similarly to our observations in *D. polymorpha*. This metabolic arrest through a decline of ATP turnover was described as hypoxia adaptive mechanism in organisms (Hochachka et al., 1996). In this way, *D. polymorpha* appears to be more hypoxia-tolerant than expected since a MRD was observed through the overall dataset. It is likely that this species developed potential acclimation or

adaptation to changing environments. Indeed, a significant increase in the frequency and the intensity of meteorological and hydrological events has been observed (EEA, 2007). According to the data collected by the French Water Agency, dissolved oxygen measurements strongly varied in previous summer months near our sampling site. Average oxygen saturation decreased from 95% in 2016 to 86% in 2018 with values below 70% in summer in 2018 (<http://rhin-meuse.eaufrance.fr>). The increased frequency of drought periods associated with oxygen variations could affect populations, bringing them to develop new strategies in order to ensure their survival.

4.3 Potential biomarkers?

The ANOVA-2 factor performed on overall responses allowed to evaluate condition, time and their combination effects. Only few combined effects of condition and time were recorded. Indeed, only *cs*, *aox* and *hif* gene expressions were significantly affected by both factors simultaneously. According to our observations, energy related indices were significantly impacted by the two conditions and by time under thermal stress. AEC has already been used as biomarker in ecotoxicology but its interpretation is controversial (Le Gal et al., 1997; Marazza et al., 1996; Sokolova et al., 2005). Although low AEC values seem to systematically indicate a stress, higher AEC values do not reflect the absence of disturbance. Indeed, an exposure to higher contaminant concentrations leads to an increase of AEC variability without a significant decrease of the average values (Le Gal et al., 1997; Marazza et al., 1996). The evolution of the curve representing the ratio ATP:ADP versus the AEC could allow to visualize the evolution of the three parameters and could bring more insights. Indeed, this representation of responses was revealed as good indicator of energetic changes that would have been missed by simple analysis of the usual energetic parameters (Thébault et al., 2000).

Concerning enzymatic activities, the targeted markers seemed to be less sensitive at the biochemical level than at the molecular one. Indeed, under thermal stress, most of the gene expressions were upregulated after 24h of exposure. However, only *ampk* significantly remained overexpressed after seven days. Few markers, i.e: *aox*, *hif* and *cs*, showed a combined effect of time and condition (25°C). They could constitute putative relevant biomarkers since they integrate both thermal stress and exposure duration. In an active biomonitoring, these markers could bring information in a global change context. However,

no significant difference in their expression level was shown after seven days of exposure. Their use as potential biomarker of disturbance chronicity still need to be further investigated.

5. Conclusion

This study highlighted that the *D. polymorpha* population studied here presented different energy metabolism management strategies according to the kind of stress in laboratory conditions. Indeed, our observations showed that thermal stress led to an increased metabolic rate and on the contrary, hypoxia induced a MRD. In addition, after 7 days of thermal stress, compensatory mechanisms seemed overwhelmed. In risk assessment, time factor should be taken into account since organisms' tolerance window depends on the duration of stress exposure. Mitochondria are a centre of animals' adaptation to environmental conditions through diverse metabolic rearrangements (fusion, fission, proliferation, and mitophagy) (Sokolova, 2018). More studies regarding combined effect of hypoxia and temperature and natural physicochemical parameters fluctuations effects on energy metabolism could allow the detection of global change impact on aquatic organism populations.

Acknowledgment

We wish to thank Stéphanie Grandemange for the oxygraph loan. This work was supported by the Grand-Est region, France and the University of Reims Champagne Ardenne through MEENDRE project.

Supplementary material:

Table S1. Primers used for gene expression measurements. Abbreviations, NCBI accession numbers of the original sequences of the genes targeted in *D. polymorpha*.

Gene	Abbreviation	NCBI	F primers	R primers
Actin	<i>act</i>	AF082863	CCTCACCTCAAGTACCCCAT	TTGGCCTTGGGTTGAGTG
Alternative oxidase	<i>aox</i>	Q9P959	GTGAACCATAACCTCGCCTC	TGTAGTGACTGCGGATGGTC
AMP deaminase	<i>ampd</i>	Q9DBT5	ACCCAGCCAGTGTGTTTCA	TTTGCTCGTGGACTCAACGT
AMP kinase α subunit	<i>ampk</i>	Q8BRK8	TGCTAAATGAAAGAGGTGACGC	CATGTGGTGGCATATACGATGT
ATP synthase	<i>atp</i>	JQ781135	GACTCCACCTCCCGTATCCT	TCCTCTGAAAGCTCGTCCAT
Cytochrome c oxidase	<i>cox</i>	AAL55513	AGGCCCTGCGATAGATTTTT	AAAGGGACCCGGTAAAATTG
Citrate synthase	<i>cs</i>	MN579511	GTGCCCTGTCAGACCCTTAC	CTGTCCTGCCTTGAGTGTGT
Cytochrome b	<i>cytb</i>	DQ072120.1	CGCCACTTTAAAGCGATTTTT	TGGGTCAGCAAATAGATCTGG
Hypoxia inducible factor-1 α	<i>hif</i>	P59723	TGTATGGGGTCAGTAAGAAGCT	TCCTGCAAGCACTCAACGAT
Lactate dehydrogenase	<i>ldh</i>	Q7TNG8	TGCCCAAACACTACATTGCCAAAT	ATTGGGATTGGCAAACGGGA
Ribosomal protein S3	<i>s3</i>	AJ517687	CAGTGTGAGTCCCTGAGATACAAG	AACTTCATGGACTTGGCTCTCTG
Succinate dehydrogenase	<i>sdh</i>	Q9YHT2	TAGACCGTCCAGTTAGCGC	CCTCTGCCACACATGTACGT

References

- Aldridge, D.W., Payne, B.S., Miller, A.C., 1995. Oxygen consumption, nitrogenous excretion, and filtration rates of *Dreissena polymorpha* at acclimation temperatures between 20 and 32 °C. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 1761–1767. <https://doi.org/10.1139/f95-768>
- Alexander Jr, J.E., McMahon, R.F., 2004. Respiratory response to temperature and hypoxia in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 137, 425–434. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2003.11.003>
- Alexander Jr., J.E., Thorp, J.H., Fell, R.D., 1994. Turbidity and Temperature Effects on Oxygen Consumption in the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 179–184. <https://doi.org/10.1139/f94-020>
- Altieri, A.H., Gedan, K.B., 2015. Climate change and dead zones. *Glob Change Biol* 21, 1395–1406. <https://doi.org/10.1111/gcb.12754>
- Chun, Y.-S., Hyun, J.-Y., Kwak, Y.-G., Kim, I.-S., Kim, C.-H., Choi, E., Kim, M.-S., Park, J.-W., 2003. Hypoxic activation of the atrial natriuretic peptide gene promoter through direct and indirect actions of hypoxia-inducible factor-1. *Biochemical Journal* 370, 149–157. <https://doi.org/10.1042/bj20021087>
- Diaz, R.J., Rosenberg, R., 2008. Spreading Dead Zones and Consequences for Marine Ecosystems. *Science* 321, 926–929. <https://doi.org/10.1126/science.1156401>
- EEA, 2007. Air pollution in Europe. EEA Technical report 5/2007 – European Environment Agency, Copenhagen.
- Elderkin, C., L., Klerks, P., L., 2005. Variation in thermal tolerance among three Mississippi river populations of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Journal of Shellfish Research* 24, 221–226. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[221:VITTAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[221:VITTAT]2.0.CO;2)
- Eliason, E.J., Farrell, A.P., 2014. Effect of hypoxia on specific dynamic action and postprandial cardiovascular physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 171, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.01.021>
- Frederich, M., O'Rourke, M.R., Furey, N.B., Jost, J.A., 2009. AMP-activated protein kinase (AMPK) in the rock crab, *Cancer irroratus*: an early indicator of temperature stress. *Journal of Experimental Biology* 212, 722–730. <https://doi.org/10.1242/jeb.021998>

- Frederich, M., Pörtner, H.O., 2000. Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279, R1531–R1538. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.5.R1531>
- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 10, 935–944. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1146363>
- Garvin, M.R., Thorgaard, G.H., Narum, S.R., 2015. Differential Expression of Genes that Control Respiration Contribute to Thermal Adaptation in Redband Trout (*Oncorhynchus mykiss gairdneri*). *Genome Biology and Evolution* 7, 1404–1414. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv078>
- Hardie, D.G., Evans, A.M., 2019. Molecular Regulation of Energy Balance, in: *Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.013.60>
- Hochachka, P.W., Buck, L.T., Doll, C.J., Land, S.C., 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 9493–9498. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9493>
- Hochachka, P.W., Lutz, P.L., 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 130, 435-459.
- Ivanina, A.V., Kurochkin, I.O., Leamy, L., Sokolova, I.M., 2012. Effects of temperature and cadmium exposure on the mitochondria of oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to hypoxia and subsequent reoxygenation. *Journal of Experimental Biology* 215, 3142–3154. <https://doi.org/10.1242/jeb.071357>
- Jost, J.A., Keshwani, S.S., Abou-Hanna, J.J., 2015. Activation of AMP-activated protein kinase in response to temperature elevation shows seasonal variation in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 182, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.11.025>
- Kalogeris, T., Bao, Y., Korthuis, R.J., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biology* 2, 702–714. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.006>

- Karatayev, A.Y., Burlakova, L., E., Padilla, D.K., 1997. The effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on aquatic communities in Eastern Europe. *Journal of Shellfish Research*, 16, 187–203.
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Mehler, K., Bocaniov, S.A., Collingsworth, P.D., Warren, G., Kraus, R.T., Hinchey, E.K., 2018. Biomonitoring using invasive species in a large Lake: *Dreissena* distribution maps hypoxic zones. *Journal of Great Lakes Research* 44, 639–649. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2017.08.001>
- Ke, R., Xu, Q., Li, C., Luo, L., Huang, D., 2018. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism: AMPK and ATP balance. *Cell Biol Int* 42, 384–392. <https://doi.org/10.1002/cbin.10915>
- Kerambrun, E., Rioult, D., Delahaut, L., Evariste, L., Pain-Devin, S., Auffret, M., Geffard, A., David, E., 2016. Variations in gene expression levels in four European zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, populations in relation to metal bioaccumulation: A field study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 134, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.018>
- Kurochkin, I.O., Etkorn, M., Buchwalter, D., Leamy, L., Sokolova, I.M., 2011. Top-down control analysis of the cadmium effects on molluscan mitochondria and the mechanisms of cadmium-induced mitochondrial dysfunction. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 300, R21–R31. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00279.2010>
- Le Gal, Y., Lagadic, L., Le Bras, S., Caquet, T.H., 1997. Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier Chap 12.
- Louis, F., Rocher, B., Barjhoux, I., Bultelle, F., Dedourge-Geffard, O., Gaillet, V., Bonnard, I., Delahaut, L., Pain-Devin, S., Geffard, A., Paris-Palacios, S., David, E., 2020. Seasonal monitoring of cellular energy metabolism in a sentinel species, *Dreissena polymorpha* (bivalve): Effect of global change? *Science of The Total Environment* 725, 138450. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138450>
- Marazza, D., Bornens, Ph., Le Gal, Y., 1996. Effect of Ammonia on Survival and Adenylate Energy Charge in the Shrimp *Palaemonetes varians*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34, 103–108. <https://doi.org/10.1006/eesa.1996.0050>
- Mascaró, M., Horta, J.L., Diaz, F., Paschke, K., Rosas, C., Simões, N., 2019. Effect of a gradually increasing temperature on the behavioural and physiological response of juvenile *Hippocampus erectus*: Thermal preference, tolerance, energy balance and

- growth. *Journal of Thermal Biology* 85, 102406.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102406>
- McMahon, R.F., 1996. The Physiological Ecology of the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, in North America and Europe. *Am Zool* 36, 339–363.
<https://doi.org/10.1093/icb/36.3.339>
- Navarro, A., Faria, M., Barata, C., Piña, B., 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environmental Pollution* 159, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.018>
- O’Brien, W.G., Ling, H.S., Zhao, Z., Lee, C.C., 2017. New insights on the regulation of the adenine nucleotide pool of erythrocytes in mouse models. *PLoS ONE* 12, e0180948.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180948>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 45e–445. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pörtner, H.-O., 2010. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology* 213, 881–893. <https://doi.org/10.1242/jeb.037523>
- Potet, M., Devin, S., Pain-Devin, S., Rousselle, P., Giambérini, L., 2016. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environmental Pollution* 218, 39–49.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.025>
- Sanders, T., Widdicombe, S., Calder-Potts, R., Spicer, J.I., 2014. Environmental hypoxia but not minor shell damage affects scope for growth and body condition in the blue mussel *Mytilus edulis* (L.). *Marine Environmental Research* 95, 74–80.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.12.013>
- Scavia, D., David Allan, J., Arend, K.K., Bartell, S., Beletsky, D., Bosch, N.S., Brandt, S.B., Briland, R.D., Daloğlu, I., DePinto, J.V., Dolan, D.M., Evans, M.A., Farmer, T.M., Goto, D., Han, H., Höök, T.O., Knight, R., Ludsin, S.A., Mason, D., Michalak, A.M., Peter Richards, R., Roberts, J.J., Rucinski, D.K., Rutherford, E., Schwab, D.J., Sesterhenn, T.M., Zhang, H., Zhou, Y., 2014. Assessing and addressing the re-eutrophication of Lake Erie: Central basin hypoxia. *Journal of Great Lakes Research* 40, 226–246. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2014.02.004>
- Sokolov, E.P., Markert, S., Hinzke, T., Hirschfeld, C., Becher, D., Ponsuksili, S., Sokolova, I.M., 2019. Effects of hypoxia-reoxygenation stress on mitochondrial proteome and

- bioenergetics of the hypoxia-tolerant marine bivalve *Crassostrea gigas*. *Journal of Proteomics* 194, 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.009>
- Sokolova, I., 2018. Mitochondrial Adaptations to Variable Environments and Their Role in Animals' Stress Tolerance. *Integrative and Comparative Biology*.
<https://doi.org/10.1093/icb/icy017>
- Sokolova, I., Pörtner, H., 2001. Physiological adaptations to high intertidal life involve improved water conservation abilities and metabolic rate depression in *Littorina saxatilis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 224, 171–186. <https://doi.org/10.3354/meps224171>
- Sokolova, I.M., Bock, C., Pörtner, H.-O., 2000. Resistance to freshwater exposure in White Sea *Littorina spp.* I: Anaerobic metabolism and energetics. *Journal of Comparative Physiology B* 170, 91–103.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research* 79, 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>
- Sokolova, I.M., Sokolov, E.P., Ponnappa, K.M., 2005. Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology* 73, 242–255. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.016>
- Spidle, A.P., May, B., Mills, E.L., 1995. Limits to tolerance of temperature and salinity in the quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 2108–2119. <https://doi.org/10.1139/f95-804>
- Stramma, L., Johnson, G.C., Sprintall, J., Mohrholz, V., 2008. Expanding Oxygen-Minimum Zones in the Tropical Oceans. *Science* 320, 655–658.
<https://doi.org/10.1126/science.1153847>
- Sussarellu, R., Dudoignon, T., Fabioux, C., Soudant, P., Moraga, D., Kraffe, E., 2013. Rapid mitochondrial adjustments in response to short-term hypoxia and re-oxygenation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Biology* 216, 1561–1569. <https://doi.org/10.1242/jeb.075879>
- Thébault, M.T., Raffin, J.P., Picado, A.M., Mendonça, E., Skorkowski, E.F., Le Gal, Y., 2000. Coordinated Changes of Adenylate Energy Charge and ATP/ADP: Use in Ecotoxicological Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 23–28.
<https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1870>

- Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M., 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. PNAS 105, 15452–15457. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803833105>
- White, J.D., Hamilton, S.K., Sarnelle, O., 2015. Heat-induced mass mortality of invasive zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) at sublethal water temperatures. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 72, 1221–1229. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2015-0064>
- Yusseppone, M.S., Rocchetta, I., Sabatini, S.E., Luquet, C.M., Ríos de Molina, M. del C., Held, C., Abele, D., 2018. Inducing the Alternative Oxidase Forms Part of the Molecular Strategy of Anoxic Survival in Freshwater Bivalves. Front. Physiol. 9, 100. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00100>

5. Conclusions

L'étude des effets des stress thermique et hypoxique sur les réponses du métabolisme énergétique a permis d'observer un profil de réponses différent selon le stress considéré. Comme cela est classiquement décrit dans la littérature, en hyperthermie, l'ensemble de l'activité métabolique augmente afin de répondre aux besoins énergétiques de l'organisme. Néanmoins, ces mécanismes compensatoires semblent ici être dépassés après 7 jours d'exposition suggérant que la tolérance à l'hyperthermie est limitée dans le temps (Figure 28). Les mêmes observations ont d'ores et déjà été décrites par Mascaro et al. (2019) chez l'hippocampe *Hippocampus erectus* dont la capacité à réguler le métabolisme pouvait dépendre du temps d'exposition. Dans une démarche de biosurveillance active, la prise en compte d'outils à la fois précoces et intégrateurs des stress dans le temps est donc essentielle.

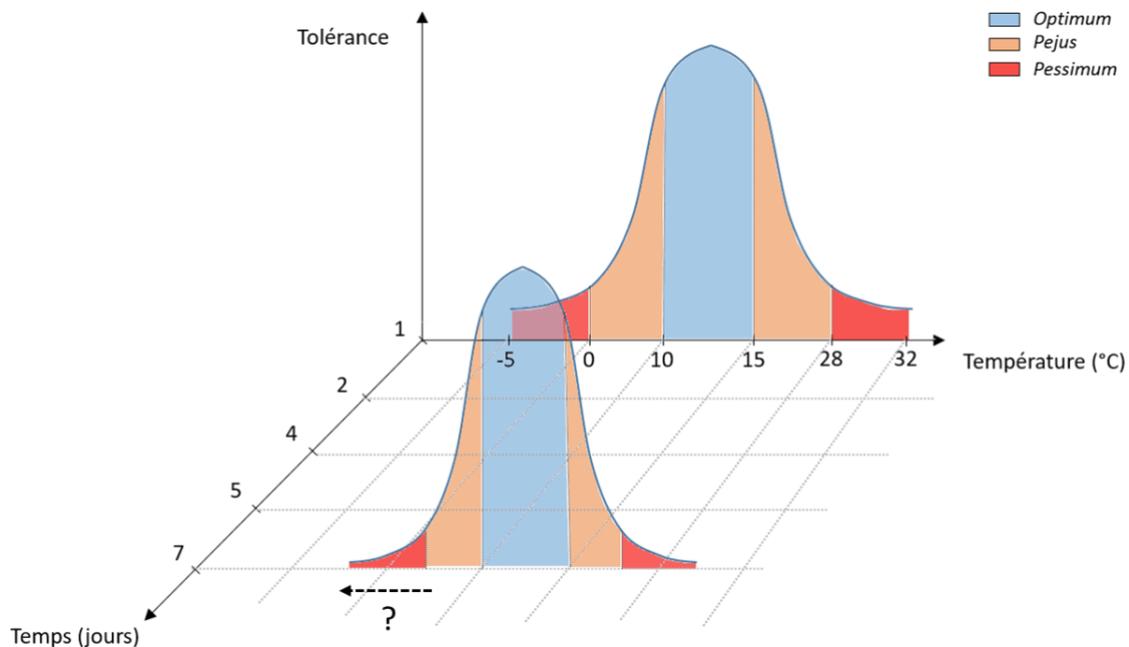


Figure 28. Fenêtre de tolérance thermique chez *D. polymorpha* en fonction du temps d'exposition précisée d'après les résultats obtenus dans cette étude.

A l'inverse du stress thermique, le stress hypoxique a induit une diminution de l'activité métabolique générale des moules exposées à 30% d'oxygène dissous. Cet « arrêt métabolique » est classiquement décrit chez des espèces tolérantes à l'hypoxie. Ce processus consiste en une forte diminution de l'activité métabolique des organismes dans le but de minimiser les dépenses énergétiques et d'assurer la survie des organismes (Sokolova and Pörtner, 2001). D'après les résultats obtenus dans cette étude, cette hypothèse d'un « arrêt métabolique » peut être notamment appuyée par l'analyse statistique globale. En effet,

l'ensemble des réponses des individus exposés à l'hypoxie a été regroupé sur le plan de l'analyse à proximité de l'intersection des deux axes, suggérant une faible réponse des marqueurs ciblés. *D. polymorpha* est un organisme souvent considéré comme peu tolérant à l'hypoxie (Alexander and Mc Mahon, 2004). Néanmoins, les résultats acquis dans cette expérimentation ont montré une capacité compensatoire de *D. polymorpha* face à la limitation en oxygène jusqu'à la fin de l'expérimentation de 7 jours notamment à travers le maintien de la balance énergétique et la mise en place d'un potentiel arrêt métabolique (Figure 29).

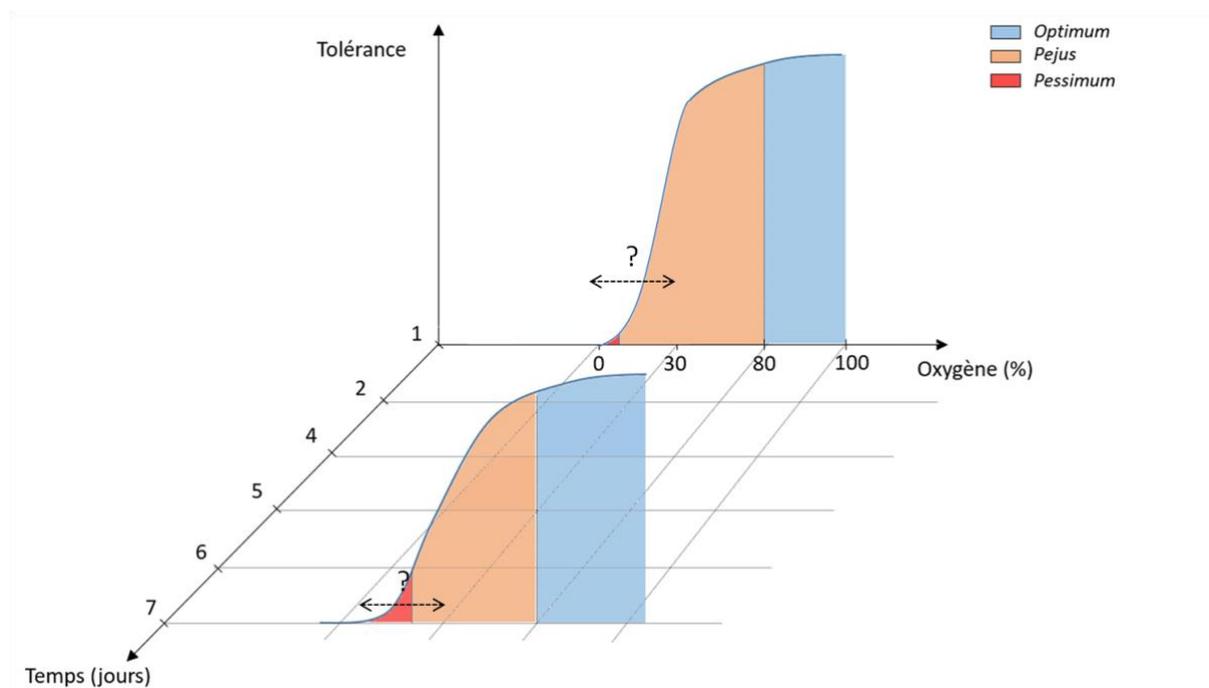


Figure 29. Fenêtre de tolérance à l'hypoxie chez *D. polymorpha* en fonction du temps d'exposition précisée d'après les résultats obtenus dans cette étude.

L'éventuelle acclimatation ou adaptation de la population à l'hypoxie peut notamment résulter des changements globaux auxquels cet animal ectotherme est fortement soumis. Néanmoins, l'augmentation de la température appliquée (+ 15 °C) semble avoir fortement affecté les organismes après 7 jours d'exposition, suggérant ici une limite de la plasticité physiologique des dreissènes à un stress thermique prolongé dans le temps. Dans ce sens, l'utilisation de marqueurs intégrateurs du temps d'exposition au stress comme l'expression du gène *hif*, apparaît comme un outil potentiel pertinent en biosurveillance, complémentaire des indices énergétiques.

II. Effet d'un stress métallique à différentes températures sur les réponses du métabolisme énergétique en fonction du stade de reproduction

1. Contexte et objectifs

D. polymorpha alloue 30 à 45% de son énergie aux différents processus physiologiques impliqués dans la reproduction (Sprung, 1995). Dans ce sens, la majorité des réserves énergétiques est utilisée au printemps-été lors de la période de reproduction et renouvelée en automne-hiver (Publication n°1 ; Palais et al., 2011, 2012). Cet effort énergétique peut sensibiliser les organismes et les rendre plus vulnérables en présence de stress environnementaux (Bacchetta and Mantecca, 2009 ; Binelli et al., 2004, 2001 ; Zorita et al., 2006). En effet, les animaux exposés à la contamination mettent en place différents mécanismes de défense engageant ainsi une dépense énergétique au détriment d'autres fonctions vitales telles que la reproduction, la croissance ou la formation de réserves énergétiques (Sokolova and Lannig, 2008). Néanmoins, en période de reproduction, l'apport en énergie peut ne pas être suffisant pour supporter à la fois la demande énergétique liée au développement des gamètes et la réponse à un stress supplémentaire. En effet, le suivi saisonnier réalisé au préalable sur la même population de *D. polymorpha* a permis d'identifier les fluctuations naturelles des marqueurs métaboliques étudiés, révélant une diminution de l'énergie disponible au sein de l'organisme à partir du printemps. Globalement, le métabolisme énergétique de *D. polymorpha* est donc fortement soumis aux variations saisonnières.

L'objectif de cette étude était de caractériser les réponses des différents processus du métabolisme énergétique ciblés dans ce travail, lors de l'exposition à des stress métallique et thermique modéré. Au sein des écosystèmes aquatiques, le cadmium est considéré comme un des métaux les plus toxiques représentant ainsi un risque certain pour les organismes qui y sont exposés (Hanana et al., 2019; Simpson, 1981; Sokolova, 2004; Sokolova et al., 2005). La toxicité du Cd est notamment due à sa capacité à se substituer à certains métaux essentiels tels que le zinc, le cuivre et le calcium et ainsi, à perturber l'activité de diverses métallo-enzymes (Martin-Garin et Simon, 2004 ; Simpson, 1981). Les organismes filtreurs comme la dreissène

peuvent accumuler cet élément trace métallique dans leurs tissus, ce qui peut induire des effets néfastes au niveau de leur métabolisme (Kraak et al., 1999 ; Kwan et al., 2003). Le Cd est notamment connu pour ses effets sur les mitochondries. En effet, en remplaçant certains métaux essentiels comme le calcium, il peut s'interposer au niveau des mécanismes de transport de ce dernier, conduisant à l'activation de l'apoptose par voie intrinsèque (Kessler and Brand, 1994 ; Skulachev et al., 1967 ; Sokolova et al., 2004). Les perturbations mitochondriales observées lors d'une exposition au Cd peuvent également être amplifiées avec l'augmentation de la température (Ivanina et al., 2012; Lannig et al., 2006; Sokolova, 2004). Lors d'un stress thermique, l'activité métabolique des organismes ectothermes augmente, entraînant une dépense énergétique importante. Cette perte énergétique peut aboutir à une sensibilité et une vulnérabilité plus importante des organismes face à l'exposition à un contaminant, limitant ainsi leur fenêtre de tolérance thermique. Dans un contexte de changements globaux, l'impact de l'augmentation de la température est un paramètre essentiel à prendre en compte dans l'évaluation des risques.

Afin de comprendre comment la gestion du métabolisme énergétique lors de l'exposition aux stress pouvait être affectée par la période de reproduction des dreissènes, deux expérimentations ont été réalisées successivement : une première en novembre 2018 en période de repos et une seconde en juin 2019 en période de reproduction. Les dreissènes ont été prélevées au sein de la même population que celle étudiée lors du suivi saisonnier. Les individus ont été exposés 7 jours à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Cd à deux températures différentes : la température mesurée *in situ* au moment du prélèvement et la température *in situ* + 5 °C. Les moules ont été échantillonnées après 24 heures et 7 jours d'exposition et l'ensemble des réponses des processus clés du métabolisme énergétique étudiés a été mesuré.

2. Principaux résultats

Cette étude a permis de révéler des différences en fonction de la période du cycle saisonnier dans les réponses de plusieurs marqueurs étudiés, tels que l'ensemble des activités enzymatiques (ETS, COX, CS et LDH), l'expression des gènes *ampk*, *cox* et *aox* ainsi que la concentration en protéines et en IMP. Lors du suivi saisonnier, ces activités s'étaient avérées influencées par la saison ainsi que par l'ensemble des fluctuations des paramètres physico-chimiques associées (Publication n°1). Les activités ETS et LDH ont également déjà été montrées sensibles aux variations saisonnières à travers une augmentation de l'activité en été et une diminution en période hivernale chez *Dreissena polymorpha* (Fanslow et al., 2001 ;

Potet, 2017). D'un autre côté, certains marqueurs ont présenté des réponses similaires pour les deux saisons après la phase d'acclimatation de 15 jours en laboratoire (T0). On retrouve parmi ces marqueurs l'ensemble des nucléotides adényliques et la CEA, l'ensemble des gènes codant pour les différents complexes de la chaîne respiratoire excepté le gène *cox*, l'expression relative des gènes *ampk* et *cs*, et les réserves énergétiques (lipides, glycogène). En juin 2019, les valeurs de la CEA mesurées après la phase d'acclimatation au laboratoire étaient plus élevées que dans le milieu naturel à la même période. Les concentrations en glycogène et lipides étaient, elles, toujours plus basses à T0. Le stress, difficilement évitable, subi par les dreissènes suite au transport et au changement de milieu peut provoquer une utilisation de ces réserves. En effet, le glycogène est la première source énergétique utilisée avant les lipides lors de l'apparition d'un stress chez les bivalves (Anacleto et al., 2013; Andrade et al., 2017; Cordeiro et al., 2017, 2016). D'autre part dans cette étude, les analyses statistiques globales ont montré que le facteur saison représentait plus de 92 % de la variance totale du jeu de données tandis que la contamination représentait seulement 0,1 %. Effectivement, peu d'effets du Cd ont été observés sur les différents marqueurs. En période de reproduction, les dreissènes exposées au Cd ont utilisé leurs réserves énergétiques (glycogène) après 24 heures d'exposition. La dégradation du glycogène a notamment pu permettre d'assurer l'apport énergétique nécessaire pour lutter contre le stress et limiter l'impact du contaminant métallique sur les fonctions mitochondriales ou l'équilibre de la balance énergétique. Cependant, des dommages cellulaires ont été mesurés en juin 2019 chez les moules exposées à la fois au stress thermique et au stress métallique suggérant une sensibilité accrue lors de la période de reproduction.

L'ensemble des résultats de cette étude a été valorisé sous la forme d'un article soumis au journal *Aquatic Toxicology* (Publication n°3).

Effect of reproduction cycle stage on energy metabolism responses in a sentinel species (*Dreissena polymorpha*) exposed to cadmium: what consequences for biomonitoring?

En révision dans le journal Aquatic Toxicology

Authors: Fanny Louis*, Laurence Delahaut, Véronique Gaillet, Isabelle Bonnard, Séverine Paris-Palacios, Elise David

Université de Reims Champagne-Ardenne, INERIS-SEBIO UMR I-02, Reims, France

*Corresponding author: Fanny LOUIS, fanny.louis@univ-reims.fr

SEBIO, UFR SEN, Campus Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims cedex 2, France

Keywords: energy metabolism, ATP, Cd, biomonitoring

Highlights:

- OXPHOS and anaerobic metabolism-related markers varied between seasons in *D. polymorpha*
- Mussel responses to Cd and warming depended on the reproduction stage.
- The reproductive cycle period accounted for 92% of marker responses variance.

Abstract: Metal trace elements such as cadmium (Cd) are commonly present in ecosystems and could lead to impairment of mitochondrial functions and energy imbalance in aquatic organisms including molluscs. Combined exposure to increasing temperatures and Cd could enhance such an impact on animals. Seasonal fluctuations, such as temperature, and the corresponding reproduction cycle can affect biomarker responses. However, the reproduction cycle stage is rarely taken into account in ecotoxicological studies. Thus, this work aimed at understanding energy metabolism responses in a sentinel species, *Dreissena polymorpha*. Mussels were collected during the rest and the reproduction periods and were exposed to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of cadmium (Cd) at two temperatures (*in situ* temperature and *in situ* temperature + 5°C) during 7 days. Energy metabolism was monitored by measuring reserves and energy nucleotides charge and by assessing aerobic and anaerobic metabolism markers, and upstream regulation pathways. Markers related to OXPHOS activity revealed seasonal variations under laboratory conditions. Conversely, adenylate nucleotides, glycogen, lipid and transcript levels of AMP-activated protein kinase, citrate synthase, ATP synthase and cytochrome b encoding genes remained steady after the acclimation period. No evident effect of Cd on energy metabolism markers was noticed for both exposures although the transcript level of succinate dehydrogenase and citrate synthase encoding genes decreased with Cd during the rest period. Cellular stress, revealed by lipid peroxidation and catalase mRNA levels, only occurred in Cd and warming-co-exposed mussels during the reproduction period. These results suggest that contaminant impact might differ according to the reproduction cycle stage. The effect of confounding factors on biomarker variations should be further investigated to have a deeper knowledge of metabolism responses under laboratory conditions.

1. Introduction

Dreissena polymorpha is a freshwater model species commonly used in biomonitoring (Binelli et al., 2015, 2004; de Lafontaine et al., 2000; Faria et al., 2011, 2009; Kerambrun et al., 2016; Pain and Parant, 2007; Palais et al., 2011). Its reproduction cycle, with gametogenesis occurring in winter, maturation and release of gametes in spring and summer, and post-reproduction and rest periods in autumn, was described to be energy-costly since this species allocates 30 to 45% of its energy to reproduction (Palais et al., 2011; Sprung, 1995). The gonadal development of *D. polymorpha*, similarly to other bivalves, depends on several environmental factors, in particular temperature and food availability (Haag et al., 1993; McMahon, 1996; Ram et al., 1996). Several studies characterised annual fluctuations of diverse physiological responses in *D. polymorpha*. A transcriptomic study revealed seasonal variations with higher transcripts related to gametogenesis and mitochondrial metabolism in the rest period than in the reproduction period (Navarro et al., 2013). Energy reserve storage such as lipids and glycogen were shown to increase and be stored during winter, and used during the reproduction period (Palais et al., 2011). Oxidative phosphorylation markers, such as electron transport system (ETS) activity and ATP synthase mRNA expression level, were higher during summer than during the winter period (Fanslow et al., 2001; Kerambrun et al., 2016). These seasonal fluctuations are considered as confounding factors and challenge the link between marker responses and the health status of model species (Faria et al., 2014; Minguez et al., 2009; Pain-Devin et al., 2014; Viarengo et al., 2007).

Temperature and trace metals are common environmental stressors in ectotherm species, which are directly exposed to environmental variations and anthropogenic pollution. High temperatures, such as those resulting from seasonal fluctuations, strongly affect the physiology of ectothermic aquatic bivalves and may decrease their tolerance to toxic substances like metals (Sokolova and Lannig, 2008). Cadmium (Cd) is a widespread toxic trace metal in aquatic environments (Simpson, 1981) and is known to be accumulated in bivalves' soft tissues (Kraak et al., 1992; Marie et al., 2006). Cd concentrations ranging from 1 to 90 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ were measured in *Dreissena polymorpha* during biomonitoring surveys (Kraak et al., 1999; Kwan et al., 2003). From 9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, *in vivo* Cd exposures lead to significant physiological disturbances (apoptosis, respiration rate decline, AMP accumulation) in aquatic organisms including molluscs (Hanana et al., 2019; Simpson, 1981; Sokolova, 2004; Sokolova et al., 2005).

Mitochondria are considered as a major target of temperature and trace metals effects, since mitochondrial metabolism plays an important role in energy balance, stress and adaptation (Salin et al., 2015; Sokolova and Lannig, 2008). Several studies reported an effect, which is enhanced at high temperatures, of Cd on energy metabolism. The additive effect of Cd and warming results in an energy deficit in molluscs through a decline of respiration rate (Cherkasov et al., 2010; Ivanina et al., 2012; Lannig et al., 2006; Mubiana and Blust, 2007; Sokolova, 2004). The exposure to Cd coupled to high temperatures also inhibits mitochondrial enzymes such as citrate synthase activity in *Crassostrea virginica* (Cherkasov et al., 2010; Ivanina et al., 2012; Sokolova, 2004). Other metabolism-related markers, such as energy balance and respiratory chain complexes, have already been targeted in metal and thermal stress studies. The adenylate energy charge (AEC) and cytochrome c oxidase (*cox*) mRNA expression decreased after 3 weeks of Cd exposure ($25\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) in *Crassostrea gigas* (Sokolova et al., 2005). Besides their combined effect, Cd and high temperature impacts could differ according to the season of the exposure. Cherkasov et al. (2010) exposed *Crassostrea virginica* to a thermal and metal cross-stress at two different seasons (winter and summer) and observed a higher impact of temperature and Cd on energy metabolism during the reproduction period (summer) than during rest (winter).

The influence of confounding factors on energy metabolism is largely described in marine species but is still poorly studied in freshwater species. In the context of freshwater pollution biomonitoring, the purpose of this work was to study how the reproduction cycle stage influenced the effects of a short-term Cd and warming co-exposure on energy metabolism responses in the sentinel species *Dreissena polymorpha*. Therefore, two Cd exposures at two different temperatures were conducted on mussels harvested during the rest period (November 2018) and during the reproduction period (June 2019). Several markers associated with cellular ATP production and management were measured after 24 hours and 7 days of Cd exposure. Key processes involved in energy metabolism such as energy nucleotides and their regulation (AMP kinase and AMP deaminase), anaerobic (lactate dehydrogenase) and aerobic (citrate synthase, succinate dehydrogenase, cytochrome b, cytochrome c oxidase and ATP synthase) metabolism markers were targeted by analysing mRNA levels and/or enzymatic activities. The potential cellular damage induced by Cd or reactive oxygen species (ROS) produced by the respiratory chain was also assessed through lipid peroxidation and catalase mRNA expression.

2. Material and Methods

2.1 Mussels collection and acclimation

Dreissena polymorpha specimens were hand-collected in the Meuse channel (Commercy, France, E05°35'32'', N48°45'50'') in October 2018 and May 2019. Physicochemical parameters of water at the sampling points are presented in Table S1. Only individuals between 15 and 25mm in length were selected and were quickly transported to the laboratory in aerated field water. Mussels were acclimated for 15 days at the field temperature (11°C in November 2018 and 14°C in June 2019) in two separate 4.5L aquaria. Water was continuously aerated and an artificial photoperiod corresponding to the one at the sampling time (8 a.m. – 6 p.m. in November and 6 a.m. – 10 p.m. in June) was applied. Water from the field was progressively replaced by spring water (Cristaline®, Aurèle spring, 1/3 per day). After 15 days, one water bath was maintained at the field temperature and the temperature of the second was increased by 5°C on three days (2°C per day the two first days and 1°C the third day).

2.2 Exposure design

After acclimation, mussels were exposed for 7 days to 10µg.L⁻¹ of Cd or kept in spring water (control). Both conditions were repeated at two different temperatures (*in situ* temperature and *in situ* temperature + 5°C), in November 2018 and in June 2019. Cadmium chloride (CdCl₂-H₂O; ref 45-23/25-33) was purchased from Sigma-Aldrich. A stock solution of Cd (10mg.L⁻¹, expressed as total ion concentration) was prepared and acidified to 1% with nitric acid to limit metal adsorption. All exposure media (4.5L) were renewed every day with a prediluted Cd solution to ensure a homogenous exposure to Cd. After each renewal, mussels were fed with 15.10³ cells.mL⁻¹ of fresh algae (*Chlorella vulgaris*). Cadmium concentration was measured twice a day in all tanks. The actual concentrations of Cd in exposure water were 7.51µg.L⁻¹ ± 2.73 (November 2018) and 7.93µg.L⁻¹ ± 2.25 (June 2019) during the experiment. Physicochemical parameters (pH, temperature, conductivity and dissolved oxygen) were monitored twice per day in each tank (Table S2). Gonadal development stage was analysed on mussels (*n* =12) before the start of the exposure and 10 other individuals were frozen for metal tissue concentration measurements. After 24 hours and after 7 days of exposure, mussels were also sampled and dissected to perform all other analyses. For transcript level of the genes and enzymatic activity analyses (*n* = 10 for each measurement), digestive glands were dissected and shock-frozen. For reserve content measurements (*n* = 10),

the whole organisms were dissected and shock-frozen. Mussels were entirely shock-frozen with their shell for energy nucleotide contents analysis ($n = 10$).

2.3 Gonadal development analysis

Dissected mussels (without byssus and shell) were fixed in Bouin's aqueous solution for 24h followed by successive alcohol dehydration baths from 50° to 100°. After dehydration, samples were placed in a butanol solution to permeate all tissues. Samples were then paraffin-embedded, and 7 μ M sections were prepared from the foot to gonads of mussels. Sections were stained with picro-indigo carmine and solid nuclear red and observed with a microscope to sex the gonads and to assign them to a development stage (Gist et al., 1997; Palais et al., 2011). The assignment was based on the size and the number of present oocytes (females) or spermatogenesis steps (males).

2.4 Cd concentration in tissues

Mussel soft tissues were dried at 60°C for 24h and digested in nitric acid 65% for 48h at 80°C. Metal quantifications were performed in the resulting acid solutions (adjusted to 3mL with deionized water) by flameless atomic absorption spectrophotometry (flameless AAS: Varian SpectrAA 220 Zeeman), as described in Palais et al. (2012). Results are expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry weight (DW).

2.5 Enzymatic activities

The digestive glands were weighed and crushed in phosphate buffer containing protease inhibitors (50mM pH 7.6 supplemented with 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1mM L-serineborate) at 8:1 (v/w) ratio. Samples were centrifuged (3000g, 10min, 4°C). The supernatant was collected for the enzymatic activities' measurement. Assays were performed with an automated spectrophotometer (Gallery, ThermoScientific). Electron transport system (ETS) and lactate dehydrogenase (LDH) activities, protein content, and lipid peroxidation (LOOH) were measured according to Garaud et al. (2016) and Potet et al. (2016).

For cytochrome c oxidase (COX) activity, cytochrome c (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) was dissolved in potassium phosphate buffer (10 mM, pH 7.0) and reduced by the addition of 6% of ascorbate. The absorbance of cytochrome c was measured at 550nm and 565nm to calculate the ratio A_{550}/A_{565} , which indicates a correct reduction for values comprised between 10 and 20. No purification step was realised after ascorbate addition. The sample supernatant was diluted to

1:45 in 100mM Tris buffer (pH 8.1). Reduced cytochrome was added to the previous dilution. Cytochrome c oxidation was then monitored for 3min at 550nm. For citrate synthase (CS) activity, supernatant was diluted to 1:55 in 0.1M Tris buffer (pH 8.1) supplemented with 0.15mM DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate; Merck) and 0.2mM acetyl-coenzyme A (Merck). The activity was first monitored for 3min at 420nm to subtract the background due to the buffer absorbance. Absorbance at 420nm was recorded again for 3min after the addition of 4mM oxaloacetate (Merck). Enzymatic activity is expressed in U.g⁻¹ proteins (molar extinction coefficient (ε) reduced cytochrome c = 7040M⁻¹.cm-1, ε DTNB = 14140M⁻¹.cm-1).

2.6 Energy reserve contents

Mussel soft tissues were weighed and crushed in 50mM phosphate buffer (pH 8) at 5:1 (v/w) ratio and centrifuged (3000g, 5min, 4°C). Protein content was determined by Bradford's method. Lipid and glycogen contents were measured according to the method of Plaistow et al. (2001).

2.7 Energy nucleotide contents

Nucleotides extraction was realized as described in Sokolova et al. (2005). Briefly, frozen mussels were quickly dissected and lyophilized for 48h. Soft tissues were then crushed in 0.6M perchloric acid (Merck) solution, centrifuged (3000g, 10min, 4°C) and the supernatant was collected. The pH of each extract was adjusted to 5 - 6.5 with 5mM potassium hydroxide and 1M bicine solution. No EDTA was added to perchloric acid solution leading to a potential underestimation (10-20%) of nucleotide contents. Precipitated potassium perchlorate was removed by a second centrifugation. Extracts were then filtered (0.45μm) and stored at -80°C. Concentrations of ATP, ADP, AMP and IMP were measured with a high-performance liquid chromatography (HPLC) system and Nucleosic C18 column (Nucleosil) according to Sokolova et al. (2000). The separation was performed at a flow rate of 0.8mL.min⁻¹ using a mobile phase of 1M phosphate buffer with 5% methanol (pH 6) for 15min. Nucleotide contents were monitored at 254nm and nucleotide concentrations were calculated using ATP, ADP, AMP, and IMP standards (Sigma) of 20, 10, 2 and 10μM, respectively. Adenylate energy charge (AEC) was calculated using the following formula:

$$AEC = \frac{[ATP] + 0.5 \times [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

2.8 mRNA expression of metabolism-related genes

Total RNA was extracted from digestive glands using TriReagent (Euromedex) following the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed on 400ng of total RNA using Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) and random hexamer/oligo dT primers (v/v 3:1) according to the manufacturer's instructions. The reaction was conducted at 42°C for 30min using a PCR Mastercycle (Eppendorf).

Transcript levels of the genes were analysed by real-time quantitative PCR using Absolute Blue qPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. Specific primers are given in Table 1. Energy nucleotides regulation was studied through AMP-activated protein kinase (*ampk*) and AMP deaminase (*ampd*) mRNA expressions. Concerning the OXPHOS, genes encoding the beta subunit of the ATP synthase (*atp*), cytochrome b (*cytb*), cytochrome c oxidase (*cox*), but also another unit of the respiratory chain, the alternative oxidase (*aox*) were selected. Citrate synthase (*cs*), lactate dehydrogenase (*ldh*), and catalase (*cat*) transcript levels were also measured. The optimal primer quantity was evaluated across a range of concentrations between 150 and 600nM. The PCR steps consisted in 15min initial denaturation at 95°C followed by 40 cycles of heat denaturation at 95°C for 10s, annealing at 60°C for 60s and were carried out in a CFX Manager (BioRad) on 1/10 diluted complementary DNA (cDNA). The relative transcript expression level was calculated using the Pfaffl method (Pfaffl, 2001) taking into account the PCR efficiency and normalized by the geometric mean of the two housekeeping genes (encoding actin and ribosomal protein S3) according to Navarro et al. (2011). A standard curve using dilutions of cDNA between 1:10 and 1:1000 was performed to calculate the PCR efficiency.

Table 1. Summary of the primers used for gene expression measurements. Abbreviations, NCBI accession numbers of the original sequences of the genes targeted in *D. polymorpha*.

Gene	Abbreviation	NCBI	F primers	R primers
Actin	<i>act</i>	AF082863	CCTCACCTCAAGTACCCCAT	TTGGCCTTTGGGTTGAGTG
Alternative oxidase	<i>aox</i>	Q9P959	GTGAACCATACCCTCGCCTC	TGTAGTACTGCGGATGGTC
AMP deaminase	<i>ampd</i>	Q9DBT5	ACCCAGCCAGTGTGTTTCA	TTTGCTCGTGGACTCAACGT
AMP kinase α subunit	<i>ampk</i>	Q8BRK8	TGCTAAATGAAAGAGGTGACGC	CATGTGGTGGCATATACGATGT
ATP synthase	<i>atp</i>	JQ781135	GACTCCACCTCCCGTATCCT	TCCTCTGAAAGCTCGTCCAT
Catalase	<i>cat</i>	EF681763	ACGGCTATGGAAGCCACACG	AGGTCGCGCATCGCATAGTC
Cytochrome c oxidase I	<i>cox</i>	AAL55513	AGGCCCTGCGATAGATTTTT	AAAGGGACCCGGTAAAAATTG
Citrate synthase	<i>cs</i>	MN579511	GTGCCCTGTCAGACCCTTAC	CTGTCTGCCTTGAGTGTGT
Cytochrome b	<i>cytb</i>	DQ072120.1	CGCCACTTTAAAGCGATTTTT	TGGGTCAGCAAATAGATCTGG
Lactate dehydrogenase	<i>ldh</i>	Q7TNG8	TGCCCAAACACTATTGCCAAAT	ATTGGGATTGGCAAACGGGA
Ribosomal protein S3	<i>s3</i>	AJ517687	CAGTGTGAGTCCCTGAGATACAAG	AACTTCATGGACTTGGCTCTCTG
Succinate dehydrogenase	<i>sdh</i>	Q9YHT2	TAGACCGTCCAGTTTAGCGC	CCTCTGCCACACATGTACGT

2.9. Statistical analysis

Marker responses were analysed by a two-way ANOVA to assess temperature, exposure duration, and contamination effects. Parametric (Tukey) or non-parametric (Kruskal-Wallis) post-hoc tests were used to determine the significant differences between conditions. Marker responses measured on mussels sampled after the acclimation were compared by a t-test to assess differences between the two reproduction cycle steps. Previously, normality and homoscedasticity of the data were tested with Shapiro and Bartlett tests respectively. A global analysis of marker results was also performed with a Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) to identify the overall capacity of markers to discriminate the different conditions and periods as well as to define the most relevant markers. The relevance of marker responses was based on the individual role of each marker in the overall model, estimated by the VIP (Variable Importance in the Projection). Only markers with a $VIP > 1$ were considered significant in the model. Partial redundancy analysis was also performed on the total dataset to see whether well-characterised variables (months) with strong effects obscure the effects of other explanatory variables. A threshold of $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analyses were performed using R software (R Development Core Team, 3.5.0).

3. Results

3.1. Gonadal development

Gonadal development was analysed on mussels before exposure for both seasons (Fig. 1). In November, 6 females and 2 males were identified, and sex could not be determined in 4 individuals due to complete gonad regression. The histological analysis revealed that 82% of mussels were in the resting stage and 18% in developing one. In June, there were 7 females and 5 males which were either in pre-spawn (33.4%) or post-spawn period (66.6%).

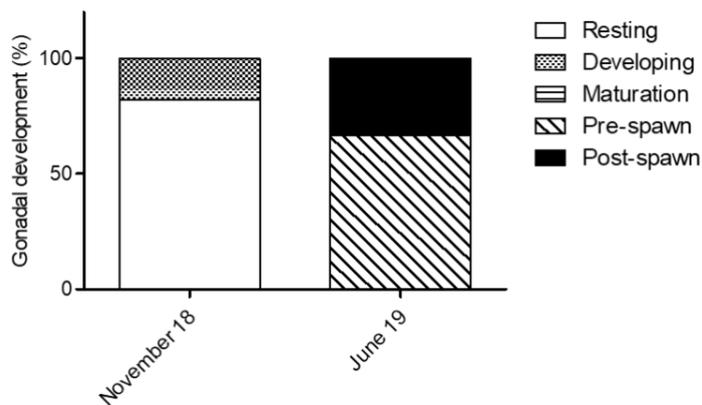


Figure 1. Gonadal development stage in November 2018 and June 2019 observed in overall male and female mussels ($n=12$). Different development stages are represented in percentage of each stage.

3.2. Cadmium bioaccumulation

No Cd accumulation was observed in control mussels after 24h or 7 days. Mussels exposed to Cd accumulated metal in both experimentations compared to control mussels, with a significantly higher accumulation after 7 days of exposure compared to 24h (Fig. 2). Temperature effects on Cd accumulation were observed in Cd-exposed mussels with higher Cd concentration at the elevated temperature after 7 days. While Cd accumulation after 24h was similar between the two months, mussels' tissues presented a significantly higher Cd concentration in November than in June after 7 days of exposure.

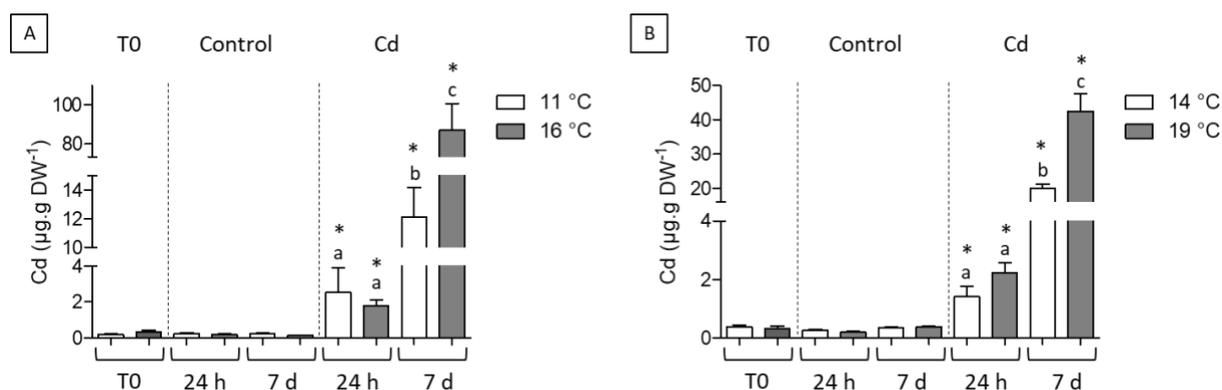


Figure 2. Cadmium bioaccumulation before (T0) and during exposure (24h and 7d) in control and Cd-exposed mussels in November 2018 (A) and June 2019 (B) at in situ temperature (white) and in situ temperature + 5°C (grey). Data are expressed as mean ± SD. Asterisk indicates significant difference with controls. Different letters indicate significant difference between Cd-exposed mussels ($p < 0.05$) ($n=10$).

3.3. Cellular energy metabolism

3.3.1. Seasonal variations

Several markers showed differences between seasons after the acclimation period (Table 2). All energy nucleotide contents (ATP, ADP, and AMP) remained stable after 15 days of acclimation (T0) in both months. Only IMP content was higher in November than in June (Table 2). Glycogen and lipid contents were similar between November and June, while protein content increased significantly in June (Table 2). The mitochondrial density, which is revealed by CS relative mRNA expression and activity, did not vary between the two reproduction periods (Table 2). The oxidative phosphorylation was assessed by measuring ETS and COX activities and relative transcript levels of *cytb*, *cox*, *sdh*, *atp* and *aox* genes. Most of these markers did not show differences between seasons except for *aox*, *sdh* and *cox* mRNA expressions and COX and ETS activities (Table 2). COX activity, *sdh* and *aox* transcript levels were higher in November than in June, while the opposite was observed for ETS activity and *cox* mRNA expression. The increase of *ldh* transcript level and LDH activity in June suggested that the potential capacity for anaerobic metabolism was enhanced in summer period (Table 2). The regulation of energy nucleotides was affected by the sampling period. Transcript level of *ampd* was significantly increased in June compared to November, while no difference was noticed in *ampk* relative mRNA expression (Table 2). No difference between the two seasons was observed in cellular stress markers, as revealed by *cat* transcript level and lipid peroxidation measurement (Table 2).

Table 2. Inter-seasonal variations of marker responses measured on mussels sampled after the acclimation period (T0). Results were expression as mean \pm SD ($n = 10$, $p < 0.05$).

	November 2018	June 2019	<i>p</i> value
<i>ldh</i>	0.01 \pm 0.005	0.02 \pm 0.004	0.001
<i>aox</i>	0.6E⁻³ \pm 0.3E⁻³	0.3E-3 \pm 0.3E⁻³	0.048
<i>cox</i>	1.21 \pm 0.36	4.2 \pm 2.5	0.002
<i>ampd</i>	0.0043 \pm 0.02	0.01 \pm 0.006	0.001
<i>ampk</i>	0.01 \pm 0.009	0.02 \pm 0.01	0.05
<i>sdh</i>	5.38E⁻⁵ \pm 1.3E⁻⁵	2.42E⁻⁵ \pm 1.3E⁻⁵	0.048
<i>cytb</i>	0.40 \pm 0.25	0.18 \pm 0.14	0.06
<i>atp</i>	0.15 \pm 0.03	0.016 \pm 0.06	0.64
<i>cs</i>	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.08
<i>cat</i>	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.58
ETS	0.74 \pm 0.11	0.99 \pm 0.09	1.40E⁻⁸
LDH	89.61 \pm 25.03	105.4 \pm 18.3	0.03
COX	5.40 \pm 2.1	1.62 \pm 0.62	2.10E⁻¹⁰
CS	88.04 \pm 24.47	100.93 \pm 35.03	0.09
IMP	0.33 \pm 0.17	0.21 \pm 0.17	0.04
ATP	5.18 \pm 2.28	4.30 \pm 2.10	0.42
ADP	2.82 \pm 0.72	2.01 \pm 0.64	0.05
AMP	1.47 \pm 0.59	0.99 \pm 0.59	0.06
AEC	0.68 \pm 0.12	0.71 \pm 0.06	0.43
Lipids	0.61 \pm 0.12	0.50 \pm 0.19	0.08
Glycogen	1.09 \pm 0.77	1.38 \pm 0.60	0.46
Proteins	35.70 \pm 6.57	48.67 \pm 14.46	0.001
LOOH	22.37 \pm 15.13	21.82 \pm 5.51	0.34

3.3.2. Exposure effects

The effects of Cd exposure on available energy were assessed by analysing energy nucleotide and reserve contents. In November, levels of adenylates (ATP, ADP and AMP) showed no variation between control and Cd-exposed mussels (Fig. 3A and Table 3). In June, ATP content significantly increased at 14°C in Cd-exposed mussels for 24h while no variation was observed in AMP and ADP contents (Fig. 3B, Table 3). AEC values remained unchanged in all conditions in November (Fig. 3C), while a significant decrease in AEC values was observed in control mussels in June after 7 days at the highest temperature (Fig. 3D). Although no effect of Cd on AEC values was observed, inter-individual variability increased in mussels co-exposed to Cd and elevated temperature for both sampling times (Fig. 3C and D). In November, energy reserves did not show any significant variation (Fig. 3E and

Table 3). During the reproduction period, 24h of Cd exposure led to a significant decrease in glycogen at both temperatures (Fig. 3F), whereas no effect was observed after 7 days of exposure. Protein and lipid contents remained unchanged in all conditions (Table 3).

Mitochondrial responses were evaluated by the activity and mRNA levels of OXPHOS-related enzymes and the citrate synthase (Fig. 4 and Table 3). In November, only *sdh* relative mRNA expression decreased significantly after 7 days of exposure at the highest temperature (Fig. 4A). The other OXPHOS related genes did not display any variation in their transcript level under Cd exposure (Fig. 4C and Table 3). In June, Cd did not affect the relative mRNA expression of the genes involved in OXPHOS (Fig.4B-D and Table 3). A Cd effect was observed on *cs* relative mRNA expression in both exposures. In November, after 24 hours at 11°C (Fig. 4E), *cs* relative transcript level significantly increased in Cd-exposed mussels. In June, it decreased in Cd and warming-co-exposed mussels after 7 days compared to control (Fig. 4F). ETS, COX and CS activities remained stable in all conditions (Table 3).

Table 3. *D. polymorpha* marker responses after 24 hours and 7 days of exposure to Cd at in situ temperature and in situ temperature + 5°C. Data are expressed as mean ± SD (n = 10). Abbreviations: Temp. (temperature); ETS (electron transport system); CS (citrate synthase); COX (cytochrome c oxidase); LDH (lactate dehydrogenase); cytb (cytochrome b gene); ampd (AMP deaminase gene); ampk (AMP-activated protein kinase gene) aox (alternative oxidase gene). Units: μmol.g DW⁻¹ (ADP, AMP and IMP), mg.g FW (proteins, lipids), mmolO₂.g proteins⁻¹.h⁻¹ (ETS), U.g proteins⁻¹ (CS and COX), μmolNADH.g proteins⁻¹.h⁻¹ and relative mRNA expression (ampk, ampd, ldh, cytb, cox and aox).

Month	Time	Temp.	Condition	ADP	AMP	IMP	Proteins	Lipids	ETS	CS	COX	LDH	ampk	ampd	ldh	cytb	cox	aox
November 2018	24 hours	11 °C	Control	2,68 ± 0,28	1,18 ± 0,55	0,23 ± 0,12	37,56 ± 3,23	0,55 ± 0,09	0,77 ± 0,09	87,09 ± 19,04	4,81 ± 1,54	86,87 ± 27,89	0,013 ± 3,7E-03	0,006 ± 2,8E-03	0,009 ± 4,4E-03	0,45 ± 0,15	1,58 ± 1,29	0,0005 ± 1,8E-04
			Cd	2,56 ± 0,63	1,19 ± 0,34	0,24 ± 0,09	35,31 ± 4,78	0,53 ± 0,11	0,76 ± 0,08	91,98 ± 13,14	5,14 ± 1,65	76,71 ± 16,68	0,014 ± 6,3E-03	0,004 ± 1,8E-03	0,009 ± 1,5E-03	0,51 ± 0,29	1,28 ± 0,62	0,0004 ± 1,8E-04
		16 °C	Control	2,67 ± 0,34	0,83 ± 0,29	0,24 ± 0,13	39,83 ± 8,76	0,65 ± 0,17	0,74 ± 0,07	88,54 ± 13,16	5,78 ± 1,65	89,62 ± 20,31	0,012 ± 3,9E-03	0,004 ± 1,6E-03	0,009 ± 2,9E-03	0,37 ± 0,14	0,91 ± 0,41	0,0004 ± 1,8E-04
			Cd	2,82 ± 0,57	1,16 ± 0,5	0,26 ± 0,07	34,92 ± 8,11	0,58 ± 0,16	0,80 ± 0,1	89,17 ± 15,11	3,96 ± 1,56	75,33 ± 17,20	0,018 ± 9,1E-03	0,003 ± 1,1E-03	0,01 ± 2,9E-03	0,40 ± 0,21	1,16 ± 0,65	0,0006 ± 3,4E-04
	7 days	11 °C	Control	2,91 ± 0,87	1,27 ± 0,75	0,19 ± 0,11	42,34 ± 11,3	0,57 ± 0,09	0,70 ± 0,04	78,08 ± 10,85	4,27 ± 1,47	70,84 ± 20,67	0,011 ± 8,2E-03	0,004 ± 2,1E-03	0,006 ± 2,9E-03	0,34 ± 0,14	0,93 ± 0,51	0,0005 ± 2E-04
			Cd	3,10 ± 0,82	1,40 ± 0,46	0,26 ± 0,13	37,48 ± 11,8	0,68 ± 0,15	0,71 ± 0,07	78,76 ± 13,23	5,31 ± 1,43	79,32 ± 13,66	0,010 ± 3,9E-03	0,005 ± 1,5E-03	0,005 ± 1,7E-03	0,27 ± 0,07	1,10 ± 0,52	0,0006 ± 3,2E-04
		16 °C	Control	2,89 ± 0,63	1,40 ± 0,58	0,21 ± 0,11	45,54 ± 9,83	0,63 ± 0,10	0,79 ± 0,09	82,02 ± 17,22	5,73 ± 1,19	78,43 ± 13,43	0,015 ± 8,7E-03	0,004 ± 1,2E-03	0,01 ± 4E-03	0,44 ± 0,20	1,05 ± 0,66	0,0006 ± 2,8E-04
			Cd	2,93 ± 0,54	1,38 ± 0,95	0,27 ± 0,15	43,90 ± 6,88	0,61 ± 0,08	0,75 ± 0,08	77,20 ± 11,12	5,88 ± 2,6	78,73 ± 8,53	0,013 ± 5,3E-03	0,004 ± 1,3E-03	0,007 ± 2,2E-03	0,38 ± 0,13	0,86 ± 0,33	0,0005 ± 2,7E-04
June 2019	24 hours	14 °C	Control	1,11 ± 0,27	0,37 ± 0,13	0,09 ± 0,04	52,94 ± 13,34	0,49 ± 0,1	0,92 ± 0,14	107,63 ± 25,01	1,76 ± 0,82	103,41 ± 20,93	0,022 ± 4,4E-03	0,0137 ± 5,7E-03	0,018 ± 6,9E-03	0,19 ± 0,10	5,97 ± 4,03	0,0003 ± 1,2E-04
			Cd	1,07 ± 0,68	0,30 ± 0,12	0,06 ± 0,02	48,13 ± 10,61	0,59 ± 0,57	0,83 ± 0,24	118,56 ± 73,00	1,34 ± 0,81	90,75 ± 16,90	0,029 ± 2,1E-02	0,011 ± 3,9E-03	0,02 ± 8,3E-03	0,21 ± 0,12	5,24 ± 2,47	0,0003 ± 3,4E-04
		19 °C	Control	1,10 ± 0,41	0,35 ± 0,11	0,1 ± 0,06	47,82 ± 12,27	0,40 ± 0,15	0,83 ± 0,16	89,79 ± 18,75	1,59 ± 1,11	118,21 ± 34,24	0,031 ± 2,3E-02	0,010 ± 3,6E-03	0,016 ± 6,1E-03	0,21 ± 0,14	5,75 ± 3,91	0,0002 ± 1,2E-04
			Cd	1,09 ± 0,16	0,42 ± 0,27	0,07 ± 0,03	56,19 ± 11,60	0,46 ± 0,23	0,84 ± 0,25	99,97 ± 46,70	1,37 ± 0,41	94,42 ± 28,43	0,023 ± 9,3E-03	0,01 ± 4,2E-03	0,017 ± 6,8E-03	0,23 ± 0,12	7,90 ± 3,97	0,0003 ± 2,2E-04
	7 days	14 °C	Control	0,84 ± 0,21	0,33 ± 0,20	0,04 ± 0,02	53,04 ± 17,30	0,47 ± 0,39	0,90 ± 0,20	89,34 ± 28,39	1,69 ± 0,65	103,47 ± 20,80	0,036 ± 2,3E-03	0,016 ± 6,2E-03	0,02 ± 1,2E-02	0,29 ± 0,21	6,54 ± 3,69	0,0004 ± 3,6E-04
			Cd	0,98 ± 0,40	0,50 ± 0,10	0,05 ± 0,02	52,80 ± 11,41	0,54 ± 0,24	0,89 ± 0,32	85,17 ± 19,89	1,13 ± 0,32	112,15 ± 32,55	0,025 ± 1,1E-02	0,013 ± 6,2E-03	0,018 ± 7,5E-03	0,24 ± 0,08	7,42 ± 3,81	0,0002 ± 9,7E-05
		19 °C	Control	1,34 ± 0,36	0,74 ± 0,12	0,08 ± 0,06	52,01 ± 12,71	0,39 ± 0,13	0,80 ± 0,13	83,42 ± 33,49	1,19 ± 0,43	75,90 ± 25,43	0,032 ± 1,2E-02	0,017 ± 1,3E-02	0,03 ± 1,2E-02	0,30 ± 0,13	13,53 ± 7,10	0,0005 ± 4,0E-04
			Cd	0,87 ± 0,47	0,43 ± 0,37	0,04 ± 0,07	56,15 ± 20,08	0,52 ± 0,14	0,91 ± 0,19	101,98 ± 39,44	1,77 ± 0,89	96,40 ± 32,20	0,04 ± 2,3E-02	0,0158 ± 6,0E-03	0,019 ± 9,3E-03	0,22 ± 0,10	6,45 ± 3,08	0,0003 ± 1,6E-04

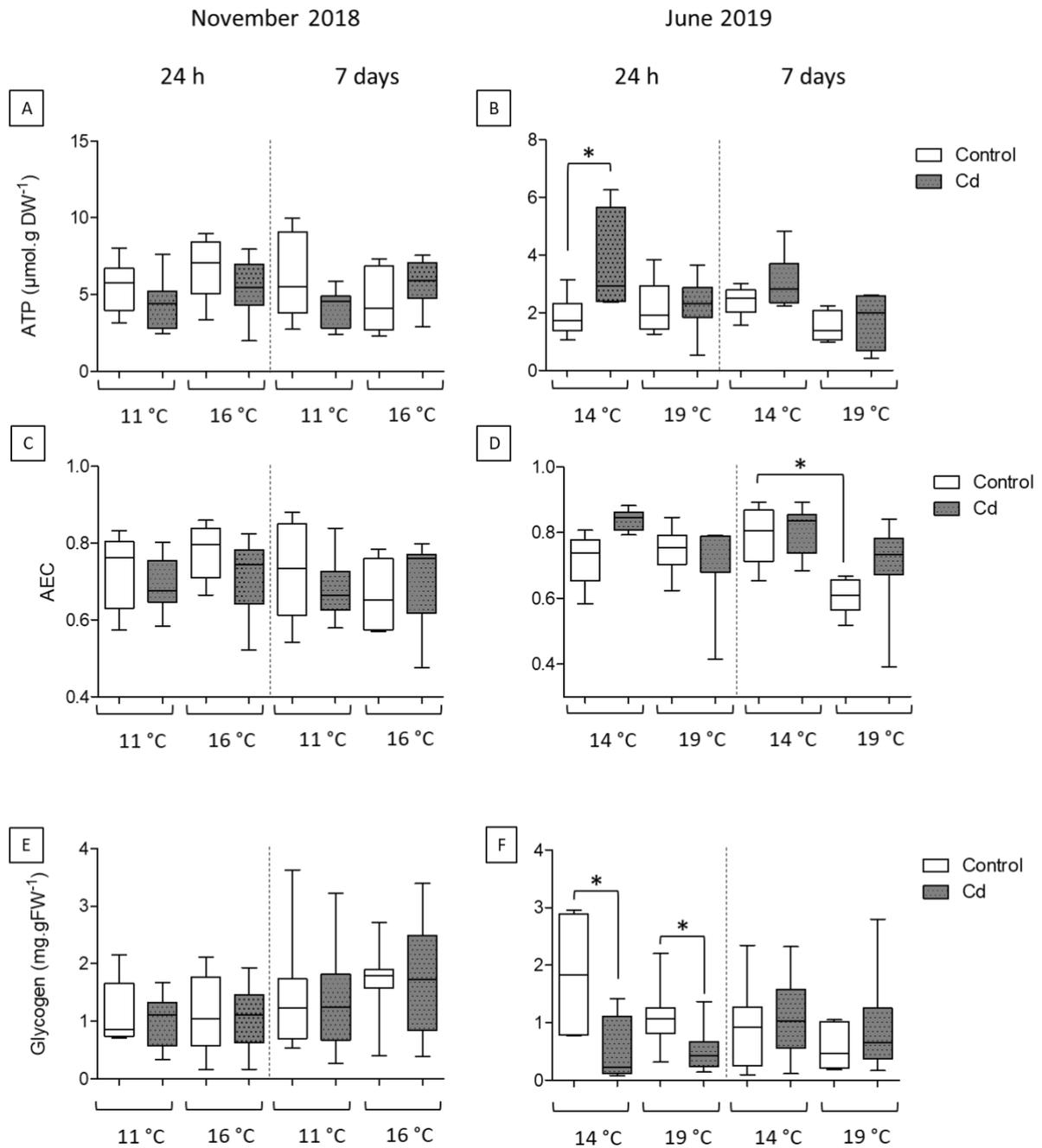


Figure 3. ATP contents, AEC and glycogen contents measured in November 2018 (A, C and E respectively) and June 2019 (B, D and F respectively) in control mussels (white boxes) and Cd-exposed mussels (grey boxes) at *in situ* temperature (11°C and 14°C) and *in situ* temperature + 5°C (16°C and 19°C) (n=10). Data are expressed as median \pm SD. Asterisk represent significant difference between two conditions ($p < 0.05$).

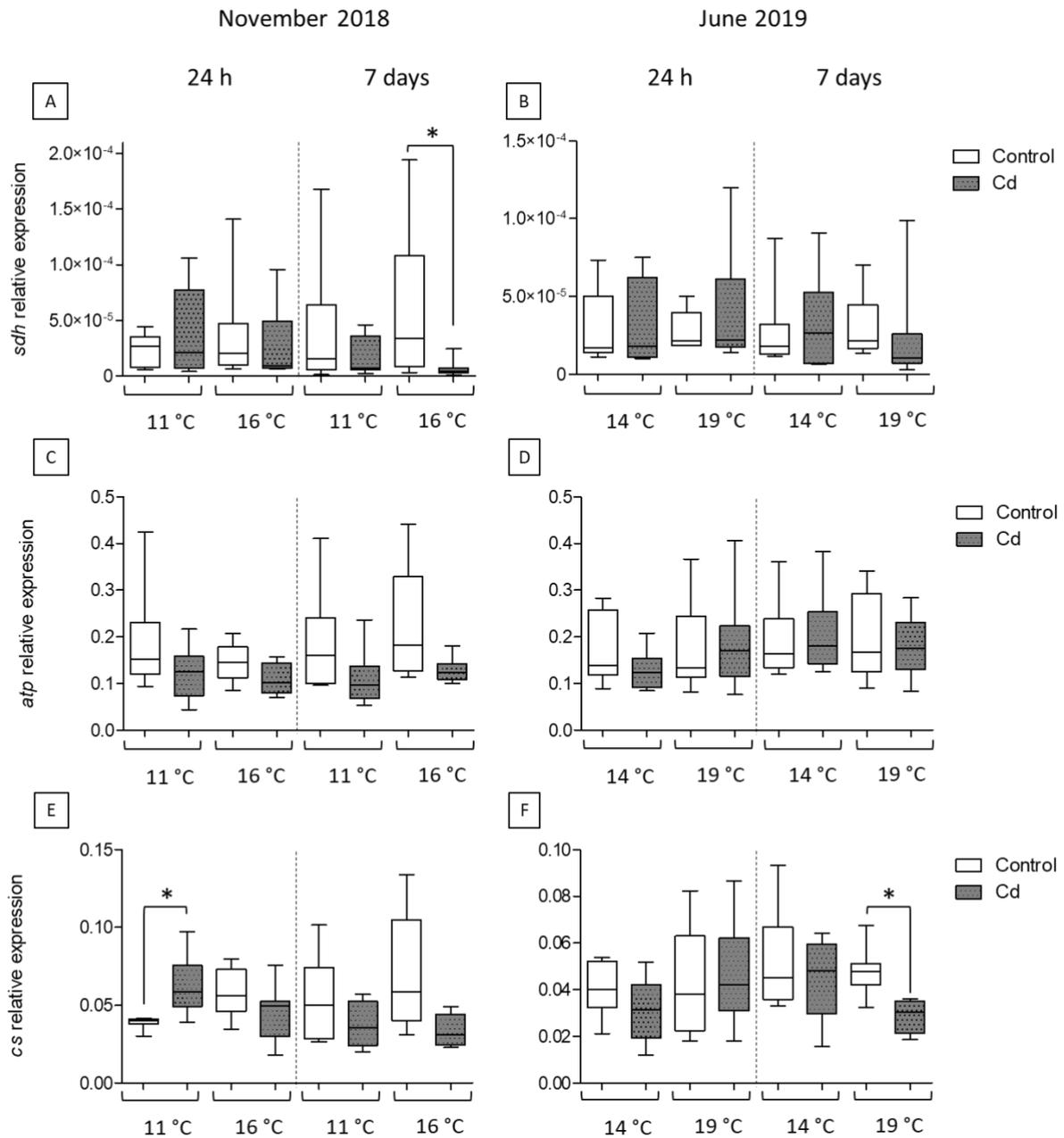


Figure 4. *sdh*, *atp* and *cs* relative gene expression levels measured in November 2018 (A, C and E respectively) and in June 2019 (B, D and F respectively) in control mussels (white boxes) and Cd-exposed mussels (grey boxes) at *in situ* temperature (11°C and 14°C) and *in situ* temperature + 5°C (16°C and 19°C) (n=10). Data are expressed as median ± SD. Asterisk represent significant difference between two conditions (p < 0.05).

3.4. Stress markers

In November, no difference was observed between the different experimental groups neither on *cat* relative mRNA expression nor on lipid peroxidation measurement (Fig. 5 A-C). In June, no Cd effect was observed after 24h of exposure. After 7 days, *cat* transcript level and lipid peroxidation increased significantly in Cd and warming-co-exposed mussels compared to the corresponding control (Fig. 5 B-D).

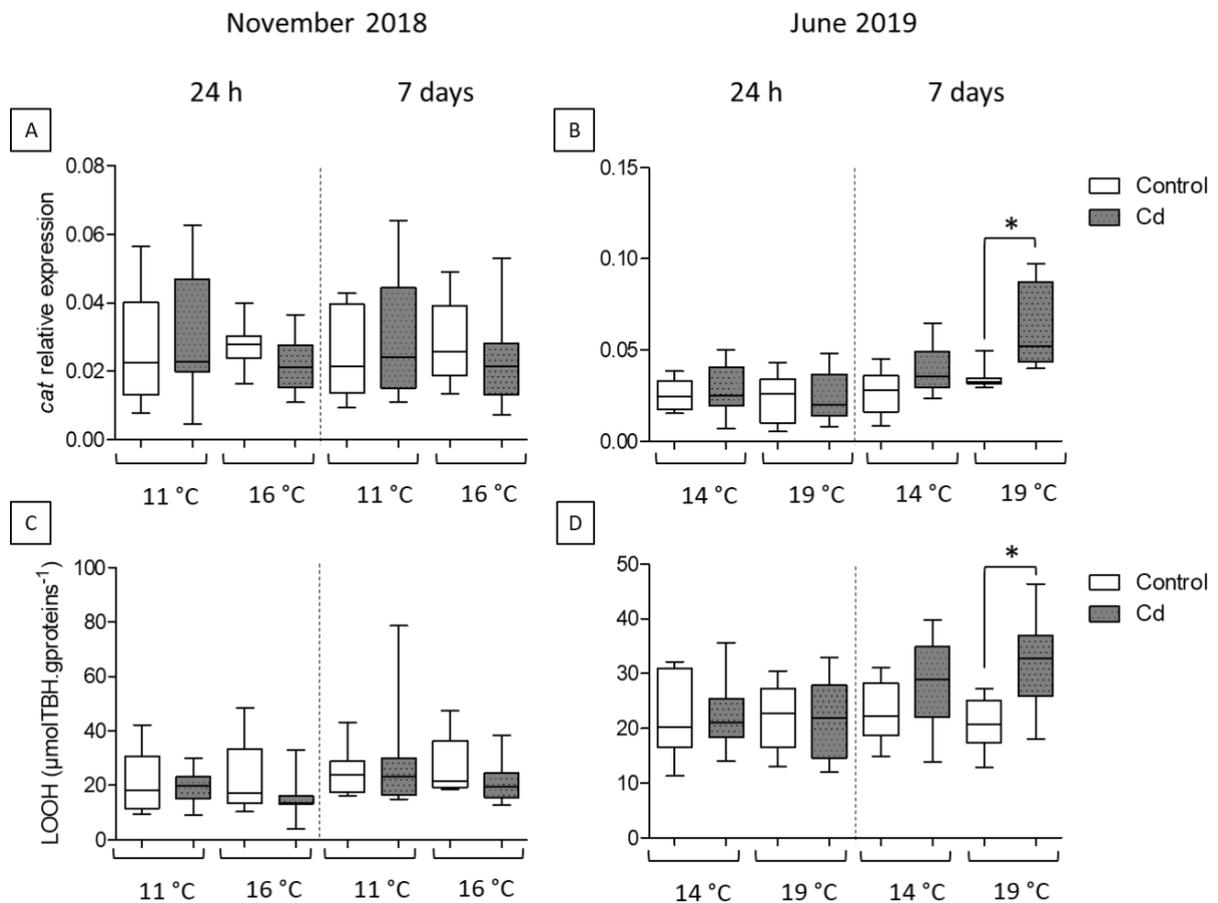


Figure 5. *cat* relative gene expression level and lipid peroxidation measured in November 2018 (A and C respectively) and June 2019 (B and D respectively) in control mussels (white boxes) and Cd-exposed mussels (grey boxes) at *in situ* temperature (11°C and 14°C) and *in situ* temperature + 5°C (16°C and 19°C) (n=10). Data are expressed as median ± SD. Asterisk represents significant difference between two conditions (p < 0.05).

3.5. Global analysis

The PLS-DA model explained 74% of the variance of the entire data set with the two first axes (Fig. 6). The identified structure was tested against a null model which revealed its significance ($p = 0.001$, 999 permutations). According to the results, energy nucleotides and reserves (left side) as well as energy nucleotides regulation and OXPHOS markers (right side) mainly defined the primary axis. The secondary axis was mainly characterised by the mRNA expression of genes involved in mitochondrial energy metabolism (*cs*, *sdh* and *atp*). The transcript levels of these three genes were VIP markers and discriminated the overall data set. The two reproduction periods were separated along the primary axis. In November, responses between controls and Cd-exposed mussels were distinguished along the secondary axis while in June the same axis separated the experimental groups according to the exposure duration. According to the redundancy analysis results, 92% of the variance was due to the exposure period. Conditions (control and Cd) represented only 0.1% of the observed variance while cumulated temperature and exposure duration variance was 1.1%. Only 7.1% of the total variance was unexplained.

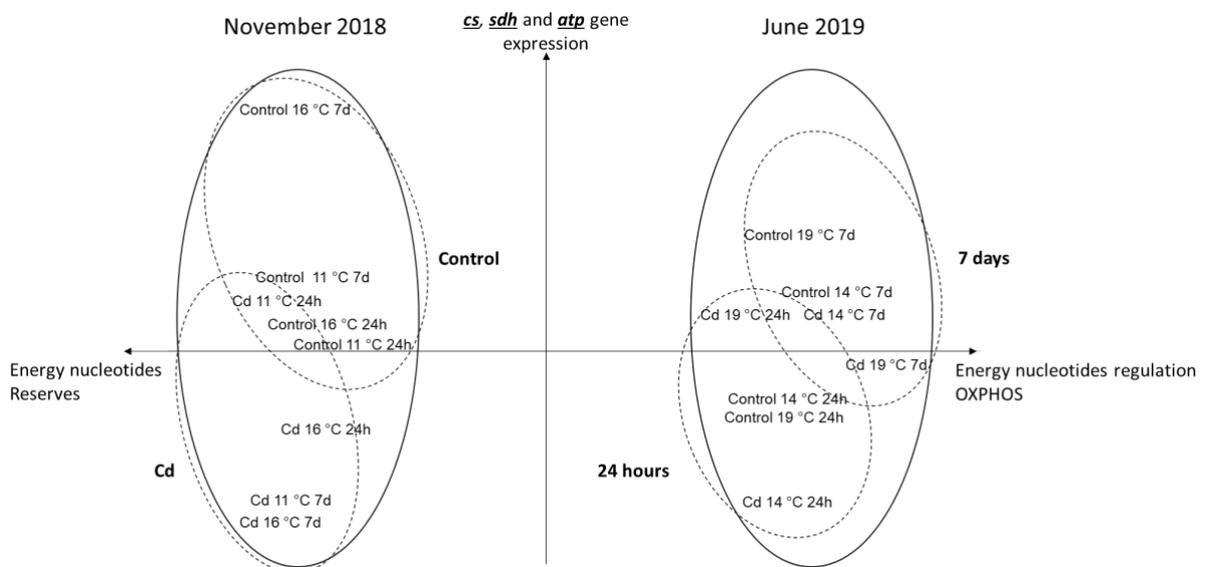


Figure 6. Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) representing biomarkers responses in November 2018 and June 2019 for controls and $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd-exposed mussels at in situ temperature and in situ temperature + 5°C . The F1-F2 axes represent 62.4% and 11.5% of the total variance of the data set respectively. Markers in bold and underlined indicate VIP markers.

4. Discussion

4.1 Seasonal variations

Biomarker development encounters some locks. Confounding factors such as reproduction cycle could bias marker responses interpretation (Amiard-Triquet et al., 2012). This study provided evidence for the potent effect of seasonality on metabolism-related marker responses in biomonitoring. Contrasted marker behaviours emerged after acclimation period to laboratory conditions (15 days) with markers presenting similar or different levels between November 2018 and June 2019. In the present study, all adenylate nucleotide contents and AEC values were similar between November and June after 15 days of acclimation. However, we previously showed that adenylate energy charge values significantly decreased *in situ* between November 2018 (mean AEC = 0.8) and June 2019 (mean AEC = 0.2) in the same population of mussels (Louis et al., 2020). Although sampling, transport and handling were stress factors, mussels were able to stabilise their energy balance during the acclimation period under laboratory conditions by potentially using energy reserves.

Lipid and glycogen levels did not vary between both exposures after the acclimation period in the present study although mussels spawned their gametes during acclimation in June. However, glycogen and lipids are the main energy storage in organisms, and are largely known to be used for gametes and gonadal tissues formation, leading thus to strong seasonal variations (Anacleto et al., 2013; Andrade et al., 2017; Cordeiro et al., 2017, 2016; Louis et al., 2020 ; Palais et al., 2011; Tourari et al., 1988). By contrast, a seasonal variation was observed in protein contents with an increase in June. In reproduction period, the synthesis of specific proteins of interest could be enhanced to ensure gametes development (Li et al., 2011).

Aerobic metabolism markers such as *cs*, *cytb* and *atp* mRNA transcript levels and CS activity did not differ between November and June in our study after the acclimation period. These markers, however, have been shown to be submitted to seasonal variation with a global aerobic metabolism activity enhancement in summer compared to winter season (Louis et al., 2020; Majed et al., 2002; Soren et al., 2018). Of note, ETS activity was reported to show seasonal variations in the natural environment with an increase in summer months (Fanslow et al., 2001; Louis et al., 2020), which is consistent with the increased ETS activity that we observed in June compared to November. Cytochrome c oxidase relative mRNA expression

was higher in June than in November, while its activity decreased. The discrepancy between these two levels of response might result from diverse regulations steps at the transcriptional but also at the post-translational level (Gedeon and Bokes, 2012).

The regulation of energy nucleotides was partially affected by the sampling period. While no seasonal variation was noticed in *ampk* transcript level, *ampd* mRNA expression significantly increased in June compared to November. Interestingly, *ampd* transcript level increased while IMP content decreased in June. AMP deaminase converts AMP into IMP to avoid AMP accumulation in cells (Składanowski et al., 2005). However, only *ampd* mRNA expression was analysed in this work restricting thus an extrapolation to the enzymatic level.

Lactate dehydrogenase activity and transcript level showed a higher level in June than in November after the laboratory acclimation period. Seasonal variations in LDH activity or *ldh* mRNA expression have been observed in different fish species and in *D. polymorpha* with an increase during summer months (Koenig and Solé, 2014; Louis et al., 2020; Vornanen, 1994). This enhancement could result from a higher energy demand during reproduction period (Sokolova et al., 2012).

This study brought out few markers, which presented stable levels after the acclimation period under laboratory conditions at both exposure periods. These markers include *ampk*, *cs*, *cytb*, *atp* mRNA expression, glycogen, lipid, adenylate nucleotide contents and citrate synthase activity. Markers with stable level present an interest for risk assessment since they could be used whatever the period of the reproduction cycle, limiting thus bias in response interpretation.

4.2 Exposure effects

The results of the present study highlighted an increased Cd bioaccumulation in mussels exposed to Cd at the highest temperature. Mussels accumulated twice more Cd in November than in June. Nardi et al. (2017, 2018) showed the same results in *Mytilus galloprovincialis* exposed to Cd during winter and summer months. In November, the increase of Cd bioaccumulation under warming-stress could result from a temperature-dependent enhancement of metabolic rate in mussels whose metabolic activity is reduced during winter months (Louis et al., 2020; Nardi et al., 2017, 2018).

No clear impact of Cd was highlighted on energy-related markers in the present study. Adenylate energy charge values remained unchanged and no mitochondrial activity variation

was noticed in both exposures. However, inter-individual AEC variability increased in June in Cd-exposed mussels. Energy nucleotide are tightly regulated and continuously balanced (Storey, 2004). Exposure to pollutants may lead to an increase of AEC variability without a significant decrease of the average value (Le Gal et al., 1997; Marazza et al., 1996). Variability changes could be as informative as significant difference between means (Devin et al., 2014). This variability increase suggests a disparity of physiological status between mussels that could be due to an energy reallocation to compensatory mechanisms. Regarding mussels' energy reserves, only a decrease in glycogen content was observed in Cd-exposed mussels after 24 hours at both temperatures in June. The use of glycogen is likely to contribute to ensuring energy demand (Koukouzika and Dimitriadis, 2008). Glycogen is a very labile energy source and can be degraded very quickly in response to a stress, which is supported by the simultaneous increase of ATP content after 24h of Cd exposure in June.

A slight negative Cd effect was here noticed on transcript level of two OXPHOS complexes (*sdh* and *atp*) and citrate synthase mRNA expression in *D. polymorpha*. During the rest period, the transcript levels of these genes trended to decrease under Cd exposure. To the best of our knowledge, the transcript levels of these genes has never been analysed after warming and Cd multi-stress although their activities were previously investigated. A decrease in OXPHOS activity under Cd exposure has already been shown in a *D. polymorpha* sister species, *Dreissena rostriformis bugensis* (Hanana et al., 2019). In addition, Kurochkin et al. (2011) showed that mitochondrial complex II (succinate dehydrogenase) was the most sensitive to Cd among all electron transport complexes in *Crassostrea virginica* isolated mitochondria. Temperature increase enhanced its sensitivity since a more pronounced decrease of complex II and citrate synthase activities was observed at 30°C compared to 20°C in Cd-exposed oysters (Ivanina et al., 2008). However, no variations of CS and ETS activities were observed in our study suggesting that Cd did not affect mitochondria activity in *D. polymorpha* whatever the season.

In ecotoxicological investigations on *D. polymorpha*, induction of defence mechanisms and cellular damage are usually observed under metal stress (Garaud et al., 2016; Marie et al., 2006; Potet et al., 2018, 2016; Schäfer et al., 2012). The appearance of cellular damage after 7days of Cd and warming co-exposure in June but not in November could suggest that mechanisms involved to overcome a contamination could differ over the reproduction cycle. Nardi et al. (2017, 2018) showed a greater efficiency of antioxidant protection mechanisms in winter than in summer in *Mytilus galloprovincialis* exposed to

20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of Cd. This difference in protection efficiency between seasons could lead to a higher sensitivity of mussels exposed to pollutant during summer months.

Marker variations in response to stress are essential to assess before considering it as a potential biomarker for risk assessment. This study brought out several markers being both stable whatever the period after acclimation to laboratory conditions and sensitive under contaminant exposure. These markers are ATP synthase, citrate synthase mRNA expression, energy nucleotides and glycogen, which may be considered as promising biomarkers.

4.3 Global response overview

The global analysis performed on control and Cd-exposed mussels' responses allowed the consideration of the whole panel of markers at each period. According to the profile of responses, the two reproduction cycle stages were separated along the first axis while the conditions (control vs Cd-exposed in November and 24h vs 7 days in June) were separated along the second axis. Exposure conditions were discriminated by the transcript levels of the mRNA expression of three genes involved in mitochondrial energy metabolism (*cs*, *sdh* and *atp*). After the acclimation to laboratory conditions, two of these markers (*cs* and *atp*) presented similar mRNA transcript level between November and June, while *sdh* mRNA expression varied between the two reproduction periods. This variation of *sdh* mRNA transcript level could result from a "laboratory effect" and lead to a misinterpretation of marker response. In the present study, the period factor represented more than 92% of the total variability of the dataset while the exposure factor represented only 0.1%. These results comfort the potent role of seasonality influence on biomarker response interpretations in ecotoxicological studies.

4. Conclusion and perspectives

This study brings a deeper understanding of how responses to chemical stress depend on the reproduction cycle in *D. polymorpha*. Strong differences were highlighted in energy metabolism responses under laboratory conditions between seasons. However, several markers (*atp*, *cs* mRNA expression, glycogen and adenylate nucleotide contents) were shown to be season-independent with the same level after laboratory acclimation period, but also sensitive to the contamination. These markers could be potentially used in contaminant effect studies under laboratory conditions. Complementary studies on several *D. polymorpha* populations would be necessary to confirm their potential use in a biomonitoring perspective. Although energy metabolism carries vital functions out, it is also a complex and tightly

regulated process. More studies considering intrinsic factor effects on energy metabolism in long-term controlled exposures are required to confirm the potential of energy-related markers as early contamination biomarkers.

Acknowledgment

We wish to thank Claire Barbieux for English corrections. This work was supported by the Grand-Est region, France and the University of Reims Champagne Ardennes through MEENDRE project.

Supplementary data

Table S1. Physicochemical parameters of water at the two sampling months. N.D: not detected.

Date	Temperature (°C)	Oxygen (%)	pH	Conductivity	Cd (µg.L ⁻¹)
10/23/2018	11.9	83	7.562	578	N.D
05/15/2019	15.1	101	7.747	562	N.D

Table S2. Physicochemical parameters of exposure media (mean ± SD).

Month	Condition	Temperature (°C)	pH	Oxygen (%)	Conductivity (µS)
Nov. 18	Control 11°C	11.2 ± 0.2	8.2 ± 0.2	109.1 ± 6.6	546 ± 12
	Cd 11 °C	11.2 ± 0.2	8.1 ± 0.2	107.1 ± 6	543 ± 13
	Control 16 °C	16.4 ± 0.5	8 ± 0.2	109.3 ± 5.2	555 ± 4
	Cd 16 °C	16.4 ± 0.5	8 ± 0.3	108 ± 7.5	559 ± 7
June 19	Control 14 °C	13.7 ± 0.4	7.6 ± 0.4	95.9 ± 0.7	522 ± 6
	Cd 14 °C	13.8 ± 0.5	7.8 ± 0.3	92.7 ± 0.4	534 ± 5
	Control 19 °C	19 ± 0.4	7.7 ± 0.2	90.6 ± 0.5	535 ± 5
	Cd 19 °C	18.8 ± 0.5	7.8 ± 0.3	92 ± 0.5	525 ± 5

References

- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow P.S., 2012. Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects. CRC Press, Boca Raton (2012)
- Anacleto, P., Maulvault, A.L., Barrento, S., Mendes, R., Nunes, M.L., Rosa, R., Marques, A., 2013. Physiological responses to depuration and transport of native and exotic clams at different temperatures. *Aquaculture* 408–409, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.035>
- Andrade, J.T.M., Cordeiro, N.I.S., Montessor, L.C., Luz, D.M.R., Luz, R.C.R., Martinez, C.B., Pinheiro, J., Paglia, A.P., Vidigal, T.H.D.A., 2017. Effect of temperature on behavior, glycogen content, and mortality in *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae). *J Limnol* 77. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1658>
- Baudrimont, M., Metivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F., Boudou, A., 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 2096–2105. <https://doi.org/10.1002/etc.5620161016>
- Binelli, A., Bacchetta, R., Mantecca, P., Ricciardi, F., Provini, A., Vailati, G., 2004. DDT in zebra mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruptions. *Aquatic Toxicology* 69, 175–188. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.05.005>
- Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S., Parolini, M., 2015. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environmental Pollution* 196, 386–403. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.023>
- Capaldi, R.A., 1990. Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annual Reviews* 59, 569–596.
- Cherkasov, A.S., Biswas, P.K., Ridings, D.M., Ringwood, A.H., Sokolova, I.M., 2006. Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on cellular energy budgets in the marine mollusk *Crassostrea virginica*: linking cellular and mitochondrial responses. *Journal of Experimental Biology* 209, 1274–1284. <https://doi.org/10.1242/jeb.02093>
- Cherkasov, A.S., Taylor, C., Sokolova, I.M., 2010. Seasonal variation in mitochondrial responses to cadmium and temperature in eastern oysters *Crassostrea virginica*

- (Gmelin) from different latitudes. *Aquatic Toxicology* 97, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.004>
- Cordeiro, N.I.S., Andrade, J.T.M., Montresor, L.C., Luz, D.M.R., Araújo, J.M., Martinez, C.B., Pinheiro, J., Vidigal, T.H.D.A., 2017. Physiological response of invasive mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) submitted to transport and experimental conditions. *Braz. J. Biol.* 77, 191–198. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.15315>
- Cordeiro, N.I.S., Andrade, J.T.M., Montresor, L.C., Luz, D.M.R., Martinez, C.B., Darrigran, G., Pinheiro, J., Vidigal, T.H.D.A., 2016. Effect of starvation and subsequent feeding on glycogen concentration, behavior and mortality in the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae). *J. Limnol.* <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1465>
- Darriba, S., San Juan, F., Guerra, A., 2005. Energy storage and utilization in relation to the reproductive cycle in the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865). *ICES Journal of Marine Science* 62, 886–896. <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2005.02.010>
- de Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic toxicology* 50, 51–71.
- Dieni, C.A., Storey, K.B., 2008. Regulation of 5'-adenosine monophosphate deaminase in the freeze tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *BMC Biochem* 9, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-12>
- Evariste, L., Rioult, D., Brousseau, P., Geffard, A., David, E., Auffret, M., Fournier, M., Betoulle, S., 2017. Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.027>
- Fanslow, D.L., Nalepa, T.F., Johengen, T.H., 2001. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia* 448, 61–70.
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.012>

- Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Piña, B., Barata, C., 2011. Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquatic Toxicology* 101, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.004>
- Faria, M., Ochoa, V., Blázquez, M., Juan, M.F.S., Lazzara, R., Lacorte, S., Soares, A.M.V.M., Barata, C., 2014. Separating natural from anthropogenic causes of impairment in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) populations living across a pollution gradient. *Aquatic Toxicology* 152, 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.020>
- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 10, 935–944. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1146363>
- Haag, W.R., Berg, D.J., Garton, D.W., Farris, J.L., 1993. Reduced Survival and Fitness in Native Bivalves in Response to Fouling by the Introduced Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) in Western Lake Erie. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 13–19. <https://doi.org/10.1139/f93-002>
- Hanana, H., Kleinert, C., André, C., Gagné, F., 2019. Influence of cadmium on oxidative stress and NADH oscillations in mussel mitochondria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 216, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.11.005>
- Hassan, M.M., Qin, J.G., Li, X., 2018. Gametogenesis, sex ratio and energy metabolism in *Ostrea angasi*: implications for the reproductive strategy of spermcasting marine bivalves. *Journal of Molluscan Studies* 84, 38–45. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyx041>
- Ivanina, A.V., Habinck, E., Sokolova, I.M., 2008. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 148, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.03.009>
- Ivanina, A.V., Kurochkin, I.O., Leamy, L., Sokolova, I.M., 2012. Effects of temperature and cadmium exposure on the mitochondria of oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to hypoxia and subsequent reoxygenation. *Journal of Experimental Biology* 215, 3142–3154. <https://doi.org/10.1242/jeb.071357>

- Kerambrun, E., Rioult, D., Delahaut, L., Evariste, L., Pain-Devin, S., Auffret, M., Geffard, A., David, E., 2016. Variations in gene expression levels in four European zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, populations in relation to metal bioaccumulation: A field study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 134, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.018>
- Koenig, S., Solé, M., 2014. Muscular cholinesterase and lactate dehydrogenase activities in deep-sea fish from the NW Mediterranean. *Marine Environmental Research* 94, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.11.003>
- Koukouzika, N., Dimitriadis, V.K., 2008. Aspects of the usefulness of five marine pollution biomarkers, with emphasis on MN and lipid content. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 941–949.
- Kraak, M.H.S., Stuijzand, S.C., Admiraal, W., 1999. Short-term ecotoxicity of a mixture of five metals to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 63, 805–812.
- Kraak, Michiel H.S., Lavy, D., Peeters, Wilma H.M., Davids, C., 1992. Chronic ecotoxicity of copper and cadmium to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23, 363–369. <https://doi.org/10.1007/BF00216246>
- Kurochkin, I.O., Etzkorn, M., Buchwalter, D., Leamy, L., Sokolova, I.M., 2011. Top-down control analysis of the cadmium effects on molluscan mitochondria and the mechanisms of cadmium-induced mitochondrial dysfunction. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 300, R21–R31. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00279.2010>
- Kwan, K.H.M., Chan, H.M., De Lafontaine, Y., 2003. Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence River. *Environmental Monitoring and Assessment* 88, 193–219. <https://doi.org/10.1023/A:1025517007605>
- Lannig, G., Cherkasov, A.S., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent effects of cadmium on mitochondrial and whole-organism bioenergetics of oysters (*Crassostrea virginica*). *Marine Environmental Research* 62, S79–S82. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.04.010>
- Le Gal, Y., Lagadic, L., Le Bras, S., Caquet, T.H., 1997. Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier Chap 12.
- Li, Q., Yang, L., Ke, Q., Kong, L., 2011. Gametogenic cycle and biochemical composition of the clam *Mactra chinensis* (Mollusca: Bivalvia): Implications for aquaculture and wild

- stock management. *Marine Biology Research* 7, 407–415. <https://doi.org/10.1080/17451000.2010.515686>
- Louis, F., Devin, S., Giambérini, L., Potet, M., David, E., Pain-Devin, S., 2019. Energy allocation in two dreissenid species under metal stress. *Environmental Pollution* 245, 889–897. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.079>
- Louis, F., Rocher, B., Barjhoux, I., Bultelle, F., Dedourge-Geffard, O., Gaillet, V., Bonnard, I., Delahaut, L., Pain-Devin, S., Geffard, A., Paris-Palacios, S., David, E., 2020. Seasonal monitoring of cellular energy metabolism in a sentinel species, *Dreissena polymorpha* (bivalve): Effect of global change? *Science of The Total Environment* 725, 138450. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138450>
- Ludwig, B., Bender, E., Arnold, S., Hüttemann, M., Lee, I., Kadenbach, B., 2001. Cytochrome c Oxidase and the Regulation of Oxidative Phosphorylation 12.
- Majed, S.A., Wells, R.M.G., Mcardle, B.H., 2002. Seasonal effect on lactate dehydrogenase and citrate synthase in snapper (*Pagrus auratus*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 36, 233–239. <https://doi.org/10.1080/00288330.2002.9517082>
- Marazza, D., Bornens, Ph., Le Gal, Y., 1996. Effect of Ammonia on Survival and Adenylate Energy Charge in the Shrimp *Palaemonetes varians*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34, 103–108. <https://doi.org/10.1006/eesa.1996.0050>
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65, 609–617. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.074>
- Mcmahon, R.F., 1996. The Physiological Ecology of the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha* , in North America and Europe. *Am Zool* 36, 339–363. <https://doi.org/10.1093/icb/36.3.339>
- Minguez, L., Meyer, A., Molloy, D.P., Giambérini, L., 2009. Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Importance in ecotoxicological studies. *Environmental Research* 109, 843–850. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.07.012>
- Mubiana, V.K., Blust, R., 2007. Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 63, 219–235. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.08.005>
- Nardi, A., Benedetti M., d'Errico G., Fattorini D., Regoli F., 2018. Effects of ocean warming and acidification on accumulation and cellular responsiveness to cadmium in

- mussels *Mytilus galloprovincialis*: importance of the seasonal status. *Aquat. Toxicol.*, 204, pp. 171-179
- Nardi, A., Mincarelli, L.F., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Regoli, F., 2017. Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 169, 493–502.
- Navarro, A., Campos, B., Barata, C., Piña, B., 2013. Transcriptomic seasonal variations in a natural population of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Science of The Total Environment* 454–455, 482–489. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.048>
- Navarro, A., Faria, M., Barata, C., Piña, B., 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environmental Pollution* 159, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.018>
- Pain, S., Parant, M., 2007. Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. *Chemosphere* 67, 1258–1263. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.017>
- Pain-Devin, S., Cossu-Leguille, C., Geffard, A., Giambérini, L., Jouenne, T., Minguez, L., Naudin, B., Parant, M., Rodius, F., Rousselle, P., Tarnowska, K., Daguin-Thiébaud, C., Viard, F., Devin, S., 2014. Towards a better understanding of biomarker response in field survey: A case study in eight populations of zebra mussels. *Aquatic Toxicology* 155, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.008>
- Palais, F., Dedourge-Geffard, O., Beaudon, A., Pain-Devin, S., Trapp, J., Geffard, O., Noury, P., Gourlay-Francé, C., Uher, E., Mouneyrac, C., Biagiante-Risbourg, S., Geffard, A., 2012. One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Ecotoxicology* 21, 888–905. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0851-1>
- Palais, F., Mouneyrac, C., Dedourge-Geffard, O., Giambérini, L., Biagiante-Risbourg, S., Geffard, A., 2011. One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83, 1062–1073. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.060>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 45e–445. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Plaistow, S.J., Troussard, J.-P., Cézilly, F., 2001. The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host

- Gammarus pulex*. International Journal for Parasitology 31, 346–351.
[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00115-1)
- Potet, M., Devin, S., Pain-Devin, S., Rousselle, P., Giambérini, L., 2016. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. Environmental Pollution 218, 39–49.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.025>
- Potet, M., Giambérini, L., Pain-Devin, S., Louis, F., Bertrand, C., Devin, S., 2018. Differential tolerance to nickel between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* populations. Scientific Reports 8.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-19228-x>
- Ram, J.L., Fong, P.P., Garton, D.W., 1996. Physiological aspects of zebra mussel reproduction: maturation, spawning, and fertilization. American Zoologist 36, 326–338.
- Salin, K., Auer, S.K., Rey, B., Selman, C., Metcalfe, N.B., 2015. Variation in the link between oxygen consumption and ATP production, and its relevance for animal performance. Proc. R. Soc. B 282, 20151028. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1028>
- Schäfer, S., Hamer, B., Treursić, B., Möhlenkamp, C., Spira, D., Korlević, M., Reifferscheid, G., Claus, E., 2012. Comparison of Bioaccumulation and Biomarker Responses in *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* After Exposure to Resuspended Sediments. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 62, 614–627.
<https://doi.org/10.1007/s00244-011-9735-2>
- Simpson, W.R., 1981. A critical review of cadmium in the marine environment. Progress in Oceanography 10, 1–70.
- Składanowski, A.C., Stepnowski, P., Kleszczyński, K., Dmochowska, B., 2005. AMP deaminase in vitro inhibition by xenobiotics. Environmental Toxicology and Pharmacology 19, 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.08.005>
- Sokolova, I., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. Climate Research 37, 181–201. <https://doi.org/10.3354/cr00764>
- Sokolova, I.M., 2004. Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). Journal of Experimental Biology 207, 2639–2648.
<https://doi.org/10.1242/jeb.01054>

- Sokolova, I.M., Bock, C., Pörtner, H.-O., 2000. Resistance to freshwater exposure in White Sea *Littorina spp.* I: Anaerobic metabolism and energetics. *Journal of Comparative Physiology B* 170, 91–103.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research* 79, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>
- Sokolova, I.M., Sokolov, E.P., Ponnappa, K.M., 2005. Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology* 73, 242–255. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.016>
- Soren, S., Vir Singh, S., Singh, P., 2018. Seasonal variation of mitochondria activity related and heat shock protein genes in spermatozoa of Karan Fries bulls in tropical climate. *Biological Rhythm Research* 49, 366–381. <https://doi.org/10.1080/09291016.2017.1361584>
- Sprung, M., 1995. Physiological energetics of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in lakes I. Growth and reproductive effort. *Hydrobiologia* 304, 117–132.
- Tourari, A.L., Crochard, C., Pihan, J.C., 1988. Action de la température sur le cycle de reproduction de *Dreissena polymorpha* (Pallas). 18. Etude “in situ” et au laboratoire. *Haliotis*, pp. 85–98.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146, 281–300. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011>
- Vornanen, M., 1994. Seasonal adaptation of crucian carp (*Carassius carassius* L.) heart: glycogen stores and lactate dehydrogenase activity. *Can. J. Zool.* 72, 433–442. <https://doi.org/10.1139/z94-061>

3. Résultats supplémentaires : étude de la phosphorylation de l'AMP kinase par Western-Blotting

L'étude de la phosphorylation de l'AMPk a été réalisée sur des échantillons issus de l'expérimentation menée en juin 2019, soit en période de reproduction des dreissènes, d'une exposition à un stress métallique (Cd) et thermique (+5 °C). L'AMPk est une enzyme activée par une cascade de réactions catalysées par des kinases aboutissant à sa phosphorylation. L'activation de cette enzyme traduit notamment un déséquilibre de la balance énergétique puisqu'elle est principalement régulée par la concentration en AMP cellulaire (Hardie et al., 2006 ; Hardie and Sakamoto, 2006).

Le ratio AMPk phosphorylée (pAMPk) / AMPk totale (AMPK α) a été calculé à partir des résultats de quantifications par Western-blot (Figure 30). Il correspond à la proportion d'AMPK activée dans les cellules. Le faible nombre de réplicats disponibles rend l'analyse statistique délicate par rapport au nombre de conditions existantes. Néanmoins, malgré l'absence de différence significative, une forte tendance à la diminution de ce ratio a été observée chez les dreissènes exposées 24 heures au Cd, aux deux températures. Après 7 jours d'exposition, l'activation de l'AMPk semblait être plus faible chez les individus témoins à 19 °C par rapport aux témoins après 24 heures à la même température.

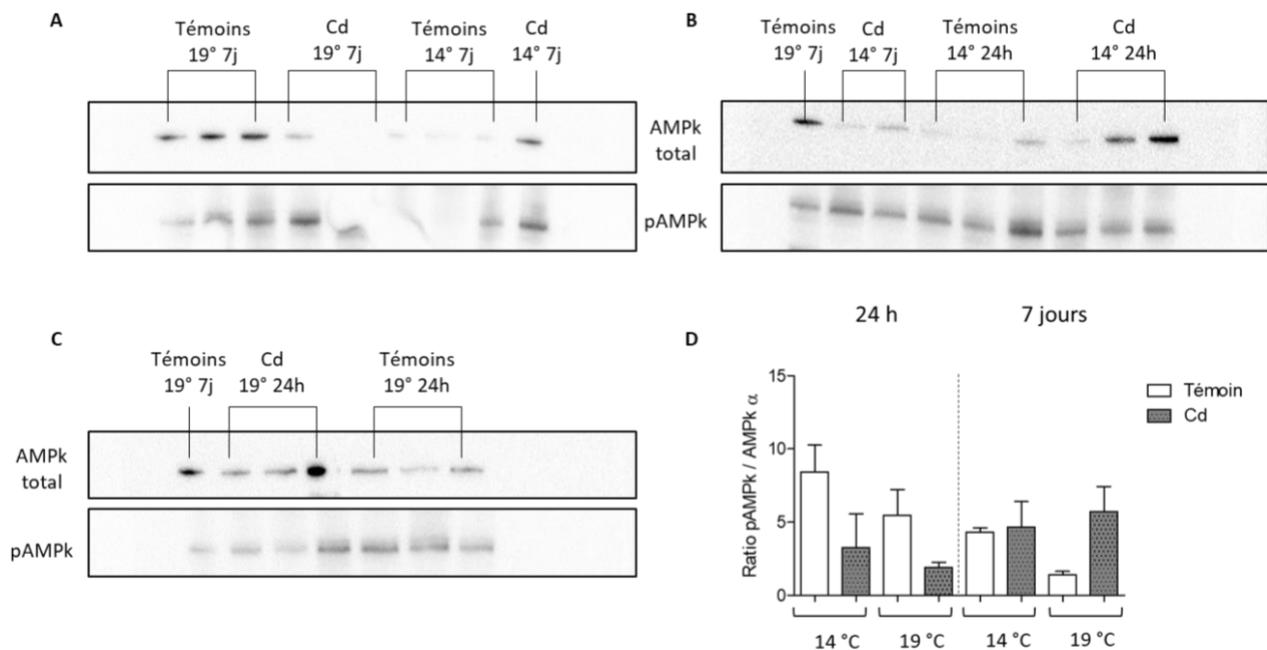


Figure 30. Analyse de l'activation de l'AMPk chez les organismes contrôles et exposés au Cd à deux températures pendant 24 heures et 7 jours par Western-Blotting. L'expression protéique de l'AMPk a été étudiée par Western-Blotting sur des extraits de protéines totales, chez les individus témoins ou les individus exposés à la contamination (Cd). La quantification a été réalisée par la mesure de la densitométrie des bandes, rapportée à celle d'un échantillon (Témoin 19 °C 7 jours). Les résultats concernant les échantillons Cd 19 °C 7 jours et Témoins 14 °C 7 jours sont présentés (A) mais suite à un mauvais transfert de membrane, les résultats sont potentiellement biaisés par la qualité de l'image et ne sont pas discutés. Les photos des différentes membranes sont présentées (A, B et C) ainsi que le ratio entre l'AMPk totale et phosphorylée (D). Aucune analyse statistique n'a été réalisée du fait du faible nombre de réplicats et de la mauvaise qualité de transfert pour certains échantillons.

Ces résultats suggèrent donc une inhibition de l'activation de l'AMP kinase lors de l'exposition au Cd. Dans la littérature, cette inhibition a déjà été décrite dans des spermatozoïdes de souris exposés au Cd, conduisant à un « blocage » du métabolisme énergétique (Li et al., 2017). L'AMPk étant à l'origine d'une cascade d'activation de plusieurs enzymes clés de la glycolyse, telles que la phosphofructo-kinase 2 ou encore la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), son inhibition conduit à terme à une diminution de la concentration en ATP cellulaire. Néanmoins, ces résultats vont à l'encontre de nos précédentes observations. En effet, à la même période, le taux de glycogène diminuait significativement chez les organismes exposés au Cd après 24 heures, suggérant une activation des voies glycolytiques. Cependant, l'impact du Cd est controversé dans la littérature puisque certaines études montrent également l'activation de l'AMPk en présence de

Cd sur des cultures cellulaires humaines (Chen et al., 2011). Après 7 jours, la baisse de l'activation de l'AMPk que nous avons observée chez les dreissènes témoins exposées aux deux températures est cohérente avec l'augmentation en AMP intracellulaire. D'après nos connaissances, aucune étude ne porte sur l'activité AMPk lors d'un stress thermique à moyen terme. Il se peut que les organismes, même non exposés au Cd, soient affectés par l'augmentation de température conduisant à un stress physiologique. L'analyse de l'activation de cette protéine clé de la régulation du métabolisme énergétique apporte une information importante sur l'état de santé global des individus. Cette étude préliminaire a permis de révéler : (1) la validité des anticorps primaires anti-souris AMPK total alpha 1 et 2 et phospho-AMPk (Abcam) monoclonaux chez *D. polymorpha* et (2) que l'AMPk étant une kinase activée par phosphorylation, l'étude de son état phosphorylé est plus informative que l'étude de son expression au niveau génique. En effet, aucune variation de l'expression du gène *ampk* n'a été observée lors de cette étude. Néanmoins, l'expression relative du gène permet d'avoir tout de même une certaine information quant au niveau de régulation inférieur ainsi que sur l'investissement énergétique potentiel dans l'expression de l'information génétique.

4. Conclusions

Différentes stratégies de gestion de l'énergie cellulaire ont été mises en évidence dans cette étude. En présence d'un stress thermique, le métabolisme énergétique est globalement plus actif par rapport à celui des témoins tandis que l'inverse a été observé en conditions hypoxiques. Bien que les deux expérimentations aient été menées dans des conditions analogues, le facteur période représente 92 % de la variabilité des réponses. Cependant, plusieurs marqueurs se sont révélés indépendants du stade de reproduction à travers des niveaux de réponse similaires mesurés après la phase d'acclimatation en laboratoire, ouvrant la voie à leur utilisation possible dans les études des effets des contaminants en laboratoire. La prise en compte des facteurs intrinsèques (cycle de reproduction, saisonnalité, âge, sexe...) est essentielle dans l'évaluation du risque car la fenêtre de tolérance des organismes peut être plus ou moins limitée en fonction de ces facteurs. En effet, une augmentation des dommages cellulaires a été observée chez les dreissènes exposées au Cd à la plus haute température uniquement en période de reproduction. Cependant, aucune perturbation des fonctions mitochondriales par le Cd n'a été décelée quelle que soit la période d'exposition suggérant ainsi que le métabolisme énergétique est un processus complexe finement régulé.

III. Perspectives issues de ces études

Lors de l'exposition à un stress thermique ou hypoxique, le temps d'exposition peut sensiblement jouer sur les réponses des organismes. Le stress thermique a, ici, révélé une activation du métabolisme à court terme avant une potentielle diminution de la capacité de réponse des dreissènes après 7 jours d'exposition. La sensibilité des organismes ectothermes vis-à-vis des contaminants peut être accrue avec la température (Sokolova et al., 2012). De plus, la réponse des organismes face à des stress multiples peut également être fortement influencée par des facteurs confondants tels que le cycle de reproduction limitant ainsi la bonne interprétation des marqueurs métaboliques ciblés (Faria et al., 2014 ; Minguez et al., 2009 ; Pain-Devin et al., 2014 ; Viarengo et al., 2007). En effet, l'ensemble des résultats acquis a permis d'observer un effet saisonnier (Chapitre 3) sur les réponses du métabolisme énergétique tant en milieu naturel qu'en conditions contrôlées de laboratoire. Cependant, certains marqueurs ont montré un même niveau de réponse après une acclimatation en conditions contrôlées de laboratoire, quelle que soit la saison d'exposition, pouvant ainsi limiter l'effet du paramètre « période » dans leur interprétation. Dans la suite de ce travail, l'ensemble des données acquises va être regroupé et traité statistiquement dans le but d'identifier des marqueurs potentiellement utilisables dans une démarche de biosurveillance.

Chapitre 5.

Intégration des données dans une perspective de biosurveillance

Contexte

L'utilisation des biomarqueurs en biosurveillance nécessite la levée d'un premier verrou afin d'affiner leur interprétation (voir Chapitre 1, Partie I.2.3), celui de la connaissance précise de leurs variations naturelles. Dans ce travail, cette étape a été initiée par la réalisation d'un suivi saisonnier des réponses des marqueurs ciblés sur un cycle annuel (mai 2018 - juin 2019). Une seconde étape a ensuite permis d'évaluer l'effet d'un facteur confondant (stade de reproduction des dreissènes) sur les réponses mesurées lorsque les organismes étaient exposés à un stress. En effet, les facteurs confondants tels que l'âge, le sexe, les caractéristiques intrinsèques ou le cycle de reproduction des animaux interfèrent dans l'interprétation des réponses des biomarqueurs mesurés et représentent ainsi un second verrou dans leur utilisation en biosurveillance (Amiard-Triquet et al., 2012).

Dans ce travail de thèse, vingt marqueurs, impliqués dans différentes voies métaboliques et à différents niveaux de régulation, ont été ciblés et mesurés sur l'ensemble des dreissènes échantillonnées soit lors du suivi saisonnier soit à l'issue des différentes expérimentations réalisées en conditions contrôlées de laboratoire. Afin d'organiser les informations apportées par l'étude de ces marqueurs non plus au niveau physiologique mais comme outils potentiels de biosurveillance, ce chapitre, en regroupant toutes les données acquises, constitue une première approche d'analyse globalisée des différents résultats obtenus dans l'ensemble des travaux réalisés au cours de la thèse. Il est divisé en trois grandes parties.

- La première partie vise à confronter les réponses des marqueurs en conditions contrôlées et en conditions naturelles. Elle compare pour cela les niveaux des marqueurs mesurés suite à une phase d'acclimatation au laboratoire de 15 jours avec ceux mesurés en conditions naturelles aux mêmes périodes de l'année.

- La seconde partie vise à évaluer la capacité des différents marqueurs à rendre compte de l'exposition à une pression environnementale en conditions contrôlées en fonction de leur comportement décrit en 1^{ère} partie. Pour cela, des modèles ACP simples ont été utilisés dans un premier temps en prenant en compte l'ensemble des facteurs influençant les réponses afin d'observer le comportement de l'ensemble des réponses suivies en fonction des différentes conditions. Dans un second temps, des modèles ACP « within/between » ont été utilisés afin de s'affranchir de la période à laquelle les expérimentations ont été réalisées, grâce à une

normalisation des données par la période. Cette normalisation est basée sur différents calculs réalisés par le modèle permettant la superposition des valeurs selon le facteur choisi. Elle rend plus simple la lecture des résultats et l'observation d'une potentielle discrimination des groupes en fonction des conditions expérimentales, en masquant l'effet de la période. Cette approche peut permettre de mieux comprendre les effets des stress appliqués en laboratoire afin d'affiner l'interprétation des résultats (Artigas et al., 2012).

- La troisième et dernière partie discute l'ensemble des résultats obtenus lors de cette approche d'intégration des données et propose des perspectives quant à l'utilisation des marqueurs du métabolisme énergétique en biosurveillance.

A l'inverse des précédents chapitres, celui-ci est donc principalement basé sur l'analyse statistique des données pour évaluer le potentiel des réponses suivies des biomarqueurs de contamination du milieu ou de stress environnemental. Lors des précédents chapitres, les réponses ont été interprétées d'un point de vue biologique ou physiologique afin d'améliorer les connaissances sur le fonctionnement du métabolisme énergétique chez *D. polymorpha* et ses modulations par le stress. Ici, l'exercice est de concilier à la fois l'intégration de l'ensemble des réponses grâce aux outils statistiques et l'interprétation biologique pour pouvoir discuter de leur intérêt en écotoxicologie.

I. Variabilité temporelle des réponses du métabolisme énergétique en conditions naturelles et contrôlées

Le suivi saisonnier des réponses du métabolisme énergétique dans la population de dreissènes du canal de la Meuse en 2018-2019 (Publication n°1) a permis d'observer les fluctuations saisonnières des différents marqueurs étudiés dans la population de *D. polymorpha* ciblée. La connaissance des variations naturelles des marqueurs est un point clé dans l'interprétation de leur réponse en conditions contrôlées de laboratoire. Ainsi, l'ensemble des données acquises lors de ce suivi a été traité de manière à observer par représentation graphique les variations des réponses (moyennes et intervalles de confiance calculés pour chaque mois de prélèvement). Sur ces mêmes graphiques, la moyenne des réponses mesurées après la phase d'acclimatation des organismes lors des différentes expérimentations réalisées au laboratoire (pour rappel : expositions au Cd en novembre 2018 et juin 2019, exposition aux stress thermique et hypoxique en novembre 2019) a été ajoutée afin d'observer leur niveau après transport et acclimatation au laboratoire, par rapport à celui qu'ils présentaient à la même période en milieu naturel. Pour ce faire, seules les réponses mesurées à T0 (point de prélèvement avant le lancement des expérimentations, après la période d'acclimatation de 15 jours) ont été utilisées et positionnées sur les représentations graphiques.

Dans cette partie, ne peuvent être considérés que les marqueurs mesurés à la fois lors du suivi saisonnier *in situ* et à T0. De ce fait, pour novembre 2019, seule la mesure des nucléotides énergétiques est représentée, les autres marqueurs n'ayant pas été mesurés lors des prélèvements *in situ*.

1. Analyse des différents marqueurs mesurés

Marqueurs de la balance énergétique et de sa régulation

La comparaison des réponses de la balance énergétique et de sa régulation mesurées à T0 et dans le milieu naturel à la même période montre un décalage entre les valeurs obtenues lors du suivi saisonnier et celles mesurées à T0 pour les différentes expositions réalisées (Figure 31). Ces marqueurs semblent donc être sensibles aux conditions contrôlées de laboratoire. Les individus prélevés au T0 des expérimentations réalisées en novembre 2018 et juin 2019 présentent des réponses similaires entre les deux périodes après acclimatation, pour

l'ensemble des marqueurs de la balance énergétique hormis l'expression relative du gène *ampd*. Ce dernier montre un niveau d'expression plus élevé en juin 2019 qu'en novembre 2018

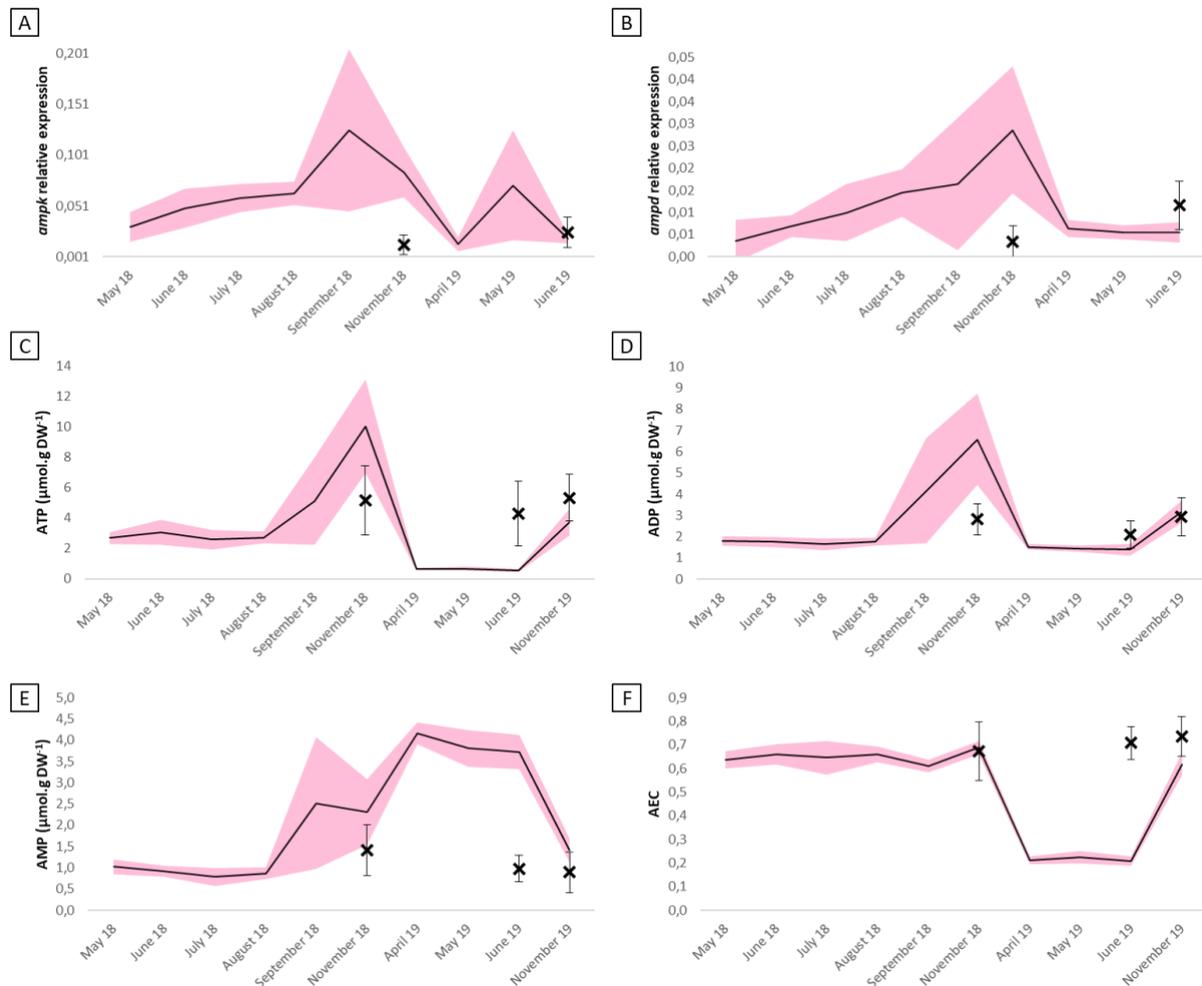


Figure 31. Variabilité des réponses des marqueurs de la balance énergétique et de sa régulation observée in situ lors du suivi saisonnier (ligne noire) et valeurs moyennes des réponses observées à l'issue des différentes phases d'acclimation réalisées au laboratoire (T0 croix noire, +/- écart-type) lors d'expérimentations en laboratoire chez la même population de *D. polymorpha*. L'intervalle de confiance (95 %) associé à la mesure du marqueur in situ est également représenté (aire rose) pour chaque marqueur. Expression relative des gènes *ampk* (A) et *ampd* (B), concentrations en ATP (C), ADP (D) et AMP (E) et valeur de la charge énergétique en adénylates (CEA ; F).

Réserves énergétiques

Concernant les réserves énergétiques, les réponses observées lors du suivi saisonnier et celles observées après acclimatation au laboratoire présentent des profils de variation différents (Figure 32). À T0, les concentrations en glycogène (Figure 32A) et en lipides (Figure 32B) sont au même niveau, quelle que soit la période d'exposition, et ne suivent pas la courbe annuelle des variations mesurées *in situ*. Concernant la concentration en protéines (Figure 32C), les valeurs mesurées après acclimatation au laboratoire suivent sensiblement les variations observées lors du suivi saisonnier bien que les niveaux soient à la fois significativement plus faibles à chaque T0 par rapport aux valeurs mesurées *in situ* et significativement différents entre les deux T0 ($p < 0.05$). Il semble donc que les concentrations en protéines mesurées à T0 soient principalement influencées par la période d'expérimentation et plus légèrement affectées par un changement d'environnement (milieu naturel *versus* acclimatation au laboratoire).

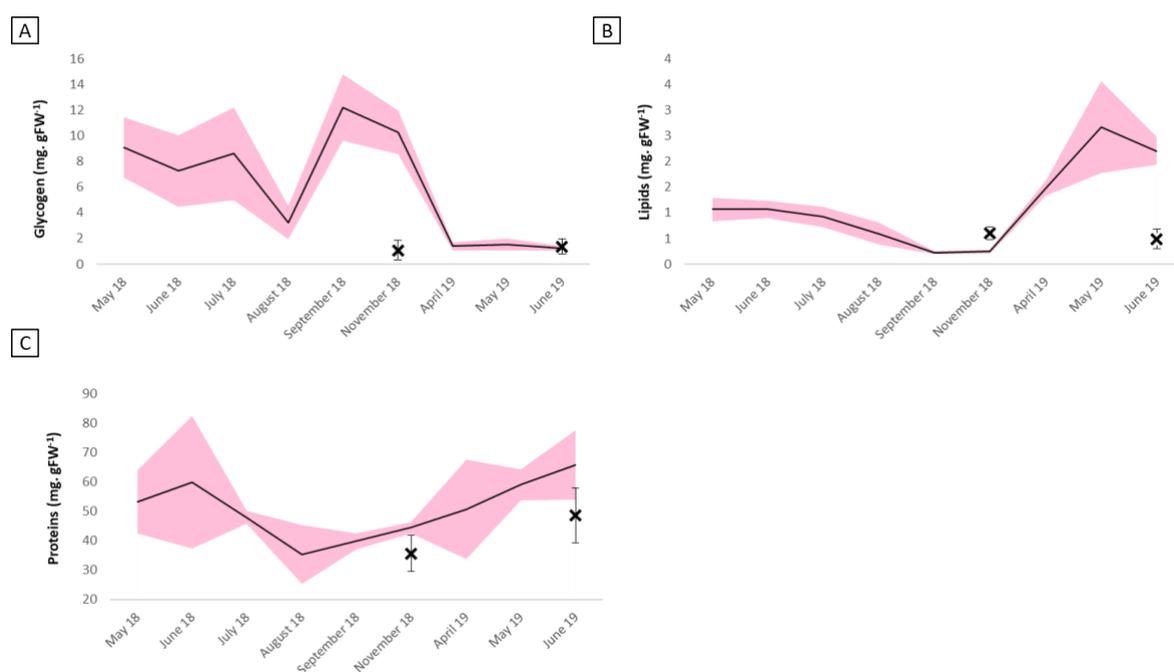


Figure 32. Variabilité des réponses des marqueurs des réserves énergétiques observée *in situ* lors du suivi saisonnier (ligne noire) et valeurs moyennes des réponses observées à l'issue des différentes phases d'acclimatation réalisées au laboratoire (T0 croix noire, +/- écart-type) lors d'expérimentations en laboratoire chez la même population de *D. polymorpha*. L'intervalle de confiance (95 %) associé à la mesure du marqueur *in situ* est également représenté (aire rose) pour chaque marqueur. Concentrations en glycogène (A), lipides (B) et protéines (C).

Marqueurs du métabolisme aérobie

L'expression relative du gène de la citrate synthase et l'activité de cette dernière présentent des valeurs similaires après la phase d'acclimatation au laboratoire quelle que soit la période d'expérimentation. Cependant une différence est observée entre les valeurs à T0 et celles mesurées *in situ* au mois correspondant pour l'expression relative *cs* (Fig. 33A). En ce qui concerne l'activité CS (Fig. 33B), les valeurs sont identiques entre les différents T0 ainsi qu'entre les T0 et les valeurs mesurées lors du suivi saisonnier. Les valeurs de l'expression relative du gène *sdh* sont différentes entre les deux T0 mesurés en novembre 2018 et juin 2019 (Fig. 33C) contrairement à l'expression relative du gène *cytb* (Fig. 33D). Concernant l'expression relative du gène *cox* et l'activité COX, leurs profils de réponse diffèrent entre les T0. En effet, les valeurs de l'expression *cox* sont différentes entre les deux T0 en novembre 2018 et juin 2019 ainsi qu'entre les différents T0 et les valeurs mesurées *in situ* à la même période (Fig. 33E). Les valeurs d'activité COX mesurées à chaque T0 sont similaires à celles mesurées lors du suivi saisonnier à la même période (COX ; Fig. 33F). L'expression relative du gène *atp* présente des valeurs similaires entre les deux T0 tandis que l'activité ETS présente des valeurs entre les deux T0 significativement différentes mais similaires à celles mesurées *in situ* lors du suivi saisonnier.

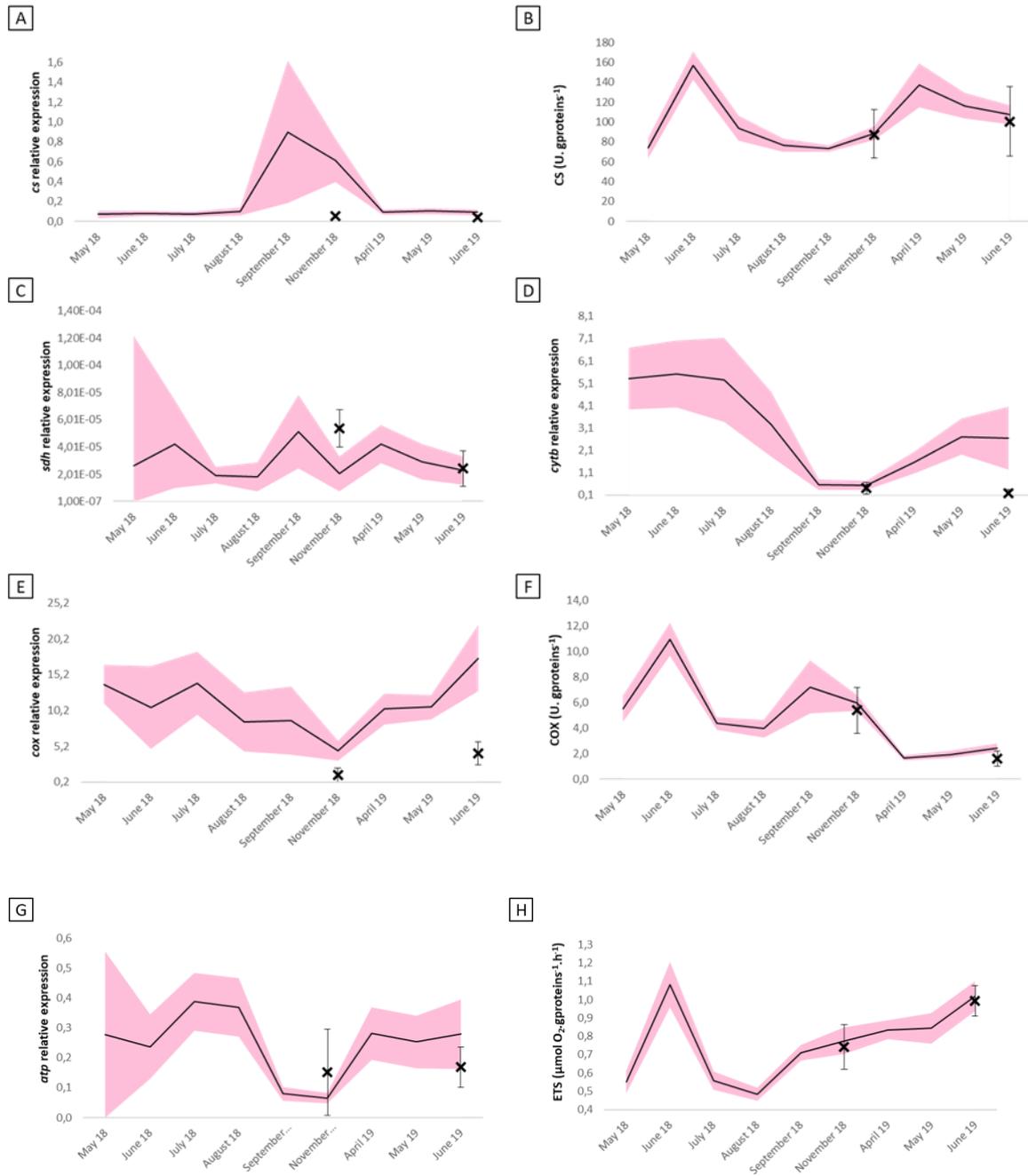


Figure 33. Variabilité des réponses des marqueurs du métabolisme aérobie observée in situ lors du suivi saisonnier (ligne noire) et valeurs moyennes des réponses observées à l'issue des différentes phases d'acclimation réalisées au laboratoire (T0 croix noire, +/- écart-type) lors d'expérimentations en laboratoire chez la même population de *D. polymorpha*. L'intervalle de confiance (95 %) associé à la mesure du marqueur in situ est également représenté (aire rose) pour chaque marqueur. Expression relative du gène *cs* (A) et activité CS (B) ; expressions relative des gènes *sdh* (C), *cyt b* (D), *cox* (E) ; activité COX (F) ; expression relative du gène *atp* (G) et activité ETS (H).

Marqueurs de stress liés au métabolisme énergétique

L'alternative oxydase, l'IMP et la lactate déshydrogénase ont été considérées comme des marqueurs de stress tout au long des travaux de la thèse. Les réponses de ces marqueurs mesurées avant chaque exposition au laboratoire (T0) présentent un niveau similaire aux mesures réalisées à la même période lors du suivi saisonnier pour l'expression du gène et l'activité de la lactate déshydrogénase, et l'expression du gène *aox* (Figure 34 A, B et C). Parmi ces marqueurs, seule l'activité LDH présente des valeurs similaires entre les deux T0 ($p < 0,05$) ; Figure 34B). La concentration en IMP en revanche présente à la fois des valeurs différentes entre les T0 ainsi qu'entre celles mesurées à T0 en juin 2019 et celles mesurées lors du suivi saisonnier à la même période ($p < 0,05$) (Figure 34D).

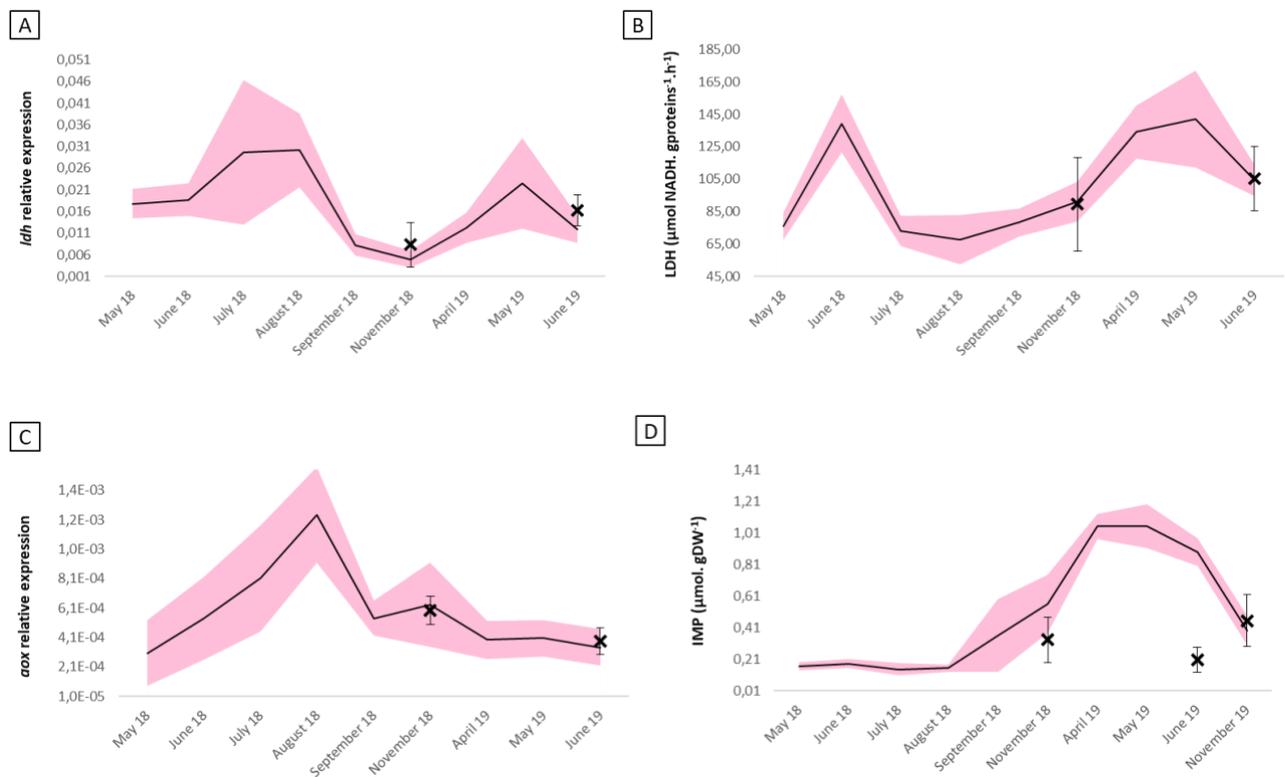


Figure 34. Variabilité des réponses des marqueurs de stress liés au métabolisme énergétique observée *in situ* lors du suivi saisonnier (ligne noire) et valeurs moyennes des réponses observées à l'issue des différentes phases d'acclimatation réalisées au laboratoire (T0 croix noire, +/- écart-type) lors d'expérimentations en laboratoire chez la même population de *D. polymorpha*. L'intervalle de confiance (95 %) associé à la mesure du marqueur *in situ* est également représenté (aire rose) pour chaque marqueur. Expression relative du gène *ldh* (A) et activité LDH (B) ; expressions relative du gène *aox* (C) et concentration en IMP (D).

2. Bilan concernant les marqueurs identifiés

La confrontation des réponses issues du suivi saisonnier et de celles obtenues suite à la phase d'acclimatation réalisée au laboratoire avant chaque expérimentation a permis d'identifier différents comportements de réponses parmi les marqueurs du métabolisme énergétique. L'ensemble des données a également été traité statistiquement afin d'évaluer la significativité des différences à la fois (i) entre les données issues du suivi saisonnier (*in situ*) et celles mesurées à T0 et (ii) entre les différents T0 (Tableau 7).

Les observations menées dans cette partie sont confortées par les analyses statistiques. En effet, les concentrations en nucléotides énergétiques adényliques (ATP, ADP et AMP) et la CEA, l'expression relative des gènes *ampk*, *cs*, *cytb* et *atp*, ainsi que les concentrations en glycogène et lipides ne sont pas différentes entre les T0 des différentes expositions. Parmi ces marqueurs, seuls l'expression relative du gène *cytb* et la concentration en lipides n'ont pas montré une variation des réponses suite à l'exposition des dreissènes à différents stress en conditions contrôlées de laboratoire. En revanche, les nucléotides adényliques, la CEA, les expressions relatives des gènes *cs*, *atp*, *ampk*, et la concentration en glycogène sembleraient pouvoir témoigner d'une modification des réponses lorsque les organismes sont soumis à un stress en laboratoire sans interférence avec les fluctuations saisonnières. Ils représenteraient donc de potentiels bons candidats pour une utilisation en écotoxicologie.

D'un autre côté, les niveaux de certains marqueurs sont similaires aux valeurs mesurées *in situ*, même après une acclimatation de 15 jours au laboratoire. C'est le cas pour les activités CS, ETS et LDH, et l'expression relative des gènes *ldh* et *aox*. Aucun de ces marqueurs n'a permis de montrer l'existence d'un stress (Cd ou 25°C ou hypoxie) lors des expérimentations réalisées au laboratoire. Cependant, ces marqueurs restent intéressants puisqu'ils pourraient permettre d'intégrer les variations associées au cycle de vie de *D. polymorpha*. En effet, lorsque les niveaux de réponses à T0 reflètent fidèlement ceux d'une population dans son environnement naturel, ils pourraient être particulièrement adaptés pour identifier à la fois les états physiologiques critiques (*e.g* période de reproduction) pour une population et la variabilité temporelle de la sensibilité au(x) stress puisque leurs réponses ne sont pas influencées par les conditions de laboratoire. De ce fait, ces marqueurs pourraient avoir une plus forte pertinence écologique.

Tableau 7. Ensemble des valeurs mesurées chez *D. polymorpha* lors du suivi saisonnier (Terrain) ainsi qu'après la phase d'acclimatation au laboratoire (T0) aux périodes correspondantes (novembre 2018, juin 2019 et novembre 2019). Le pourcentage de variation entre le terrain et les T0 est représenté ainsi que les différentes p-values obtenues pour les tests statistiques effectués (test t ou kruskal-wallis) afin d'évaluer la significativité des différences entre les valeurs mesurées lors du suivi saisonnier et aux différents T0. L'aptitude potentielle des marqueurs à témoigner d'une variation de réponses lorsque les dreissènes sont soumises à un stress en laboratoire est également présentée (oui/non).

Marqueur	Terrain novembre 2018	T0 novembre 2018	Variation (Terrain/T0; %)	p value (Terrain /T0)	Terrain juin 2019	T0 juin 2019	Variation (Terrain/T0; %)	p value (Terrain /T0)	Terrain novembre 2019	T0 novembre 2019	Variation (Terrain/T0; %)	p value (Terrain /T0)	p value (entre T0)	Effet Cd	Effet T°C	Effet Hypoxie
ldh	0,005	0,008	40,756	0,05	0,012	0,016	26,84	0,07	NA	0,008	NA	NA	0,001	non	non	non
cs	0,615	0,056	-990,255	3,00E-08	0,092	0,045	-104,94	0,02	NA	0,037	NA	NA	0,08	oui	non	non
atp	0,066	0,153	56,866	0,001	0,280	0,170	-64,83	0,048	NA	0,128	NA	NA	0,64	oui	oui	non
cox	4,577	1,213	-277,353	0,001	17,508	4,196	-317,21	2,30E-05	NA	2,558	NA	NA	0,002	non	oui	non
cytb	0,538	0,406	-32,519	0,321	2,645	0,189	-1301,34	0,001	NA	0,809	NA	NA	0,06	non	non	non
ampd	0,030	0,004	-580,868	0,004	0,006	0,013	48,45	0,03	NA	0,005	NA	NA	0,001	non	non	non
ampk	0,084	0,013	-547,996	1,00E-07	0,019	0,025	24,14	0,37	NA	0,021	NA	NA	0,05	non	oui	non
aox	0,001	0,001	-6,658	0,85	0,000	0,000	10,77	0,94	NA	0,0001	NA	NA	0,048	non	non	non
sdh	2,04E-05	5,38E-05	62,172	0,03	2,29E-05	2,42E-05	5,37	0,88	NA	0,000	NA	NA	0,028	oui	non	non
ETS	0,774	0,741	-4,503	0,65	1,019	0,993	-2,62	0,54	NA	1,048	NA	NA	1,04E-08	non	non	non
LDH	91,244	89,603	-1,831	0,88	104,16	105,4	1,17	0,85	NA	141,431	NA	NA	0,12	non	non	non
CS	88,715	88,041	-0,766	0,94	107,390	100,937	-6,392	0,45	NA	94,376	NA	NA	0,09	non	non	non
COX	5,969	5,399	-10,567	0,54	2,461	1,618	-52,081	0,001	NA	0,900	NA	NA	2,10E-10	non	non	non
Protéines	44,490	35,714	-24,574	0,001	65,850	48,674	-35,286	0,01	NA	NA	NA	NA	0,001	non	NA	NA
Lipides	0,253	0,612	58,595	2,10E-11	2,214	0,501	-342,235	1,14E-13	NA	NA	NA	NA	0,08	non	NA	NA
Glycogène	10,255	1,092	-839,393	2,80E-11	1,231	1,381	10,879	0,64	NA	NA	NA	NA	0,46	oui	NA	NA
CEA	0,699	0,682	-2,388	0,707	0,217	0,718	69,727	3,97E-15	0,627	0,745	15,760	0,02	0,43	oui	oui	oui
IMP	10,052	0,333	-2916,609	0,03	0,557	0,207	-169,683	3,71E-11	0,390	0,454	14,069	0,69	0,04	non	non	non
ATP	0,699	5,186	86,528	0,01	0,217	4,300	94,946	9,74E-12	3,754	5,336	29,650	0,12	0,42	oui	non	oui
ADP	6,593	2,825	-133,373	0,003	1,394	2,101	33,645	5,00E-03	3,173	2,954	-7,409	0,69	0,05	non	non	oui
AMP	2,313	1,417	-63,190	0,02	3,726	0,990	-276,389	8,70E-10	1,416	0,899	-57,507	0,14	0,06	non	non	oui

Un troisième groupe de marqueurs a été identifié. En effet l'expression relative des gènes *sdh*, *ampd*, *cox* ainsi que la concentration en IMP et l'activité COX ne présentent ni un niveau similaire lors des différentes périodes d'expositions au laboratoire à T0, ni une valeur similaire à celle mesurée à la même période du suivi saisonnier. Les valeurs mesurées à T0 sont significativement différentes de celles mesurées lors du suivi saisonnier et varient selon la période (Tableau 7). Dans ce sens, l'interprétation des variations de ces marqueurs peut s'avérer compliquée ou délicate suite à l'exposition des dreissènes à un stress.

Le tableau 7 indique également les pourcentages de variation des marqueurs entre les valeurs mesurées lors du suivi saisonnier et celles mesurées lors des différentes expérimentations à T0. Parmi les marqueurs montrant des différences significatives, certains présentent une augmentation de leurs valeurs en laboratoire indépendamment de la période (expression relative *sdh*, concentration en ATP) et d'autres une diminution (expression des gènes *cs*, *cox*, *cytb*, concentrations en protéines, IMP et AMP). Des sens de variations différents ont également été observés après l'acclimatation (T0) selon la période :

- L'expression relative *atp* et la concentration en lipides sont plus fortes en novembre et plus faibles en juin par rapport aux valeurs mesurées lors du suivi saisonnier à la même période.

- L'inverse est observé pour l'expression relative des gènes *ampd*, *ampk*, les concentrations en glycogène et en ADP. En effet les valeurs mesurées à T0 pour ces marqueurs sont inférieures à celles mesurées *in situ* en novembre 2018 et supérieures en juin 2019. Cependant, il est délicat d'interpréter biologiquement les sens de variation des marqueurs observés aux différents T0. En effet ces variations diffèrent à la fois selon le marqueur et la période.

Différents groupes de marqueurs ont donc été définis sur la base de leur comportement en laboratoire après la phase d'acclimatation par rapport aux valeurs mesurées lors du suivi saisonnier. La partie suivante vise donc à vérifier leur potentiel rôle de biomarqueur lorsque les dreissènes sont soumises à un stress pouvant être rencontré dans le milieu naturel (dans notre cas, un stress métallique, thermique ou hypoxique), autre qu'un stress lié au transport et à l'acclimatation des animaux aux conditions de laboratoire.

II. Intégration des réponses observées lors des expositions contrôlées en conditions de laboratoire

Afin d'identifier le potentiel de réponse des marqueurs étudiés vis-à-vis de l'exposition à un stress, plusieurs ACP ont été réalisées sur le jeu de données regroupant les réponses mesurées chez les dreissènes exposées en conditions contrôlées de laboratoire (i) en prenant en compte l'effet de la période d'exposition ou (ii) en masquant cet effet période grâce aux modèles ACP within/between qui permettent de normaliser les réponses par le facteur choisi. En effet, dans la publication n°3 (expositions au Cd à deux températures et à deux périodes du cycle de reproduction), le pourcentage de variance des réponses représentait 92 % de la variabilité totale du jeu de données. Le facteur « contamination » ne représentait que 0,1 % de la variabilité totale. Dans ce sens, la discrimination des groupes expérimentaux était principalement liée à la période d'exposition. La normalisation des réponses par le facteur période pourrait permettre de rendre ainsi plus lisible l'effet de la contamination.

L'ensemble des réponses mesurées lors des différentes expérimentations a été séparé en deux groupes avec :

- (a) groupe « T0 stables » : les marqueurs présentant à la fois des niveaux similaires après la phase d'acclimatation en laboratoire entre les différentes expérimentations et une aptitude à témoigner d'une variation de réponses lorsque les dreissènes sont exposées à un stress en conditions contrôlées (i.e. l'ATP, la CEA, les expressions relatives des gènes *cs*, *atp*, *ampk*, et la concentration en glycogène).

- (b) groupe « T0 saisonniers » : les marqueurs présentant après acclimatation au laboratoire des niveaux similaires aux réponses saisonnières (aucune différence significative entre le terrain et les T0 correspondants) (i.e. les activités CS, ETS et LDH et l'expression relative des gènes *ldh* et *aox*).

Les marqueurs identifiés précédemment comme délicats d'utilisation dans une perspective de biosurveillance étant donnée la difficulté d'interprétation des réponses (i.e. la concentration en IMP, l'activité COX et l'expression relative des gènes *ampd*, *cox* et *sdh*) n'ont pas été pris en compte dans cette partie.

La charge énergétique en adénylates étant calculée à partir de la concentration des différents nucléotides énergétiques, seul cet indice est utilisé dans la construction des modèles afin d'éviter la redondance. La concentration en ATP n'a donc pas été prise en compte.

1. Réponses issues des deux expositions au Cd

Deux expositions au Cd ont été réalisées à deux périodes distinctes du cycle de reproduction : en période de repos (novembre 2018) et en période de reproduction (juin 2019). Dans cette partie, l'ensemble des réponses des marqueurs mesurés chez les dreissènes d'une part chez les organismes contrôles (température *in situ* et température *in situ* + 5 °C) et d'autre part chez les organismes exposés au Cd (température *in situ* et température *in situ* + 5 °C) a été rassemblé afin de voir globalement la capacité de discrimination des conditions expérimentales par les différents groupes de marqueurs sans prendre en compte le temps d'exposition (24h et 7 jours) ou la température d'exposition. Le choix de mettre en commun l'ensemble des groupes expérimentaux soit « contrôles » soit « exposés au Cd » sans prendre en compte la température repose sur trois arguments :

(1) L'écart de température choisi était de + 5 °C en fonction de la température du milieu naturel au moment du prélèvement des organismes aux deux périodes. Lors du suivi saisonnier, l'amplitude quotidienne des variations de la température a très fréquemment dépassé cette valeur supposant ainsi que les dreissènes soient potentiellement acclimatées à une variation thermique modérée (Publication n°1).

(2) Suite aux deux expositions au Cd, l'ensemble des données a été intégré dans un modèle PLS-DA (Publication n°3). Sur la représentation graphique, nous avons observé une discrimination des différentes conditions expérimentales en fonction de la condition (Cd et contrôle) en novembre 2018 et en fonction de la durée d'exposition (24 heures et 7 jours) en juin 2019 mais aucune discrimination en fonction de la température d'exposition supposant ainsi un effet négligeable de la température sur les réponses du métabolisme énergétique.

(3) La sélection des marqueurs repose sur leur réponse après 15 jours d'acclimatation (T0) avant le lancement de l'exposition. Le facteur « temps d'exposition » (24 heures et 7 jours) n'a donc pas été pris en compte car on s'intéresse au comportement des marqueurs dans leur globalité.

Le but ici était d'observer le comportement général des marqueurs lorsque les dreissènes est exposées à une contamination.

Les marqueurs ont été traités selon les deux groupes proposés précédemment, avec pour rappel :

- (a) les marqueurs « T0 stables » présentant à la fois des niveaux similaires aux différents T0 et une aptitude à témoigner d'une variation de réponses en lorsque les dreissènes sont exposées à un stress métallique et thermique au laboratoire (i.e. la CEA, les expressions relatives des gènes *cs*, et *atp*, et la concentration en glycogène). A noter que l'expression relative *ampk* n'a pas été sélectionnée ici car elle n'a pas montré de variations de réponses lors des expositions au Cd mais uniquement lors des expositions aux stress hypoxique et thermique.

- (b) les marqueurs « T0 saisonnier » présentant des niveaux similaires aux réponses saisonnières (aucune différence significative entre les réponses mesurées sur le terrain lors du suivi saisonnier et les réponses mesurées au T0 à la même période ; i.e. les activités CS, ETS et LDH et l'expression relative *ldh* et *aox*).

1.1. Comportement des marqueurs suite à l'exposition des organismes au Cd en prenant en compte la période

Afin de décrire le comportement des marqueurs « T0 stables » et « T0 saisonniers », des ACP ont été réalisées. D'après les résultats obtenus, les marqueurs « T0 stables » permettent de discriminer les différents groupes expérimentaux (Figure 35A) et les deux saisons. Les réponses mesurées chez les moules exposées au Cd présentent des profils contrastés avec une inversion du sens de variation des marqueurs (CEA et glycogène) entre novembre et juin (Figure 35A et B). En novembre, les réponses des dreissènes exposées au Cd sont caractérisées par une concentration en glycogène plus élevée et une valeur moyenne de la CEA plus faible par rapport aux dreissènes exposées en juin. Les expressions relatives des gènes *atp* et *cs* semblent principalement discriminer les groupes expérimentaux témoins (contrôle) et exposés au Cd. Dans la publication n°3, une tendance à la baisse de l'expression relative *cs* et *atp* avait justement été observée chez les dreissènes exposées au Cd par rapport aux contrôles.

Les réponses des marqueurs « T0 saisonniers » (valeur à T0 similaire aux valeurs mesurées *in situ* lors du suivi saisonnier) (Figure 35 C et D) permettent de séparer les groupes expérimentaux en fonction de la période (novembre 2018 et juin 2019) mais ne permettent pas de discriminer les différentes conditions expérimentales (contrôles et exposées). En effet, les ellipses des conditions contrôles et exposées sont superposées dans le plan de l'ACP. De ce fait, la capacité de ces marqueurs à discriminer les conditions d'exposition est limitée.

En définitive, en prenant en compte la période d'exposition, seuls les marqueurs « T0 stables » semblent être capables de témoigner de l'effet d'un stress métallique en laboratoire. Néanmoins, il se peut qu'en s'affranchissant de ce facteur période, l'effet de la contamination soit visible avec les deux groupes de marqueurs.

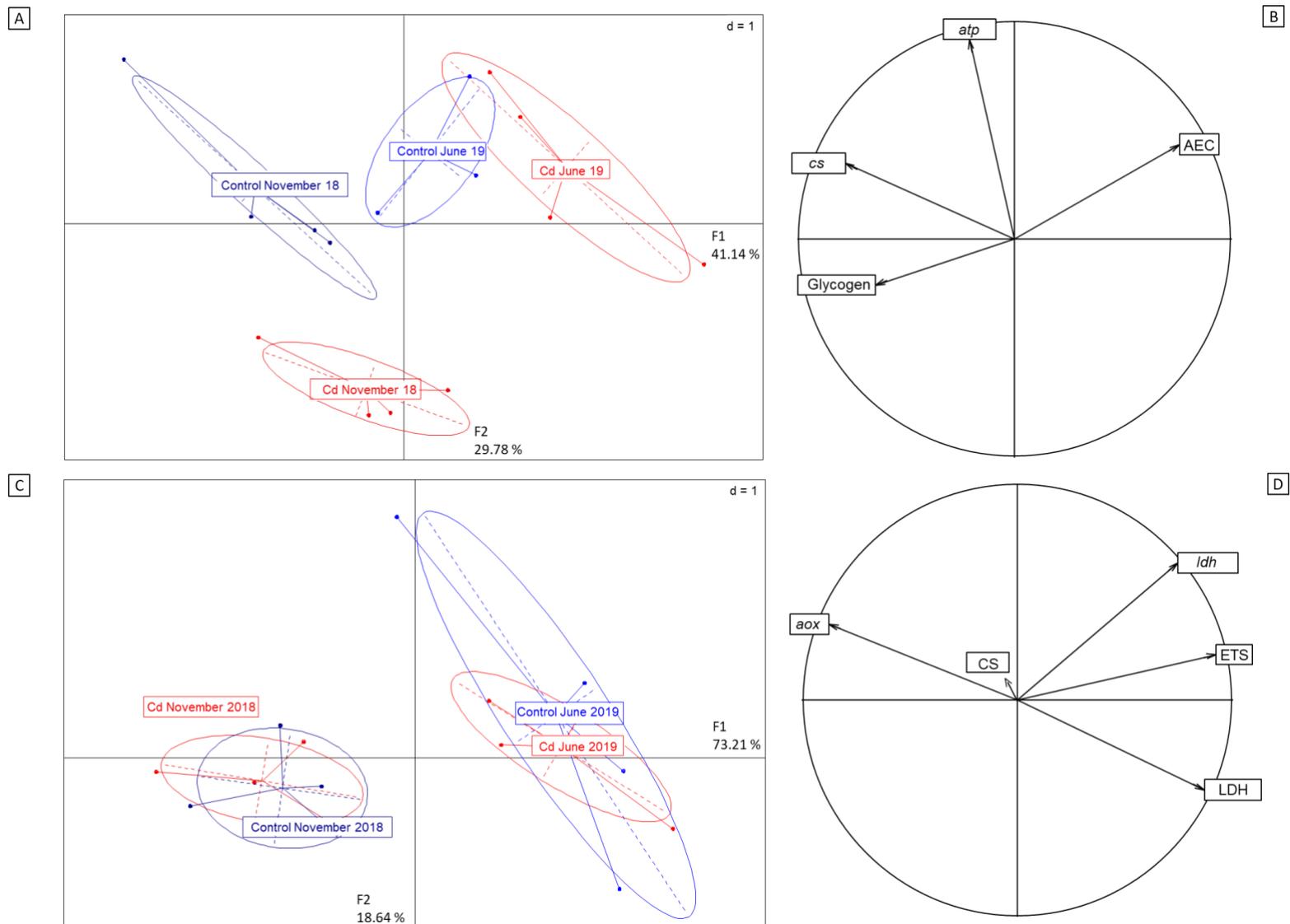


Figure 35. ACP représentant la variabilité des réponses des marqueurs en condition contrôlée de laboratoire chez les organismes témoins (Control, bleu) et exposés au Cd et à la température (Cd, rouge) chez *D. polymorpha* toutes conditions confondues en considérant l'effet de la période. Les marqueurs « T0 stables » et « T0 saisonniers » sont illustrés respectivement dans les diagrammes A et C avec leur cercle des corrélations associés (B et D).

1.2. Intégration des données sans prendre en compte l'effet de la période

Dans le but de mieux observer l'effet des conditions expérimentales, des ACP within/between ont été utilisées afin de normaliser le jeu de données par le facteur période. Cette méthode permet de masquer cet effet grâce à la superposition des données dans l'espace. De ce fait, l'effet du facteur condition (Control November/June et Cd November/June) devient plus lisible.

D'après les résultats obtenus (Figure 36), les marqueurs « T0 stables » permettent toujours de discriminer les différentes conditions expérimentales bien que la séparation des groupes soit moins marquée que lorsque la période est prise en compte (Figure 36A). L'expression relative des gènes *atp* et *cs* permettent de distinguer les réponses entre les contrôles et les organismes exposés au Cd (Figure 36B). Les profils de réponse des dreissènes témoins (Control) et Cd sont inversés selon la saison d'exposition comme cela a été observé précédemment. Dans la publication n°3, une hypothèse quant à une différence de gestion de l'énergie disponible avait été émise suite aux différents résultats observés. Cette approche réalisée ici nous permet notamment de valider, en partie, cette hypothèse bien que seulement 4 marqueurs aient été considérés pour la construction du modèle.

Le diagramme présentant les marqueurs « T0 saisonniers » montre une superposition des réponses des organismes témoins et exposés au Cd renforcée lorsque l'effet de la période d'exposition est masqué (Figure 36C). Bien qu'intégratrices de certains caractères intrinsèques des dreissènes, les réponses des marqueurs « T0 saisonniers » ne semblent pas être aptes à témoigner d'une variation de réponse liée à l'exposition au Cd au laboratoire. Cependant, les réponses de ces marqueurs peuvent dépendre de la nature du stress environnemental (autre qu'un stress chimique) subi par les dreissènes.

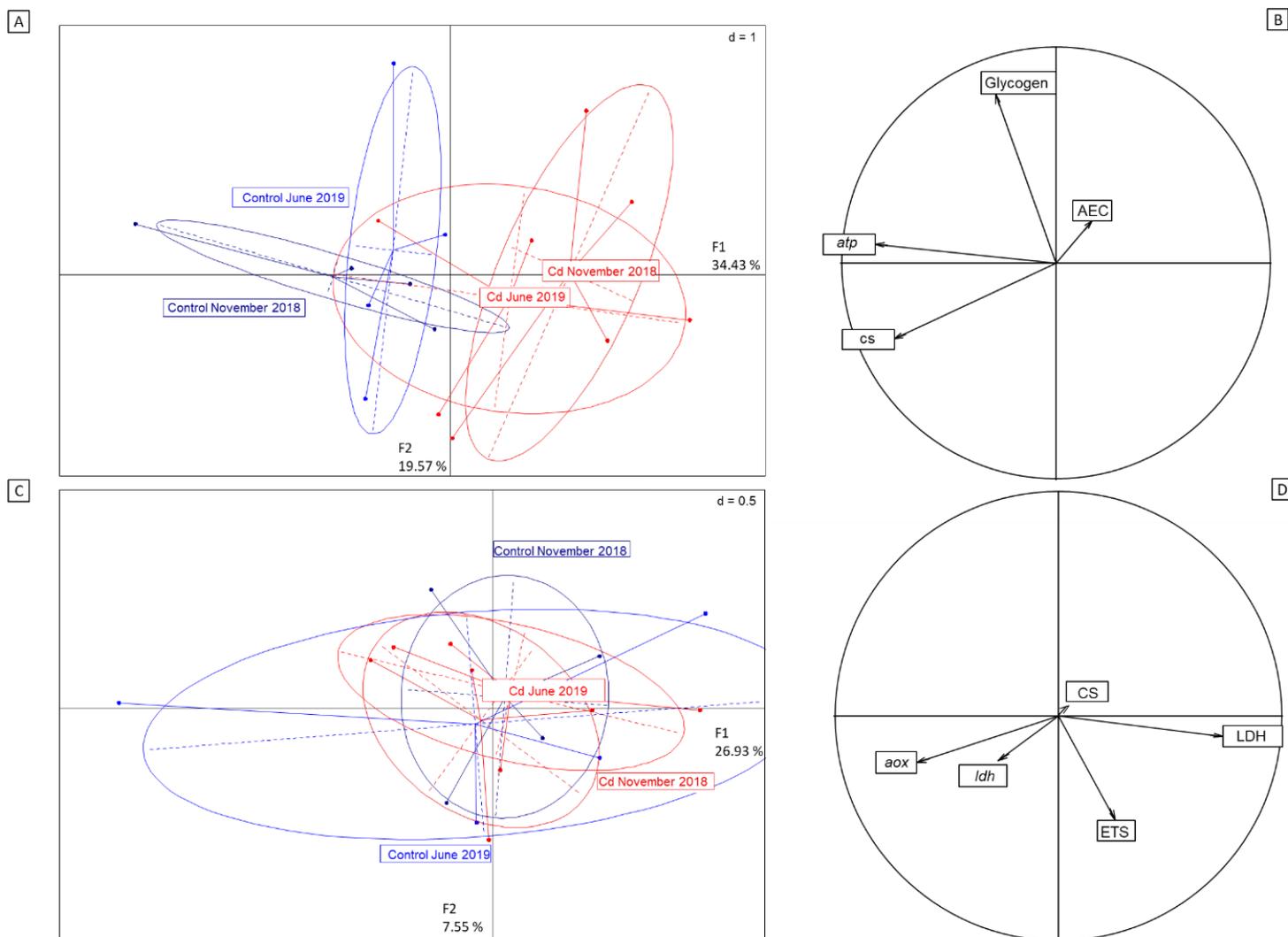


Figure 36. ACP représentant la variabilité des réponses des marqueurs en condition contrôlées de laboratoire chez les organismes témoins (Control, bleu) et exposés au Cd (Cd, rouge) chez *D. polymorpha* toutes conditions confondues en masquant l'effet de la période. Les marqueurs « T0 stables » et « T0 saisonniers » sont illustrés respectivement dans les diagrammes A et C avec leur cercle des corrélations associés (B et D).

2. Réponses issues de l'ensemble des expositions réalisées en conditions contrôlées de laboratoire

Dans les travaux de la thèse, plusieurs expérimentations ont été réalisées au laboratoire : les deux expositions au Cd à différentes températures, une exposition à l'hypoxie ainsi qu'une exposition à un stress thermique chez la même population de *D. polymorpha*. Les marqueurs présentant un niveau similaire chez les individus témoins à T0 entre les deux expérimentations de novembre 2018 et juin 2018 (marqueurs « T0 stables ») semblent posséder un potentiel de discrimination des réponses en présence d'un stress métallique. Dans cette partie, l'ensemble des réponses issues des différentes expositions réalisées en conditions contrôlées de laboratoire a été rassemblé (Cd, hypoxie, stress thermique) afin de tester leur potentiel en tant que biomarqueurs. Pour cela, les mesures communes réalisées dans l'ensemble des expérimentations (toutes les mesures sauf les réserves énergétiques) ont été utilisées pour la construction de nouvelles ACP. Les expérimentations ont été réalisées à trois périodes différentes (novembre 2018, 2019 et juin 2019). De ce fait, le facteur « période » a été directement masqué pour voir une éventuelle variation des réponses en fonction de la nature du stress environnemental auquel sont soumises les dreissènes.

Les marqueurs ont encore une fois été séparés entre les deux groupes suivants :

(a) les marqueurs « T0 stables » présentant à la fois des niveaux similaires après la période d'acclimatation (T0) entre les différentes expositions et une aptitude à témoigner de l'exposition au stress identifiée lors des deux expositions au Cd ou lors de l'expérimentation hypoxie/thermie : la CEA et l'expression relative des gènes *ampk*, *cs*, et *atp*. Les réserves n'ont pas été mesurées à l'issue de l'exposition au stress thermique et hypoxique, le glycogène n'est donc pas pris en compte dans cette partie de l'analyse.

(b) les marqueurs « T0 saisonniers » présentant des niveaux similaires à ceux du suivi saisonnier (aucune différence significative entre les valeurs mesurées lors du suivi saisonnier et celles mesurées aux différents T0 aux mêmes périodes) : les activités CS, ETS et LDH et l'expression relative des gènes *ldh* et *aox*.

L'ACP construite avec les marqueurs « T0 stables » et le cercle des corrélations associé sont présentés dans les figures 37 A et B. Sur le plan de l'analyse (Figure 37A), l'axe primaire est principalement caractérisé par l'expression relative des gènes *atp* et *cs*. Ces deux marqueurs permettent de discriminer principalement les différentes conditions d'exposition,

avec toujours une expression relative plus élevée mesurée chez les dreissènes témoins par rapports à celles mesurées chez les organismes exposés aux stress Cd et hypoxie. Les réponses des dreissènes exposées au stress thermique présentent également un point de prélèvement (24 heures) caractérisé par une augmentation de l'expression des mêmes gènes *atp* et *cs*. Dans la publication n°2, il a, en effet, été observé que suite à une courte exposition à 25 °C (24 heures), la plupart des expressions géniques étaient augmentées par rapport aux témoins.

Il faut noter que, lors de l'ensemble des expositions, deux points de prélèvement ont été réalisés. Cependant, les données provenant de l'ensemble des conditions « exposées au Cd » peu importe la température ont été compilées pour la construction des modèles ACP. De ce fait, quatre points représentent les résultats mesurés chez les organismes exposés au Cd tandis que seuls deux points représentent ceux exposés à l'hypoxie et à 25 °C. La représentation par ellipse n'a donc pas été possible pour les réponses des organismes exposés au stress hypoxique et thermique.

Concernant le groupe de marqueurs « T0 saisonniers » (Figure 37C et D), les conditions sont superposées dans l'espace comme observé précédemment pour les expositions au Cd seules, limitant la capacité de ces marqueurs à mettre statistiquement en évidence l'exposition à un stress (Figure 37C). Le cercle des corrélations associé montre un faible rôle des marqueurs (vecteur très courts) dans la discrimination des conditions (Figure 37D).

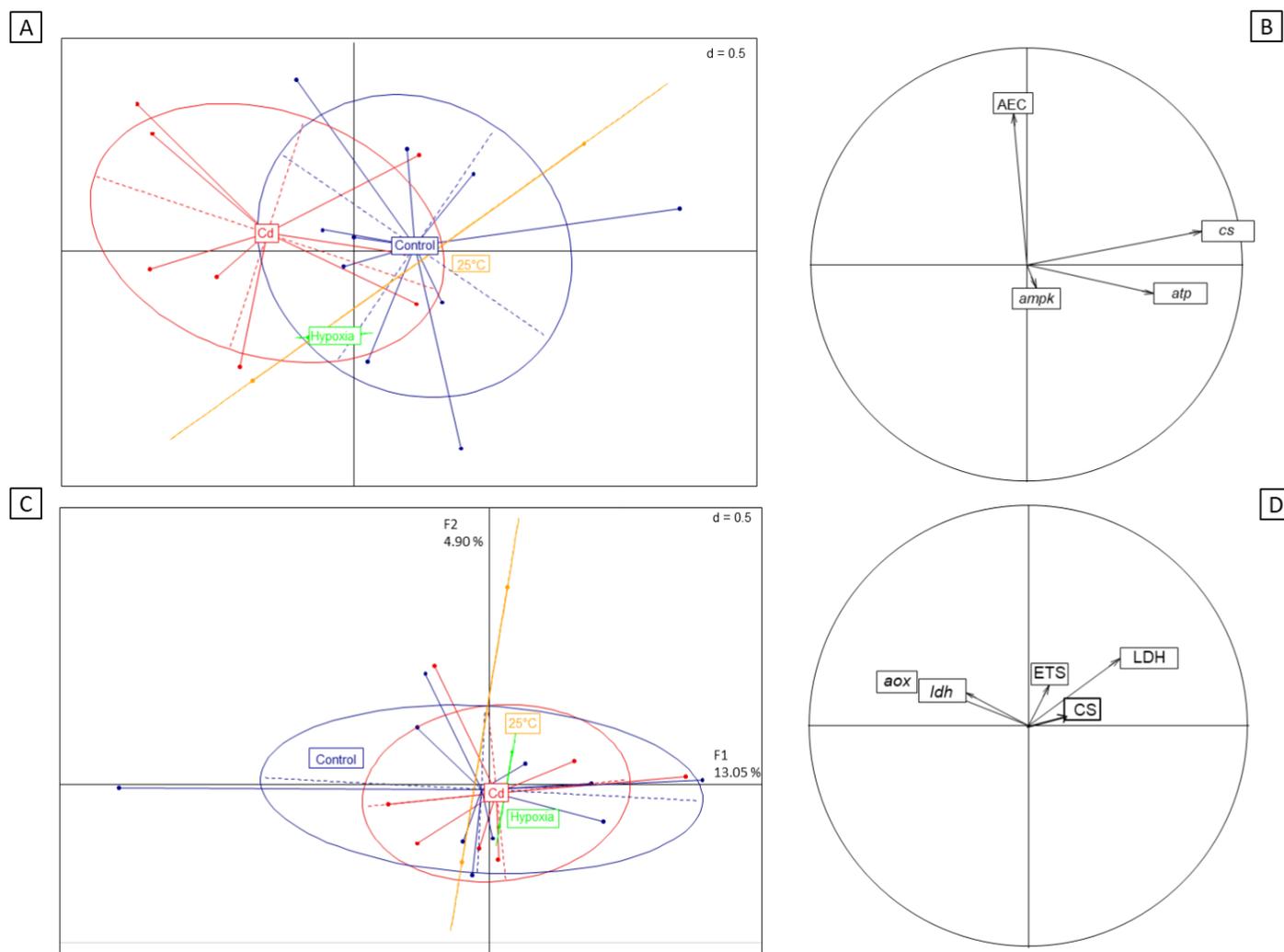


Figure 37. ACP représentant la variabilité des réponses des marqueurs en condition contrôlée de laboratoire chez les organismes témoins (Control, noir), exposés au Cd (Cd, rouge), à l'hypoxie (Hypoxia, vert) et à 25°C (orange) chez *D. polymorpha* toutes expérimentations confondues en masquant l'effet de la période. Les marqueurs « T0 stables » et « T0 saisonniers » sont illustrés respectivement dans les diagrammes A et C avec leur cercle des corrélations associés (B et D).

3. Conclusion sur l'intégration des données issues des expérimentations réalisées en conditions contrôlées de laboratoire

Les marqueurs présentant des niveaux similaires après la phase d'acclimatation quelle que soit la période d'exposition, ceux du groupe « T0 stables », ont montré une aptitude à témoigner de l'apparition d'une variation de réponse suite à une exposition à un stress permettant de discriminer les conditions expérimentales réalisées dans ces travaux que l'on prenne ou non en compte la période d'expérimentation. Ce groupe de marqueurs comprend : la CEA, l'expression relative des gènes *ampk*, *cs* et *atp* et la concentration en glycogène.

Le groupe « T0 saisonniers », qui concerne les marqueurs dont les réponses mesurées chez les dreissènes à T0 en laboratoire sont similaires aux réponses mesurées à la même période *in situ*, comprend les activités CS, ETS et LDH, et l'expression relative des gènes *ldh* et *aox*. Ce groupe n'a pas permis de discriminer, à travers les diverses ACP réalisées, les différentes conditions d'exposition auxquelles ont été exposées les dreissènes au laboratoire.

Le troisième groupe, comprenant la concentration en IMP, l'activité COX et l'expression relative des gènes *ampd*, *cox* et *sdh*, correspond à ceux présentant des niveaux de réponses variables entre les T0 des différentes expérimentations et dont les valeurs moyennes à T0 sont différentes des réponses mesurées lors du suivi saisonnier à la même période. De ce fait, l'interprétation de ces marqueurs peut être biaisée en conditions contrôlées de laboratoire. L'expression relative *sdh* a été proposée comme marqueur permettant la discrimination des deux expérimentations d'exposition au stress métallique et thermique dans la publication n°3. Néanmoins, d'après les réponses observées à travers cette première approche d'intégration, la différence de réponse entre les deux mois d'expérimentation (novembre 2018 et juin 2019) peut être principalement associée à un effet laboratoire suite au transport et au changement de milieu. Dans la publication n°3, nous avons conclu que l'expression relative *sdh* n'était pas influencée par la période d'expérimentation. Pourtant, ici, une différence significative entre les réponses mesurées aux différents T0 a été observée. L'expression relative *sdh* a donc varié entre la phase d'acclimatation (T0) et 24 heures après le lancement de l'exposition (réponses mesurées chez les dreissènes contrôles). Les réponses de ce marqueur observées dans la publication n°3 ont donc été influencées par les conditions de laboratoire.

À ce stade de l'intégration des données, nous avons donc regardé la capacité des deux groupes de marqueurs « T0 stables » et « T0 saisonniers » à discriminer les différentes conditions expérimentales. Les marqueurs du groupe « T0 stables » (T0 similaires entre les différentes expérimentations) semblent être de potentiels bon candidats dans une perspective de biosurveillance. Dans un contexte de biosurveillance, il est nécessaire que les marqueurs ciblés soient capables de montrer des variations de leur réponse *in situ* lorsque les populations sont soumises à des stress d'origine anthropique ou naturelle.

4. Comportement des marqueurs en conditions naturelles

Lors du suivi saisonnier, un schéma de variation temporelle des marqueurs du métabolisme énergétique a été mis en évidence chez la population de *D. polymorpha* étudiée dans le milieu naturel. Trois phases ont notamment été décrites (Chapitre 3, Publication n°1) :

- de mai à août 2018, l'activité globale du métabolisme énergétique était plus forte par rapport aux mois suivants.
- de septembre à novembre 2018, les marqueurs liés à la phosphorylation oxydative ainsi que ceux des réserves énergétiques ont diminué (après la reproduction) tandis qu'une augmentation de la concentration en nucléotides énergétiques et de l'expression relative des gènes citrate synthase (*cs*) et AMP kinase (*ampk*) a été observée ;
- de mars à juin 2019, les valeurs de la charge énergétique en adénylates ont fortement diminué par rapport à novembre. Cette diminution s'accompagne d'une baisse de l'activité COX et d'une augmentation de la peroxydation lipidique et de l'apoptose, suggérant que les dreissènes ont potentiellement subi un stress lors de cette période.

Dans cette dernière partie d'intégration des réponses, de nouvelles ACP ont été construites afin de voir si, en fonction du groupe de marqueurs considéré, l'analyse statistique appuyait ce schéma de réponses temporelles. Pour ce faire, des modèles d'ACP simples ont été utilisés sur l'ensemble des réponses du suivi saisonnier pour chacun des deux groupes de marqueurs, « T0 stables » et « T0 saisonniers ». La figure 38A présente les résultats de cette ACP pour les marqueurs « T0 stables » en laboratoire ayant des niveaux similaires entre les différents T0 au laboratoire. Sur le plan de l'analyse, on retrouve trois ensembles (Figure 38A et B), regroupant :

- les mois de mai à Aout 2018, caractérisés par un niveau d'expression relative du gène *atp* et des valeurs de CEA élevés.
- les mois de septembre et novembre 2018, caractérisés par un niveau d'expression relative des gènes *ampk* et *cs* élevé.
- les mois d'avril à juin 2019, caractérisés par une baisse des valeurs de CEA.

Ces observations sont cohérentes avec celles obtenues lors du suivi saisonnier et décrites dans la publication n°1.

Sur la seconde ACP construite à partir des marqueurs « T0 saisonniers », différents ensembles sont cette fois observés pour :

- les mois de juillet et août 2018, caractérisés par une faible activité ETS et LDH.
- les mois de mai, novembre et septembre 2018, caractérisés par un niveau d'expression relative des gènes *aox* et *ldh* élevé.
- les mois de juin 2018 ainsi que d'avril à juin 2019, caractérisés par une activité ETS et LDH élevée.

Pour ce groupe de marqueurs (« T0 saisonniers »), les regroupements de mois ne correspondent pas aux phases décrites précédemment (Figure 38C-D).

Cette dernière analyse montre que seuls les marqueurs présentant des valeurs mesurées similaires après la phase d'acclimatation quelle que soit la période (« T0 stables ») semblent pertinents pour mettre en évidence une variation de réponse lors d'une exposition à un changement de milieu chez *D. polymorpha*.

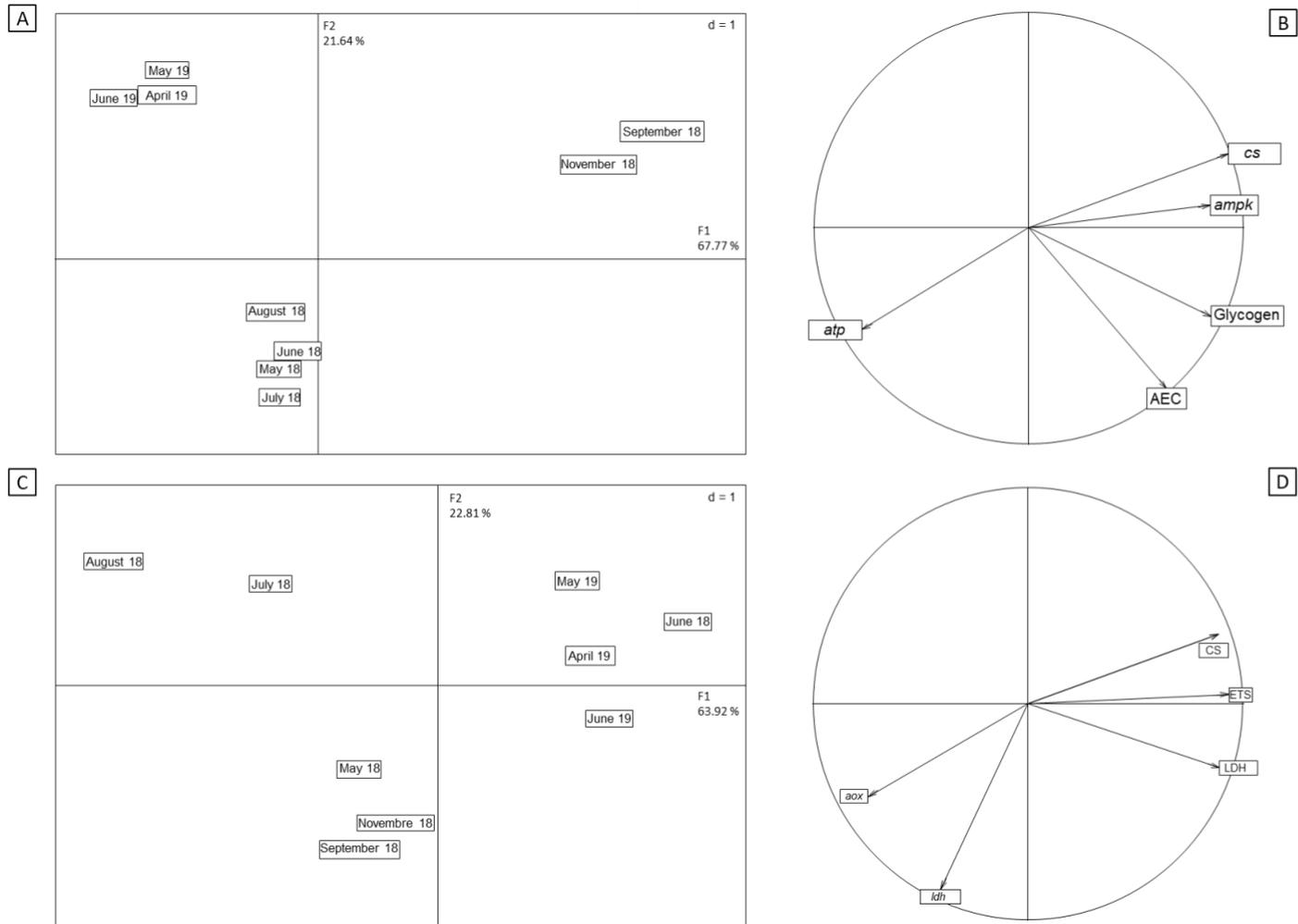


Figure 38. ACP représentant la variabilité des réponses des marqueurs mesurés lors du suivi saisonnier chez *D. polymorpha*. Les marqueurs « T0 stables » et « T0 saisonniers » sont illustrés respectivement dans les diagrammes A et C avec leur cercle des corrélations associés (B et D).

III. Discussion sur l'intégration des données dans une perspective de biosurveillance

La multiplication des marqueurs dans les études écotoxicologiques est devenue une pratique courante afin de cibler un maximum de processus physiologiques chez les organismes étudiés. Comme l'ont confirmé les observations réalisées dans ce travail, les marqueurs sont plus ou moins influencés par les facteurs intrinsèques des organismes en conditions contrôlées de laboratoire. Certains marqueurs présentent des niveaux semblables entre les différentes saisons après 15 jours d'acclimatation au laboratoire, tandis que d'autres présentent des valeurs moyennes similaires à celles mesurées lors du suivi saisonnier à la même période. La phase d'acclimatation permet aux organismes d'éliminer en partie les contaminants accumulés dans le milieu naturel, de se rétablir après le stress de la collecte et du transport et de s'habituer aux conditions de laboratoire, notamment au changement de milieu.

Nous avons observé que seuls les marqueurs présentant un niveau similaire entre les différents T0 (que nous avons nommés « T0 stables ») permettaient de détecter une variation de leur réponse lorsque *D. polymorpha* était exposée, que ce soit en conditions contrôlées de laboratoire ou dans le milieu naturel, à un stress. Ces marqueurs sont les suivants : l'expression relative des gènes *ampk*, *cs* et *atp*, la charge énergétique en adénylates ainsi que les réserves énergétiques (glycogène). Parmi ces marqueurs les expressions relatives des gènes *cs* et *atp* se sont avérées plusieurs fois, au cours des différents travaux menés ici, pouvoir être proposées comme des biomarqueurs potentiels dans une perspective de biosurveillance. En effet, le suivi saisonnier a montré que la réponse de ces marqueurs n'était pas influencée par les variations des paramètres physico-chimiques au cours de l'année. Il faut noter que lors des différentes expositions au stress métallique réalisées au laboratoire (novembre 2018 et juin 2019), l'expression relative des gènes *atp* et *cs* n'a pas été influencée par la période d'exposition. Dans ce sens, ils ne sembleraient pas être affectés par les facteurs confondants intrinsèques à l'organisme et de surcroît, pourraient être de bons biomarqueurs potentiels pour leur utilisation au laboratoire comme dans un contexte de biosurveillance *in situ*.

D'après les résultats du suivi saisonnier, les réserves énergétiques et la CEA ont montré de fortes variations en fonction de la saison, avec une augmentation des réserves avant la saison de reproduction et une augmentation de la concentration en nucléotides énergétiques en période hivernale (Publication n°1). Néanmoins on a pu noter que la CEA reste stable sur une grande partie du cycle annuel avant de chuter fortement entre novembre 2018 et avril 2019. L'utilisation de ce marqueur en biosurveillance a déjà été critiquée (Le gal et al., 1997). En effet, il a été montré qu'une diminution significative de la CEA pouvait apparaître lorsque les organismes étaient placés dans des conditions sub-létales mais aussi en conditions physiologiques optimales. Cependant, ici, la CEA permet de discriminer les conditions (Témoin, Cd, hypoxie et stress thermique) lorsqu'elle est couplée avec d'autres marqueurs du métabolisme énergétique notamment la concentration en glycogène et l'expression relative des gènes codant pour l'ATP synthase et la citrate synthase. Concernant le glycogène, il représente la principale source d'énergie libre chez les invertébrés. La concentration en glycogène mesurée chez un organisme représente donc une indication pertinente de son état de santé général (Anacleto et al., 2013 ; Andrade et al., 2017 ; Cordeiro et al., 2016, 2017). Enfin, les marqueurs de la PHOSOX, notamment l'expression relative du gène *atp*, sont également soumis aux fluctuations saisonnières et leur niveau peut varier selon la contamination des milieux. En effet, chez la dreissène, une diminution de l'expression relative du gène *atp* a été observée sur des sites considérés comme les plus contaminés, par rapport aux sites moins pollués (Kerambrun et al., 2016).

D'un autre côté, les marqueurs que nous avons nommés « T0 variables » qui présentent des niveaux de réponse similaires à ceux mesurés lors du suivi saisonnier aux mêmes périodes, n'ont pas permis de distinguer les différents groupes expérimentaux lors des expositions réalisées au laboratoire. Les activités enzymatiques (CS, ETS et LDH) ainsi que les expressions géniques *ldh* et *aox* font partie de ce groupe de marqueurs. Malgré cette tendance générale, les différents cercles de corrélations associés aux ACP ont montré que l'activité LDH reste le marqueur le plus discriminant de ce groupe. Cette enzyme a déjà été proposée comme bon indicateur de stress chez *D. polymorpha* lorsqu'elle est mesurée individuellement et hors période de reproduction (Potet, 2017). Cependant, dans l'ensemble des travaux de thèse réalisés dans notre contexte, aucune variation significative de l'activité LDH n'a été décelée à l'issue des différentes expositions.

On peut noter que les marqueurs du groupe « T0 stables » sont tous liés directement à la gestion de l'ATP. Bien que l'expression des gènes ne puisse être extrapolée au niveau

enzymatique, l'activation des voies de signalisation est la première réponse des organismes lorsqu'ils sont soumis à un stress (Vihervaara et al., 2018). En juin 2019, les valeurs de CEA mesurées chez les dreissènes lors du suivi saisonnier étaient significativement plus faibles que celles mesurées suite à la phase d'acclimatation au laboratoire à la même période. Il se peut que ces conditions d'acclimatation soient favorables aux organismes leur permettant de maintenir leur balance énergétique. Néanmoins, il se peut également que l'augmentation de la CEA soit une réponse au stress subi par les dreissènes bien qu'aucune variation de l'activité PHOSOX n'ait été observée. Le fragile équilibre entre la production et la consommation de l'ATP ne peut être décrit ici car l'activité ATP synthase n'a pas été suivie. Néanmoins, on peut supposer que la régulation transcriptionnelle des gènes *cs* et *atp* soit directement ou indirectement associée au maintien de la CEA. Le deuxième groupe de marqueurs « T0 saisonniers » comprend la plupart des activités enzymatiques mesurées dans nos travaux (CS, ETS et LDH) et aucun de ces marqueurs n'a permis d'observer une variation de sa réponse en conditions de stress. Entre les deux groupes, il faut noter que l'expression du gène *cs* (« T0 stables ») et l'activité CS (« T0 saisonniers ») présentent deux profils de réponse opposés. En effet, il a été observé que lorsque l'expression relative du gène *cs* augmentait, l'activité CS diminuait, suggérant ainsi des niveaux de régulation indépendants entre les deux marqueurs. D'après les résultats observés ici, le niveau transcriptionnel semblerait plus sensible que le niveau enzymatique puisque l'ensemble des activités mesurées dans ces travaux n'ont pas permis d'observer une variation de leur réponse lorsque les organismes étaient soumis à un stress. Les expressions relatives des gènes *aox* et *ldh* font partie du second groupe de marqueurs (« T0 saisonniers ») et ne montrent aucune variation de réponse en conditions de stress. Le métabolisme anaérobie est associé à une réponse au stress chez les animaux traduisant, en général, un déficit de la capacité aérobie (Falfushynska et al., 2014). Dans les études écotoxicologiques, les marqueurs de stress et de dommages cellulaires sont les plus fréquemment utilisés. L'activité ETS est un marqueur du métabolisme énergétique également couramment retrouvé (Fanslow et al., 2001 ; Louis et al., 2019 ; Potet et al., 2016, 2018). Cependant, dans notre contexte, l'ETS ne semble pas représentatif de l'état de santé des organismes. Cette première approche d'intégration des réponses nous a permis de voir que certains marqueurs du métabolisme énergétique, comme la CEA, pourtant plus rarement utilisée, présentent un bon potentiel de biomarqueurs dans une perspective de biosurveillance.

Bien que les outils statistiques soient en évolution constante, l'interprétation simultanée d'une multitude de marqueurs reste délicate. Lorsque tous les marqueurs ont été

pris en compte pour la construction du modèle PLS-DA suite aux deux expositions au Cd, le facteur « période » représentait 92 % de la variance du jeu de données, rendant ainsi difficile l'observation d'un effet de la contamination. Les facteurs confondants influençant les marqueurs physiologiques et limitant l'interprétation des réponses doivent nécessairement être pris en compte (Faria et al., 2014 ; Minguez et al., 2009 ; Pain-Devin et al., 2014 ; Potet, 2017 ; Viarengo et al., 2007). Néanmoins, la saisonnalité et le cycle de reproduction ne sont pas les seuls facteurs risquant de biaiser cette interprétation. La disponibilité en nourriture, les modifications de l'habitat (la variation de la hauteur d'eau par exemple), la prédation ou encore le parasitisme sont tout autant considérés comme des facteurs confondants. De plus, ces facteurs peuvent également interagir entre eux. Il a par exemple été montré que la prévalence de certains parasites chez *D. polymorpha* était dépendante de la saison (Minguez et Giambérini, 2012).

Les travaux réalisés dans ce chapitre permettent néanmoins de réaliser une première approche dans la caractérisation de nouveaux biomarqueurs. L'utilisation des modèles ACP within/between a permis de s'affranchir d'un de ces effets confondants, la période à laquelle ont été menées les différentes expérimentations, et d'interpréter plus solidement les effets des stress appliqués en laboratoire afin d'affiner l'interprétation des résultats (Artigas et al., 2012). Nous avons observé que justement, seuls les marqueurs capables de revenir à un état basal constant en laboratoire quelle que soit la période d'expérimentation (« T0 stables ») ont mis en évidence la présence d'un stress. Cette première approche dévoile aussi certaines perspectives quant à l'intérêt du métabolisme énergétique pour le développement de biomarqueurs. En effet, le métabolisme énergétique est pertinent à l'échelle de l'organisme puisqu'il est directement lié à sa fitness (Barrick et al., 2016 ; Durou et al., 2007) et certains marqueurs ciblés ici ont permis de mettre en évidence des perturbations du métabolisme énergétique à la fois en conditions contrôlées de laboratoire et *in situ*. Parmi ces marqueurs « T0 stables », nous trouvons : la CEA, la concentration en glycogène et l'expression relative des gènes *ampk*, *cs* et *atp*.

Enfin, de nombreuses étapes sont encore à franchir avant de pouvoir appeler un de ces marqueurs « biomarqueurs » ou encore « core biomarkers ». Les « core biomarkers » représentent des biomarqueurs pour lesquels de nombreuses données sont disponibles avec notamment des niveaux de référence ainsi que des limites de réponse reflétant un état sub-létal des organismes (Davies et Vethaak, 2012). En général, l'effet des facteurs confondants

sur les réponses des « core biomarkers » sont bien connus et l'interprétation de leur réponse est bien maîtrisée.

Les travaux réalisés ici se sont focalisés sur une seule population de *D. polymorpha*, un seul site et l'ensemble des expérimentations a été réalisé au sein d'un seul laboratoire. De nouvelles expérimentations dans différents laboratoires avec l'utilisation de protocoles identiques, ou même *in situ* dans des sites contrastés, à différentes périodes de l'année pourraient permettre de vérifier si les groupes de marqueurs distingués ici sont liés à un effet « laboratoire » ou au comportement propre des marqueurs.

Chapitre 6.

Discussion Générale, Conclusion et Perspectives

L'environnement et sa préservation constituent aujourd'hui une préoccupation majeure au sein de notre société. En Europe, la Directive Cadre sur l'Eau (DCE), concernant l'ensemble des masses d'eau continentales, appelle au développement de nouveaux marqueurs précoces et intégrateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques. Le métabolisme énergétique permet aux organismes vivants d'assurer l'ensemble des fonctions physiologiques et joue ainsi un rôle clé pour la survie des individus et le devenir des populations. Il peut en ce sens être une source pertinente pour développer des outils d'intérêt en biosurveillance.

L'objectif de cette thèse était donc d'approfondir les connaissances sur le fonctionnement du métabolisme énergétique cellulaire chez la moule d'eau douce, *Dreissena polymorpha*. Un ensemble de marqueurs des grandes voies du métabolisme énergétique a été étudié chez une même population de dreissènes. Une première approche de suivi passif *in situ* a été menée afin de caractériser les réponses des organismes dans leur environnement naturel, en intégrant les fluctuations saisonnières. Des expérimentations en laboratoire ont également permis d'approfondir les connaissances concernant la gestion de l'énergie cellulaire et les différentes stratégies mises en place en conditions de stress divers chez *D. polymorpha*.

1. La charge énergétique en adénylates, un outil pertinent

Le métabolisme énergétique regroupe l'ensemble des réactions biochimiques associées à la production, à la consommation et à la régulation de l'énergie libre sous forme d'ATP. Au sein d'une cellule, toutes les réactions nécessitent un apport plus ou moins coûteux en énergie. De ce fait, le maintien de l'homéostasie cellulaire et de l'équilibre entre la production et la consommation d'énergie sont essentiels à la bonne santé des organismes. Les stress de toutes natures auxquels sont exposés les êtres vivants peuvent affecter considérablement cet équilibre. Cependant, jusqu'à récemment, peu d'études expérimentales se sont concentrées sur la réponse du métabolisme énergétique face aux stress chez les espèces sentinelles utilisées en écotoxicologie, notamment chez les invertébrés d'eau douce. L'équilibre énergétique peut être considéré comme un facteur clé pour la détermination des limites de tolérance d'un animal face au stress. La perturbation de cet équilibre peut avoir des conséquences aux niveaux populationnel et écosystémique, si elle entraîne des risques pour la survie et la reproduction des individus (Sokolova et al., 2012).

La recherche de nouveaux biomarqueurs associés au métabolisme énergétique nécessite tout d'abord l'approfondissement des connaissances sur le fonctionnement de ce dernier. Cette première étape a ici été réalisée à travers le suivi saisonnier d'une population de

dreissènes installée dans le canal de la Meuse à Commercy (Publication n°1). L'ensemble des informations acquises a permis de déterminer, en partie, l'évolution des marqueurs étudiés au cours d'un cycle de reproduction. Pour la plupart de ces marqueurs, les variations observées étaient semblables aux informations disponibles pour certains d'entre eux dans la littérature, avec notamment une augmentation de l'activité métabolique lors du développement des gamètes et de la ponte puis une diminution après la période de reproduction (Kerambrun et al., 2016 ; Navarro et al., 2013 ; Palais et al., 2011).

Les marqueurs du métabolisme énergétique tout comme les autres marqueurs ou biomarqueurs déjà utilisés en écotoxicologie sont souvent soumis à de fortes variations saisonnières (Amiard-Triquet, 2015; Kerambrun et al., 2016; Pain et al., 2007; Palais et al., 2011). Des corrélations positives ou négatives ont été montrées lors du suivi saisonnier entre les marqueurs étudiés et les principaux paramètres physico-chimiques du milieu (Publication n°1). Ce type de corrélations (positives ou négatives) a d'ores et déjà été montré entre l'apparition d'un stress oxydatif chez *D. polymorpha* et la concentration en minéraux, la disponibilité en oxygène, et le pH des milieux (Wojtal-Frankiewicz et al., 2017). Pendant les trois derniers mois du suivi saisonnier (avril à juin 2019), nous avons observé une chute considérable des valeurs de la CEA, lesquelles, étaient jusqu'alors restées stables tout au long de l'année (Publication n°1). La CEA est un marqueur utilisé depuis de nombreuses années (Le Gal et al., 1997) mais de plus en plus rarement dans les études écotoxicologiques. Il faut noter qu'il est difficile d'associer l'intensité du stress subi avec la capacité de survie des organismes à travers la seule valeur de CEA (Le gal et al., 1997). En effet, Marazza et al., (1996) ont montré qu'une diminution de la CEA indique une réaction de l'animal face au stress sans forcément remettre en cause la survie des organismes, tandis qu'une augmentation de la variabilité de cet indice dans une population peut refléter un dépassement des mécanismes de compensation chez une partie des individus, pouvant mener à de la mortalité. Cette augmentation de la variabilité, nous l'avons observée chez les dreissènes exposées au Cd en laboratoire en juin 2019, associée en parallèle à une augmentation des dommages cellulaires et des défenses anti-oxydantes (Publication n°3). Cependant, aucune mortalité ni variation des réponses des autres marqueurs du métabolisme énergétique n'a été observée lors de cette expérimentation. Il est donc difficile d'associer directement une valeur de CEA à un état physiologique précis. A l'issue de l'exposition aux stress thermique et hypoxique, les résultats ont été illustrés par la représentation graphique du ratio ATP:ADP en fonction de la CEA. Des courbes de tendance (puissance) ont été tracées et les pentes des courbes ont été utilisées pour décrire les résultats. Lors de l'exposition au stress thermique (Publication n°2),

les pentes étaient bien plus faibles chez les individus exposés que chez les individus témoins bien qu'aucune variation des valeurs de la CEA n'ait été observée. Cette méthode d'illustration des résultats a été utilisée par Sokolova et al. (2005) suite à une exposition de *C. virginica* au Cd et a permis d'observer une diminution du ratio ATP:ADP chez les organismes exposés au Cd par rapport aux contrôles sans qu'il n'y ait de variations de la valeur de la CEA. L'utilisation de la combinaison de ces deux indices semble donc intéressante pour l'évaluation de l'état de santé des individus. Néanmoins, la plupart des réponses étudiées restent stables ou présentent des amplitudes de variation modérées suite aux différentes expositions, ce qui nous amène à émettre une hypothèse sur la possible tolérance de cette espèce face aux différents stress testés dans les travaux de cette thèse.

2. *D. polymorpha*, une espèce adaptée au stress ?

Au cours des différents travaux réalisés ici, aucun effet du Cd n'a été observé sur les fonctions mitochondriales chez *D. polymorpha*. Une première hypothèse peut alors être proposée :

- ***D. polymorpha* est une espèce invasive dont les populations se sont adaptées aux pressions environnementales grâce au développement de mécanismes d'acclimatation et d'adaptation leur permettant de tolérer la présence de stress de différentes natures.**

Dans une étude récente réalisée chez *D. polymorpha* exposée au Cd, aucune variation de certains marqueurs du métabolisme énergétique, l'activité ETS et l'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction, n'a été observée (Louis et al., 2019). Dans ces travaux de thèse, le Cd a été choisi comme contaminant modèle du fait de sa forte toxicité, notamment sur les mitochondries, observée chez d'autres espèces aquatiques (Cherkasov et al., 2010, 2007; Ivanina et al., 2010; Sokolova and Lannig, 2008; Sokolova, 2004). Par soucis de réalisme environnemental, la concentration choisie était de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, ce qui représente une concentration relativement élevée mais qui peut être retrouvée dans le milieu naturel (Baudrimont et al., 1997). Le site de prélèvement a été choisi suite à différentes études réalisées sur cette population. Lors des projets précédents, les mesures de la contamination dans l'eau et dans les sédiments avaient montré une faible concentration en polluants

minéraux et organiques (Projet PolQua RT2E Rovaltain, 2016-2018). Bien que peu, voire aucune trace de Cd n'ait été mesurée dans l'eau au moment de notre étude (Publication n°1), il est possible que la population de dreissènes se soit progressivement adaptée à la pollution métallique lors du processus d'invasion. En effet, *D. polymorpha* est une espèce invasive arrivée dans le Nord-Est de la France il y a plus de 200 ans. Avec le temps et les générations, la sélection génétique a pu aboutir à une évolution de sa capacité de tolérance voire résistance aux métaux. L'adaptation aux métaux est bien connue chez les bivalves (McMahon, 2002 ; Milan et al., 2016). Lorsque les organismes sont pré-exposés dans leur existence à des contaminants et notamment aux métaux, ils sont capables d'augmenter leur tolérance à travers différents mécanismes. Dans la littérature, ce phénomène est appelé « tolérance induite » (Chelomin et al., 1998). Parmi les mécanismes impliqués dans cette tolérance, la régulation par les métallothionéines est reconnue pour son implication chez les organismes métallo-tolérants. mais d'un point de vue plus global, ce sont les mécanismes de défense anti-oxydante, de détoxification et de réparation des dommages cellulaires grâce à diverses protéases qui sont surexprimés chez ces organismes (Milan et al., 2016).

De par leur succès de colonisation, les espèces invasives peuvent être plus tolérantes aux polluants que les espèces autochtones. Il a déjà été montré que *D. polymorpha* possédait une capacité de détoxification plus importante que deux espèces de bivalves natives des cours d'eau de l'Ouest Européen : *Anodonta cygnea* et *Unio tumidus* (Contardo-Jara et al., 2014). *Dreissena polymorpha* est également plus tolérante que d'autres espèces invasives comme son espèce sœur *D. rostriformis bugensis* après une exposition au nickel (Potet et al., 2016, 2018). Au début de leur expansion, les espèces invasives présentent une faible diversité génétique (Bifulchi, 2007). Au cours du temps et des générations, cette variabilité génétique augmente ensuite dans les populations pouvant aboutir à une augmentation de leur potentiel adaptatif (Potet, 2017). La forte tolérance de *D. polymorpha* vis-à-vis de la contamination par rapport à d'autres espèces invasives arrivées depuis seulement quelques dizaines d'années dans les cours d'eau de France pourrait être expliquée par son histoire évolutive.

Cependant, face aux variations de paramètres abiotiques tels que la température, le taux d'oxygène ou encore le pH, *D. polymorpha* s'est avérée plus sensible que des espèces d'unionidés natives (Mc Mahon, 2002). Au cours des travaux réalisés ici, il a été observé que *D. polymorpha* était plus tolérante qu'attendu à l'hypoxie et moins tolérante au stress thermique par rapport aux résultats décrits dans la littérature (publication n°2). Il a déjà été montré que chez des espèces tolérantes à un type de stress, la sensibilité des individus peut être accrue lors de l'exposition à d'autres facteurs de stress tels que la température ou la

disponibilité en oxygène. Ainsi, Lannig et al. (2006) ont observé une sensibilité accrue à une augmentation de la température dans une population de *C. gigas* adaptée à la pollution.

Lorsque les organismes sont exposés à un stress auquel ils se sont acclimatés, les coûts énergétiques associés à la mise en place des mécanismes de défense peuvent engendrer un déficit énergétique lors d'un stress additionnel. Ce déficit peut, à terme, conduire au dépassement de leurs capacités de défense. Cependant, lorsque que les coûts énergétiques engagés dans une tolérance aboutissent à un désavantage sélectif de l'espèce, cette tolérance à un contaminant peut être perdue suite à l'absence d'exposition au contaminant en question (Mouneyrac et al., 2011). Cependant, bien qu'aucune trace de Cd n'ait été mesurée lors des travaux réalisés pendant la thèse, la population de *D. polymorpha* ciblée semble toujours posséder une certaine tolérance face à ce contaminant.

Depuis quelques années, les études se focalisent sur le rôle des mitochondries dans l'adaptation des espèces face à un stress. En effet, des études réalisées chez des organismes modèles tels que des mammifères terrestres et des insectes ont montré le rôle des mitochondries dans l'adaptation des organismes et dans leur tolérance aux stress (Sokolova, 2018). De récents travaux se concentrent sur l'influence du génotype mitochondrial sur les réponses des organismes en conditions naturelles ainsi que sur son rôle dans cette adaptation (Li et al., 2019; Ma et al., 2019). Il a été montré que des mutations au niveau de l'ADN mitochondrial influenceraient la capacité de tolérance chez les vertébrés et les invertébrés (Bettinazzi et al., 2019). Chez les humains, ces mutations seraient notamment impliquées dans la tolérance à la température ainsi que dans la vulnérabilité des individus face à certaines maladie (Mishmar et al., 2003; Taylor and Turnbull, 2005).

En présence d'un stress, il a également été montré que les mitochondries jouaient un rôle essentiel dans la signalisation cellulaire à travers la production de nombreuses molécules pouvant être utilisées comme substrats dans la régulation post-traductionnelle et ainsi favoriser ou à l'inverse inhiber la synthèse protéique (Naquet et al., 2016). De plus, il a également été montré que les mitochondries étaient impliquées dans l'immunité innée des mammifères à travers l'activation de certaines voies de signalisation (Monlun et al., 2017).

Les travaux réalisés dans cette thèse se sont focalisés sur une seule population d'une espèce de bivalve limitant ainsi toute conclusion quant à une adaptation liée aux fonctions mitochondriales. Néanmoins, la comparaison des réponses du métabolisme énergétique et notamment au niveau de la mitochondrie serait intéressante à réaliser entre différentes populations voire différentes espèces afin d'évaluer le rôle de cet organelle dans l'adaptation des espèces modèles en écotoxicologie et ainsi mieux comprendre l'impact des contaminants

sur ces espèces dans un cadre de biosurveillance. Cependant, les travaux réalisés au cours de ce travail doctoral nous ont permis d'observer chez la dreissène que l'ensemble des fonctions remplies par les mitochondries et notamment la production d'ATP font d'elles des organites soumis à une régulation complexe (Pan et al., 2017).

3. Le métabolisme énergétique cellulaire : un processus finement régulé

Le peu de variations des réponses que nous avons observées lors des expérimentations réalisées au laboratoire nous pousse également à poser une seconde hypothèse :

- **Le métabolisme énergétique est considéré comme intégrateur de l'état de santé des organismes. Sa régulation, essentielle à son bon fonctionnement, permet de compenser l'effet d'un stress à court terme et la mise en place de mécanismes de défense.**

Les organismes exposés à un stress sur un temps court sortent de leur fenêtre d'*optimum* vers un état dit « *pejus* » en employant divers mécanismes cellulaires, physiologiques ou comportementaux afin de réduire l'impact de ce stress. Au niveau cellulaire, le stress modéré induit un ensemble commun de réponses incluant la réparation de lésions à l'ADN et les dommages protéiques, l'apoptose, la dégradation des débris et un passage général de l'état de croissance cellulaire vers un état de réparation cellulaire (Kassahn et al., 2009). Au niveau de l'organisme, une augmentation de la consommation d'oxygène peut être également observée. De manière générale, les processus compensatoires au niveau cellulaire et de l'organisme entier sont coûteux énergétiquement et peuvent détourner le flux d'énergie destiné à la reproduction et la croissance vers la maintenance et le rétablissement de l'organisme (Sokolova et al., 2012). En effet, les coûts énergétiques pour la synthèse de protéines représentent de 5 à 10 % de la demande totale en ATP en conditions contrôlées et 30 à 40 % lors d'une exposition à des métaux lourds chez les bivalves (Cherkasov et al., 2006 ; Ivanina et al., 2008). Lors d'une exposition à un stress thermique, la régulation des processus de transcription est un des mécanismes principaux de compensation. Ainsi en condition de stress thermique, une surexpression de nombreux gènes impliqués dans l'ensemble des voies métaboliques a été observée (Falfushynska et al., 2014; Múgica et al., 2015; Yampolsky et al., 2014). D'après les résultats obtenus dans nos travaux, suite à l'exposition de *D. polymorpha* à

un stress thermique (Publication n°2), le panel de marqueurs suivis nous a permis de voir un potentiel dépassement des mécanismes de compensation après 7 jours d'exposition à 25°C. Les principales variations ont été observées au niveau de l'expression de gènes ainsi qu'au niveau du ratio ATP:ADP. D'un autre côté, lorsque les dreissènes ont été soumises à l'hypoxie, une diminution de la CEA a été observée après 24h sans qu'il n'y ait de variation dans le ratio ATP:ADP. Des stratégies différentes de gestion de l'énergie ont donc été mises en évidence à la fois selon la période du cycle de reproduction (Publication n°3) et selon le stress subi par les organismes. En effet, l'intégration de données réalisée à l'issue des expositions au Cd (Chapitre 5, Partie II) a permis d'observer des réponses inversées en fonction de la saison. Bien que deux marqueurs de la régulation de la balance énergétique aient été ciblés (expression relative des gènes *ampk* et *ampd*), les résultats issus de l'expression d'un gène ne peuvent être extrapolés à son activité notamment pour des gènes codant des protéines kinases, qui sont activées par leur phosphorylation. L'AMPk est considérée comme senseur métabolique essentiel pour l'ajustement précis des besoins et disponibilités énergétiques cellulaires (Chauhan et al., 2020). L'activité AMPk est principalement régulée par le ratio ATP:ADP. Une fois activée, cette enzyme inhibe la synthèse de protéines, d'acides gras et de glycogène afin d'augmenter la concentration d'ATP (Ke et al., 2018). L'étude de la phosphorylation de l'AMPk a été menée dans ce travail sur des échantillons issus de l'exposition au Cd en juin 2019. Cependant, seuls 3 réplicats par condition ont pu être utilisés, rendant ainsi l'interprétation des résultats délicate. Les anticorps anti-AMPk totale ou phosphorylée étant fonctionnels chez *D. polymorpha*, il serait intéressant par la suite d'approfondir l'approche par western-blotting et ainsi de confronter les résultats issus de l'expression génique et de l'activation de la protéine pour avoir une information de la régulation au niveau des transcrits ainsi qu'au niveau post-traductionnel.

La régulation fine de l'ensemble du métabolisme énergétique a pu potentiellement compenser l'effet premier du stress subi par les organismes. Des expérimentations plus longues pourraient permettre de mieux cerner le mécanisme d'action des stress de natures différentes sur la gestion du métabolisme énergétique et ainsi de mieux appréhender les risques associés à plus long terme. Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes focalisés principalement sur le fonctionnement du métabolisme énergétique cellulaire. Cependant, nous avons remarqué que le sens de variation des réponses n'était pas défini, c'est-à-dire qu'une réponse d'un marqueur peut aussi bien augmenter ou diminuer lors de l'exposition à un stress. En effet, bien qu'une diminution du ratio ATP:ADP ou de la CEA soit connue pour représenter un stress subi par les organismes, la mise en place de mécanismes de

compensation peut mener dans un premier temps à une augmentation des valeurs du ratio ATP:ADP et de la CEA, afin de maintenir l'équilibre de la balance énergétique.

Le métabolisme énergétique peut renseigner si les fonctions vitales, telles que la croissance, la reproduction et le maintien du métabolisme basal des organismes, sont affectées lors d'une exposition à un ou des stress (Durou et al., 2007). Son étude devrait alors permettre d'alerter sur les effets des différents stress qui pourraient affecter les populations et leur maintien (Barrick et al., 2016 ; Durou et al., 2007). L'utilisation des marqueurs du métabolisme énergétique dans les études écotoxicologiques pourrait augmenter leur pertinence écologique, mais il est tout de même nécessaire d'élargir le panel de marqueurs étudiés à plusieurs processus métaboliques, et à plusieurs niveaux d'organisation biologiques.

4. Intérêt d'une approche multi-marqueurs

Les études écotoxicologiques se tournent de plus en plus vers des approches multi-marqueurs. En plus d'élargir la variété de marqueurs choisis, les études augmentent également le nombre de niveaux d'organisation biologique investigués. L'intégration de marqueurs représentatifs de plusieurs niveaux d'organisation biologique doit permettre une meilleure compréhension de l'impact des polluants et de leur mode d'action (compréhension toxicologique et écologique) (Magni et al., 2017). A l'issue du suivi saisonnier, la chute des valeurs de CEA, de l'activité COX et des expressions de gènes *ampd* et *ampk* a permis d'émettre une hypothèse quant à la survenue d'un stress *in situ*. La mesure de la peroxydation lipidique et de l'activité caspase-3 a permis d'appuyer cette hypothèse. L'apport de marqueurs impliqués dans d'autres voies physiologiques et couramment utilisés dans les études écotoxicologiques, permet donc de mieux comprendre et interpréter les réponses mesurées. Cependant, plus les marqueurs suivis sont nombreux, plus l'interprétation de l'ensemble des réponses devient délicate. La nécessité de développer des indices intégrateurs devient alors indispensable.

Certains indices simples sont utilisés pour intégrer l'ensemble des réponses. Au niveau énergétique, certains d'entre eux sont utilisés en écotoxicologie chez *D. polymorpha* comme le *scope for growth* (allocation énergétique à la croissance et à la reproduction ; Louis et al., 2019 ; Smolders et al., 2004), l'allocation énergétique cellulaire (Smolders et al., 2004), ainsi que la charge énergétique en adénylates qui a été utilisée ici. Ces indices sont basés sur des mesures réalisées à petites échelles à travers des marqueurs suivis au niveau individuel (*e.g* la respiration des organismes). A plus grande échelle, des modèles bioénergétiques ont été

développés tels que le *Dynamic Energy Budget* (DEB) proposé par Kooijman (2010) dont l'une des applications est le modèle DEBtox (Jager, 2020). Ce modèle a été utilisé pour lier l'allocation énergétique à la croissance démographique et incorporer des variables environnementales telles que les polluants, la disponibilité alimentaire ou encore le stress thermique (Van Haren et al., 1994 ; Pouvreau et al. 2006 ; Kooijman et al., 2009 ; Einarsson et al., 2011). Ces modèles sont extrêmement utiles dans la prédiction des effets aux niveaux populationnel et écologique suite à des perturbations environnementales. Cependant, ils exigent un paramétrage extensif qui demande à la fois du temps et une connaissance précise des réponses de l'organisme étudié (Van Haren et Kooijman, 1993 ; van Haren et al., 1994 ; Bacher et Gangnery, 2006 ; Kooijman et al., 2009 ; Sarà et al., 2012).

Depuis plusieurs années, de nouveaux outils statistiques intégrateurs apparaissent notamment sous la forme d'indices globaux comme l' *Integrated Biomarker Response* (IBR ; Devin et al., 2014) ou encore le *Weight of Evidence* (WOE ; Barjhoux et al., 2018; Piva et al., 2011). L'IBR est l'outil qui, à ce jour, reste le plus utilisé dans l'intégration des réponses de biomarqueurs en écotoxicologie. Cet outil fournit à la fois une représentation graphique synthétique des différentes réponses de biomarqueurs choisis ainsi qu'une valeur numérique propre regroupant l'ensemble des réponses. De ce fait, l'interprétation des différentes valeurs d'IBR est simplifiée pour comparer les réponses des différents marqueurs mais aussi pour les interpréter au regard des conditions du milieu environnemental (Devin et al., 2014). D'après Devin et al. (2014), le nombre maximum de biomarqueurs intégrables dans l'indice est de huit. Il est souvent délicat de déterminer, parmi toute une batterie de marqueurs, lesquels seraient les plus pertinents à intégrer dans les indices. Les résultats obtenus dans le chapitre 5 ont permis de dégager, sur un ensemble de vingt marqueurs, cinq marqueurs pertinents pouvant témoigner de l'exposition à un stress par une variation de leur réponse. L'ensemble des données acquises dans le cadre de cette thèse pourrait permettre, à l'aide de nouveaux suivis et expérimentations contrôlées, de développer des indices énergétiques plus poussés et riches en informations pour ensuite les intégrer, avec d'autres marqueurs généraux, dans des indices comme l'IBR ou une approche de WOE. L'utilisation d'une approche multi-marqueurs énergétiques couplée à des marqueurs d'autres processus clés de la physiologie des organismes (défense, intégrité cellulaire...) pourrait permettre de proposer un indice complet et pertinent. De plus, la prise en compte de certains marqueurs relatifs à la croissance ou la reproduction comme réalisé dans le modèle DEB, augmenterait probablement la pertinence écologique des études. En effet, l'établissement d'un nouvel indice basé sur plusieurs niveaux

d'organisation (moléculaire, cellulaire, individuel voire populationnel) pourrait aider au développement d'un AOP ou *Adverse Outcome Pathways* (Ankley et al., 2010).

5. Conclusion

L'ensemble des travaux réalisés dans cette thèse a permis de mieux comprendre et d'approfondir les connaissances sur le fonctionnement du métabolisme énergétique cellulaire chez l'espèce modèle *D. polymorpha*. Les réponses des marqueurs étudiés sont dépendantes de la période du cycle annuel, facteur confondant qui doit donc être pris en compte dans l'interprétation des réponses aussi bien en laboratoire que lors de campagnes de biosurveillance active ou passive réalisées *in situ*. Au laboratoire, différentes stratégies de gestion de l'énergie cellulaire ont été observées chez la dreissène lors de l'exposition au stress, en fonction de la période d'exposition ainsi que selon la nature du stress imposé.

L'ensemble des résultats acquis dans ces travaux a notamment permis de valider chez *D. polymorpha* la gestion des stocks énergétiques déjà connue et décrite dans la littérature (Palais et al., 2011). Lors du suivi saisonnier, la chute des valeurs de CEA et à la diminution de l'activité COX mesurées à partir d'avril 2019, nous ont permis d'émettre l'hypothèse de la présence d'un stress ayant pu affecter fortement les organismes. Les métabolismes aérobie et anaérobie ont montré des profils de réponses différents selon la saison avec des réponses plus élevées lors du développement et la ponte des gamètes. Cependant l'absence de variations nettes à l'issue des expositions réalisées au laboratoire nous montre, en plus d'une potentielle tolérance de *D. polymorpha* face au Cd, une importante et complexe régulation de l'activité mitochondriale au sein des organismes. En effet, malgré l'observation d'une forte variabilité interindividuelle lors des expositions réalisées au laboratoire, les valeurs de CEA restent stables. Suite à l'exposition des dreissènes à un stress thermique et hypoxique, il s'est avéré que la représentation graphique des résultats par la courbe du ratio ATP:ADP en fonction des valeurs de la CEA semblait être un meilleur indicateur de stress que les valeurs de CEA prises de façon isolée. L'expression des résultats peut modifier les conclusions proposées. En effet, Salin et al. (2018) ont montré que les résultats de mesures de l'efficacité mitochondriale peuvent être contradictoires selon la méthode de calcul de cette dernière, par le calcul du RCR (*Respiratory Control Ratio*) ou par le calcul du ratio ATP : O (production d'ATP en fonction de l'oxygène consommé). Ces deux indices sont les plus fréquemment utilisés dans les études sur le fonctionnement mitochondrial. Dans les travaux réalisés au cours de la thèse, ce genre d'approche n'a pu être mené. Néanmoins, à l'avenir, la mesure simultanée de la consommation d'oxygène et de la production d'ATP permettrait d'enrichir les connaissances acquises sur le fonctionnement du métabolisme énergétique chez cette espèce sentinelle. De

plus, l'optimisation d'une méthode d'isolation des mitochondries serait également pertinente pour l'étude du fonctionnement mitochondrial chez *D. polymorpha*.

Au cours de la thèse, une collaboration avec la plateforme PICT (INSERM, Reims), a permis de réaliser une première approche de cryofixation de tissus de bivalves pour des observations cytologiques réalisées au microscope électronique et pour le dosage des ions au sein des mitochondries. L'analyse de la structure des mitochondries de la glande digestive a révélé un accroissement de la fréquence et de l'intensité des atteintes mitochondriales chez les dreissènes exposées simultanément au Cd et à une température plus élevée, une présence accrue de corps mitochondriaux (indice de catabolisme) et des fluctuations variables des contenus ioniques de la matrice mitochondriale. Les résultats tout à fait préliminaires n'ont pas été présentés dans ce manuscrit mais l'approche fonctionnelle et structurale permettrait, dans de futurs travaux, de mieux comprendre le fonctionnement mitochondrial et ainsi de mieux appréhender les effets de l'exposition à des polluants sur ce compartiment cellulaire.

D. polymorpha est une espèce connue pour avoir une large fenêtre de tolérance face aux variations des paramètres environnementaux comme la température. Cependant, cette fenêtre de tolérance ne prend pas en compte la durée de l'exposition. D'après nos résultats, cet aspect temporel est essentiel à prendre en compte dans la description de ces fenêtres. En effet, après 7 jours à 25°C (stress thermique de +15°C), les mécanismes de compensation semblaient être dépassés traduisant une tolérance de courte durée de la dreissène face à une forte température. D'un autre côté, il a été observé que *D. polymorpha* était plus tolérante qu'attendu aux conditions hypoxiques. Pour ces deux expérimentations, l'intégration de l'ensemble des données acquises à travers un modèle PLS-DA nous a permis de souligner l'importance de ce facteur temps dans l'évaluation de la tolérance. Le suivi des réponses du métabolisme énergétique sur une période plus longue pourrait permettre de préciser le moment où les mécanismes de compensation deviennent dépassés par les conditions. Dans les travaux réalisés ici, seuls un stress thermique chaud et un stress hypoxique ont été étudiés. Néanmoins, l'étude des effets d'un stress thermique chaud et froid, et de stress hypoxique et hyperoxique sur les réponses métaboliques, sur des durées plus longues, pourraient permettre de préciser des fenêtres temporelles de tolérance en prenant en compte à la fois l'effet d'une variation positive et négative des paramètres testés.

L'intégration de l'ensemble des données a aussi permis d'observer différents profils de réponses entre les marqueurs suite à la période d'acclimatation en laboratoire (T0). Parmi ces marqueurs, ceux ayant des niveaux similaires entre les T0 indépendamment de la période ont permis à la fois, de distinguer les conditions témoins des conditions exposées au laboratoire et

de témoigner l'apparition d'un stress *in situ*. L'approfondissement des connaissances sur ces marqueurs à travers de nouvelles campagnes de suivi sur plusieurs populations pourrait permettre, à terme, de valider l'utilisation de ces marqueurs dans une perspective de biosurveillance.

Le Cd a été choisi dans ces travaux pour sa forte toxicité connue sur les mitochondries. Cependant la population de *D. polymorpha* étudiée s'est avérée peu sensible à ce contaminant et aucun effet net n'a été observé sur les marqueurs choisis. De plus, le métabolisme énergétique étant fondamental dans la survie des organismes, les mécanismes de régulation mis en place par les dreissènes ont pu également compenser l'effet du Cd. Dans le milieu naturel, les organismes sont constamment soumis à un cocktail de contaminants minéraux, organiques et/ou biologiques. Dans ce sens, il serait intéressant de se pencher vers des contaminants de natures différentes, comme par exemple, certains fongicides dont les mitochondries sont la cible (exemple des SDHI, inhibiteurs de la succinate déshydrogénase), et qui ont été utilisés massivement dans le traitement des zones agricoles, se retrouvant à terme dans le compartiment aquatique.

Les principaux résultats, hypothèses et perspectives issus des différents travaux réalisés sont résumés dans la figure 39 sous la forme d'un schéma synthétique (voir la légende de la figure pour les détails).

D'un point de vue plus général, l'approfondissement des connaissances sur le fonctionnement mitochondrial et les mécanismes d'action des polluants pourrait s'intégrer dans une problématique émergente reliant à la fois la santé environnementale et humaine que l'on regroupe sous le terme de « *one health* » (Probst et Laggoun, 2017). Dans un contexte de changement global, incluant le réchauffement climatique ou l'explosion démographique humaine et animale domestique, la compréhension des relations entre les santés humaines, animales et environnementales est un enjeu majeur de santé publique. Une meilleure compréhension des mécanismes d'action des contaminants sur la santé animale pourrait permettre une meilleure gestion des risques et ainsi limiter l'émergence de nouvelles zoonoses. L'exemple récent de la pandémie liée à la Covid-19 illustre la nécessité de développer de nouvelles démarches scientifiques intégratives reliant l'impact des contaminants sur la santé animale et la santé humaine.

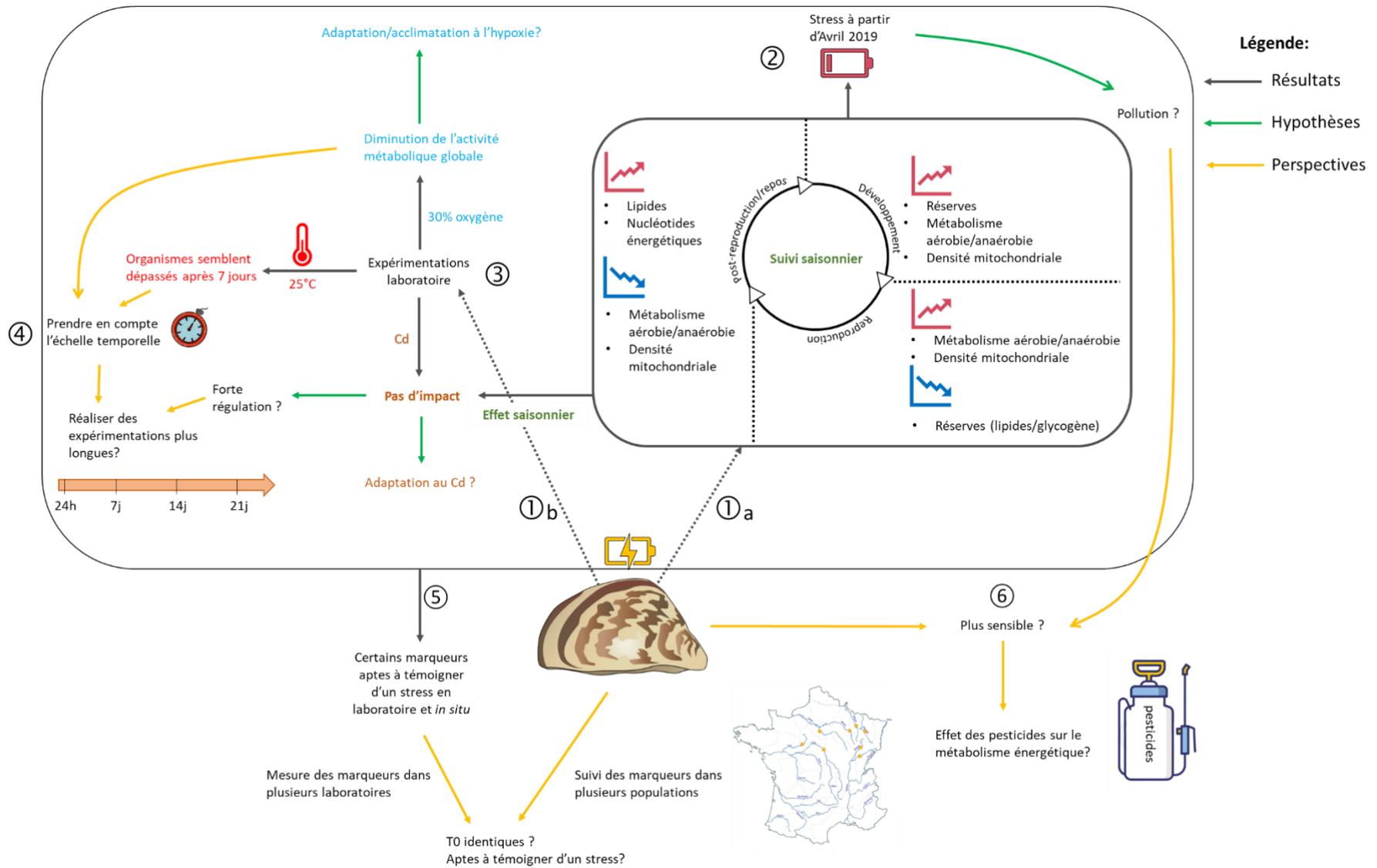


Figure 39. Schéma synthétique regroupant l'ensemble des travaux réalisés chez *D. polymorpha* au cours du travail de thèse. ①a. Les réponses du métabolisme énergétique ont été suivies lors d'un cycle saisonnier et, ①b lors de différentes expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire. ② A l'issue du suivi saisonnier, il a été observé que la population ciblée avait été exposée à un potentiel stress. ③ En parallèle, les réponses mesurées suite aux deux expositions au Cd (orange) réalisées à deux périodes du cycle de reproduction ont montré un effet période prépondérant et un impact négligeable du Cd sur le métabolisme énergétique conduisant à l'hypothèse d'une adaptation de la population face au stress métallique. Après l'exposition à un stress hypoxique (bleu) les individus semblaient être acclimatés à la limitation en oxygène tandis qu'après 7 jours d'exposition à 25 C (rouge), les dreissènes semblaient être dépassées. ④ La stabilité des fonctions mitochondriales montre une régulation fine et complexe du métabolisme énergétique, la prise en compte de l'échelle temporelle pour l'établissement des fenêtres de tolérance est donc nécessaire. A partir de l'ensemble des résultats obtenus, ⑤ certains marqueurs apparaîtraient prometteurs dans une perspective de biosurveillance. De nouvelles campagnes de prélèvement sur différents sites permettraient d'affirmer ce potentiel de biomarqueurs ainsi que ⑥ d'évaluer la sensibilité de *D. polymorpha* face à d'autres stress. Les flèches grises, vertes et jaunes indiquent respectivement les résultats obtenus, les hypothèses émises et les perspectives issus de ces travaux.

Références bibliographiques

A

- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *Journal of Experimental Biology* 205, 1831–1841.
- Ackerman, A.S., Toon, O.B., Hobbs, P.V., 1994. Reassessing the dependence of cloud condensation nucleus concentration on formation rate. *Nature* 367, 445–447. <https://doi.org/10.1038/367445a0>
- Adeva-Andany, M.M., Carneiro-Freire, N., Seco-Filgueira, M., Fernández-Fernández, C., Mouriño-Bayolo, D., 2019. Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion* 46, 73–90.
- Aldridge, D.W., Payne, B.S., Miller, A.C., 1995. Oxygen consumption, nitrogenous excretion, and filtration rates of *Dreissena polymorpha* at acclimation temperatures between 20 and 32 °C. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 1761–1767. <https://doi.org/10.1139/f95-768>
- Alexander Jr, J.E., McMahon, R.F., 2004. Respiratory response to temperature and hypoxia in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 137, 425–434. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2003.11.003>
- Alexander Jr., J.E., Thorp, J.H., Fell, R.D., 1994. Turbidity and Temperature Effects on Oxygen Consumption in the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 179–184. <https://doi.org/10.1139/f94-020>
- Allen, S.K., Downing, S.L., 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 102, 197–208. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90176-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90176-0)
- Alonso, A., Camargo, J.A., 2003. Short-Term Toxicity of Ammonia, Nitrite, and Nitrate to the Aquatic Snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70, 1006–1012. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0082-5>
- Altieri, A.H., Gedan, K.B., 2015. Climate change and dead zones. *Glob Change Biol* 21, 1395–1406. <https://doi.org/10.1111/gcb.12754>

- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., 2008. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier.
- Amiard-Triquet, C., 2015. How to Improve Toxicity Assessment? From Single-Species Tests to Mesocosms and Field Studies, in: *Aquatic Ecotoxicology*. Elsevier, pp. 127–151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00006-1>
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Rainbow, P.S., 2012. *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*. CRC Press.
- Anacleto, P., Maulvault, A.L., Barrento, S., Mendes, R., Nunes, M.L., Rosa, R., Marques, A., 2013. Physiological responses to depuration and transport of native and exotic clams at different temperatures. *Aquaculture* 408–409, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.035>
- Andrade, J.T.M., Cordeiro, N.I.S., Montessor, L.C., Luz, D.M.R., Luz, R.C.R., Martinez, C.B., Pinheiro, J., Paglia, A.P., Vidigal, T.H.D.A., 2017. Effect of temperature on behavior, glycogen content, and mortality in *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae). *J Limnol* 77. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1658>
- André, C., Gagné, F., 2017. Cumulative effects of ibuprofen and air emersion in zebra mussels *Dreissena polymorpha*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 55, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.08.016>
- Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E., Villeneuve, D.L., 2010. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 730–741. <https://doi.org/10.1002/etc.34>
- Arnold, I., 1998. Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *The EMBO Journal* 17, 7170–7178. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7170>
- Arrêté du 27 juillet 2018 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface pris en application des articles R. 212-10, R. 212-11 et R. 212-18 du code de l'environnement.
- Artigas, J., Arts, G., Babut, M., Caracciolo, A.B., Charles, S., Chaumot, A., Combourieu, B., Dahllöf, I., Despréaux, D., Ferrari, B., Friberg, N., Garric, J., Geffard, O., Gourlay-Francé, C., Hein, M., Hjorth, M., Krauss, M., De Lange, H.J., Lahr, J., Lehtonen, K.K., Lettieri, T., Liess, M., Lofts, S., Mayer, P., Morin, S., Paschke, A., Svendsen,

- C., Usseglio-Polatera, P., van den Brink, N., Vindimian, E., Williams, R., 2012. Towards a renewed research agenda in ecotoxicology. *Environmental Pollution* 160, 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.011>
- Astaneï, I., Gosling, E., Wilson, J., Powell, E., 2005. Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Mol. Ecol.* 14, 1655–1666. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02530.x>
- Atkinson, D.E., 1968. Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7, 4030–4034. <https://doi.org/10.1021/bi00851a033>

B

- Bacchetta, R., Mantecca, P., 2009. DDT polluted meltwater affects reproduction in the mussel *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere* 76, 1380–1385. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.020>
- Bacher, C., Gangnery, A., 2006. Use of dynamic energy budget and individual based models to simulate the dynamics of cultivated oyster populations. *Journal of Sea Research* 56, 140–155. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2006.03.004>
- Baldwin, B.S., Mayer, M.S., Dayton, J., Pau, N., Mendilla, J., Sullivan, M., Moore, A., Ma, A., Mills, E.L., 2002. Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for North American lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 680–694. <https://doi.org/10.1139/f02-043>
- Barjhoux, I., Fechner, L.C., Lebrun, J.D., Anzil, A., Ayrault, S., Budzinski, H., Cachot, J., Charron, L., Chaumot, A., Clérandeau, C., Dedourge-Geffard, O., Faburé, J., François, A., Geffard, O., George, I., Labadie, P., Lévi, Y., Munoz, G., Noury, P., Oziol, L., Quéau, H., Servais, P., Uher, E., Urien, N., Geffard, A., 2018. Application of a multidisciplinary and integrative weight-of-evidence approach to a 1-year monitoring survey of the Seine River. *Environ Sci Pollut Res* 25, 23404–23429. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6993-6>
- Barrick, A., Châtel, A., Marion, J.-M., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Mouneyrac, C., 2016. A novel methodology for the determination of biomarker baseline levels in the

- marine polychaete *Hediste diversicolor*. *Marine Pollution Bulletin* 108, 275–280.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.056>
- Bartell, S.M., 2006. Biomarkers, Bioindicators, and Ecological Risk Assessment—A Brief Review and Evaluation. *Environmental Bioindicators* 1, 60–73.
<https://doi.org/10.1080/15555270591004920>
- Baudrimont, M., Metivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F., Boudou, A., 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 2096–2105.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620161016>
- Benítez-Mora, A., Aguirre-Sierra, A., Alonso, Á., Camargo, J.A., 2014. Ecotoxicological assessment of the impact of nitrate (NO₃⁻) on the European endangered white-clawed crayfish *Austropotamobius italicus* (Faxon). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 101, 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.12.025>
- Benson, A.J., 2013. Chronological history of zebra and quagga mussels (Dreissenidae) in North America, 1988–2010. *Quagga and zebra mussels: biology, impacts, and control* 9–31.
- Berg, D.J., Fisher, S.W., Landrum, P.F., 1996. Clearance and processing of algal particles by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Journal of Great Lakes Research* 22, 779–788.
- Bettinazzi, S., Rodríguez, E., Milani, L., Blier, P.U., Breton, S., 2019. Metabolic remodelling associated with mtDNA: insights into the adaptive value of doubly uniparental inheritance of mitochondria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 286, 20182708. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2708>
- Bifulchi, A., 2007. Biologie et génétique des populations d'une espèce invasive: le cas du vison d'amérique (*Mustela vison* Schreber, 1777) en bretagne (Thèse de Doctorat). Université d'Angers.
- bij de Vaate, A., Jazdzewski, K., Ketelaars, H.A.M., Gollasch, S., Van der Velde, G., 2002. Geographical patterns in range extension of Ponto-Caspian macroinvertebrate species in Europe. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 1159–1174.
<https://doi.org/10.1139/f02-098>
- Binelli, A., Bacchetta, R., Mantecca, P., Ricciardi, F., Provini, A., Vailati, G., 2004. DDT in zebra mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruptions. *Aquatic Toxicology* 69, 175–188.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.05.005>

- Binelli, A., Bacchetta, R., Vailati, G., Galassi, S., Provini, A., 2001. DDT contamination in Lake Maggiore (N. Italy) and effects on zebra mussel spawning 7.
- Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S., Parolini, M., 2015. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environmental Pollution* 196, 386–403. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.023>
- Bolaños, J.P., Almeida, A., Moncada, S., 2010. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends in Biochemical Sciences* 35, 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.006>
- Borcherding, J., 1991. The annual reproductive cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in lakes. *Oecologia* 87, 208–218.
- Bratton, S.B., Salvesen, G.S., 2010. Regulation of the Apaf-1–caspase-9 apoptosome. *Journal of cell science* 123, 3209–3214.
- Bundschuh, M., Zubrod, J.P., Seitz, F., Newman, M.C., Schulz, R., 2011. Mercury-Contaminated Sediments Affect Amphipod Feeding. *Arch Environ Contam Toxicol* 60, 437–443. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9566-6>

C

- Calow, P., 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100, 3–6. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90110-F](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90110-F)
- Calow, P., Forbes, V.E., 1998. How do physiological responses to stress translate into ecological and evolutionary processes? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120, 11–16. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10003-X](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10003-X)
- Calvo, S.E., Mootha, V.K., 2010. The Mitochondrial Proteome and Human Disease. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 11, 25–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082509-141720>
- Camargo, J.A., Alonso, A., Salamanca, A., 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58, 1255–1267. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.044>

- Campbell, S.C., Wisniewski, P.J., 2017. Chapter 13 - Nutritional Recommendations for Athletes, in: Coulston, A.M., Boushey, C.J., Ferruzzi, M.G., Delahanty, L.M. (Eds.), Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease (Fourth Edition). Academic Press, pp. 255–271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802928-2.00013-8>
- Capaldi, R.A., 1990. Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annual Reviews* 59, 569–596.
- Capt, C., Renaut, S., Stewart, D.T., Johnson, N.A., Breton, S., 2019. Putative Mitochondrial Sex Determination in the Bivalvia: Insights From a Hybrid Transcriptome Assembly in Freshwater Mussels. *Front. Genet.* 10, 840. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00840>
- Castello, A., Hentze, M.W., Preiss, T., 2015. Metabolic Enzymes Enjoying New Partnerships as RNA-Binding Proteins. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 26, 746–757. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.09.012>
- Cecchini, G., 2003. Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain. *Annual Review of Biochemistry* 72, 77–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700>
- Chauhan, A.S., Zhuang, L., Gan, B., 2020. Spatial control of AMPK signaling at subcellular compartments. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 1–16. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1727840>
- Chelomin, V.P., Belcheva, N.N., Zakhartsev, 1998. Biochemical Mechanisms of Adaptation to Cadmium and Copper Ions in the Mussel *Mytilus trossulus*. *Russian Journal of Marine Biology* 24, 330–336.
- Cherkasov, A.S., Biswas, P.K., Ridings, D.M., Ringwood, A.H., Sokolova, I.M., 2006. Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on cellular energy budgets in the marine mollusk *Crassostrea virginica*: linking cellular and mitochondrial responses. *Journal of Experimental Biology* 209, 1274–1284. <https://doi.org/10.1242/jeb.02093>
- Cherkasov, A.S., Grewal, S., Sokolova, I.M., 2007. Combined effects of temperature and cadmium exposure on haemocyte apoptosis and cadmium accumulation in the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Journal of Thermal Biology, Role of Thermal Environment in Stress Adaptation and Tolerance: Ingegration of Multiple Stressors* 32, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.005>
- Cherkasov, A.S., Taylor, C., Sokolova, I.M., 2010. Seasonal variation in mitochondrial responses to cadmium and temperature in eastern oysters *Crassostrea virginica*

- (Gmelin) from different latitudes. *Aquatic Toxicology* 97, 68–78.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.004>
- Chen, L., Xu, B., Liu, L., Luo, Y., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Han, X., Kontos, C.D., Huang, S., 2011. Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 624–632.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.032>
- Cheung, S.G., 1993. Population dynamics and energy budgets of green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) in a polluted harbour. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 168, 1–24. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(93\)90113-3](https://doi.org/10.1016/0022-0981(93)90113-3)
- Chun, Y.-S., Hyun, J.-Y., Kwak, Y.-G., Kim, I.-S., Kim, C.-H., Choi, E., Kim, M.-S., Park, J.-W., 2003. Hypoxic activation of the atrial natriuretic peptide gene promoter through direct and indirect actions of hypoxia-inducible factor-1. *Biochemical Journal* 370, 149–157. <https://doi.org/10.1042/bj20021087>
- Chung, D.J., Sparagna, G.C., Chicco, A.J., Schulte, P.M., 2018. Patterns of mitochondrial membrane remodeling parallel functional adaptations to thermal stress. *J Exp Biol* 221, jeb174458. <https://doi.org/10.1242/jeb.174458>
- Claudi, R., Mackie, G.L., 1994. Practical manual for zebra mussel monitoring and control. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Cohen, A.N., 2005. A Review of Zebra Mussels' Environmental Requirement. California Department of Water Resources 33.
- Contardo-Jara, V., Otterstein, S.K.B., Downing, S., Downing, T.G., Pflugmacher, S., 2014. Response of antioxidant and biotransformation systems of selected freshwater mussels (*Dreissena polymorpha*, *Anadonta cygnea*, *Unio tumidus*, and *Corbicula javanicus*) to the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine. *Toxicological & Environmental Chemistry* 96, 451–465.
<https://doi.org/10.1080/02772248.2014.945452>
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., Wiegand, C., 2011. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* 105, 428–437.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.017>
- Cordeiro, N.I.S., Andrade, J.T.M., Montresor, L.C., Luz, D.M.R., Araújo, J.M., Martinez, C.B., Pinheiro, J., Vidigal, T.H.D.A., 2017. Physiological response of invasive mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) submitted to transport and

experimental conditions. *Braz. J. Biol.* 77, 191–198. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.15315>

Cordeiro, N.I.S., Andrade, J.T.M., Montresor, L.C., Luz, D.M.R., Martinez, C.B., Darrigran, G., Pinheiro, J., Vidigal, T.H.D.A., 2016. Effect of starvation and subsequent feeding on glycogen concentration, behavior and mortality in the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae). *J. Limnol.* <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1465>

Correia, R.R.S., Martins de Oliveira, D.C., Guimarães, J.R.D., 2013. Mercury methylation in mesocosms with and without the aquatic macrophyte *Eichhornia crassipes* (mart.) Solms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 96, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.002>

D

Dahlhoff, E.A., Somero, G.N., 1993. Effects of Temperature on Mitochondria from Abalone (genus *Haliotis*): Adaptive Plasticity and Its Limits. *Journal of Experimental Biology* 185, 151–168.

Daily, G.C., Postel, S., Bawa, K.S., Kaufman, L., 1997. *Natures's Services: Societal Dependence On Natural Ecosystems*. Island Press.

Darriba, S., San Juan, F., Guerra, A., 2005. Energy storage and utilization in relation to the reproductive cycle in the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865). *ICES Journal of Marine Science* 62, 886–896. <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2005.02.010>

Davies, I.M., Vethaak, D. (Eds.), 2012. *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects*, ICES cooperative research report. ICES/CIEM, Copenhagen.

De Castro-Català, N., López-Doval, J., Gorga, M., Petrovic, M., Muñoz, I., 2013. Is reproduction of the snail *Physella acuta* affected by endocrine disrupting compounds? An in situ bioassay in three Iberian basins. *J. Hazard. Mater.* 263 Pt 1, 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.053>

De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 6, 43–55.

- de Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* 50, 51–71. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00094-6)
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3, 161–172.
- Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L., Pain-Devin, S., 2014. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environ Sci Pollut Res* 21, 2448–2454. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2169-9>
- Diaz, R.J., Rosenberg, R., 2008. Spreading Dead Zones and Consequences for Marine Ecosystems. *Science* 321, 926–929. <https://doi.org/10.1126/science.1156401>
- Dieni, C.A., Storey, K.B., 2008. Regulation of 5'-adenosine monophosphate deaminase in the freeze tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *BMC Biochem* 9, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-12>
- Duchen, M.R., 2004. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol. Aspects Med.* 25, 365–451. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.03.001>
- Dudognon, T., Lambert, C., Quere, C., Auffret, M., Soudant, P., Kraffe, E., 2014. Mitochondrial activity, hemocyte parameters and lipid composition modulation by dietary conditioning in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Comparative Physiology B* 184, 303–317. <https://doi.org/10.1007/s00360-013-0800-1>
- Durou, C., Smith, B.D., Roméo, M., Rainbow, P.S., Mouneyrac, C., Mouloud, M., Gnassia-Barelli, M., Gillet, P., Deutsch, B., Amiard-Triquet, C., 2007. From biomarkers to population responses in *Nereis diversicolor*: Assessment of stress in estuarine ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 402–411. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.02.016>

E

-
- EEA, 2007. Air pollution in Europe. EEA Technical report 5/2007 – European Environment Agency, Copenhagen
- Ehrlich, P.R., Mooney, H.A., 1983. Extinction, Substitution, and Ecosystem Services. *BioScience* 33, 248–254. <https://doi.org/10.2307/1309037>

- Eigentler, A., Draxl, A., Wiethüchter, A., Kuznetsov, A.V., Lassing, B., Gnaiger, E., 2012. Laboratory protocol: citrate synthase, a mitochondrial marker enzyme. *Mitochondrial Physiology Network* 17, 1–11.
- Eisner, V., Picard, M., Hajnóczky, G., 2018. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nat Cell Biol* 20, 755–765. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0133-0>
- Elderkin, C., L., Klerks, P., L., 2005. Variation in thermal tolerance among three Mississippi river populations of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Journal of Shellfish Research* 24, 221–226. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[221:VITTAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[221:VITTAT]2.0.CO;2)
- Eliason, E.J., Clark, T.D., Hague, M.J., Hanson, L.M., Gallagher, Z.S., Jeffries, K.M., Gale, M.K., Patterson, D.A., Hinch, S.G., Farrell, A.P., 2011. Differences in Thermal Tolerance Among Sockeye Salmon Populations. *Science* 332, 109–112. <https://doi.org/10.1126/science.1199158>
- Eliason, E.J., Farrell, A.P., 2014. Effect of hypoxia on specific dynamic action and postprandial cardiovascular physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 171, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.01.021>
- Encomio, V., Chu, F.-L.E., 2000. The effect of PCBs on glycogen reserves in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* 50, 45–49. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00044-1)
- Eprintsev, A.T., Fedorin, D.N., Dobychnina, M.A., Igamberdiev, A.U., 2018. Regulation of expression of the mitochondrial and peroxisomal forms of citrate synthase in maize during germination and in response to light. *Plant Science* 272, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.017>
- Evariste, L., Rioult, D., Brousseau, P., Geffard, A., David, E., Auffret, M., Fournier, M., Betoulle, S., 2017. Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.027>

F

- Fadhlaoui, M., Couture, P., 2016. Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* 180, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.005>
- Faggio, C., Tsarpali, V., Dailianis, S., 2018. Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Science of The Total Environment* 636, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.264>
- Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Yurchak, I., Ivanina, A., Stoliar, O., Sokolova, I., 2014. Habitat pollution and thermal regime modify molecular stress responses to elevated temperature in freshwater mussels (*Anodonta anatina*: Unionidae). *Science of The Total Environment* 500–501, 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.112>
- Fanslow, D.L., Nalepa, T.F., Johengen, T.H., 2001. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia* 448, 61–70.
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.012>
- Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Piña, B., Barata, C., 2011. Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquatic Toxicology* 101, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.004>
- Faria, M., Ochoa, V., Blázquez, M., Juan, M.F.S., Lazzara, R., Lacorte, S., Soares, A.M.V.M., Barata, C., 2014. Separating natural from anthropogenic causes of impairment in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) populations living across a pollution gradient. *Aquatic Toxicology* 152, 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.020>
- Farkas, A., Ács, A., Vehovszky, á., Falfusynska, H., Stoliar, O., Specziár, A., Győri, J., 2017. Interspecies comparison of selected pollution biomarkers in dreissenid spp. inhabiting pristine and moderately polluted sites. *Science of The Total Environment* 599–600, 760–770. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.033>

- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 272–280. <https://doi.org/10.1897/05-257r.1>
- Frederich, M., Balschi, J.A., 2002. The Relationship between AMP-activated Protein Kinase Activity and AMP Concentration in the Isolated Perfused Rat Heart. *Journal of Biological Chemistry* 277, 1928–1932. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107128200>
- Frederich, M., O'Rourke, M.R., Furey, N.B., Jost, J.A., 2009. AMP-activated protein kinase (AMPK) in the rock crab, *Cancer irroratus*: an early indicator of temperature stress. *Journal of Experimental Biology* 212, 722–730. <https://doi.org/10.1242/jeb.021998>
- Frederich, M., Pörtner, H.O., 2000. Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279, R1531–R1538. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.5.R1531>
- Frieder, C.A., Applebaum, S.L., Pan, T.-C.F., Hedgecock, D., Manahan, D.T., 2017. Metabolic cost of calcification in bivalve larvae under experimental ocean acidification. *ICES Journal of Marine Science* 74, 941–954. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsw213>
- Funes, S., Nargang, F.E., Neupert, W., Herrmann, J.M., 2004. The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family. *Molecular biology of the cell* 15, 1853–1861.

G

- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 10, 935–944. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1146363>
- Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V., Giamberini, L., 2015. Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO₂) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeseli*. *Aquatic Toxicology* 158, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.004>

- Garric, J., Morin, S., Vincent-Hubert, F., 2010. Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. *Sciences Eaux Territoires* Numéro 1, 12–17.
- Garton, D.W., McMahon, R., Stoeckmann, A.M., 2013. Limiting environmental factors and competitive interactions between zebra and quagga mussels in North America, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Quagga and Zebra Mussels - Biology, Impacts, and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 383–402.
- Geffard, O., Geffard, A., Budzinski, H., Crouzet, C., Menasria, R., Amiard, J., Amiard-Triquet, C., 2005. Mobility and potential toxicity of sediment-bound metals in a tidal estuary. *Environmental Toxicology* 20, 407–417.
- Gist, D.H., Miller, M.C., Brence, W.A., 1997. Annual reproductive cycle of the zebra mussel in the Ohio River : a comparison with Lake Erie. *Arch. Hydrobiol* 138, 365–379.
- Gob, F., Bilodeau, C., Thommeret, N., Belliard, J., Albert, M.-B., Tamisier, V., Baudoin, J.-M., Kreutzenberger, K., 2014. Un outil de caractérisation hydromorphologique des cours d'eau pour l'application de la DCE en France (CARHYCE). *geomorphologie* 20, 57–72. <https://doi.org/10.4000/geomorphologie.10497>
- Goedkoop, W., Naddafi, R., Grandin, U., 2011. Retention of N and P by zebra mussels (*Dreissena polymorpha* Pallas) and its quantitative role in the nutrient budget of eutrophic Lake Ekoln, Sweden. *Biol Invasions* 13, 1077–1086. <https://doi.org/10.1007/s10530-011-9950-9>
- Gosling, E.M., 2003. *Bivalve molluscs: biology, ecology, and culture*. Fishing News Books, Oxford ; Malden, MA.
- Grutters, B.M.C., Verhofstad, M.J.J.M., van der Velde, G., Rajagopal, S., Leuven, R.S.E.W., 2012. A comparative study of byssogenesis on zebra and quagga mussels: the effects of water temperature, salinity and light–dark cycle. *Biofouling* 28, 121–129. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.654779>

H

- Han, H.-S., Kang, G., Kim, J.S., Choi, B.H., Koo, S.-H., 2016. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med* 48, e218–e218. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>
- Hanana, H., Kleinert, C., André, C., Gagné, F., 2019. Influence of cadmium on oxidative stress and NADH oscillations in mussel mitochondria. *Comparative Biochemistry and*

- Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 216, 60–66.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.11.005>
- Hardie, D.G., Evans, A.M., 2019. Molecular Regulation of Energy Balance, in: Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience. Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.013.60>
- Hardie, D.G., Hawley, S.A., 2001. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* 23, 1112–1119. <https://doi.org/10.1002/bies.10009>
- Hardie, D.G., Hawley, S.A., Scott, J.W., 2006. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J. Physiol. (Lond.)* 574, 7–15.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.108944>
- Hardie, D.G., Sakamoto, K., 2006. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda)* 21, 48–60. <https://doi.org/10.1152/physiol.00044.2005>
- Hassan, M.M., Qin, J.G., Li, X., 2018. Gametogenesis, sex ratio and energy metabolism in *Ostrea angasi*: implications for the reproductive strategy of spermcasting marine bivalves. *Journal of Molluscan Studies* 84, 38–45.
<https://doi.org/10.1093/mollus/eyx041>
- He, Y., Wu, J., Dressman, D.C., Iacobuzio-Donahue, C., Markowitz, S.D., Velculescu, V.E., Diaz Jr, L.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Papadopoulos, N., 2010. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* 464, 610–614.
- Hebert, P.D.N., Muncaster, B.W., Mackie, G.L., 1989. Ecological and Genetic Studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas): a New Mollusc in the Great Lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46, 1587–1591. <https://doi.org/10.1139/f89-202>
- Hellemond, J.J.V., Simons, B., Millenaar, F.F., Tielens, A.G., 1998. A Gene Encoding the Plant-Like Alternative Oxidase is Present in *Phytomonas* but Absent in *Leishmania* spp. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45, 426–430.
- Hernandez, G., Roble, R.G., 1995. Thermospheric nighttime neutral temperature and winds over Fritz Peak Observatory: Observed and calculated solar cycle variation. *J. Geophys. Res.* 100, 14647. <https://doi.org/10.1029/95JA00565>
- Higgins, S.N., Zanden, M.J.V., 2010. What a difference a species makes: a meta-analysis of dreissenid mussel impacts on freshwater ecosystems. *Ecological Monographs* 80, 179–196. <https://doi.org/10.1890/09-1249.1>
- Hilton, Z., Clements, K.D., Hickey, A.J.R., 2010. Temperature sensitivity of cardiac mitochondria in intertidal and subtidal triplefin fishes. *J Comp Physiol B* 180, 979–990. <https://doi.org/10.1007/s00360-010-0477-7>

- His, E., Beiras, R., Seaman, M.N.L., 1999. The assessment of marine pollution-bioassays with bivalve embryos and larvae, in: *Advances in Marine Biology*. Elsevier, pp. 1–178.
- Hochachka, P.W., Buck, L.T., Doll, C.J., Land, S.C., 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 9493–9498. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9493>
- Hochachka, P.W., Lutz, P.L., 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 130, 435-459.
- Hochaka and Somero, 2002. Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 30, 215–216. <https://doi.org/10.1002/bmb.2002.494030030071>
- Hong, H.-K., Jeung, H.-D., Kang, H.-S., Choi, K.-S., 2020. Seasonal variations in the hemocyte parameters, gonad development, energy storage and utilization of the giant honeycomb oyster *Hyotissa hyotis* (Linnaeus 1758) in Jeju Island off the south coast of Korea. *Aquaculture Reports* 17, 100299. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100299>
- Hraoui, G., Bettinazzi, S., Gendron, A.D., Boisclair, D., Breton, S., 2020. Mitochondrial thermo-sensitivity in invasive and native freshwater mussels. *J Exp Biol* 223, jeb215921. <https://doi.org/10.1242/jeb.215921>
- Hrdinka, T., Novický, O., Hanslík, E., Rieder, M., 2012. Possible impacts of floods and droughts on water quality. *Journal of Hydro-environment Research* 6, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.jher.2012.01.008>
- Hu, Y.-C., Chung, M.-H., Lee, T.-H., 2018. An assay of optimal cytochrome c oxidase activity in fish gills. *Analytical Biochemistry* 553, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.05.017>
- Hulbert, A.J., Else, P.L., 2005. Membranes and the setting of energy demand. *Journal of Experimental Biology* 208, 1593–1599. <https://doi.org/10.1242/jeb.01482>

I

INERIS, 2011. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : les polychlorobiphényles (PCB) (No. DRC-11-118962-11081A).

- IPCC, 2014. In: Pachauri, R.K., Meyer, L.A. (Eds.), Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland. Core Writing Team.
- Isani, G., Serra, R., Cattani, O., Cortesi, P., Carpena, E., 1997. Adenylate Energy Charge and Metallothionein as Stress Indices in *Mytilus Galloprovincialis* Exposed to Cadmium and Anoxia. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 77, 1187–1197. <https://doi.org/10.1017/S0025315400038704>
- Ivanina, A.V., Froelich, B., Williams, T., Sokolov, E.P., Oliver, J.D., Sokolova, I.M., 2011. Interactive effects of cadmium and hypoxia on metabolic responses and bacterial loads of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin. Chemosphere 82, 377–389. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.075>
- Ivanina, A.V., Habinck, E., Sokolova, I.M., 2008. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 148, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.03.009>
- Ivanina, A.V., Kurochkin, I.O., Leamy, L., Sokolova, I.M., 2012. Effects of temperature and cadmium exposure on the mitochondria of oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to hypoxia and subsequent reoxygenation. Journal of Experimental Biology 215, 3142–3154. <https://doi.org/10.1242/jeb.071357>
- Ivanina, A.V., Nesselova, I., Leamy, L., Sokolov, E.P., Sokolova, I.M., 2016. Intermittent hypoxia leads to functional reorganization of mitochondria and affects cellular bioenergetics in marine molluscs. The Journal of Experimental Biology 219, 1659–1674. <https://doi.org/10.1242/jeb.134700>
- Ivanina, A.V., Sokolov, E.P., Sokolova, I.M., 2010. Effects of cadmium on anaerobic energy metabolism and mRNA expression during air exposure and recovery of an intertidal mollusk *Crassostrea virginica*. Aquatic Toxicology 99, 330–342. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.013>

J

-
- Jager, T., 2020. Revisiting simplified DEBtox models for analysing ecotoxicity data. Ecological Modelling 416, 108904. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2019.108904>

- Johns, C., 2011. Quagga mussels (*Dreissena bugensis*) as biomonitors of metal contamination: A case study in the upper St. Lawrence River. *Journal of Great Lakes Research* 37, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2010.11.002>
- Johnson, P.D., McMahon, R.F., 1998. Effects of temperature and chronic hypoxia on survivorship of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and Asian clam (*Corbicula fluminea*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 1564–1572. <https://doi.org/10.1139/f98-030>
- Jost, J.A., Keshwani, S.S., Abou-Hanna, J.J., 2015. Activation of AMP-activated protein kinase in response to temperature elevation shows seasonal variation in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 182, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.11.025>
- Jost, J.A., Podolski, S.M., Frederich, M., 2012. Enhancing thermal tolerance by eliminating the pejus range: a comparative study with three -decapod crustaceans. *Marine Ecology Progress Series* 444, 263–274. <https://doi.org/10.3354/meps09379>
- Juhel, G., Davenport, J., O’Halloran, J., Culloty, S.C., O’Riordan, R.M., James, K.F., Furey, A., Allis, O., 2006. Impacts of microcystins on the feeding behaviour and energy balance of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*: A bioenergetics approach. *Aquatic Toxicology* 79, 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.07.007>

K

- Kalogeris, T., Bao, Y., Korthuis, R.J., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biology* 2, 702–714. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.006>
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L., E., Padilla, D.K., 1997. The effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on aquatic communities in Eastern Europe. *Journal of Shellfish Research*, 16, 187–203.
- Karatayev, A.Y., Boltovskoy, D., Padilla, D.K., Burlakova, L.E., 2007. The invasive bivalves *Dreissena polymorpha* and *Limnoperna fortunei*: parallels, contrasts, potential spread and invasion impacts. *Journal of Shellfish Research* 26, 205–213. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[205:TIBDPA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[205:TIBDPA]2.0.CO;2)

- Karatayev, A., Burlakova, L., Padilla, D., 2013. General Overview of Zebra and Quagga Mussels: What We Do and Do Not Know, in: Quagga and Zebra Mussels. CRC Press, pp. 695–704. <https://doi.org/10.1201/b15437-53>
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Mehler, K., Bocaniov, S.A., Collingsworth, P.D., Warren, G., Kraus, R.T., Hinchey, E.K., 2018. Biomonitoring using invasive species in a large Lake: Dreissena distribution maps hypoxic zones. *Journal of Great Lakes Research* 44, 639–649. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2017.08.001>
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 2015. Zebra versus quagga mussels: a review of their spread, population dynamics, and ecosystem impacts. *Hydrobiologia* 746, 97–112.
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 2002. Impacts of zebra mussels on aquatic communities and their role as ecosystem engineers, in: *Invasive Aquatic Species of Europe. Distribution, Impacts and Management*. Springer, pp. 433–446.
- Kassahn, K.S., Crozier, R.H., Pörtner, H.O., Caley, M.J., 2009. Animal performance and stress: responses and tolerance limits at different levels of biological organisation. *Biological Reviews* 84, 277–292. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00073.x>
- Kazak, L., Reyes, A., Holt, I.J., 2012. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 659–671.
- Ke, R., Xu, Q., Li, C., Luo, L., Huang, D., 2018. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism: AMPK and ATP balance. *Cell Biol Int* 42, 384–392. <https://doi.org/10.1002/cbin.10915>
- Keller, M., Sommer, A.M., Pörtner, H.O., Abele, D., 2004. Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. *Journal of Experimental Biology* 207, 2529–2538. <https://doi.org/10.1242/jeb.01050>
- Kerambrun, E., Rioult, D., Delahaut, L., Evariste, L., Pain-Devin, S., Auffret, M., Geffard, A., David, E., 2016. Variations in gene expression levels in four European zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, populations in relation to metal bioaccumulation: A field study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 134, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.018>
- Kessler, A., Brand, M.D., 1994. Localisation of the Sites of Action of Cadmium on Oxidative Phosphorylation in Potato Tuber Mitochondria Using Top-Down Elasticity Analysis. *Eur J Biochem* 225, 897–906. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.0897b.x>

- Koenig, S., Solé, M., 2014. Muscular cholinesterase and lactate dehydrogenase activities in deep-sea fish from the NW Mediterranean. *Marine Environmental Research* 94, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.11.003>
- Kooijman, S.A.L.M., 2010. *Dynamic energy and mass budgets in biological systems*. Cambridge university press.
- Kooijman, S.A.L.M., Baas, J., Bontje, D., Broerse, M., van Gestel, C.A.M., Jager, T., 2009. Ecotoxicological Applications of Dynamic Energy Budget Theory, in: Devillers, J. (Ed.), *Ecotoxicology Modeling, Emerging Topics in Ecotoxicology*. Springer US, Boston, MA, pp. 237–259. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0197-2_9
- Korge, P., Calmettes, G., Weiss, J.N., 2015. Increased reactive oxygen species production during reductive stress: The roles of mitochondrial glutathione and thioredoxin reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1847, 514–525. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.012>
- Kovtun, I.V., Liu, Y., Bjoras, M., Klungland, A., Wilson, S.H., McMurray, C.T., 2007. OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature* 447, 447–452. <https://doi.org/10.1038/nature05778>
- Kraak, M.H.S., Stuijzand, S.C., Admiraal, W., 1999. Short-term ecotoxicity of a mixture of five metals to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 63, 805–812.
- Kraak, Michiel H.S., Lavy, D., Peeters, Wilma H.M., Davids, C., 1992. Chronic ecotoxicity of copper and cadmium to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23, 363–369. <https://doi.org/10.1007/BF00216246>
- Kroon, F., Streten, C., Harries, S., 2017. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. *PLoS ONE* 12, e0174762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174762>
- Kurochkin, I.O., Etkorn, M., Buchwalter, D., Leamy, L., Sokolova, I.M., 2011. Top-down control analysis of the cadmium effects on molluscan mitochondria and the mechanisms of cadmium-induced mitochondrial dysfunction. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 300, R21–R31. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00279.2010>
- Kwan, K.H.M., Chan, H.M., De Lafontaine, Y., 2003. Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence River. *Environmental Monitoring and Assessment* 88, 193–219. <https://doi.org/10.1023/A:1025517007605>

L

- Lane, N., 2005. Power, sex, suicide: Mitochondria and the meaning of life. *J Clin Invest* 116, 1742. <https://doi.org/10.1172/JCI29253>
- Lannig, G., Cherkasov, A.S., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent effects of cadmium on mitochondrial and whole-organism bioenergetics of oysters (*Crassostrea virginica*). *Marine Environmental Research* 62, S79–S82. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.04.010>
- Le Gal, Y., Lagadic, L., Le Bras, S., Caquet, T.H., 1997. Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier Chap 12.
- Le Guernic, A., Geffard, A., Le Foll, F., Palos Ladeiro, M., 2020. Comparison of viability and phagocytic responses of hemocytes withdrawn from the bivalves *Mytilus edulis* and *Dreissena polymorpha*, and exposed to human parasitic protozoa. *International Journal for Parasitology* 50, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.10.005>
- Lepom, P., Irmer, U., Wellnitz, J., 2012. Mercury levels and trends (1993–2009) in bream (*Abramis brama L.*) and zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from German surface waters. *Chemosphere* 86, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.10.021>
- Lepoutre, A., Milliote, N., Bonnard, M., Palos-Ladeiro, M., Rioult, D., Bonnard, I., Bastien, F., Faassen, E., Geffard, A., Lance, E., 2018. Genotoxic and Cytotoxic Effects on the Immune Cells of the Freshwater Bivalve *Dreissena polymorpha* Exposed to the Environmental Neurotoxin BMAA. *Toxins* 10, 106. <https://doi.org/10.3390/toxins10030106>
- Li, H., Sun, B., Lydy, M.J., You, J., 2013. Sediment-associated pesticides in an urban stream in China: implication of a shift in pesticide use patterns. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1040–1047. <https://doi.org/10.1002/etc.2147>
- Li, Q., Yang, L., Ke, Q., Kong, L., 2011. Gametogenic cycle and biochemical composition of the clam *Macatra chinensis* (Mollusca: Bivalvia): Implications for aquaculture and wild stock management. *Marine Biology Research* 7, 407–415. <https://doi.org/10.1080/17451000.2010.515686>

- Li, R., Luo, X., Zhu, Y., Zhao, L., Li, L., Peng, Q., Ma, M., Gao, Y., 2017. ATM signals to AMPK to promote autophagy and positively regulate DNA damage in response to cadmium-induced ROS in mouse spermatocytes. *Environ. Pollut.* 231, 1560–1568. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.044>
- Li, X.C., Peris, D., Hittinger, C.T., Sia, E.A., Fay, J.C., 2019. Mitochondria-encoded genes contribute to evolution of heat and cold tolerance in yeast. *Sci. Adv.* 5, eaav1848. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav1848>
- Lin, M.T., Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787–795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>
- Louis, F., Devin, S., Giambérini, L., Potet, M., David, E., Pain-Devin, S., 2019. Energy allocation in two dreissenid species under metal stress. *Environmental Pollution* 245, 889–897. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.079>
- Louis, F., Rocher, B., Barjhoux, I., Bultelle, F., Dedourge-Geffard, O., Gaillet, V., Bonnard, I., Delahaut, L., Pain-Devin, S., Geffard, A., Paris-Palacios, S., David, E., 2020. Seasonal monitoring of cellular energy metabolism in a sentinel species, *Dreissena polymorpha* (bivalve): Effect of global change? *Science of The Total Environment* 725, 138450. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138450>
- Ludwig, B., Bender, E., Arnold, S., Hüttemann, M., Lee, I., Kadenbach, B., 2001. Cytochrome c Oxidase and the Regulation of Oxidative Phosphorylation 12.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Lushchak, V.I., Husak, V.V., Storey, K.B., 2008. Regulation of AMP-deaminase activity from white muscle of common carp *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 149, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.10.008>

M

- Mackie, G.L., 1991. Biology of the exotic zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in relation to native bivalves and its potential impact in Lake St. Clair. *Hydrobiologia* 219, 251–268. <https://doi.org/10.1007/BF00024759>

- Mackie, G.L., Ontario (Eds.), 1990. The Zebra mussel, *Dreissena polymorpha*: a synthesis of European experiences and a preview for North America. Ontario Environment, Ottawa.
- Madon, S.P., Schneider, D.W., Stoeckel, J.A., Sparks, R.E., 1998. Effects of inorganic sediment and food concentrations on energetic processes of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*: implications for growth in turbid rivers. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 55, 401–413. <https://doi.org/10.1139/cjfas-55-2-401>
- Magni, S., Gagné, F., André, C., Della Torre, C., Auclair, J., Hanana, H., Parenti, C.C., Bonasoro, F., Binelli, A., 2018. Evaluation of uptake and chronic toxicity of virgin polystyrene microbeads in freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia). Science of The Total Environment 631–632, 778–788. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.075>
- Magni, S., Parolini, M., Della Torre, C., de Oliveira, L.F., Catani, M., Guzzinati, R., Cavazzini, A., Binelli, A., 2017. Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha*. Science of The Total Environment 578, 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.208>
- Magniez, G., Franco, A., Geffard, A., Rioult, D., Bonnard, I., Delahaut, L., Joachim, S., Daniele, G., Vulliet, E., Porcher, J.-M., Bonnard, M., 2018. Determination of a new index of sexual maturity (ISM) in zebra mussel using flow cytometry: interest in ecotoxicology. Environ Sci Pollut Res 25, 11252–11263. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9256-2>
- Majed, S.A., Wells, R.M.G., Mcardle, B.H., 2002. Seasonal effect on lactate dehydrogenase and citrate synthase in snapper (*Pagrus auratus*). New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 36, 233–239. <https://doi.org/10.1080/00288330.2002.9517082>
- Majumdar, D., Gupta, N., 2000. Nitrate pollution of groundwater and associated human health disorders. Indian Journal of Environmental Health 13.
- Maltby, L., Clayton, S.A., Yu, H., McLoughlin, N., Wood, R.M., Yin, D., 2000. Using single-species toxicity tests, community-level responses, and toxicity identification evaluations to investigate effluent impacts. Environmental Toxicology and Chemistry 19, 151–157. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190118>
- Marazza, D., Bornens, Ph., Le Gal, Y., 1996. Effect of Ammonia on Survival and Adenylate Energy Charge in the Shrimp *Palaemonetes varians*. Ecotoxicology and Environmental Safety 34, 103–108. <https://doi.org/10.1006/eesa.1996.0050>

- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65, 609–617. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.074>
- Mascaró, M., Horta, J.L., Diaz, F., Paschke, K., Rosas, C., Simões, N., 2019. Effect of a gradually increasing temperature on the behavioural and physiological response of juvenile *Hippocampus erectus*: Thermal preference, tolerance, energy balance and growth. *Journal of Thermal Biology* 85, 102406. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102406>
- Matthews, M.A., McMahon, R.F., 1999. Effects of temperature and temperature acclimation on survival of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian clams (*Corbicula fluminea*) under extreme hypoxia. *J Molluscan Stud* 65, 317–325. <https://doi.org/10.1093/mollus/65.3.317>
- McDonald, A., Vanlerberghe, G., 2004. Branched Mitochondrial Electron Transport in the Animalia: Presence of Alternative Oxidase in Several Animal Phyla. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)* 56, 333–341. <https://doi.org/10.1080/1521-6540400000876>
- McMahon, R.F., 2002. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: *r* selection versus resistance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 1235–1244. <https://doi.org/10.1139/f02-105>
- Michel, C., Vincent-Hubert, F., 2015. DNA oxidation and DNA repair in gills of zebra mussels exposed to cadmium and benzo(a)pyrene. *Ecotoxicology* 24, 2009–2016. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1536-3>
- Mihuc, T.B., Battle, J.M., Mihuc, J.R., Bryan, C.F., 1999. Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) seasonal colonization patterns in a sub-tropical floodplain river. *Hydrobiologia* 392, 121–128. <https://doi.org/10.1023/A:1003586524471>
- Milan, M., Matozzo, V., Pauletto, M., Di Camillo, B., Giacomazzo, M., Boffo, L., Binato, G., Marin, M.G., Patarnello, T., Bargelloni, L., 2016. Can ecological history influence response to pollutants? Transcriptomic analysis of Manila clam collected in different Venice lagoon areas and exposed to heavy metal. *Aquatic Toxicology* 174, 123–133.
- Minguez, L., Giambérini, L., 2012. Seasonal dynamics of zebra mussel parasite populations. *Aquat. Biol.* 15, 145–151. <https://doi.org/10.3354/ab00418>
- Minguez, L., Meyer, A., Molloy, D.P., Giambérini, L., 2009. Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Importance in

- ecotoxicological studies. *Environmental Research* 109, 843–850.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.07.012>
- Ministère de la Transition Ecologique et Solidaire, 2019. Guide technique relatif à l'évaluation de l'état des eaux de surface (cours d'eau, canaux, plans d'eau).
https://www.eaufrance.fr/sites/default/files/2018-07/Guide_REEE-ESC_mise_a_jour_2016.pdf consulté le 30 mai 2020.
- Monlun, M., Hyernard, C., Blanco, P., Lartigue, L., Faustin, B., 2017. Mitochondria as Molecular Platforms Integrating Multiple Innate Immune Signalings. *Journal of Molecular Biology* 429, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.10.028>
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A.G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M.D., Sukernik, R.I., Olckers, A., Wallace, D.C., 2003. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *PNAS* 100, 171–176. <https://doi.org/10.1073/pnas.0136972100>
- Moreira, S.M., Moreira-Santos, M., Guilhermino, L., Ribeiro, R., 2006. An in situ postexposure feeding assay with *Carcinus maenas* for estuarine sediment-overlying water toxicity evaluations. *Environ. Pollut.* 139, 318–329.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.05.004>
- Morley, S.A., Hirse, T., Pörtner, H.-O., Peck, L.S., 2009. Geographical variation in thermal tolerance within Southern Ocean marine ectotherms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 153, 154–161.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.02.001>
- Mouneyrac, C., Leung, P.T.Y., Leung, K.M.Y., 2011. Cost of tolerance, in: Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Roméo, M. (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 265–297.
- Mubiana, V.K., Blust, R., 2007. Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 63, 219–235. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.08.005>

N

-
- Nalepa, T.F., Fanslow, D.L., Pothoven, S.A., 2010. Recent changes in density, biomass, recruitment, size structure, and nutritional state of *Dreissena* populations in southern

- Lake Michigan. *Journal of Great Lakes Research* 36, 5–19.
<https://doi.org/10.1016/j.jglr.2010.03.013>
- Naquet, P., Giessner, C., Galland, F., 2016. Metabolic adaptation of tissues to stress releases metabolites influencing innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 38, 30–38.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.10.005>
- Nardi, A., Benedetti M., d'Errico G., Fattorini D., Regoli F., 2018. Effects of ocean warming and acidification on accumulation and cellular responsiveness to cadmium in mussels *Mytilus galloprovincialis*: importance of the seasonal status. *Aquat. Toxicol.*, 204, pp. 171-179
- Nardi, A., Mincarelli, L.F., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Regoli, F., 2017. Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 169, 493–502.
- Navarro, A., Campos, B., Barata, C., Piña, B., 2013. Transcriptomic seasonal variations in a natural population of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Science of The Total Environment* 454–455, 482–489. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.048>
- Navarro, A., Faria, M., Barata, C., Piña, B., 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environmental Pollution* 159, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.018>
- Newman, M.C., 2015. *Fundamentals of Ecotoxicology*. CRC Press 664.

O

- O'Brien, W.G., Ling, H.S., Zhao, Z., Lee, C.C., 2017. New insights on the regulation of the adenine nucleotide pool of erythrocytes in mouse models. *PLoS ONE* 12, e0180948.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180948>
- Osellame, L.D., Blacker, T.S., Duchon, M.R., 2012. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 26, 711–723.
- Owens, T.G., King, F.D., 1975. The measurement of respiratory electron-transport-system activity in marine zooplankton. *Mar. Biol.* 30, 27–36.
<https://doi.org/10.1007/BF00393750>

P

- Pain, S., Devin, S., Parant, M., 2007. Biomarker versus environmental factors: Seasonal variations and modelling multixenobiotic defence (MXD) transport activity in transplanted zebra mussels. *Science of The Total Environment* 373, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.10.054>
- Pain-Devin, S., Cossu-Leguille, C., Geffard, A., Giambérini, L., Jouenne, T., Minguez, L., Naudin, B., Parant, M., Rodius, F., Rousselle, P., Tarnowska, K., Daguin-Thiébaud, C., Viard, F., Devin, S., 2014. Towards a better understanding of biomarker response in field survey: A case study in eight populations of zebra mussels. *Aquatic Toxicology* 155, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.008>
- Paital, B., Chainy, G.B.N., 2014. Effects of temperature on complexes I and II mediated respiration, ROS generation and oxidative stress status in isolated gill mitochondria of the mud crab *Scylla serrata*. *J. Therm. Biol.* 41, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.02.013>
- Palais, F., Dedourge-Geffard, O., Beaudon, A., Pain-Devin, S., Trapp, J., Geffard, O., Noury, P., Gourlay-Francé, C., Uher, E., Mouneyrac, C., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2012. One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Ecotoxicology* 21, 888–905. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0851-1>
- Palais, F., Mouneyrac, C., Dedourge-Geffard, O., Giambérini, L., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2011. One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83, 1062–1073. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.060>
- Pan, H., Li, L.-Y., Li, J.-M., Wang, W.-L., Limbu, S.M., Degrace, P., Li, D.-L., Du, Z.-Y., 2017. Inhibited fatty acid β -oxidation impairs stress resistance ability in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology* 68, 500–508. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.058>
- Pan, Y., Cao, M., Liu, J., Yang, Q., Miao, X., Go, V.L.W., Lee, P.W.N., Xiao, G.G., 2017. Metabolic Regulation in Mitochondria and Drug Resistance, in: Sun, H., Wang, X. (Eds.), *Mitochondrial DNA and Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Singapore, Singapore, pp. 149–171. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6674-0_11

- Parolini, M., Magni, S., Castiglioni, S., Binelli, A., 2016. Amphetamine exposure imbalanced antioxidant activity in the bivalve *Dreissena polymorpha* causing oxidative and genetic damage. *Chemosphere* 144, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.025>
- Parolini, M., Magni, S., Traversi, I., Villa, S., Finizio, A., Binelli, A., 2015. Environmentally relevant concentrations of galaxolide (HHCB) and tonalide (AHTN) induced oxidative and genetic damage in *Dreissena polymorpha*. *Journal of Hazardous Materials* 285, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.11.037>
- Parrino, V., Kraus, D.W., Doeller, J.E., 2000. ATP production from the oxidation of sulfide in gill mitochondria of the ribbed mussel *Geukensia demissa*. *Journal of Experimental Biology* 203, 2209–2218.
- Peck, L.S., Pörtner, H.O., Hardewig, I., 2002. Metabolic Demand, Oxygen Supply, and Critical Temperatures in the Antarctic Bivalve *Laternula elliptica*. *Physiological and Biochemical Zoology* 75, 123–133. <https://doi.org/10.1086/340990>
- Perez, M.H., Wallace, W.G., 2004. Differences in Prey Capture in Grass Shrimp, *Palaemonetes pugio*, Collected Along an Environmental Impact Gradient. *Arch Environ Contam Toxicol* 46, 81–89. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-0249-9>
- Petes, L.E., Menge, B.A., Harris, A.L., 2008. Intertidal mussels exhibit energetic trade-offs between reproduction and stress resistance. *Ecological Monographs* 78, 387–402. <https://doi.org/10.1890/07-0605.1>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 45e–445. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pilchova, I., Klacanova, K., Tatarkova, Z., Kaplan, P., Racay, P., 2017. The Involvement of Mg²⁺ in Regulation of Cellular and Mitochondrial Functions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6797460>
- Piva, F., Ciaprini, F., Onorati, F., Benedetti, M., Fattorini, D., Ausili, A., Regoli, F., 2011. Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: A practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere* 83, 475–485. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.064>
- Plaiستow, S.J., Troussard, J.-P., Cézilly, F., 2001. The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *International Journal for Parasitology* 31, 346–351. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00115-1)

- Pörtner, H.-O., 2010. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology* 213, 881–893. <https://doi.org/10.1242/jeb.037523>
- Pörtner, H.-O., 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften* 88, 137–146. <https://doi.org/10.1007/s001140100216>
- Potet, M., 2017. De l'acclimatation à l'adaptation : mécanismes évolutifs, conséquences populationnelles et implication en biosurveillance (These de doctorat). Université de Lorraine.
- Potet, M., Devin, S., Pain-Devin, S., Rousselle, P., Giambérini, L., 2016. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environmental Pollution* 218, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.025>
- Potet, M., Giambérini, L., Pain-Devin, S., Louis, F., Bertrand, C., Devin, S., 2018. Differential tolerance to nickel between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* populations. *Scientific Reports* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19228-x>
- Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A., Alunno-Bruscia, M., 2006. Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *Journal of Sea Research, Dynamic Energy Budgets in Bivalves* 56, 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2006.03.007>
- Pradet, A., Raymond, P., 1983. Adenine Nucleotide Ratios and Adenylate Energy Charge in Energy Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 34, 199–224. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.34.060183.001215>
- Prescott, K.L., Claudi, R., Janik, J., Veldhuizen, T., 2014. Use of the calcite saturation index as an indicator of environmental suitability for dreissenid mussels. *Management of Biological Invasions* 5, 217.
- Probst, J.L., Laggoun, F., 2017. Bilan et Prospective 2018-2022 de la Commission Spécialisée Surfaces et Interfaces Continentales de l'Institut National des Sciences de l'Univers. Synthèse des ateliers, des forums préparatoires et du colloque de Paris 9-11 octobre 2017

Q

Quinn, B., Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R., 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere* 84, 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.033>

R

- Ram, J.L., Crawford, G.W., Walker, J.U., Mojares, J.J., Patel, N., Fong, P.P., Kyojuka, K., 1993. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 265, 587–598.
- Ram, J.L., Fong, P.P., Garton, D.W., 1996. Physiological aspects of zebra mussel reproduction: maturation, spawning, and fertilization. *American Zoologist* 36, 326–338.
- Ram, J.L., Karim, A.S., Banno, F., Kashian, D.R., 2012. Invading the invaders: reproductive and other mechanisms mediating the displacement of zebra mussels by quagga mussels. *Invertebrate Reproduction & Development* 56, 21–32. <https://doi.org/10.1080/07924259.2011.588015>
- Ramcharan, C.W., Padilla, D.K., Dodson, S.I., 1992. Models to Predict Potential Occurrence and Density of the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 2611–2620. <https://doi.org/10.1139/f92-289>
- Reeders, H.H., De Vaate, A.B., 1990. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): a new perspective for water quality management. *Hydrobiologia* 200, 437–450.
- Ricci, J.-E., Muñoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H., Green, D.R., 2004. Disruption of Mitochondrial Function during Apoptosis Is Mediated by Caspase Cleavage of the p75 Subunit of Complex I of the Electron Transport Chain. *Cell* 117, 773–786. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.008>
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., Mammucari, C., 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 566–578.
- Rodrigo, A.P., Costa, P.M., 2017. The Role of the Cephalopod Digestive Gland in the Storage and Detoxification of Marine Pollutants. *Front. Physiol.* 8, 232. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00232>

Rossi, A., Pizzo, P., Filadi, R., 2019. Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1866, 1068–1078. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.016>

S

Saddala, M.S., Kandimalla, R., Adi, P.J., Bhashyam, S.S., Asupatri, U.R., 2017. Novel 1, 4-dihydropyridines for L-type calcium channel as antagonists for cadmium toxicity. *Sci Rep* 7, 45211. <https://doi.org/10.1038/srep45211>

Salin, K., Auer, S.K., Rey, B., Selman, C., Metcalfe, N.B., 2015. Variation in the link between oxygen consumption and ATP production, and its relevance for animal performance. *Proc. R. Soc. B* 282, 20151028. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1028>

Sappal, R., MacDonald, N., Fast, M., Stevens, D., Kibenge, F., Siah, A., Kamunde, C., 2014. Interactions of copper and thermal stress on mitochondrial bioenergetics in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology* 157, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.09.007>

Sapone, A., Canistro, D., Vivarelli, F., Paolini, M., 2016. Perturbation of xenobiotic metabolism in *Dreissena polymorpha* model exposed in situ to surface water (Lake Trasimene) purified with various disinfectants. *Chemosphere* 144, 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.022>

Sarà, G., Reid, G.K., Rinaldi, A., Palmeri, V., Troell, M., Kooijman, S.A.L.M., 2012. Growth and reproductive simulation of candidate shellfish species at fish cages in the Southern Mediterranean: Dynamic Energy Budget (DEB) modelling for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture* 324–325, 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.042>

Scavia, D., David Allan, J., Arend, K.K., Bartell, S., Beletsky, D., Bosch, N.S., Brandt, S.B., Briland, R.D., Daloğlu, I., DePinto, J.V., Dolan, D.M., Evans, M.A., Farmer, T.M., Goto, D., Han, H., Höök, T.O., Knight, R., Ludsins, S.A., Mason, D., Michalak, A.M., Peter Richards, R., Roberts, J.J., Rucinski, D.K., Rutherford, E., Schwab, D.J., Sesterhenn, T.M., Zhang, H., Zhou, Y., 2014. Assessing and addressing the re-eutrophication of Lake Erie: Central basin hypoxia. *Journal of Great Lakes Research* 40, 226–246. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2014.02.004>

- Schäfer, S., Hamer, B., Treursić, B., Möhlenkamp, C., Spira, D., Korlević, M., Reifferscheid, G., Claus, E., 2012. Comparison of Bioaccumulation and Biomarker Responses in *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* After Exposure to Resuspended Sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62, 614–627. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9735-2>
- Selye, H., 1976. Stress without Distress, in: Serban, G. (Ed.), *Psychopathology of Human Adaptation*. Springer US, Boston, MA, pp. 137–146. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2238-2_9
- Sena, L.A., Chandel, N.S., 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell* 48, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>
- Sharma, A.K., Singh, V., Gera, R., Purohit, M.P., Ghosh, D., 2017. Zinc Oxide Nanoparticle Induces Microglial Death by NADPH-Oxidase-Independent Reactive Oxygen Species as well as Energy Depletion. *Mol Neurobiol* 54, 6273–6286. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0133-7>
- Simpson, W.R., 1981. A critical review of cadmium in the marine environment. *Progress in Oceanography* 10, 1–70.
- Składanowski, A.C., Stepnowski, P., Kleszczyński, K., Dmochowska, B., 2005. AMP deaminase in vitro inhibition by xenobiotics: A potential molecular method for risk assessment of synthetic nitro- and polycyclic musks, imidazolium ionic liquids and N-glucopyranosyl ammonium salts. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19, 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.08.005>
- Skulachev, V.P., Sharaf, A.A., Liberman, E.A., 1967. Proton Conductors in the Respiratory Chain and Artificial Membranes. *Nature* 216, 719–721. <https://doi.org/10.1038/216719a0>
- Smith, R.A.J., Hartley, R.C., Cochemé, H.M., Murphy, M.P., 2012. Mitochondrial pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences* 33, 341–352. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.010>
- Smolders, R., Bervoets, L., Blust, R., 2002. Transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as active biomonitors in an effluent-dominated river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1889–1896.
- Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution* 129, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.027>

- Sokolov, E.P., Markert, S., Hinzke, T., Hirschfeld, C., Becher, D., Ponsuksili, S., Sokolova, I.M., 2019. Effects of hypoxia-reoxygenation stress on mitochondrial proteome and bioenergetics of the hypoxia-tolerant marine bivalve *Crassostrea gigas*. *Journal of Proteomics* 194, 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.009>
- Sokolova, I., 2018. Mitochondrial Adaptations to Variable Environments and Their Role in Animals' Stress Tolerance. *Integrative and Comparative Biology*. <https://doi.org/10.1093/icb/icy017>
- Sokolova, I., Pörtner, H., 2001. Physiological adaptations to high intertidal life involve improved water conservation abilities and metabolic rate depression in *Littorina saxatilis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 224, 171–186. <https://doi.org/10.3354/meps224171>
- Sokolova, I.M., 2004. Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Journal of Experimental Biology* 207, 2639–2648. <https://doi.org/10.1242/jeb.01054>
- Sokolova, I.M., Evans, S., Hugues, F.M, 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *Journal of Experimental Biology* 207, 3369–3380. <https://doi.org/10.1242/jeb.01152>
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research* 79, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>
- Sokolova, I.M., Pörtner, H.-O., 2003. Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda: Littorinidae) from different latitudes. *Journal of Experimental Biology* 206, 195–207. <https://doi.org/10.1242/jeb.00054>
- Sokolova, I.M., Sokolov, E.P., Ponnappa, K.M., 2005. Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology* 73, 242–255. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.016>
- Somero, G.N., 2010. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers.” *Journal of Experimental Biology* 213, 912–920. <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>

- Soon, T.K., Zheng, H., 2019. Climate Change and Bivalve Mass Mortality in Temperate Regions, in: de Voogt, P. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 251, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 109–129. https://doi.org/10.1007/398_2019_31
- Soren, S., Vir Singh, S., Singh, P., 2018. Seasonal variation of mitochondria activity related and heat shock protein genes in spermatozoa of Karan Fries bulls in tropical climate. *Biological Rhythm Research* 49, 366–381. <https://doi.org/10.1080/09291016.2017.1361584>
- Soroka, M., Rymaszewska, A., Sańko, T., Przylucka, A., Lubośny, M., Śmietanka, B., Burzyński, A., 2018. Next-generation sequencing of *Dreissena polymorpha* transcriptome sheds light on its mitochondrial DNA. *Hydrobiologia* 810, 255–263.
- Sousa, R., Novais, A., Costa, R., Strayer, D.L., 2014. Invasive bivalves in fresh waters: impacts from individuals to ecosystems and possible control strategies. *Hydrobiologia* 735, 233–251. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1409-1>
- Spidle, A.P., May, B., Mills, E.L., 1995. Limits to tolerance of temperature and salinity in the quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 2108–2119. <https://doi.org/10.1139/f95-804>
- Sprung, M., 1995. Physiological energetics of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in lakes I. Growth and reproductive effort. *Hydrobiologia* 304, 117–132.
- Sprung, M., Rose, U., 1988. Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecologia* 77, 526–532.
- Stewart, S.C., Dick, J.T.A., Laming, P.R., Gerhardt, A., 2010. Assessment of the Multispecies Freshwater Biomonitor™ (MFB) in a marine context: the Green crab (*Carcinus maenas*) as an early warning indicator. *J. Environ. Monit.* 12, 1566–1574. <https://doi.org/10.1039/B925474A>
- Stobbe, M.D., Houten, S.M., van Kampen, A.H.C., Wanders, R.J.A., Moerland, P.D., 2012. Improving the description of metabolic networks: the TCA cycle as example. *The FASEB Journal* 26, 3625–3636. <https://doi.org/10.1096/fj.11-203091>
- Stoeckmann, A., 2003. Physiological energetics of Lake Erie dreissenid mussels: a basis for the displacement of *Dreissena polymorpha* by *Dreissena bugensis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60, 126–134. <https://doi.org/10.1139/f03-005>
- Stoeckmann, A.M., Garton, D.W., 2001. Flexible energy allocation in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in response to different environmental conditions. *Journal of*

- the North American Benthological Society 20, 486–500.
<https://doi.org/10.2307/1468043>
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 321–336. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H)
- Storey, K.B., 2005. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons.
- St-Pierre, J., Brand, M.D., Boutilier, R.G., 2000. Mitochondria as ATP consumers: Cellular treason in anoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 8670–8674.
<https://doi.org/10.1073/pnas.140093597>
- Stramma, L., Johnson, G.C., Sprintall, J., Mohrholz, V., 2008. Expanding Oxygen-Minimum Zones in the Tropical Oceans. *Science* 320, 655–658.
<https://doi.org/10.1126/science.1153847>
- Sussarellu, R., Dudognon, T., Fabioux, C., Soudant, P., Moraga, D., Kraffe, E., 2013. Rapid mitochondrial adjustments in response to short-term hypoxia and re-oxygenation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Biology* 216, 1561–1569. <https://doi.org/10.1242/jeb.075879>
- Suzuki, T., Hashimoto, T., Yabu, Y., Kido, Y., Sakamoto, K., Nihei, C., Hato, M., Suzuki, S., Amano, Y., Nagai, K., Hosokawa, T., Minagawa, N., Ohta, N., Kita, K., 2004. Direct evidence for cyanide-insensitive quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: phylogenetic and therapeutic implications. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313, 1044–1052.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.038>

T

- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., Usseglio-Polatera, P., 2000. *Invertébrés d'eau douce - systématique, biologie, écologie* - CNRS Editions.
- Tait, S.W., Green, D.R., 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 621–632.
- Thébault, M.T., Raffin, J.P., Picado, A.M., Mendonça, E., Skorkowski, E.F., Le Gal, Y., 2000. Coordinated Changes of Adenylate Energy Charge and ATP/ADP: Use in Ecotoxicological Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 23–28.
<https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1870>

- Taylor, R.W., Turnbull, D.M., 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics* 6, 389–402. <https://doi.org/10.1038/nrg1606>
- Tourari, A.L., Crochard, C., Pihan, J.C., 1988. Action de la température sur le cycle de reproduction de *Dreissena polymorpha* (Pallas). 18. Etude “*in situ*” et au laboratoire. *Haliotis*, pp. 85–98.
- Tschischka, K., Abele, D., Portner, H.O., 2000. Mitochondrial oxyconformity and cold adaptation in the polychaete *Nereis pelagica* and the bivalve *Arctica islandica* from the Baltic and White Seas. *Journal of Experimental Biology* 203, 3355–3368.
- Tyler, S., Sidell, B.D., 1984. Changes in mitochondrial distribution and diffusion distances in muscle of goldfish upon acclimation to warm and cold temperatures. *Journal of Experimental Zoology* 232, 1–9. <https://doi.org/10.1002/jez.1402320102>

U

- UE, 2018. Directive 2018/229/UE de la Commission du 12 février 2018 établissant, conformément à la directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil, les valeurs pour les classifications du système de contrôle des États membres à la suite de l'exercice d'inter-étalonnage et abrogeant la décision 2013/480/UE de la Commission
- UE, 2013. Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau, *Journal Officiel de l'union Européenne* n° 226 du 24 août 2013.
- UE, 2000. Directive 2000/60/EC du Parlement Européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.

V

- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A.T., Norberg, E., 2017. The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482, 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.088>

- Valette, L., Chandesris, A., Mengin, N., Malavoi, J.R., Souchon, Y., Wasson, J.G., 2008. SYstème Relationnel d'Audit de l'Hydromorphologie des Cours d'Eau SYRAH CE. Principes et méthodes de la sectorisation hydromorphologique 28.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology* 13, 57–149.
- van Haren, R.J.F., Kooijman, S.A.L.M., 1993. Application of a dynamic energy budget model to *Mytilus edulis* (L.). *Netherlands Journal of Sea Research* 31, 119–133. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(93\)90002-A](https://doi.org/10.1016/0077-7579(93)90002-A)
- van Haren, R.J.F., Schepers, H.E., Kooijman, S.A.L.M., 1994. Dynamic energy budgets affect kinetics of xenobiotics in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Chemosphere* 29, 163–189. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)90099-X](https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90099-X)
- van Vliet, M.T.H., Zwolsman, J.J.G., 2008. Impact of summer droughts on the water quality of the Meuse river. *Journal of Hydrology* 353, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.01.001>
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L., 1997. Alternative oxidase: from gene to function. *Annual review of plant biology* 48, 703–734.
- Vanlerberghe, G.C., Ordog, S.H., 2002. Alternative oxidase: integrating carbon metabolism and electron transport in plant respiration, in: *Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism*. Springer, pp. 173–191.
- Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M., 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *PNAS* 105, 15452–15457. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803833105>
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International* 28, 711–717.
- Verslycke, T., Roast, S.D., Widdows, J., Jones, M.B., Janssen, C.R., 2004. Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 306, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.12.022>
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146, 281–300. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011>

- Vihervaara, A., Duarte, F.M., Lis, J.T., 2018. Molecular mechanisms driving transcriptional stress responses. *Nat Rev Genet* 19, 385–397. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0001-6>
- Vignerón, A., 2015. Capacités d'adaptation des populations naturelles à la contamination des milieux aquatiques: cas d'étude du cadmium chez le crustacé *Gammarus fossarum* (PhD Thesis).
- Voets, J., Talloen, W., de Tender, T., van Dongen, S., Covaci, A., Blust, R., Bervoets, L., 2006. Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. *Aquatic Toxicology* 79, 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.001>
- Völkel, S., Grieshaber, M.K., 1996. Mitochondrial sulfide oxidation in *Arenicola marina*. *The FEBS Journal* 235, 231–237.
- Vornanen, M., 1994. Seasonal adaptation of crucian carp (*Carassius carassius* L.) heart: glycogen stores and lactate dehydrogenase activity. *Can. J. Zool.* 72, 433–442. <https://doi.org/10.1139/z94-061>

W

- Walz, N., 1978. The energy balance of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in laboratory experiments and in Lake Constance. I.: Pattern of activity, feeding and assimilation efficiency.
- Wang, Z., Wang, N., Liu, P., Xie, X., 2016. AMPK and Cancer, in: Cordero, M.D., Viollet, B. (eds). *AMP-Activated Protein Kinase*. Springer International Publishing, Cham, pp. 203–226. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43589-3_9
- Weber, A., Jeckel, N., Wagner, M., 2020. Combined effects of polystyrene microplastics and thermal stress on the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Science of The Total Environment* 718, 137253. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137253>
- Westman, W.E., 1977. How Much Are Nature's Services Worth? 197, 5.
- White, J.D., Hamilton, S.K., Sarnelle, O., 2015. Heat-induced mass mortality of invasive zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) at sublethal water temperatures. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 72, 1221–1229. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2015-0064>

- Willer, D., Aldridge, D.C., 2017. Microencapsulated diets to improve bivalve shellfish aquaculture. *Royal Society open science* 4, 171142.
- Winder, W.W., Hardie, D.G., 1999. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol.* 277, E1-10. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.277.1.E1>
- Wisnovsky, S., Lei, E.K., Jean, S.R., Kelley, S.O., 2016. Mitochondrial Chemical Biology: New Probes Elucidate the Secrets of the Powerhouse of the Cell. *Cell Chemical Biology* 23, 917–927. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.06.012>

Y

- Yampolsky, L.Y., Zeng, E., Lopez, J., Williams, P.J., Dick, K.B., Colbourne, J.K., Pfrender, M.E., 2014. Functional genomics of acclimation and adaptation in response to thermal stress in *Daphnia*. *BMC Genomics* 15, 859. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-859>
- Yancheva, V., Mollov, I., Georgieva, E., Stoyanova, S., Tsvetanova, V., Velcheva, I., 2017. Ex situ Effects of Chlorpyrifos on the Lysosomal Membrane Stability and Respiration Rate in Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771).
- Yu, N., Culver, D.A., 1999. In situ survival and growth of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) under chronic hypoxia in a stratified lake. *Hydrobiologia* 392, 205–215.
- Yusseppone, M.S., Rocchetta, I., Sabatini, S.E., Luquet, C.M., Ríos de Molina, M. del C., Held, C., Abele, D., 2018. Inducing the Alternative Oxidase Forms Part of the Molecular Strategy of Anoxic Survival in Freshwater Bivalves. *Front. Physiol.* 9, 100. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00100>

Z

- Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2006. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquatic Toxicology* 78, S109–S116. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.032>

Annexes

Annexe I : Energy allocation in two dreissenid species under metal stress

Environmental Pollution, 245 (2019) 889-897

Fanny Louis^{1,2*}, Simon Devin², Laure Giambérini², Marine Potet², Elise David¹, Sandrine Pain-Devin²

¹ Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR 02 SEBIO (Stress environnementaux et biosurveillance des milieux aquatiques), Reims, France

² Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France

Keywords: *Dreissena* spp.; metal; biomarkers; Scope For Growth

Highlights:

- Sub-cellular biomarker responses and scope for growth measurements show variations after a metal stress on *D. polymorpha*
- No variation at the sub-cellular and individual levels was highlighted for *D. r. bugensis*
- The two dreissenids displayed different strategies concerning their metabolic trade-offs

Abstract: Measurements of biological responses on living organisms are essential in aquatic biomonitoring. In freshwaters, *Dreissena polymorpha* is an invasive bivalve commonly used in ecotoxicological studies and considered as a model organism. However, *D. polymorpha* abundances are declining while another species colonizes most of the freshwaters: *Dreissena rostriformis bugensis*. This species has already been studied in ecophysiology but there is still a lack of data concerning its responses to stressors before its use as a bioindicator of environmental pollution. This study aims to compare the responses of the two species exposed to metal stress. Responses at different levels of biological organization were targeted with measurement of sub-cellular and individual biomarkers following an exposure of up to 7 days to cadmium at 10 µg.L⁻¹. At the individual level, the scope for growth (SFG) was measured. It corresponds to the energy allocated to growth and reproduction. *D. polymorpha* exhibits variations in biomarker measurements as well as in the SFG in presence of Cd. *D. r. bugensis* shows no variation in its responses at the different targeted levels. According to the present results, energy metabolism seems to have an essential role for these species when facing a metal stress. Different energy allocation strategies were evidenced between the two species, although the link with biochemical biomarkers is more evident for *D. polymorpha* than for *D. r. bugensis*.

Capsule: Different energy allocation strategies were highlighted between the two dreissenid species after a 7 days cadmium exposure.

*Corresponding author: Fanny LOUIS, fanny.louis@univ-reims.fr

SEBIO, UFR SEN, Campus Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims cedex 2, France

1. Introduction

The European Water Framework Directive adopted in 2000 aims to reduce major hazardous substance concentrations to their natural background levels in aquatic systems and to reach “good status” objectives for water bodies (DC 2000/60/CE, 2000). In addition to the physicochemical characterization of the media, the biomonitoring of water bodies includes biological tests to assess the health status of organisms (DC 2008/105/CE, 2008). These tests can be based on biomarker measurements. Biomarker analysis has been a popular method in biomonitoring for the last twenty years (Roméo and Giamberini, 2008). Several definitions have been proposed to define the term “biomarkers”. According to Depledge (1993), a biomarker is a biochemical, cellular, physiological or behavioral change that can be measured in all or part of an organism and that highlights a previous exposure to one or more chemical pollutants. Progress in biochemistry and molecular toxicology has brought a better knowledge about pollutants and their effects on organisms, leading to the development of biomarkers as indicators of biological status (condition) of an organism. Indeed, some recognized biomarkers (Core biomarkers) were validated and their use has become common in aquatic ecotoxicology (Roméo and Giambérini, 2008). The assessment of the health status of organisms is mainly carried out on species considered as models in ecotoxicology. Often considered as key species, model species present a number of criteria making them eligible for this status (Connell et al., 1999). They must be representative of their environment and sedentary, with a wide range of repartition. In addition, model species must be in contact with contaminants and react to their presence without suffering from lethal effects. Substantial knowledge and relevant data concerning these species are therefore necessary to be able to compare the responses obtained following exposure to a contaminant with a known baseline level (Kerambrun et al., 2016; Pain-Devin et al., 2014).

Dreissena polymorpha (Pallas, 1771) and *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) are two freshwater invasive bivalve species of the Northern hemisphere. The zebra mussel, *D. polymorpha*, native to the Ponto-Caspian region, spread in western Europe during the 18^e century (Karatayev et al., 2013). Because of its biological characteristics (abundance, wide geographical distribution and high filtration activity), *D. polymorpha* is used as a model species for freshwater biomonitoring (de Lafontaine et al., 2000; Faria et al., 2011, 2009; Kerambrun et al., 2016; Pain et al., 2007; Palais et al., 2011). *D. polymorpha* is recognized for its responses to contaminants, especially to metal contamination (Marie et al., 2006). However, in Europe, its abundance has decreased over the years and this species has been gradually replaced by a sister species, *D. r. bugensis* in many areas. The expansion of *D. r. bugensis*, also known as the quagga mussel, began in the 1940s from the north of the Black Sea in Ukraine. After its first discovery in Eastern Europe its expansion in the continental waters of Western Europe was rapid and was associated with the occurrence of high numbers, sometimes in very dense populations (bij de Vaate et al., 2002; Molloy et al., 2007). These two species

of bivalves have similar characteristics in their life cycle, but differ in their morphology, their population dynamics and their growth (Karatayev et al., 2013). Moreover, *D. r. bugensis* presents different tolerance ranges from *D. polymorpha* for salinity, temperature or depth. *D. r. bugensis* also has higher assimilation rates and loses less energy for its respiration than *D. polymorpha* (Baldwin et al., 2002; bij de Vaate et al., 2002). The two species have different physiological characteristics, but responses to contamination are still poorly characterized for *D. r. bugensis* (Boeckman and Bidwell, 2014). Only a few studies are available on *D. r. bugensis* and on both species in terms of response comparison (Evariste et al., 2018; Farkas et al., 2017; Kerambrun et al., 2018; Potet et al., 2018, 2016; Schäfer et al., 2012). Schäfer et al. (2012) highlighted dissimilar biochemical responses after an exposure to resuspended sediments contaminated with persistent organic pollutants. The same observation was noticed after an exposure to nickel and chromium that leads to divergent sub-cellular responses (Potet et al., 2018, 2016). *D. polymorpha* would be more tolerant than *D. r. bugensis* to contamination, thanks to a higher activity of defense mechanisms. *D. r. bugensis* seems to have a faster growth (Karatayev et al., 2013) and an earlier and more efficient reproduction than *D. polymorpha* (Ram et al., 2012), but has low ability to activate its defense mechanisms in the presence of a contamination. The energy metabolism regulation and processes of energy allocation that will ensure individual survival and population maintenance thus deserve to be compared between the two species.

The energy budget of an organism is dedicated to maintenance, growth and reproduction. In general, bivalves allocate most of their energy to gamete production and their net growth cannot be monitored because of the shell (Widdows, 1985). Thus, direct measurement of growth and reproduction is particularly difficult for bivalve species. However, Bayne and Worrall (1980) have shown a correlation between growth estimations and size measurement of organisms based on energy budget. Among available models for determining the energy budget of organisms, one of the most studied is the scope for growth (SFG). Scope for growth corresponds to the energy allocation to growth and reproduction of an organism (Smolders et al., 2002; Widdows, 1985; Widdows et al., 1990). It is a major feature of the physiological fitness of living beings (Scarlet et al., 2015; Smolders et al., 2002; Stoeckmann, 2003; Widdows, 1985; Widdows and Johnson 1988; Widdows et al., 1990). Since it allows an immediate measurement of energetic status, SFG assessment, rather than organism growth *per se*, provides early observations of potential impacts of pollution (Widdows, 1985). Thus, variations in SFG from a baseline level can be recorded under different environmental conditions, and provide information about organism capacity to manage these conditions. For example, it has been shown that a temperature increase is associated with a decrease in energy allocated to growth and reproduction in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Verslycke et al., 2004). In addition, some pollutants, like the pesticide chlorpyrifos, induce an increase in oxygen consumption and therefore a decrease in energy allocation to growth and reproduction in *Neomysis integer* (Roast et al., 1999). SFG can thus be considered as a highly integrative and ecologically relevant pollution biomarker,

representing a tool for environmental biomonitoring (Widdows and Johnson, 1988). The damage caused by contaminants in an organism can be observed in the short term at the sub-individual level and can be spread in the long term, at higher levels of biological organization such as individual or population levels (Smolders et al., 2002; Vasseur and Cossu-Leguille, 2003). Hence, studying the effect of a contaminant at several biological levels at once could enable the claiming for ecological relevance that has become an essential criterion in aquatic biomonitoring (Solomon et al., 2008).

Cadmium (Cd) is a metal occurring in the environment from natural processes and anthropogenic activities (Gómez-Mendikute and Cajaraville, 2003; Simpson, 1981). Cadmium is one of the four priority metals under the WFD and its environmental quality standard (EQS-Annual average concentration) in freshwater is $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (CD 2013/39/UE, 2013). However, cadmium concentrations in water can reach or exceed $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ around zinc ore processing plants notably with metallurgy industry (Andres and Ribeyre, 2000; Martin-Garin and Simon, 2004). This metal is known to have toxic effects on aquatic organisms (Anderson, 1993). Several authors highlighted the negative impact of cadmium on energy metabolism in multiple bivalve species (Ivanina et al., 2010; Lannig et al., 2006; Sokolova et al., 2004). As filter feeders, *D. polymorpha* and *D. r. bugensis* can accumulate a large amount of metal in their soft tissues (Kraak et al., 1991; Marie et al., 2006). Although there are many studies on the effect of cadmium on bivalves, none describes the impact of this metal on several levels of biological organization of both dreissenid species. The concentration of $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ was chosen after a previous experiment in which a quick responses variation was visible without lethal effect on organisms.

In this study, sub-individual and individual levels of organization were targeted in the two dreissenid species in order to assess the early effects of a metallic contamination and its impact at a population level that may reflect delayed effects over time. Different parameters were monitored during an intermediate period of exposure (7 days) to observe the early and medium-term responses of organisms. We thus decided to monitor both the general metabolic status (SFG) and biochemical biomarkers (relative to antioxidant defenses, cellular energy metabolism and cell damage) to check whether organisms were able to compensate at the individual level the potential effects observed at the sub-individual level (Amiard and Amiard-Triquet, 2008; Potet et al., 2016, 2018; Schäfer et al., 2012). These responses were measured in both species, exposed or not to Cd at $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ between 0 and 7 days of exposure, to ultimately determine (1) if the two species use the same energy allocation strategies under stress conditions and (2) if we can record a biological response to contamination in *D. r. bugensis* to use it as a model species in biomonitoring.

2. Materials and methods

2.1 Organism collection

Specimens of both species *D. polymorpha* and *D. r. bugensis* were collected by divers at the same location in the Moselle River (Montigny-lès-Metz, France, E06°09'46'' N49°06'37'') in May 2017. Metal concentrations contained in sediments are presented in table 1. Only organisms with a length of 16±2 mm were selected and quickly transported to the laboratory in field water. Individuals

Metal	Al	As	Cd	Cr	Co	Cu	Fe	Mn	Hg	Ni	Pb	Zn
µg.kg ⁻¹ of dry matter	36600	8.4	0.1	84.5	3.1	14.4	18350	483.1	0.01	9	33.9	35.6

from
the
two
species

were differentiated according to morphometric parameters (Pavlova and Izyumov, 2014).

Table 1. Metals concentrations measured in the sampling site sediments

2.2 Acclimation

Organisms were acclimated for 72 h at the field temperature (15 °C). For each species, 160 individuals were placed in two separate 4.5 L aquaria under a natural photoperiod and water was continuously aerated. Water from the field was progressively replaced by spring water (Cristaline®, source Aurèle, 1/3 per day). After 72 h, individuals of each species were placed in 600mL experimental beakers (5 individuals of the same species per beaker) to allow byssal fixation. Beakers were filled with 500 mL of Cristaline® and kept in a water bath to maintain a 15 °C temperature, under natural photoperiod.

2.3 Exposure design

After acclimation, mussels were exposed for 7 days to 10 µg.L⁻¹ of Cd or kept in spring water (control: only water). SFG measurements were performed on 5 replicates (i.e beakers) containing 5 individuals each, while biochemical biomarkers were measured on each individual (n=15) exposed in independent devices. Cadmium chloride (CdCl₂-H₂O; ref 45-23/25-33) was purchased from Sigma-Aldrich. Stock solution of Cd (10 mg.L⁻¹, expressed as total ion concentration) was prepared and acidified to 1 % with nitric acid. All media were prepared with Cristaline® water and beakers were filled with 500 mL of Cd 10 µg.L⁻¹ solution or only water for controls. Media were renewed every 48 h to avoid anoxia. After each renewal, organisms were fed with 15000 cells.mL⁻¹ of fresh algae (*Chlorella vulgaris*). Cadmium was measured in contaminated media and the actual concentration varied between 6.3 µg.L⁻¹ and 10.1 µg.L⁻¹ along the experiment (Supplementary data I).

For each SFG endpoint measurement (day 0 and 7), parameters had to be monitored over a period of 90 min in all media (control and exposed conditions). In order to compare our results, we applied the same protocol for organisms dedicated to biomarker measurements. At day 0, mussels

were also dissected and digestive glands were frozen at -80 °C after 90 min of exposure for control and exposed organisms.

2.4 SFG measurements

SFG measurements were performed according to the protocol established by Widdows and Johnson (1988) and redesigned by Mubiana and Blust (2007). SFG calculation is described as follow:

$$\text{SFG} = \text{AE} - (\text{RE} + \text{EE})$$

AE: Absorbed Energy

RE: Respired Energy

EE: Excreted Energy

SFG calculation is based on two experiments measuring (1) respired energy (RE) and (2) absorbed and excreted energies (AE and EE).

2.4.1 Measurement principles

(1) The measurement of the energy lost by breathing is based on the monitoring of the oxygen concentration in the medium. Organisms' respiration is assessed by a decrease of this concentration.

(2) Measurement of absorbed energy is based on the decline of the algal concentration in the medium. This decline reflects the assimilation of algae by the organisms and therefore the energy absorbed from algae calorific potential. For the excreted energy, we measured NH_4 produced in the medium since it is the main component of the organisms' metabolic waste.

2.4.2 Measurement protocols

(1) In order to evaluate the effect of cadmium exposure, two measures were done for control and cadmium exposed organisms: one after a short term exposure (90 min), called day 0 and a second one at the end of the 7 days exposure, called day 7. For each measurement, an oxygen sensor (Odeon®) was placed in each beaker a few centimeters below the surface, not in contact with the organisms. Oxygen consumption monitoring started 30 min after the installation of the sensor to allow potentially disturbed individuals to reopen and resume their filtration activity. The oxygen consumption was recorded for 90 min. After seven days of exposure, organisms were dissected and the soft tissues were dried for 72 h at 60 °C. The dry weight (DW) was then measured and used to calculate the energy lost by breathing (equation 1).

Equation 1: $\text{RE} (\text{J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \text{respiration rate} (\text{mg O}_2 \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \times 13.98^1 (\text{J} \cdot \text{mg}^{-1} \text{O}_2)$

¹ Conversion factor (Elliott and Davison, 1975)

Preliminary tests were done in order to use open beakers and closed ones. There was no difference after 4 hours of oxygen monitoring between open and closed beakers. Measurements were also

performed on beakers without organisms in 5 replicates in order to confirm that there was no oxygen supply.

(2) Absorbed and excreted energy measurements were conducted within the same experiment. In order to measure the amount of algae filtered by the organisms, 15000 cells.mL⁻¹ were added in each beaker after renewal. A volume of 1mL of medium (3 replicates per beaker) was sampled 5 min (C1) and 90 min (C2) after algae addition. In order to determine the algal concentration, the medium samples were analyzed by flow cytometry (BD Accuri® C6). In addition, 10 mL of medium collected at the beginning and at the end of the exposure were then filtered (0.045µm) to assess NH₄ concentration. Ammonia measurements were spectrophotometrically made by colorimetry according to the method of Solorzano (1969). At the end of the exposure period, the organisms were dissected and dried for 72 h at 60 °C before dry weight measurements. The data collected through these experiments allowed calculation of the Clearance Rate (CR, equation 2), that describes the variation of algae concentration in the medium. This CR was then used to calculate the Absorbed Energy (AE, equation 3), while NH₄ production rate allowed the calculation of Excreted Energy (equation 4).

Equation 2: $CR (J.g^{-1}.h^{-1}) = [Volume (L) \times (\log C1 - \log C2)] / (DW (g) \times time (h))$

Equation 3: $AE (J.g^{-1}.h^{-1}) = CR (L.g^{-1}.h^{-1}) \times POM \times algae\ energy\ intake^2 (J. mg^{-1}) \times absorption\ rate^3$

With:

CR: Clearance Rate

C1: initial algae concentration (mg.L⁻¹)

C2: final algae concentration (mg.L⁻¹)

POM: Particulate Organic Matter; injected algae concentration (mg.L⁻¹)

² Value provided by fresh algae producer (Terramer®; 0.8795 J. mg⁻¹)

³ Absorption rate : 63% for zebra mussel and 81% for quagga mussel (Baldwin et al., 2002).

Equation 4: $EE (J.g^{-1}.h^{-1}) = NH_4 (mg.g^{-1}.h^{-1}) \times 19.4^4 (J.mg^{-1} NH_4)$

⁴ Conversion factor (Widdows and Johnson, 1988)

The absence of body weight loss during the experiment has been confirmed by keeping organisms for 7 days in the same conditions as described previously. At day 0 and 7, organisms were dissected and dried for 72h at 60°C before dry weight measurements.

2.5 Biomarker measurements

At day 0 and day 7, all individuals used for biomarker measurements (15 per condition for each species) were dissected and mussels' digestive glands were frozen at -80 °C until being processed. The set of biomarkers was measured in each mussel individually, according to Garaud et al. (2016) and Potet et al. (2016).

Briefly, the digestive glands were weighed and crushed in homogenization buffer containing protease inhibitors (Phenylmethylsulfonyl fluoride and L-serineborate) at a 4/1 (v/w) ratio. Samples then underwent a first centrifugation (250 g, 4 °C, 5 min) and a part of the supernatant was collected (crude extract) for a first set of biomarker measurements: triglyceride (Tri), cholesterol (Chol), lipid peroxide concentration (LOOH), electron transport system (ETS) and acid phosphatase (ACP) activities. Two other centrifugations were performed on the remaining supernatant to obtain the cytosolic fraction (1000 g, 4 °C, 20 min and 20000 g, 4 °C, 50 min). A second set of biomarkers was measured on the cytosolic fraction: total antioxidant capacity (TAC), glutathione-S-transferase (GST), lactate dehydrogenase (LDH) and caspase-3 (CSP3) activities. Proteins were quantified on both fractions (crude extract and cytosolic fraction). The biomarker assays were performed with an automated spectrometer (Konelab 20-XTi, ThermoScientific) and with a spectrofluorimeter (SAFAS, Xenius).

2.6 Statistical analysis

Biomarker responses and SFG results were first analyzed separately by a three-way Anova to assess time, concentration and/or species effects. Biomarkers were then processed by an Anova test followed by a t-test to assess differences between species and conditions. When necessary, post-hoc t-tests were performed, and p values obtained were adjusted for multiple comparisons by the Benjamini and Hochberg correction method. In order to see if organisms are trying to keep their SFG in balance, SFG results were compared to a standard ($\mu=0$) that represents an equilibrium between energy absorbed and energy loss, either by excretion or respiration. Previously, normality and homoscedasticity of the data were tested with Shapiro and Bartlett tests respectively. A Principal Component Analysis (PCA) was performed on the different energy parameters in order to see the importance of each parameter in the SFG evaluation. A global analysis of biomarker results was also performed with a Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) to identify the overall capacity of biomarkers to discriminate experimental groups and to define the most relevant biomarkers among the battery. Relevance of biomarker responses was based on the individual role of each biomarker in the overall model, estimated by the VIP (Variable Importance in the Projection). Only biomarkers with a $VIP > 0.8$ were considered significant in the models. The relevance of the structure identified following PLS-DA was assessed by comparing our model to a null model generated by 999 random permutations of our dataset.

A threshold of $p \leq 0.05$ was considered significant. Statistical analyzes were performed using R software (R Development Core Team, 3.4.0).

3. Results

3.1 Individual level: SFG measurements

All SFG values calculated are negative (inverse ordinate scale) for both species (Fig 1). For *D. r. bugensis*, the SFG values obtained at day 0 and day 7 are not different between control organisms and those exposed to Cd. For *D. polymorpha*, although it is not significant, the SFG value is lower ($-91 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) in exposed organisms than in controls ($-41 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) at day 0, whereas at day 7 it is higher in exposed organisms ($-66 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) than in controls ($-118 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). However, a significant difference is observed between control organisms at day 0 ($-41 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and day 7 for *D. polymorpha*. Finally, SFG results are not significantly different between both species, except for the control batches at day 7. Even if not significant, we can note that SFG values are always lower in *D. polymorpha* than in *D. r. bugensis*.

The results were compared to a standard which is equal to 0 (student test, $\mu=0$) in order to see if an equilibrium between energy absorbed and energy loss was maintained (Table 2). SFG values obtained for *D. polymorpha* are all different from 0 except for the control organisms at day 7. In *D. r. bugensis*, no SFG value is different from 0 except for control organisms at day 0.

All energy parameters measured are presented in table 3.

Absorbed energy is higher in exposed organisms than in controls for *D. polymorpha*. In contrast for *D. r. bugensis*, absorbed and lost energies decrease between day 0 and day 7 for control and exposed organisms (Figure 2a). Axes representing absorbed and respired energies in the correlation circle (Figure 2b) are perpendicular. Therefore, the two variables (AE and RE) are independent from each other.

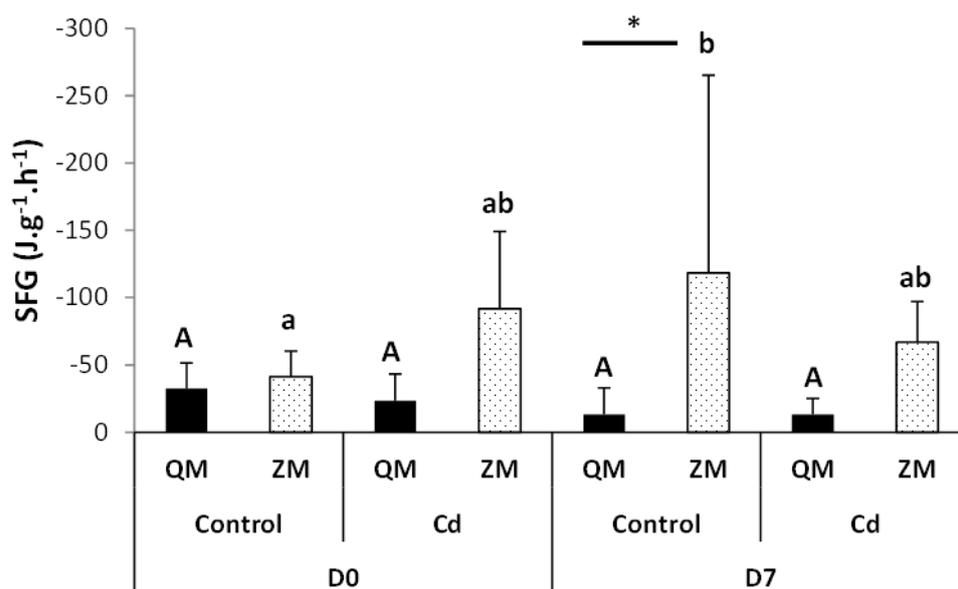
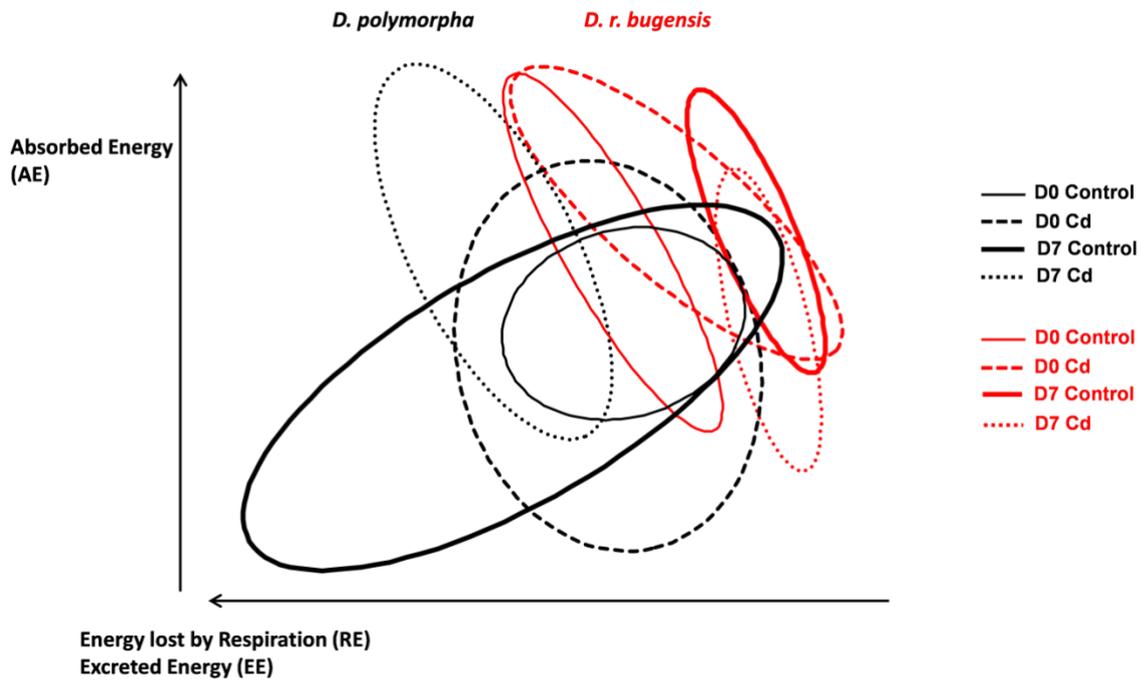


Figure 1. Mean (\pm SD) of SFG values obtained in both species. The ordinate scale is inverted (negative values). The asterisks indicate significant interspecies differences. The lowercase and uppercase letters indicate significant differences between conditions for *D. polymorpha* (ZM) and *D. r. bugensis* (QM) respectively. A t-test, a 2-factor ANOVA and a Kruskal Wallis test were performed on results.

A



B

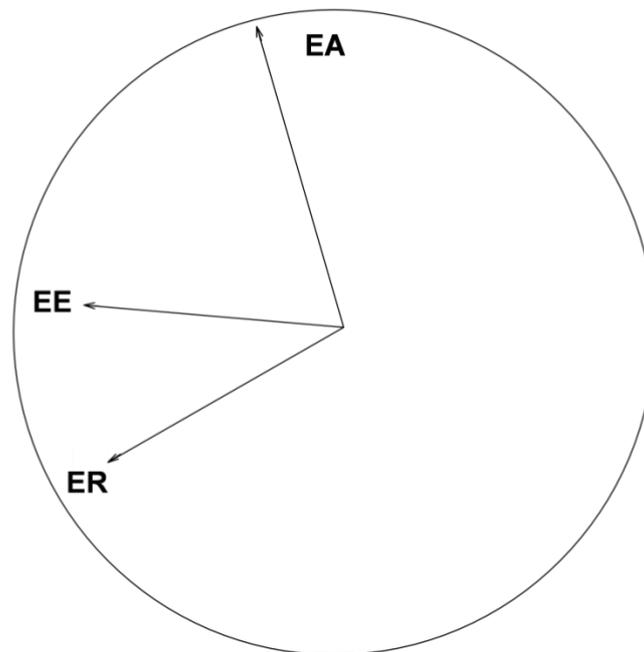


Figure 2. (A) Principal component analysis (PCA) of measured energy parameters at day 0 (D0) and day 7 (D7) for *D. polymorpha* and *D. r. bugensis* exposed to Cd at $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and for the controls. The F1-F2 axes represent 39.93% and 33.84% of the total variance of the data set. (B) Correlation circle associated to the principal component analysis.

Table 2. Student test (comparison of SFG obtained in each condition to a standard $\mu=0$) for *D. polymorpha* (ZM) and *D. r. bugensis* (QM).

Day	Species	Treatment	P value
0	QM	control	0.02
		Cd	0.05
	ZM	control	<0.01
		Cd	0.02
7	QM	control	0.21
		Cd	0.07
	ZM	control	0.14
		Cd	<0.01

Table 3. Energetic parameters ($J.g^{-1}.h^{-1}$) used to calculate the SFG at Day 0 and Day 7 for *D. polymorpha* (ZM) and *D. r. bugensis* (QM) exposed to Cd at $10\mu g.L^{-1}$ and for the controls.

Day	Species	Treatment	AE	EE	RE
0	QM	control	15.26	0.74	46.92
		Cd	18.33	0.48	41.46
	ZM	control	10.22	0.75	50.81
		Cd	11.24	0.54	102.41
7	QM	control	16.67	0.25	29.58
		Cd	9.51	0.34	22.22
	ZM	control	9.92	0.8	128.58
		Cd	16.99	0.99	82.9

3.2 Sub-individual level: biomarker measurements

3.2.1 Biomarker responses

Detailed biomarker responses are presented in table 4.

For *D. polymorpha*, biomarker results analyzed individually (see Table IV for mean and standard deviation values, Table 5 for statistics) show that protein concentrations in the crude extract are significantly lower ($p < 0.05$) on day 0 in exposed organisms compared to controls and also between day 0 and 7 in non-exposed organisms. Although there is no significant difference, ETS and CSP3 activities are higher in exposed organisms at day 7. No difference is highlighted for the other biomarkers neither between each condition nor between times of exposure.

For *D. r. bugensis*, acid phosphatase (ACP) activities significantly decreased between day 0 and 7 (controls and exposed) ($p < 0.01$). The same differences are observed for protein concentrations in the cytosolic fraction ($p < 0.01$) and in the crude extract ($p < 0.05$). No difference is highlighted for the other biomarkers neither between each condition nor between exposure times.

Table 4. *D. polymorpha* (ZM) and *D. r. bugensis* (QM) biomarker responses after 90 min (Day 0) and 7 days (Day 7) of exposure to cadmium. Data are expressed as mean \pm SD (n=15). Different letters (lower case for ZM and upper case for QM) indicate significant differences for each species ($p < 0.05$). No letter means no difference between conditions. Values with an asterisk present a significant interspecies difference ($p < 0.05$) for the same condition. Abbreviations: Tri (triglyceride), Chol (cholesterol), ETS (electron transport system), LOOH (lipid hydroperoxide), ACP (acid phosphatase), GST (glutathione-S-transferase), TAC (total antioxidant capacity), LDH (lactate dehydrogenase), CSP3 (caspase-3), Prot CF (proteins on cytosolic fraction), Prot CE (proteins on crude extract).

Day	Treatment	Species	Tri (mg.gFW ⁻¹)	Chol (mg.gFW ⁻¹)	ETS ($\mu\text{molO}_2\text{.gProt}^{-1}\text{.h}^{-1}$)	LOOH ($\mu\text{molTBH.gProt}^{-1}$)	ACP ($\mu\text{mol.gProt}^{-1}\text{.h}^{-1}$)	GST ($\mu\text{molCDNB.gProt}^{-1}\text{.min}^{-1}$)	TAC ($\mu\text{molTeq.gProt}^{-1}\text{.min}^{-1}$)	LDH ($\mu\text{molNADH.gProt}^{-1}\text{.h}^{-1}$)	CPS3 ($\mu\text{molpNA.gProt}^{-1}\text{.h}^{-1}$)	Prot CF (mg.gFW ⁻¹)	Prot CE (mg.gFW ⁻¹)	
0	Control	QM	24.57 \pm 6.38	1.96 \pm 0.30	0.68* \pm 0.34	44.82 \pm 29.68	71.34 ^{A,D} \pm 11.25	297.3 \pm 75.79	15.05* \pm 3.74	147.54 \pm 52.07	2.21 \pm 1.94	40.70 ^A \pm 7.14	60.14 ^A \pm 9.83	
		ZM	20.16 \pm 8.92	1.99 \pm 0.41	1.14* \pm 0.50	28.95 \pm 32.26	65.86 \pm 11.14	343.23 ^a \pm 174.11	21.62* \pm 7.50	139.5 \pm 45.94	6.2 \pm 9.24	40.45 \pm 7.59	65.23 ^a \pm 8.51	
	Cd	QM	25.47 \pm 3.47	2.01 \pm 0.37	0.64* \pm 0.22	51.03 \pm 34.66	74.65 ^{A,C} \pm 16.90	300.12 \pm 72.22	15.61 \pm 5.08	150.91 \pm 56.57	2.13 \pm 1.05	30.48 ^B \pm 6.62	50.24 ^{A,B} \pm 10.97	
		ZM	21.84 \pm 5.92	1.91 \pm 0.32	1.24* \pm 0.57	38.07 \pm 29.80	67.8 \pm 11.46	227.24 ^b \pm 79.50	21.46 \pm 5.17	129.62 \pm 30.74	4.86 \pm 2.18	35.14 \pm 7.36	54.95 ^b \pm 11.33	
	7	Control	QM	26.66* \pm 2.69	1.93 \pm 0.44	0.49* \pm 0.15	80.35* \pm 44.59	55.67 ^{B,C} \pm 8.28	345.17 \pm 85.35	16.75* \pm 7.33	163.27 \pm 43.91	1.24* \pm 0.54	31.43 ^B \pm 6.95	50.03 ^B \pm 8.16
			ZM	20.61* \pm 5.99	1.86 \pm 0.36	1.46* \pm 0.59	31.04* \pm 27.64	60.39 \pm 8.18	284.46 ^{ab} \pm 98.95	24.13* \pm 5.91	149.49 \pm 39.69	7.39* \pm 6.20	33.83 \pm 7.69	50.59 ^b \pm 7.78
Cd		QM	25.17* \pm 4.07	1.82 \pm 0.25	0.53* \pm 0.15	64.15 \pm 29.68	60.43 ^{B,D} \pm 5.85	282.41 \pm 51.36	19.54 \pm 3.87	141.18 \pm 39.80	2.36* \pm 2.90	32.1 ^B \pm 3.85	52.7 ^{A,B} \pm 4.26	
		ZM	19.73* \pm 3.39	1.85 \pm 0.24	1.44* \pm 0.43	39.01 \pm 32.26	64.25 \pm 9.59	350.12 ^a \pm 99.12	21.76 \pm 3.92	145.55 \pm 36.47	10.21* \pm 10.06	29.06 \pm 5.29	51.53 ^{ab} \pm 7.83	

Table 5. F and p values for ANOVA 3 factors; time, concentration and species effects performed on biomarker responses for *D. polymorpha* (ZM) and *D. r. bugensis* (QM). In bold: p values ≤ 0.05 .

	Time		Concentration		Species		Residuals
	F	P	F	P	F	p	
Tri	0.001	0.97	0.003	0.96	23.98	<0.01	29.82
Chol	2.62	0.11	0.37	0.54	0.14	0.71	30.44
ETS	0.61	0.44	0.08	0.78	99.27	<0.01	0.16
LOOH	3.90	0.05	0.07	0.79	15.59	<0.01	1282.8
ACP	24.44	<0.01	3.10	0.08	0.23	0.63	116.6
GST	1.73	0.19	2.36	0.13	0.08	0.78	9642
TAC	4.41	0.03	0.04	0.84	30.13	<0.01	30.23
LDH	0.99	0.32	1.03	0.31	1.46	0.23	1923.2
CSP3	2.07	0.15	0.39	0.53	26.40	<0.01	30.44
Prot CE	15.88	<0.01	6.58	0.01	2.03	0.16	78.04
Prot CF	17.40	<0.01	16.19	<0.01	0.59	0.44	44.58

Interspecific differences are observed at day 0 for only two biomarkers, ETS and TAC, with lower values for *D. r. bugensis*, which is maintained at day 7. In addition, at day 7, we can also notice higher levels of LOOH for *D. r. bugensis* in the control condition, and lower values of caspase activities in this species compared to *D. polymorpha*, in both exposure conditions. To summarize, *D. polymorpha* seems to have a more active cellular metabolism, with stronger defense mechanisms as well as greater apoptotic activity and lower cellular damage while *D. r. bugensis* has more energetic reserves. No interspecific difference was noticed for the 7 other biomarkers.

3.2.2 Global analysis

The PLS-DA model built explained 45.6% of between-site variance with the two first axis. The identified structure identified was tested against a null model and is significant ($p=0.001$, 999 permutations), and lead to a mean classification error rate of 59.1%. PLS-DA allowed us to identify the overall capacity of biomarker responses to discriminate experimental groups and to define the most discriminant biomarkers among the battery. According to the results (Fig 3), the primary axis is mainly characterized by defense mechanisms (TAC, CSP3) and energy metabolism (ETS) on the left side, and energy reserves (Tri) and cellular damage (LOOH) on the right side. The secondary axis is mainly characterized by protein concentrations in the crude and cytosolic extracts. The two species are separated along the primary axis while responses between day 0 and day 7 are separated along the secondary axis. In fact, responses obtained for *D. polymorpha* are on the left of the primary axis while those obtained for *D. r. bugensis* are on the right (potential species effect). At day 0, *D. polymorpha* responses are predominantly characterized by high protein content and active defense mechanisms supported by strong metabolic activity. At the end of exposure, defense and energy mechanisms are

still able to characterize *D. polymorpha* responses whereas the protein concentration decreases. Concerning *D. r. bugensis* responses, at day 0, they are not only defined by a high protein concentration, like *D. polymorpha*, but also by high energy reserves.

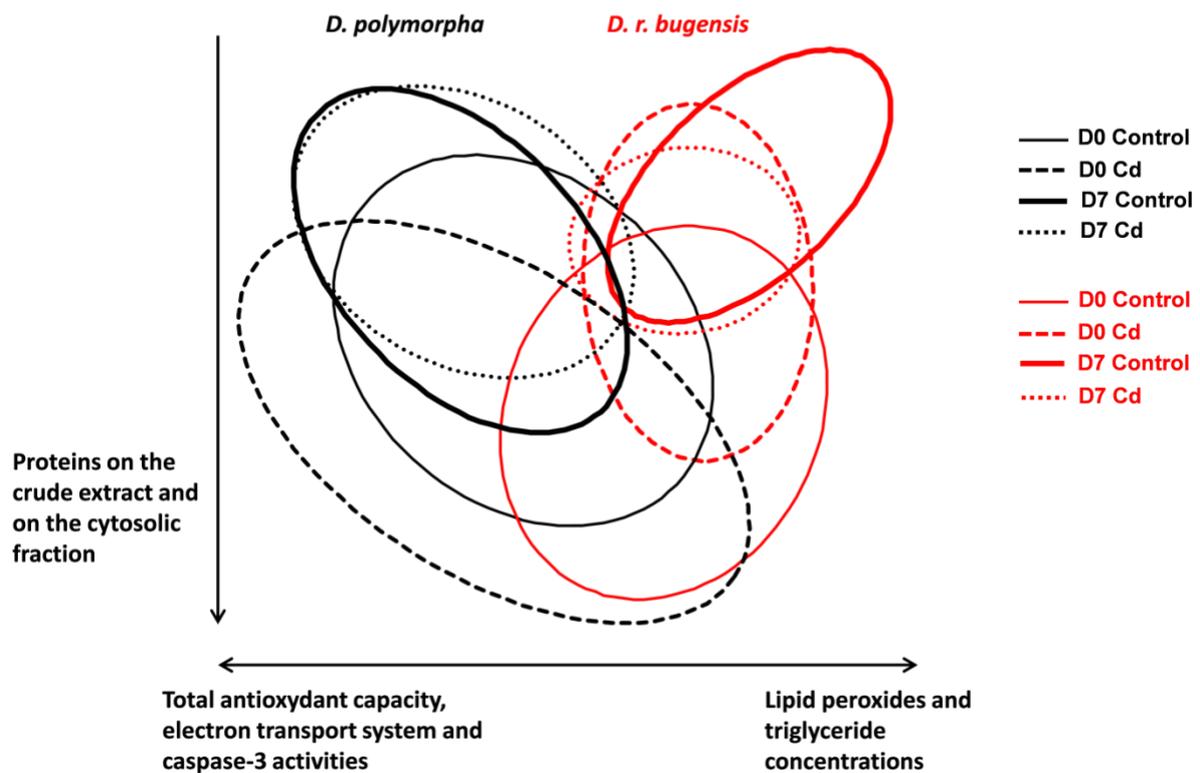


Figure 3. Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) representing biomarker responses at day 0 (D0) and day 7 (D7) for *D. polymorpha* and *D. r. bugensis* exposed to Cd at $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and for the controls. The F1-F2 axes represent 26.5% and 19.1% of the total variance of the data set.

4. Discussion

To the best of our knowledge, we present for the first time a study dealing with energy metabolism at the sub-cellular and individual levels in two freshwater dreissenid species under metal stress. Our results highlighted here a differential response between *D. polymorpha* and *D. r. bugensis*. At the sub-individual level, energetic reserves (Tri) and cellular damage (LOOH) were higher in *D. r. bugensis* for each condition at each collecting point. Conversely, some biomarkers (ETS, TAC and CPS3) were higher in *D. polymorpha*. Other studies also noted the occurrence of different patterns of response between both species. Schäfer et al. (2012) showed enhanced defense mechanisms and less DNA damage in *D. polymorpha* compared to *D. r. bugensis* after an exposure to contaminated sediments. In addition, the same kind of conclusion was drawn by Potet et al. (2016) following an exposure to chromium and nickel at different temperatures. Indeed, metabolic activities, including defense mechanisms (TAC, CSP3) and energy metabolism (ETS) increased upon exposure for *D. polymorpha* whereas higher cellular damage and energy reserves were noticed for *D. r. bugensis*.

Despite different biomarker responses between the two species, no significant effect of cadmium was evidenced. The absence of Cd effect at the chosen concentration ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) has already been observed in other studies on *D. polymorpha*. After exposing hemocytes *ex vivo* to Cd at this range of concentration, no effect was observed on immunomarkers (Evariste et al., 2017). However, several other groups observed a Cd effect at low concentrations. A decrease in filtration rate from $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ of Cd (Kraak et al., 1999) and change of lysosomal system morphology after Cd exposure at $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Giambérini and Cajaraville, 2005) were observed. The absence of cadmium effect observed here could be explained by the period during which the experiment was run. Indeed, the organisms were collected during the breeding season and at this time biomarker levels are very variable because of inter-individual differences in reproductive status. Seasonal variations in biomarker values have been shown for both species. Farkas et al. (2017) assessed different biomarkers (lipid peroxidation, metallothionein concentration, DNA strand breaks and vitellogenin-like proteins) on several dreissenid populations subject to a pollution gradient. A significant difference was observed for MT, DNA strand breaks and vitellogenin-like proteins concentrations between June and October for both dreissenid species from the same location. Different parameters, such as seasonality, reproduction status or food availability can be considered as confounding factors (Faria et al., 2014; Viarengo et al., 2007) and make sometimes difficult to link biomarker alterations and health status of model species (Minguez et al., 2009; Pain-Devin et al., 2014).

One goal of this study was also to link sub-cellular responses of organisms with their energy metabolism using the SFG measurement. Negative SFG values were obtained in both species. Since the organisms were harvested during breeding season, gonads were mature and individual growth was reduced (Sprung, 1995). Negative SFG values reflect energy reallocation to other mechanisms.

Negative SFG values have already been reported following exposure to different environmental factors or stresses (temperature, salinity, food quality, metal concentration) in *D. polymorpha* (Madon et al., 1998) as well as in other bivalves, *Perna viridis* (Wang et al., 2011) and *Mytilus edulis* (Mubiana and Blust, 2007; Widdows et Johnson, 1988). A decreased SFG value was previously reported in *Mytilus edulis* in the presence of high metal (Cd, As, Pb, Cu) concentrations (Anderlini, 1992) and in an estuarine mysid, *Neomysis integer* following an exposure to chlorpyrifos (Verslycke et al., 2004). Smolders et al. (2004) evaluated the energy budget in *D. polymorpha* transplanted along a gradient of contamination in the field by measuring available energy reserves, cellular energy allocation and energy consumption. This experiment highlighted that the overall energy budget of *D. polymorpha* decreased to become negative at the most contaminated sites. According to our results, on one hand, no significant effect of contamination is visible through biochemical biomarker responses. On the other hand, the metal has an effect on the energy allocation in *D. polymorpha* indicating the higher sensitivity of the individual level. Scope for growth evaluation could then provide us a both sensitive and integrative tool for biomonitoring.

Besides negative values, in our case, all SFG values are lower in *D. polymorpha* than in *D. r. bugensis*. These lower SFG values obtained in Cd-exposed *D. polymorpha* could confirm the impact of this metal on their energy metabolism. These values can be explained by the use of the energy for the establishment of defense mechanisms that require a large part of the energy produced by organisms. Nevertheless, it is difficult to confirm this hypothesis with observed biomarker responses, which show some variations but no significant effect of Cd. However, the evaluation of scope for growth can highlight a rapid response of organisms with an immediate reallocation of energy reserves under stress. After 90 minutes of exposure, the SFG value has quickly decreased. In fact, SFG measurements show a difference of $50 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ between controls and exposed organisms. In addition to being an integrative and sensitive tool, SFG measurement seems to be a good early indicator of organisms' health status during a short exposure. The metabolic activity of *D. polymorpha* at day 7 is higher than at day 0. The interpretation of SFG is therefore different depending on exposure duration. The inversion of the SFG values at day 7 for *D. polymorpha* can be explained in particular by a significant increase in respiration rate in the controls along with a weaker absorption.

The impact of Cd in *D. r. bugensis* is difficult to assess using biomarkers and SFG, since this species responds weakly to contamination at these two levels of organization in contrast to *D. polymorpha*. These results could suggest that *D. r. bugensis* would be more tolerant than *D. polymorpha*. Indeed *D. polymorpha* activates its defense mechanisms under contamination, contrary to *D. r. bugensis*. The latter presents only small variations of responses at both sub-cellular and individual levels, suggesting that organisms did not react to metal contamination. However, Potet et al. (2018) showed a difference of tolerance between both species. The lethal time for 50 % of the organisms (LT_{50}) was measured during a nickel exposure. This study reveals that the lowest value of

LT₅₀ obtained among *D. polymorpha* populations ($\pm 130\text{h}$) is higher than the highest value obtained for *D. r. bugensis* ones ($\pm 80\text{h}$). Then, the authors concluded that *D. r. bugensis* was less tolerant than *D. polymorpha* under metal contamination.

From an ecological point of view, the reproduction strategy could be a distinguishing factor between the two species. Ram et al. (2012) suggested that both species would use a r reproduction strategy which would lead to a higher energy allocation for reproduction. However, since *D. polymorpha* has invaded Eastern Europe for more than 200 years (Karatayev et al., 2013), it might have adapted to its environment, moving towards a K reproduction strategy. Although *D. polymorpha* is considered as an invasive species, it may present higher tolerance and adaptation capacity than other more recent invasive species like *Corbicula fluminea* or *Limnoperna fortune* (Mc Mahon, 2002). *D. polymorpha* would promote its tolerance mechanisms and a stronger shell and byssus (Grutters et al., 2012, Nalepa et al., 2010) at the expense of its growth and reproduction. The majority of its energy would be allocated to the development of its defenses, which could lead to the increase in tolerance of this species to contaminant exposure. Energy metabolism therefore remains a relevant pathway to investigate in order to understand how populations maintain themselves in the environment, particularly with abundance fluctuations between both species. The study of energy allocation mechanisms at the biomolecular level up to the cellular level could bring a better knowledge of the responses of these two dreissenid species.

Acknowledgments

We wish to thank Sharon Kruger for English corrections, Jean-François Poinssaint for his help during experimental set up as well as Bénédicte Sohm for his help with the cytometer. We also acknowledge the diving club “Club Aquasport Plongée” for its help during organisms’ collection. This work was supported by the French foundation ROVALTAIN through PolQua program (RT2E 2015).

Supplementary data

Supplementary data I. Cd concentrations measured in media. Data are expressed as mean (SD) (n=3)

Day	Cd ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
D0	10.05 (0.63)
D2	6.26 (1.06)
D4	9.7 (0.75)
D6	10.13 (0.28)
D7	10.07 (0.05)

References

- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., 2008, Les biomarqueurs de dommages, in : Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, Chap 3, Lavoisier, Pages : 95-119
- Anderlini, V.C., 1992. The effect of sewage on trace metal concentrations and scope for growth in *Mytilus edulis aoteanus* and *Perna canaliculus* from Wellington Harbour, New Zealand. *Sci. Total Environ.* 125, 263–287.
- Anderson, R.S., 1993. Modulation of nonspecific immunity by environmental stressors. Couch, J.A., Fournie, J.W. (Eds.), *Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms*. CRC Press, BocaRaton, pp. 483–510.
- Andres, S., Ribeyre, F., 2000. Interspecific comparison of cadmium and zinc contamination in the organs of four fish species along a polymetallic pollution gradient (Lot River, France). *Science of The Total Environment* 248, 11–25. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00477-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00477-5)
- Baldwin, B.S., Mayer, M.S., Dayton, J., Pau, N., Mendilla, J., Sullivan, M., Moore, A., Ma, A., Mills, E.L., 2002. Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for North American lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 680–694. <https://doi.org/10.1139/f02-043>
- Bayne, B.L., Worrall, C.M., 1980. Growth and production of mussels *Mytilus edulis* from two populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*
- bij de Vaate, A., Jazdzewski, K., Ketelaars, H.A., Gollasch, S., van der Velde, G., 2002. Geographical patterns in range extension of Ponto-Caspian macroinvertebrate species in Europe. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1159–1174. <https://doi.org/10.1139/f02-098>
- Boeckman, C.J., and Bidwell, J.R. 2014. Density, growth, and reproduction of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in two Oklahoma reservoirs. In in : *Quagga and Zebra Mussels : Biology, Impacts, and Control*, F. Nalepa, Don W. Schloesser, Pages: 369-382
- Claudi, R., Mackie, G. L. *Practical manual for zebra mussel monitoring and control*. (Lewis Publishers, 1994).
- Connell, D., Lam, P., Richardson, B., Wu, R., 1999, *Introduction to ecotoxicology*, BlackwellScience, 164p
- de Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* 50, 51–71.
- Depledge, 1993, *The Rational Basis for the Use of Biomarkers as Ecotoxicological Tools*, in : Fossi, M.C., Leonzio, C., *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*, Lewis Publisher, Boca Raton, Florida, Pages : 271-295
- Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau. *Journal Officiel de l'union Européenne* n° 226 du 24 août 2013 (2013).
- Directive 2008/105/CE du 16/12/08 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE
- Directive 2000/60/EC du Parlement Européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (2000).
- Elliott, J.M., Davison, W., 1975. Energy equivalents of oxygen consumption in animal energetics. *Oecologia* 19, 195–201.
- Evariste, L., Rioult, D., Brousseau, P., Geffard, A., David, E., Auffret, M., Fournier, M., Betoulle, S., 2017. Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 137, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.027>
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.012>

- Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Piña, B., Barata, C., 2011. Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquat. Toxicol.* 101, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.004>
- Faria, M., Ochoa, V., Blázquez, M., Juan, M.F.S., Lazzara, R., Lacorte, S., Soares, A.M.V.M., Barata, C., 2014. Separating natural from anthropogenic causes of impairment in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) populations living across a pollution gradient. *Aquat. Toxicol.* 152, 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.020>
- Farkas, A., Ács, A., Vehovszky, Falfusynska, H., Stoliar, O., Specziár, A., Győri, J., 2017. Interspecies comparison of selected pollution biomarkers in dreissenid spp. inhabiting pristine and moderately polluted sites. *Sci. Total Environ.* 599–600, 760–770. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.033>
- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 10, 935–944. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1146363>
- Gestel, C. van, Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217–225.
- Giambérini, L., Cajaraville, M.P., 2005. Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. *Environ. Res.* 98, 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.11.003>
- Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. In Vitro* 17, 539–546. doi:10.1016/S0887-2333(03)00093-6
- Grutters, B.M.C., Verhofstad, M.J.J.M., van der Velde, G., Rajagopal, S., Leuven, R.S.E.W., 2012. A comparative study of byssogenesis on zebra and quagga mussels: the effects of water temperature, salinity and light–dark cycle. *Biofouling* 28, 121–129. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.654779>
- Ivanina, A.V., Sokolov, E.P., Sokolova, I.M., 2010. Effects of cadmium on anaerobic energy metabolism and mRNA expression during air exposure and recovery of an intertidal mollusk *Crassostrea virginica*. *Aquat. Toxicol.* 99, 330–342. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.013>
- Karatayev, A., Burlakova, L., Padilla, D., 2013. General Overview of Zebra and Quagga Mussels: What We Do and Do Not Know, in: *Quagga and Zebra Mussels*. CRC Press, pp. 695–704. <https://doi.org/10.1201/b15437-53>
- Kerambrun, E., Delahaut, L., Geffard, A., David, E., 2018. Differentiation of sympatric zebra and quagga mussels in ecotoxicological studies: A comparison of morphometric data, gene expression, and body metal concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 154, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.051>
- Kerambrun, E., Rioult, D., Delahaut, L., Evariste, L., Pain-Devin, S., Auffret, M., Geffard, A., David, E., 2016. Variations in gene expression levels in four European zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, populations in relation to metal bioaccumulation: A field study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 134, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.018>
- Kraak, M.S., Lavy, D., Peeters, W.M., Davids, C., 1992. Chronic ecotoxicity of copper and cadmium to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23, 363–369. <https://doi.org/10.1007/BF00216246>
- Kraak, M.H.S., Stuijzand, S.C., Admiraal, W., 1999. Short-term ecotoxicity of a mixture of five metals to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 805–812.
- Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3, 193–208.
- Lannig, G., Cherkasov, A.S., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent effects of cadmium on mitochondrial and whole-organism bioenergetics of oysters (*Crassostrea virginica*). *Mar. Environ. Res.* 62, S79–S82. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.04.010>

- Madon, S.P., Schneider, D.W., Stoeckel, J.A., Sparks, R.E., 1998. Effects of inorganic sediment and food concentrations on energetic processes of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, implications for growth in turbid rivers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 401–413. <https://doi.org/10.1139/cjfas-55-2-401>
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65, 609–617. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.074>
- McMahon, R.F., 2002. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: r selection versus resistance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1235–1244. <https://doi.org/10.1139/f02-105>
- Martin-Garin, A. et O. Simon. 2004. Fiche radionucléide, Cadmium 10g et environnement. Direction de l'environnement ede l'intervention - service d'étude du comportement des radionucléides dans les écosystèmes. IRSN, Fontenay-aux-Roses. France. 14p. http://www.irsn.fr/FR/Larecherche/publications-documentation/fiches-radionucleides/Documents/environnement/Cadmium_Cd109_v1.pdf
- Minguez, L., Meyer, A., Molloy, D.P., Giambérini, L., 2009. Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Importance in ecotoxicological studies. *Environ. Res.* 109, 843–850. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.07.012>
- Molloy, D.P., bij de Vaate, A., Wilke, T., Giamberini, L., 2007. Discovery of *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov 1897) in Western Europe. *Biol. Invasions* 9, 871–874. <https://doi.org/10.1007/s10530-006-9078-5>
- Mubiana, V.K., Blust, R., 2007. Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* 63, 219–235. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.08.005>
- Nalepa, T.F., Fanslow, D.L., Pothoven, S.A., 2010. Recent changes in density, biomass, recruitment, size structure, and nutritional state of *Dreissena* populations in southern Lake Michigan. *J. Gt. Lakes Res.* 36, 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2010.03.013>
- Pain, S., Devin, S., Parant, M., 2007. Biomarker versus environmental factors: Seasonal variations and modelling multixenobiotic defence (MXD) transport activity in transplanted zebra mussels. *Sci. Total Environ.* 373, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.10.054>
- Pain-Devin, S., Cossu-Leguille, C., Geffard, A., Giambérini, L., Jouenne, T., Minguez, L., Naudin, B., Parant, M., Rodius, F., Rousselle, P., Tarnowska, K., Daguin-Thiébaud, C., Viard, F., Devin, S., 2014. Towards a better understanding of biomarker response in field survey: A case study in eight populations of zebra mussels. *Aquat. Toxicol.* 155, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.008>
- Palais, F., Mouneyrac, C., Dedourge-Geffard, O., Giambérini, L., Biagiante-Risbourg, S., Geffard, A., 2011. One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83, 1062–1073. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.060>
- Pavlova, V., Izyumov, Y. Morphological variability of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* (Mollusca: Bivalvia). in Quagga and zebra mussels - Biology, impacts, and control (eds. Nalepa, T. F. , Schloesser, D. W.) 287–314 (CRC Press, 2014).
- Potet, M., Devin, S., Pain-Devin, S., Rousselle, P., Giambérini, L., 2016. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environ. Pollut.* 218, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.025>
- Potet, M., Giambérini, L., Pain-Devin, S., Louis, F., Bertrand, C., Devin, S., 2018. Differential tolerance to nickel between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* populations. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19228-x>
- Ram, J.L., Karim, A.S., Banno, F., Kashian, D.R., 2012. Invading the invaders: reproductive and other mechanisms mediating the displacement of zebra mussels by quagga mussels. *Invertebr. Reprod. Dev.* 56, 21–32. <https://doi.org/10.1080/07924259.2011.588015>

- Roast, S.D., Widdows, J., Jones, M.B., 1999. Scope for growth of the estuarine mysid *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea): effects of the organophosphate pesticide chlorpyrifos. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 191, 233–241.
- Roméo, M., Giambérini, L., 2008. Historique, in: *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*, Amiard et Amiard-Triquet, Lavoisier, Chap 1, 17-54.
- Scarlet, M.P.J., Halldórsson, H.P., Granmo, Å., 2015. Scope for growth and condition index in the clam *Meretrix meretrix* (L.) as biomarkers of pollution in Espírito Santo Estuary, Mozambique. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 1, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2015.03.002>
- Schäfer, S., Hamer, B., Treursić, B., Möhlenkamp, C., Spira, D., Korlević, M., Reifferscheid, G., Claus, E., 2012. Comparison of Bioaccumulation and Biomarker Responses in *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* After Exposure to Resuspended Sediments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 614–627. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9735-2>
- Simpson, W.R., 1981. A critical review of cadmium in the marine environment. *Prog. Oceanogr.* 10, 1–70.
- Smolders, R., Bervoets, L., Blust, R., 2002. Transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as active biomonitors in an effluent-dominated river. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1889–1896.
- Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environ. Pollut.* 129, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.027>
- Sokolova, I.M., 2004. Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica*. Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *J. Exp. Biol.* 207, 2639–2648. <https://doi.org/10.1242/jeb.01054>
- Solomon, K.R., Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Eds.), 2008. Extrapolation practice for ecotoxicological effect characterization of chemicals, SETAC Publications. CRC Press, Boca Raton.
- Solorzano, L., 1969. Determination of Ammonia in Natural Waters by the Phenolhypochlorite, *Limnology and Oceanography*, Vol. 14, No. 5 pp. 799-801
- Sprung, M., 1995. Physiological energetics of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in lakes I. Growth and reproductive effort. *Hydrobiologia* 304, 117–132.
- Stoeckmann, A., 2003. Physiological energetics of Lake Erie dreissenid mussels: a basis for the displacement of *Dreissena polymorpha* by *Dreissena bugensis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 60, 126–134. <https://doi.org/10.1139/f03-005>
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ. Int.* 28, 711–717.
- Verslycke, T., Roast, S.D., Widdows, J., Jones, M.B., Janssen, C.R., 2004. Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 306, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.12.022>
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 281–300 (2007).
- Wang, Y., Hu, M., Wong, W.H., Shin, P.K.S., Cheung, S.G., 2011. The combined effects of oxygen availability and salinity on physiological responses and scope for growth in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 63, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.004>
- Widdows, J., 1985. Physiological responses to pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 16, 129–134.
- Widdows, J., Johnson, D., 1988. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: Scope for Growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Vol 46, 113-121.
- Widdows, J., Burns, K.A., Menon, N.R., Page, D.S., Soria, S., 1990. Measurement of physiological energetics (scope for growth) and chemical contaminants in mussels (*Arca zebra*) transplanted along a contamination gradient in Bermuda. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 138, 99–117.

Annexe II : Liste des communications

Publication en préparation :

Rocher B., David E., Tanguy A., Le Saux A., Kerambrun E., Evariste L., **Louis F.**, Delahaut L., Rioult D., Pain-Devin S., Péden R., Dedourge-Geffard O., Palos-Ladeiro M., Devin S., Bultelle F. Characterization of Cu/Zn-SODs in sympatric species: a comparison of Zebra and Quagga mussels.

Publications en révision :

Louis, F., Delahaut, L., Gaillet, V., Bonnard, I., Paris-Palacios, S., David, E., 2020. Effect of reproduction cycle stage on energy metabolism responses in a sentinel species (*Dreissena polymorpha*) exposed to cadmium: what consequences for biomonitoring? En revision dans le journal Aquatic Toxicology.

Louis F., Rioult D., Rocher B., Gaillet V., Delahaut L., Paris-Palacios S., David E., Energy metabolism responses to thermal and hypoxic stress in the sentinel species *Dreissena polymorpha* under experimental conditions. En révision dans le journal Science of the Total Environment.

Publications acceptées :

Louis, F., Rocher, B., Barjhoux, I., Bultelle, F., Dedourge-Geffard, O., Gaillet, V., Bonnard, I., Delahaut, L., Pain-Devin, S., Geffard, A., Paris-Palacios, S., David, E., 2020. Seasonal monitoring of cellular energy metabolism in a sentinel species, *Dreissena polymorpha* (bivalve): Effect of global change? Science of The Total Environment 725, 138450. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138450>

Péden, R., Poupin, P., Sohm, B., Flayac, J., Giambérini, L., Klopp, C., **Louis, F.**, Pain-Devin, S., Potet, M., Serre, R.-F., Devin, S., 2019. Environmental transcriptomes of invasive dreissena, a model species in ecotoxicology and invasion biology. Sci Data 6, 234. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0252-x>

Louis, F., Devin, S., Giambérini, L., Potet, M., David, E., Pain-Devin, S., 2019. Energy allocation in two dreissenid species under metal stress. Environmental Pollution 245, 889–897. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.079>

Potet, M., Giambérini, L., Pain-Devin, S., **Louis, F.**, Bertrand, C., Devin, S., 2018. Differential tolerance to nickel between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* populations. Sci. Rep. 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19228-x>

Présentations orales : 4 nationales et 4 internationales, congrès avec comité de lecture

Louis, F., Rocher, B., Delahaut L., Bonnard I., Gaillet V., Paris-Palacios S., David E (2020). Effect of the reproduction cycle period on energy metabolism responses in a model organism (*Dreissena polymorpha*) exposed to cadmium: what consequences for biomonitoring? Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), mai 2020, Dublin, Irlande.

Louis F., Rocher B., Delahaut L., Bonnard I., Gaillet V., Paris-Palacios S., David E. (2019). Effet de la période du cycle de reproduction sur les réponses du métabolisme énergétique chez un organisme modèle exposés au cadmium : quelles conséquences en biosurveillance ? 4^{ème} Colloque d'écophysiologie animale (CEPA4), octobre 2019, Rennes, France.

Louis F., Rocher B., Bultelle F., Delahaut L., Gaillet V., Paris-Palacios S., David (2019). Seasonal modulations of cellular energy metabolism in the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*. Ecology and Behaviour, mai 2019, Toulouse, France

Péden R., Sohm B., Potet M., **Louis F.**, Flayac J., Poupin P., Klopp C., Giambérini L., Pain-Devin S., Devin S. (2018). Étude multi-sites du transcriptome de dreissenidées : quels motifs de réponses ? Congrès de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), juin 2018, Montpellier, France.

Potet M., Giambérini L., **Louis F.**, Pain-Devin S., Devin S. (2018). Variabilité spatio-temporelle des biomarqueurs et biomonitoring passif : l'impossible mariage ? Congrès de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), juin 2018, Montpellier, France.

Potet M., Bertrand C., **Louis F.**, Pain-Devin S., Giambérini L., Devin S. Variabilité interpopulationnelle de la tolérance de *Dreissena sp.* à un stress métallique: implications pour la biosurveillance.(2017). 13^{ème} Colloque du réseau ÉcoBIM /2^{ème} Colloque du RÉAQ, 29-31 mai 2017, Rimouski, Québec, Canada.

Devin S., Potet M., Bertrand C., **Louis F.**, Giambérini L., Pain-Devin S. Les indices multimarqueurs dans les programmes de biosurveillances. (2017). 13^{ème} Colloque du réseau

ÉcoBIM /2ème Colloque du RÉAQ, 29-31 mai 2017, Rimouski, Québec, Canada. Conférence invitée.

Louis F., Pain-Devin S., Potet M., David E., Devin S., Giambérini L. (2017). Allocation énergétique chez les moules d'eau douce (*Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis*): Scope for Growth et cadmium. Congrès de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), juin 2017, Lille, France.

Présentations posters : 3 internationales et 3 nationales, congrès avec comité de lecture

Sohm B., Péden R., Poupin P., Flayac J., Giambérini L., Klopp C., **Louis F.**, Potet M., Serre R.F., Devin S. (2020). Biomarkers, Transcriptomic and Variability: towards a mechanistic approach of population susceptibility and biomonitoring, SETAC Europe 30th Annual Meeting. mai 2020, Dublin, Irlande.

David E., Auffret M., Bonnard M., Bultelle F., Dedourge-Geffard O., Delahaut L., Devin S., Lebreton M., **Louis F.**, Rocher B., Tanguy A., Pain-Devin S. (2020). Responses of sympatric dreissenid species to contamination: comparison of zebra mussel and quagga mussel exposed to cadmium, and consequences for ecotoxicological studies. SETAC Europe 30th Annual Meeting. mai 2020, Dublin, Irlande.

Le Saux A., Bultelle F., Chan P., Olivier S., Poret A., Vaudry D., David E., **Louis F.**, Tanguy A., Devin S., Pain-Devin S., Péden R., Coulaud R., Le Foll F., Rocher B. (2020). Sister species zebra and quagga mussels exposed to cadmium exhibit specific proteomic modifications. SETAC Europe 30th Annual Meeting. mai 2020, Dublin, Irlande.

David E., Auffret M., Bonnard M., Bultelle F., Dedourge-Geffard O., Delahaut L., Devin S., Geffard A., Lebreton M., **Louis F.**, Rocher B., Tanguy A., Pain-Devin S. (2019). Moule zébrée ou moule quagga, identification génétique et comparaison des réponses biologiques aux stress : quelles conséquences de la sympatrie pour les études écotoxicologiques ? Journée de la Fondation Rovaltain, novembre 2019, Alixan, France.

Le Saux A., Bultelle F., Chan P., Olivier S., Poret A., Vaudry D., David E., **Louis F.**, Tanguy A., Devin S., Pain-Devin S., Péden R., Le Foll F., Rocher B. (2019). Mise en évidence de protéines révélant une réponse au stress adaptative divergente entre les espèces *Dreissena*

polymorpha et *Dreissena rostriformis bugensis*. 4ème Colloque d'Ecophysiologie Animale (CEPA4). octobre 2019, Rennes, France.

Louis F., Devin S., Potet M., Wagner P., Rousselle P., Giambérini L., Pain-Devin S. *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis* : comparaison des LT50 (temps létal pour 50% des individus testés) suite à une exposition au nickel. (2016). Congrès de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), juin 2016, Reims, France.

Autres présentations autour de la thèse

Présentation orale en anglais lors des journées des jeunes docteurs de l'école doctorale ABIÉS, les 16 et 17 avril 2019 à Paris.

Présentation orale lors des journées transfrontalières organisées par Mme Sandrine Bouquillon les 2 et 3 avril 2019 à Reims.

Participation au concours « Ma thèse en 180 secondes » en deuxième année de thèse.

Résumé : La préservation de l'environnement est un sujet majeur de préoccupation des sociétés actuelles. Afin d'évaluer la qualité des écosystèmes aquatiques, la Directive Cadre sur l'Eau appelle au développement de nouveaux outils à la fois précoces dans le temps et intégrateurs de l'état de santé des organismes. Le métabolisme énergétique permet aux organismes d'assurer l'ensemble des fonctions physiologiques et peut être source de biomarqueurs d'intérêt en biosurveillance. L'objectif de ce travail était d'enrichir les connaissances sur le fonctionnement du métabolisme énergétique cellulaire chez une espèce d'eau douce couramment utilisée en écotoxicologie, *Dreissena polymorpha*, afin de proposer de nouveaux biomarqueurs associés à la production et à la régulation de l'ATP. Différents substrats, produits, enzymes et gènes associés ont été ciblés. Les modulations naturelles de ces réponses par les facteurs extrinsèques (saison) et intrinsèques (cycle de reproduction) ont été caractérisées lors d'un suivi saisonnier *in situ*. En parallèle, des expérimentations ont été réalisées en laboratoire afin d'étudier l'effet de différents stress (cadmium, température et hypoxie) sur ces réponses du métabolisme énergétique à différents stades de reproduction. La batterie de réponses mesurées dans l'ensemble des travaux a permis de mettre en avant certains marqueurs révélateurs des modifications de la qualité du milieu (*e.g* charge énergétique en adénylates, gènes *atp* et *cs*). A l'avenir, ces travaux devraient permettre une meilleure appréhension de la tolérance de cette espèce ainsi qu'une interprétation affinée des réponses du métabolisme énergétique dans une perspective de biosurveillance.

Mots clés : *Dreissena polymorpha*, métabolisme énergétique, ATP, biomarqueurs

Abstract: The environment preservation is a growing concern in our society. To assess aquatic ecosystems quality, the Water Framework Directive calls for the development of new tools that could be both early in time and integrative of the organism health. Energy metabolism enables all physiological functions, and thus it could be a source of relevant biomarkers in biomonitoring. The objective of this work was to enrich the knowledge on the energy metabolism management in a freshwater species commonly used in ecotoxicology, *Dreissena polymorpha*, in order to propose new biomarkers involved in the production of ATP and its regulation. Several substrates, products, enzymes and genes related to energy metabolism were targeted. Natural response variations influenced by extrinsic (season) and intrinsic (reproduction cycle) factors were characterised over a reproduction cycle *in situ*. In parallel, experiments were carried out in laboratory to study the effect of different stresses (cadmium, temperature, hypoxia) on energy metabolism responses with expositions at different periods of the reproductive cycle. The panel of responses measured into the overall work allowed to highlight several markers, which revealed changes in the environment quality (*e.g* adenylate energy charge). In the future, this work will provide a deeper understanding of tolerance mechanisms but also a sharpened interpretation of energy metabolism responses in a biomonitoring perspective.

Key words: *Dreissena polymorpha*, energy metabolism, ATP, biomarkers

Laboratoire SEBIO, UFR SEN, Campus Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims cedex 2, France.