



HAL
open science

Adaptation de la faune souterraine aux basses températures : mécanismes et enjeux écologiques

Julien Issartel

► To cite this version:

Julien Issartel. Adaptation de la faune souterraine aux basses températures : mécanismes et enjeux écologiques. Ecologie, Environnement. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00173375

HAL Id: tel-00173375

<https://theses.hal.science/tel-00173375>

Submitted on 19 Sep 2007

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

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

THESE

Présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le 11 juillet 2007

par

M. Julien ISSARTEL

**Adaptation de la faune souterraine aux basses températures : mécanismes
et enjeux écologiques**

JURY : Madame J. GIBERT, President

Monsieur P. VERNON, Directeur de thèse

Monsieur F. HERVANT, Co-encadrant

M. P. MARMONIER, Rapporteur

M. G. CHARMANTIER, Rapporteur

REMERCIEMENTS

Le jury, les rapporteurs

Frédéric Hervant

Yann Voituron

David Renault

Philippe Vernon

Anne Beaudot, Valentina Odagescu, Geneviève Guillot

Florien Malard

Christophe Douady

Janine Gibert

Ben, Caro, Dom

Arnaud, David, Géraldine et Céline

Christian, Clément et Caro

Ester

Mes parents

RESUME

Adaptation de la faune souterraine aux basses températures : mécanismes et enjeux écologiques.

De par leur structure, les écosystèmes souterrains présentent des variations thermiques extrêmement faibles ($\pm 1^{\circ}\text{C}$ sur l'année). De ce fait, les animaux hypogés devraient présenter des caractéristiques de sténothermes (faible tolérance aux variations thermiques), puisqu'ils ne subissent aucune variation de la température durant leur cycle de vie. Pourtant, plusieurs biospéologues ont constaté que le crustacé aquatique souterrain *Niphargus rhenorhodanensis* pouvait supporter des températures négatives. Afin de déterminer l'échelle thermobiologique de *N. rhenorhodanensis* ainsi que les mécanismes adaptatifs lui permettant de tolérer les basses températures, nous avons comparé ses réponses à celles d'un autre amphipode souterrain (*N. virei*), ainsi qu'à celles d'un crustacé morphologiquement proche vivant dans les cours d'eau épigé (*Gammarus fossarum*). *N. rhenorhodanensis* montre des temps de survies à -2°C significativement supérieurs à ceux des deux autres organismes. Les mesures de performance (métabolisme, activité locomotrice, ventilation) en fonction de la température (sur une gamme allant de -2°C à 28°C) démontrent que *N. rhenorhodanensis* présente les caractéristiques d'un organisme eurytherme : il maximise sa performance sur large plage de température. Enfin, lors d'une exposition au froid, *N. rhenorhodanensis* accumule des substances cryoprotectrices dans ses tissus (tréhalose, acides aminés libres), diminue sa teneur en eau libre (eau corporelle disponible pour la congélation), et tolère la congélation lorsqu'elle est initiée par contact avec la glace. A l'inverse, chez les deux autres organismes, la congélation est mortelle, les teneurs en substances cryoprotectrices n'augmentent que très peu et l'eau libre ne varie pas. Avec l'appui de récents travaux phylogéographiques, nous émettons l'hypothèse que la présence de telles adaptations chez *N. rhenorhodanensis* serait liée à son histoire de vie durant les dernières ères glaciaires.

ABSTRACT

Subterranean fauna adaptations to low temperatures: mechanisms and ecological aspects.

Subterranean ecosystems are generally characterised by reduced yearly thermal variations ($\pm 1^\circ\text{C}$ along the year). Thus, hypogean organisms should present stenotherm profiles (reduced tolerance to thermal variations), as they never endure variation of the temperature during their life cycle. Yet, several biospeologists observed a surprising survival to negatives temperatures in the subterranean crustacean *Niphargus rhenorhodanensis*. In order to determine the *N. rhenorhodanensis* thermobiological scale as well as the adaptive mechanisms allowing its cold tolerance, we measured its responses to low temperatures and we compared them to those of another hypogean crustacean (*Niphargus virei*) and to those of a morphologically close surface-dwelling crustacean (*Gammarus fossarum*). *N. rhenorhodanensis* showed larger survival times at -2°C than the two other organisms. Performance experiments (oxygen consumption, locomotory and ventilatory activities) when exposed to different temperatures (from -2 to 28°C) pointed out that *N. rhenorhodanensis* exhibited a eurytherm profile (maximising its performance on a broader range of temperature). Finally, during cold exposure, *N. rhenorhodanensis* shows i) a cryoprotectant (trehalose, free amino acid) body accumulations, ii) a decrease in free water body content (water that is able to participate in ice formation), and iii) a inoculative freezing tolerance. At the opposite, inoculative freezing is lethal in the two other organisms, with limited cryoprotectant body content increases, and no variation in free water body contents. With the support of recent phylogeographical studies, we hypothesise that cold hardiness pointed out in *N. rhenorhodanensis* might result from its life history during quaternary glaciations.

SOMMAIRE

PREMIERE PARTIE - L'ECOPHYSIOLOGIE : L'ETUDE DE L'ADAPTATION D'UN ORGANISME A SON MILIEU	
1. L'environnement, fluctuations, contraintes et stress	6
2. Le concept d'adaptation	9
3. Les variations adaptatives : combattre le changement par le changement	10
<i>3.1 Variations adaptative intra-générationnelles: la plasticité phénotypique</i>	10
<i>3.1.1 Plasticité développementale</i>	11
<i>3.1.2 Bet-hedging</i>	12
<i>3.1.3 Plasticité physiologique ou acclimatation ?</i>	13
<i>3.2 Variations adaptatives intergénérationnelles</i>	14
DEUXIEME PARTIE - ECOLOGIE ET BIOLOGIE SOUTERRAINE, DEFINITIONS ET CONCEPTS GENERAUX	15
1. Le milieu souterrain	15
<i>1.1. Introduction et définitions du milieu souterrain</i>	15
<i>1.2 Les principaux types d'aquifères souterrains</i>	16
<i>1.3 Ecologie souterraine</i>	17
2. La faune souterraine	19
<i>2.1. Biodiversité du milieu souterrain</i>	19
<i>2.2. Adaptations au milieu souterrain</i>	22
<i>2.2.1 Modifications morphologiques</i>	23
<i>2.2.2 Modifications comportementales, physiologiques et métaboliques</i>	24
TROISIEME PARTIE - LA SURVIE AUX BASSES TEMPERATURES : UN CHALLENGE POUR LES ECTOTHERMES	29
1. Impact de la température sur le métabolisme des ectothermes	29
<i>1.1 Relation entre la température et le métabolisme</i>	29
<i>1.2 La performance : spécialiste ou généraliste ?</i>	30
2. Les dommages occasionnés par le froid	33
<i>2.1. Notion d'échelle thermobiologique</i>	33
<i>2.2. Les blessures occasionnées par le froid</i>	34
<i>2.3. Altérations de la membrane plasmique</i>	35

2.4. Altérations des protéines et des acides nucléiques	35
2.5. Chill coma	36
2.6. Le processus de nucléation : notions biophysiques	36
2.7. Congélation dans un système biologique	37
3. Adaptations des ectothermes aux basses températures	39
3.1. Adaptations comportementales	39
3.2. Adaptations cellulaires	40
3.3. Stratégies de tolérance au froid	42
3.4. Protéines antigels	46
3.5. Protéines de nucléation et agents nucléants exogènes	47
QUATRIEME PARTIE : PROBLEMATIQUE, OBJECTIF, METHODOLOGIE ET PRESENTATIONS DES PUBLICATIONS	48
1. Problématique générale et objectifs	48
2. Organisme étudiés	50
3. Méthodologie et présentation des publications	52
<u>Publication 1</u>	56
<u>Publication 2</u>	80
<u>Publication 3</u>	106
CINQUIEME PARTIE – SYNTHÈSE ET CONCLUSION	131
I. Cadre Théorique	131
II. Problématique	132
III. Méthodologie	133
IV. Synthèse des résultats obtenus et discussion	134
1. Survie (publication 1)	134
2. Performance (publication 1)	135
3. Substances cryoprotectrices (publication 2)	137
4. Tolérance au gel (publication 3)	141
5. Classification des organismes étudiés	145
V. CONTEXTE ECOLOGIQUE ET EVOLUTIF	146
1. Exaptation ou adaptation ?	146
i) Théorie de l'exaptation	146
ii) Adaptation fossile	148

<i>iii) Conservation d'une adaptation en environnement non sélectif</i>	151
PERSPECTIVES	154
BIBLIOGRAPHIE	162

PREMIERE PARTIE - L'ECOPHYSIOLOGIE : L'ETUDE DE L'ADAPTATION D'UN ORGANISME A SON MILIEU

Avant de développer les problématiques et les thématiques liées à ma thèse, il me semble important de donner les définitions des concepts inhérents à l'écophysiologie. L'écophysiologie étudie le lien entre l'organisme et son milieu de vie, elle permet de comprendre, en intégrant les réponses comportementales, physiologiques et biochimiques dans un contexte environnemental, comment les organismes vivants font face aux contraintes de leur milieu.

1. L'environnement, fluctuations, contraintes et stress

Les milieux de vie des organismes vivants (ou biotope) sont des systèmes comportant de multiples dimensions (ressources trophiques, prédation, compétition, température, teneur en oxygène...), et chacune d'entre elles est susceptible de varier au cours du temps ou de l'espace. Cette variabilité environnementale va être la source d'une multitude de stratégies, de traits au sein des populations vivantes dont la nature est en grande partie dépendante de la nature même des fluctuations environnementales (Meyers and Bull, 2002). Les variations environnement initial vers un autre revêtent donc un caractère déterminant dans la compréhension des mécanismes adaptatifs utilisés par les organismes pour faire face à leur milieu. Ces fluctuations de l'environnement peuvent varier temporairement et/ou spatialement et peuvent être de nature biotique ou abiotique (Meyers and Bull, 2002).

-Fluctuations spatiales et temporelles

L'hétérogénéité spatiale peut se répartir selon des zones plus ou moins grandes, de même que les fluctuations temporelles peuvent se produire sur des durées plus ou moins courtes. Au sein d'une échelle temporelle, les variations peuvent survenir (i) de manière régulière (donc prévisible pour les organismes), comme par exemple les changements environnementaux diurnes ou saisonniers ; ou (ii) de manière irrégulière ou stochastiques (donc imprévisible pour les organismes). Les variations spatiales peuvent également être très localisées, ou bien être au contraire très étendues. Ainsi, une population sédentaire endurent des contraintes environnementales temporelles, fait face aux mêmes difficultés que des populations mobiles se déplaçant dans un environnement spatialement hétérogène (Meyers and Bull, 2002).

-Fluctuations biotiques ou abiotiques.

Les fluctuations abiotiques correspondent aux changements climatiques ainsi que ceux de l'ensemble des paramètres physico-chimiques de l'environnement ; les fluctuations biotiques représentent les variations de l'abondance de nourriture/proies, de prédateurs ou de parasites et tous paramètres liés directement à une entité biologique. Ces facteurs sont parfois imbriqués : des facteurs abiotiques peuvent provoquer des variations des paramètres biotiques (Meyers and Bull, 2002).

Lorsque ces fluctuations sont suffisamment fortes (intensité élevée, phénomène anormalement long...), elles peuvent devenir des **contraintes** pour les organismes. La conséquence de cette/ces contrainte(s) est appelée **stress** ; il correspond à l'ensemble des perturbations biologiques induites par l'environnement nécessitant une réponse comportementale ou phénotypique de l'organisme pour qu'il maintienne son homéostasie, et sauvegarde sa fitness. La contrainte et le stress sont donc étroitement liés et leur relation peut être graphiquement représentée comme indiqué sur la figure 1.

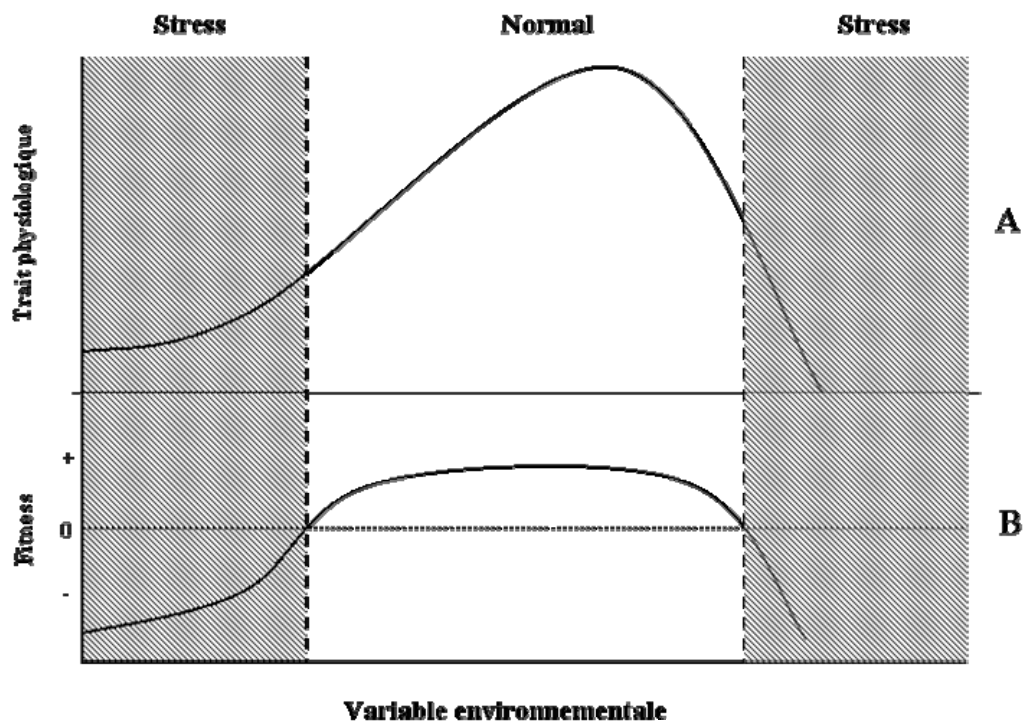


Figure 1 - Relation hypothétique entre une variable environnementale, un trait physiologique (A) et la fitness Darwinienne (survie, taux de croissance, fécondité) (B). Les conditions environnementales pour lesquelles la fitness devient négative sont caractérisées de « stressantes ». D'après Calow and Forbes (1998).

Les fluctuations de l'environnement deviennent donc des contraintes lorsque l'organisme n'est plus capable de maintenir sa performance physiologique ainsi que sa fitness. Dès lors, hormis quelques rares exceptions, nous pouvons intuitivement penser que la majorité des êtres vivants peuvent être soumis plus ou moins quotidiennement à des contraintes dans leurs milieux. Comment les organismes vivants réussissent-ils à vaincre ces contraintes ?

2. Le concept d'adaptation

Le phénotype (i.e. l'ensemble des caractères résultant de l'expression du génotype et du milieu de vie) d'un organisme est généralement associé à l'environnement qu'il occupe, ce qui lui permet d'assurer sa reproduction et sa survie. Il est admis que l'ensemble des traits d'un organisme résulte d'un processus d'évolution, « façonné » par la sélection naturelle, donc génétiquement ancré, que l'on appelle l'**adaptation**. Le concept d'adaptation est devenu très important dans de nombreuses disciplines telles que la physiologie mais également l'écologie, la biologie évolutive ou la dynamique des populations. En pratique, il peut être difficile de montrer que certaines caractéristiques d'un organisme présentent une valeur adaptative et/ou d'identifier le « pourquoi » de ces caractéristiques. L'étude comparative peut permettre de déterminer le caractère adaptatif d'un trait. Ainsi, la présence de traits physiologiques ou morphologiques similaires chez des groupes phylogénétiquement distincts mais occupant le même environnement peut suggérer que les traits considérés sont adaptatifs, car les contraintes du milieu ont finalement mené à l'émergence de structures similaires (Eckert, 1999) (par exemple, l'hypométabolisme caractérisant la plupart des animaux stygobies). D'autre part, l'origine d'une adaptation, sa « raison d'être », est également un problème de premier ordre tant il apparaît parfois difficile de l'identifier clairement. L'origine d'une adaptation n'est pas forcément la contrainte environnementale correspondante. On parle alors d'**exaptation** (Gould and Vbra, 1982), qui correspond plus précisément à l'utilisation d'un trait (une molécule, un processus physiologique...) pour une nouvelle fonction, sans aucune relation avec sa valeur sélective originale. C'est par exemple le cas du glycérol. Ce polyol, qui intervient dans des chaînes métaboliques essentielles telles que la synthèse des phospholipides ou la production d'ATP, est également une molécule hautement accumulée par les ectothermes durant des températures négatives durant l'hiver, pour diminuer leur point de congélation (il joue le rôle d'un antigel, mécanisme que je développerai plus tard). Le

glycérol, en tant que molécule, joue donc plusieurs rôles « *exaptatifs* » résultant tous de systèmes « *adaptatifs* » de régulation de la concentration de cette molécule. Ainsi, comme le décrivent Hochachka and Somero (2002), nous préférons pour la suite de cet exposé utiliser le terme d'adaptation pour les mécanismes biologiques mis en évidence lors de nos recherches, car nous faisons référence aux processus de régulations et non à la molécule *per se*.

3. Les variations adaptatives : combattre le changement par le changement

Lorsque le milieu fluctue et qu'il devient « stressant », les organismes vivants répondent par une modification de leur phénotype. Ces modifications adaptatives peuvent avoir lieu durant leur cycle de vie (variations adaptatives intragénérationnelles), ou/et entre les générations (variations adaptatives intergénérationnelles).

3.1 Variations adaptative intra-générationnelles: la plasticité phénotypique

Le phénotype d'un organisme n'est optimal que pour un éventail limité de conditions environnementales (Via et al., 1995). Afin de s'adapter aux variations de leur biotope, les organismes ont développé des moyens d'ajuster leur phénotype selon les conditions rencontrées dans leur milieu de vie. Ainsi, un organisme ne doit pas être perçu comme une entité statique dont les multiples variables (morphologies, comportement, physiologie...) seraient immuables et fixes pour la vie entière de l'individu, mais comme un système plastique, modulable dans le temps (toutes proportions gardées). Les multiples observations et expériences démontrant l'existence de ces facultés à moduler le phénotype ont conduits les biologistes à élaborer le concept de plasticité phénotypique. La plasticité phénotypique est un concept très général pouvant être défini comme la production de multiples phénotypes induits par les changements de l'environnement, à partir d'un seul génotype, et au sein d'un même

cycle de vie. La plasticité au sens large n'est donc pas forcément adaptative car elle prend en compte les effets néfastes induits par l'environnement

Il existe plusieurs catégories de plasticité phénotypique, dépendant par exemple du stade de développement durant lequel l'individu est exposé à une contrainte, ou bien encore du type (dirigée ou aléatoire) et de la nature (physiologique, morphologique, comportementale...) de la réponse (Meyers and Bull, 2002). Nous verrons dans les sections suivantes quelques cas particuliers de plasticité phénotypique.

3.1.1 Plasticité développementale

La plasticité développementale est un cas particulier de plasticité phénotypique. Elle ne prend en compte que les changements induits par l'environnement lors des stades précoces du développement d'un organisme (Wilson and Franklin, 2002b). Ce type de plasticité est favorisé lorsque l'environnement rencontré par l'organisme durant son ontogénie est un bon prédicteur des futures conditions environnementales, et peuvent donc servir de « déclencheur » d'un futur phénotype approprié aux futures conditions (Meyers and Bull, 2002). Ce genre de plasticité s'illustre tout à fait chez les têtards des crapauds *Spea bombifrons* et *S. multiplicata* qui peuvent distinctement suivre deux trajectoires développementales alternatives. Si durant son cycle larvaire (stade têtard), un individu a l'opportunité de se nourrir d'autres têtards ou de macrocristacés, il deviendra au stade adulte un crapaud à la mâchoire surdéveloppée et carnivore. S'il ne rencontre pas ces conditions durant son stade larvaire, il deviendra un crapaud à la mâchoire plus réduite et présentera un régime alimentaire omnivore (Pfennig and Murphy, 2000).

La plasticité développementale prend également en compte les effets non désirables induits par la contrainte lors du développement d'un individu (Leroi et al., 1994 ; Wilson and Franklin, 2002b). En effet, prenons l'exemple d'une larve d'insecte exposé à une très forte température,

ce dernier présentera une meilleure survie aux hautes températures au stade adulte, mais une fitness moins bonne comparativement à un groupe témoin. Les larves exposées à la chaleur ont donc développé un phénotype résistant à la chaleur, mais ont également été victimes de dommages induits par ces hautes températures (Hoffmann and Hewa-Kapuge, 2000 ; Wilson and Franklin, 2002b).

Ce constat est à l'origine d'un débat entre physiologistes et écologues sur lequel je reviendrai dans la section 3.1.3

3.1.2 Bet-hedging

Le bet-hedging peut être considéré comme une forme de plasticité développementale aléatoire (Meyers and Bull, 2002). En effet, contrairement à la plasticité développementale « classique » où les organismes développent un phénotype déterminé par les contraintes endurées durant le développement, les êtres vivants « utilisant » le bet-hedging « choisissent » des phénotypes au hasard, avant même d'avoir expérimenté des contraintes environnementales. De nombreuses plantes annuelles vivant sous des climats désertiques font face à des conditions de germination stochastiques : si la première pluie déclenchant la germination est suivie d'autres précipitations, les chances de survie seront bonnes, mais si la germination est suivie d'une sécheresse, la plante périra. Ainsi on observe chez certaines espèces végétales que la germination d'une partie des graines est reportée d'une ou plusieurs années. Cette plasticité maximise les chances de germer dans de bonnes conditions, en supposant qu'au moins une des années de germination sera bonne (Cohen, 1966 ; Bull, 1987). Cette stratégie est également présente chez de nombreux insectes entrant en diapause, dont certains de leurs œufs ou larves suspendent leur développement tardivement en été pour éviter une mort prématurée due à des gelées précoces (Danks, 1987 ; Menu et al., 2000).

Le bet-hedging est une stratégie typiquement favorisée lorsque les contraintes rencontrées sont imprévisibles (Menu et al., 2000 ; Meyers and Bull, 2002).

3.1.3 Plasticité physiologique ou acclimatation ?

L'acclimatation et la plasticité physiologique sont le sujet de nombreuses controverses au sein de la communauté scientifique, et cela est dû en grande partie à la définition que l'on donne au terme *acclimatation*. La plasticité physiologique fait appel à tous les changements phénotypiques physiologiques induits par l'environnement et elle est souvent confondue avec l'acclimatation, qui correspond en réalité à un cas particulier de la plasticité phénotypique (Franklin and Wilson, 2002 ; Deere and Chown, 2006). Il existe depuis le milieu des années 90 un débat illustrant bien la confusion existant entre physiologistes et écologues au sujet de l'acclimatation. Ce débat est né du fait que l'acclimatation est généralement et intuitivement perçue comme un changement phénotypique augmentant la performance physiologique ou la fitness d'un individu dans un environnement au sein duquel les changements ont été induits. En d'autres termes, les organismes acclimatés à un environnement particulier présenteraient une performance ou une fitness supérieure à celles d'organismes n'ayant pas été acclimatés à cet environnement (Leroi et al., 1994). Ce paradigme est appelée *hypothèse de l'acclimatation bénéfique* (Beneficial Acclimation Hypothesis, BAH ; Leroi et al., 1994). Certaines études rejetèrent cette hypothèse, en montrant que l'acclimatation pouvait produire des effets néfastes sur la fitness des organismes, comparativement à d'autres maintenus à un environnement intermédiaire (Leroi et al., 1994). Wilson and Franklin (2002b) notèrent que la plupart des expériences rejetant la BAH consistaient à induire un stress lors du développement de l'organisme et d'en observer les effets sur la fitness à l'âge adulte. De ce fait, ces auteurs proposent que ces expériences mesurent davantage la valeur adaptative de la plasticité développementale (concept qui prend en compte les effets délétères induits par la contrainte)

plutôt que de celle de l'acclimatation (Wilson and Franklin, 2002b ; Deere and Chown, 2006), et que ce débat reflétait typiquement un manque de précision sémantique du terme *adaptation*. Ainsi, nous proposons pour la suite de ce manuscrit que le terme acclimatation soit défini comme les réponses physiologiques impliquant des mécanismes sensoriels détectant les changements environnementaux et effectuant un changement (régulée par les gènes) de l'expression phénotypique (Wilson and Franklin, 2002a). Ainsi, les effets directs dus aux contraintes environnementales qui peuvent se révéler délétères au cours de la vie de l'organisme, relèvent de la plasticité développementale ou physiologique et non, par définition, de l'acclimatation. Enfin, notons que l'acclimatation est un phénomène clairement réversible, ce qui n'est pas généralisable pour la plasticité phénotypique (Wilson and Franklin, 2002a).

3.2 Variations adaptatives intergénérationnelles

Lors d'un changement de l'environnement, la sélection naturelle tend à retenir les organismes présentant un phénotype et donc un génotype en adéquation avec les nouvelles conditions environnementales. Ce phénomène peut donc être perçu comme une alternative à la plasticité, qui est un mécanisme reposant sur les capacités d'un organisme à modifier son phénotype durant son cycle de vie, alors que dans le cas d'une sélection des meilleurs phénotypes dans une population présentant un polymorphisme, la variation adaptative est intergénérationnelle. Ainsi, au sein d'une population, le polymorphisme revêt un caractère déterminant. Plus le polymorphisme des descendants (donc des nouvelles générations) est élevé, plus la population maximise ses chances de survie en cas de modifications contraignantes du milieu.

DEUXIEME PARTIE - ECOLOGIE ET BIOLOGIE SOUTERRAINE, DEFINITIONS ET CONCEPTS GENERAUX

1. Le milieu souterrain

1.1. Introduction et définitions du milieu souterrain

Le milieu souterrain est généralement peu connu du grand public ; il se limite d'ailleurs pour la plupart des néophytes aux grottes, alors qu'elles ne représentent qu'une petite partie des écosystèmes hypogés (i.e. souterrains).

Le milieu souterrain se compose en réalité d'une multitude de biotopes de structure différente (grotte, tunnel de lave, réseau de fissures, remplissages de type interstitiel...) mais pouvant se définir comme l'ensemble des cavités qui répondent aux facteurs suivants : une absence de lumière permanente (et donc de photopériode), une très faible amplitude des variations thermique, une chaîne trophique courte et une humidité relative proche de la saturation (Juberthie et Decu, 1994).

Malgré des conditions pouvant paraître hostiles au développement de la vie, l'environnement souterrain aquatique représente un immense biotope pour de nombreuses espèces animales (380 espèces et sous-espèces ont été récemment recensées en France ; Ferreira et al., 2006).

D'autre part, les eaux souterraines stockées principalement dans les massifs karstiques et alluviaux représentent 40 % des eaux douces continentales. En France, 60 % des besoins en eaux potables sont assurées par les eaux souterraines (Guillemin et Roux, 1994). Elles revêtent ainsi un caractère vital et économique très fort.

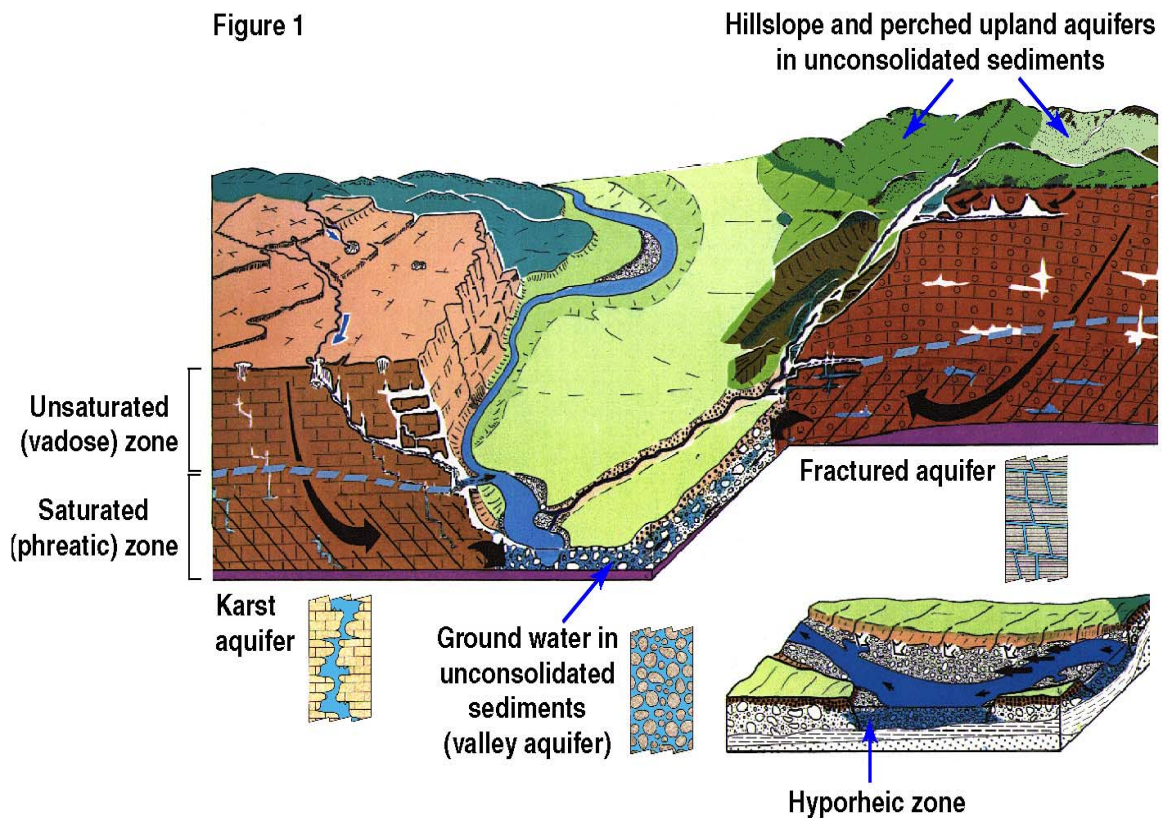


Figure 1 - Représentation schématique des différents types de milieu souterrain. D'après Gibert (2001).

1.2 Les principaux types d'aquifères souterrains

Il existe une multitude d'environnements souterrains différents (Figure 1), nous nous concentrerons pour notre étude sur les deux milieux les plus répandus et documentés : les aquifères karstiques et les aquifères phréatiques.

-Les aquifères karstiques

Le karst correspond à l'ensemble des massifs calcaires érodés par l'eau en surface et en profondeur et qui renferment des systèmes souterrains formés de fissures, de cavités, de galeries et de grottes. Les karsts sont largement distribués sur les continents. En France, ils représentent 25 % de la surface totale du territoire (Juberthie et Decu, 1994). L'aquifère karstique correspond donc au réservoir d'eau constitué par le karst.

-Les aquifères phréatiques

Le réseau hydrographique des fleuves présente une succession de plaines alluviales qui sont le siège de circulations d'eaux souterraines formant des nappes alluviales qui alimentent les rivières et fleuves ; celles-ci constituent d'immenses habitats et réservoirs d'eau souterrains pouvant s'étendre sur plusieurs kilomètres de large (Juberthie et Decu, 1994).

1.3 Ecologie souterraine

L'obscurité permanente est l'une des caractéristiques fondamentales de l'environnement souterrain, elle détermine la quasi totalité des paramètres biotiques de cet écosystème. Ainsi, la photosynthèse n'existe pas dans les milieux hypogés, et cette absence va avoir des répercussions majeures sur les paramètres que sont *i*) les ressources trophiques et *ii*) la teneur en oxygène.

-Ressources trophiques

Les végétaux sont habituellement les premiers maillons de la chaîne trophique dans les milieux superficiels, mais en l'absence de lumière, leur développement est impossible. Il n'existe donc pas de production primaire dans les écosystèmes souterrains (à l'exception d'organismes chimiosynthétiques dans la grotte de Movilé en Roumanie). Ils sont d'ailleurs caractérisés, en comparaison des biotopes superficiels photosynthétiques, d'écosystème énergétiquement limités. De ce fait, les domaines souterrains sont donc des systèmes hétérotrophes entièrement dépendants de la surface pour les ressources alimentaires (Creuzé des Chatelliers et al., 1991). L'apport trophique n'est assuré que par les infiltrations d'eau (d'origine lotique ou météorique) drainant la matière organique dissoute ou particulaire dans le milieu hypogé (Ginet et Decou, 1977 ; Juberthie et Decu, 1994 ; Gibert et al., 1994).

La flore fongique et bactérienne qui compose le biofilm souterrain représente une source alternative de nutriment pour les macro-organismes hypogés (Barlocher et Murdoch, 1989).

-Pression partielle en oxygène

En raison de l'obscurité permanente, la photosynthèse dans les milieux hypogés est impossible, le rendant totalement dépendant du transport de l'oxygène de la surface vers les aquifères hypogés (Malard and Hervant, 1999). Il en résulte généralement des périodes d'hypoxie plus ou moins sévères pouvant parfois aller jusqu'à une quasi anoxie. Le renouvellement de l'oxygène dissout dans les eaux souterraines est accomplie par diffusion avec la zone non saturée de l'aquifère ou par recharge avec de l'eau normoxique de pluie ou de cours d'eau superficiel (rivière, fleuve...) (Malard and Hervant, 1999).

La rareté de la nourriture et la faible teneur en oxygène sont des phénomènes transitoires, ils sont en général essentiellement liés au cycle hydrologique annuel : baisse saisonnière des précipitations entraînant une baisse du niveau et du débit de l'eau dans les aquifères, et donc une baisse du renouvellement de matière organique et d'oxygène.

L'obscurité n'est pas la seule caractéristique des environnements souterrains, ils sont également caractérisés par une variabilité extrêmement réduite d'autres paramètres abiotiques telles que la chimie des eaux, la saturation en eau dans l'atmosphère ou la température. Mais cette stabilité est toute relative selon l'échelle de temps considérée et en particulier dans le cas de la température.

La température du milieu souterrain est égale à la moyenne annuelle de la température extérieure des écosystèmes superficiels adjacents, et ne varie en général que de quelques dixièmes de degrés au cours de l'année (Ginet et Decou, 1977 ; Juberthie et Decu, 1994). Des différences de température sont tout de même observées selon la latitude et la longitude du biotope souterrain considéré :

-*la latitude* : les températures sont naturellement plus ou moins élevées selon que l'on s'éloigne ou que l'on s'approche de l'équateur. Ainsi, les grottes tropicales atteignent en moyenne 18 à 24°C, les températures des grottes d'Europe moyenne s'échelonnent de 8 à 12°C, alors qu'elles ne dépassent pas 0°C en Laponie (Ginet et Decou, 1977).

-*l'altitude* : une montée de 100 mètres engendre une baisse de la température de 0.6 à 0.8°C. Les karsts alpins du massif du Haut-Giffre, situés à une altitude moyenne de 1600 mètres, présentent une température moyenne de 4.6°C alors que la nappe de Chalamont (280 mètres) montre une température annuelle de 12°C (Mathieu, 1967 ; Ginet et Mathieu, 1968 ; Malard et al., 2006).

Sur une échelle de temps courte, la température des écosystèmes souterrains ne varie donc pas ou très peu. Mais il est envisageable qu'un bouleversement climatique de longue durée, comme cela a été le cas durant les glaciations du Quaternaire, puisse ou ait pu influencer significativement la température des biotopes hypogés (REF).

Les milieux souterrains présentent donc une grande stabilité vis-à-vis de certains paramètres biotiques et abiotiques en comparaison des écosystèmes superficiels, mais sont aussi un biotope contraignant présentant des conditions extrêmes d'hypoxie et de rareté de ressources trophiques.

2. La faune souterraine

2.1. Biodiversité du milieu souterrain

Le milieu souterrain n'est pas seulement un vaste réservoir d'eau, c'est également un biotope abritant de nombreux groupes taxonomiques. Les données actuelles montrent que tous les types de biotopes aquatiques souterrains ont été colonisés, depuis les zones équatoriales

jusqu'aux zones subarctiques (Juberthie et Decu, 1994 ; 1998 ; 2001). Les communautés d'organismes vivant dans les eaux souterraines continentales sont composées en proportions variables d'organismes provenant des eaux de surface (les épigés) et d'organismes provenant des eaux souterraines.

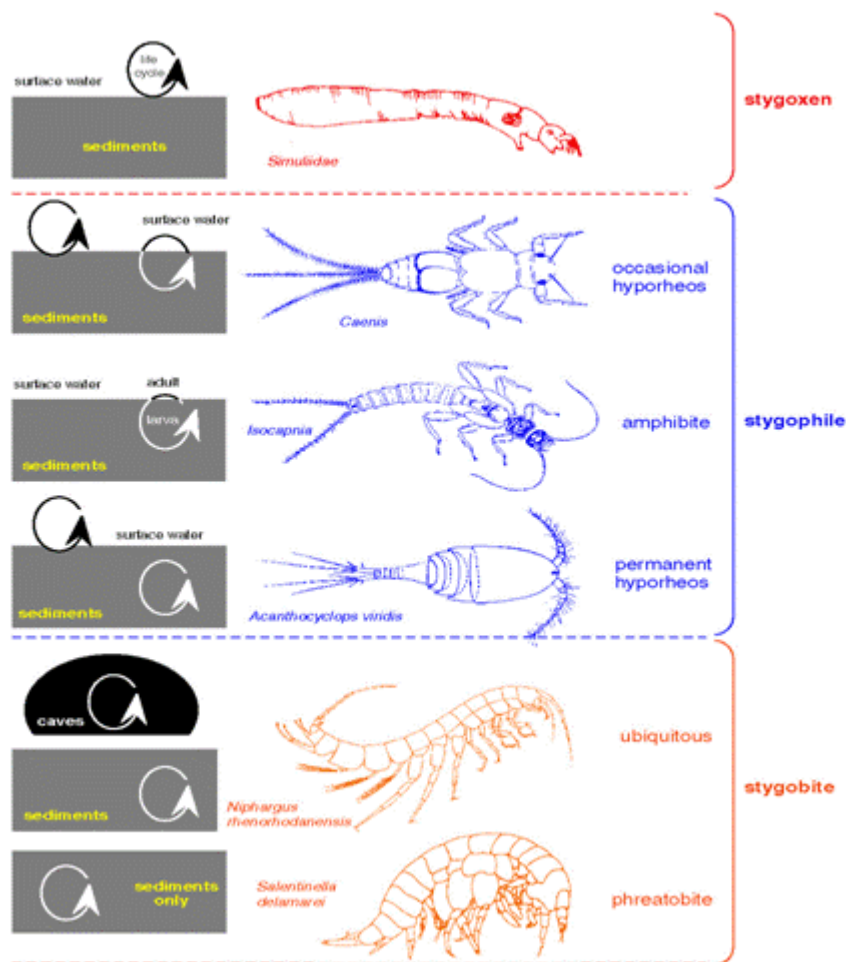


Figure 2 - Détermination des domaines de vie des invertébrés aquatiques continentaux.
(Marmonier et al., 1993)

Ces organismes sont plus finement différenciés selon leur degré d'affinité avec le milieu souterrain (Figure 2) : les **stygoxènes** correspondent aux organismes épigés qui ne présentent aucune affinité particulière avec le domaine aquatique souterrain mais qui peuvent s'y retrouver accidentellement. Les **stygophiles** sont les espèces épigées qui présentent une

certaine affinité pour les eaux souterraines, pouvant y passer une partie de leur cycle vital. Enfin, les **stygbies** sont les espèces présentant des adaptations morphologiques, comportementales et métaboliques en relation directe avec le milieu souterrain, et qui réalisent la totalité de leur cycle de vie dans ce milieu (Marmonier et al., 1993 ; Gibert et al., 1994).

Le milieu souterrain a longtemps été considéré comme n'étant colonisé que par quelques espèces très spécialisées. Les données actuelles montrent au contraire qu'il s'agit d'un biotope où vivent des communautés d'espèce relativement riches, composées majoritairement d'invertébrés mais aussi de vertébrés et de micro-organismes (Juberthie et Decu, 1994 ; Gibert and Deharveng, 2002 ; Culver and White, 2004).

AQUATIC FAUNA	Stygofauna mundi
Protozoa	1,015
Minor invert. Phyla	481
Porifera	15
Cnidaria, Ctenophora	24
Plathelminthes	199
Nematoda	322
Bryozoa	3
Brachiopoda	2
Mollusca	456
Annelida	510
Crustacea	2,870
Cladocera	5
Ostracoda	309
Copepoda	997
Remipedia	5
Mystacocarida	13
Syncarida	154
Mysidacea	22
Mictacea	1
Isopoda	569
Amphipoda	664
Thermosbaenacea	10
Decapoda	121
Insecta	24
Arachnida	590
Echinoderma	5
Urochordata	12
Cephalochordata	0
Vertebrata	106
Agnatha	0
Chondrichthyes	0
Osteichthyes	92
Amphibia	14
Reptilia	
Aves	
Mammalia	
Total	6,634

Le dernier faunistique recensement indique que les eaux souterraines du globe sont colonisées par près de 7000 espèces et sous-espèces, dont la majorité peut être considérée comme stygobie (Tableau 1 ; Botoseanu, 1986 ; Stoch, 1995). La faune hypogée est généralement composée de crustacés, qui représentent à eux seuls 44 % des espèces souterraines aquatiques connues (alors qu'ils ne représentent que 4 % des espèces aquatiques épigées européennes ; Danielopol et al., 2000).

Tableau 1 - Diversité des espèces souterraines connues (d'après Gibert et Deharveng, 2002)

2.2. Adaptations au milieu souterrain

Les animaux qui peuplent les milieux souterrains ont tous des ancêtres d'origine superficielle (Notemboom, 1991). Durant la colonisation du milieu hypogé, l'espèce ancestrale a progressivement « évolué » vers la forme souterraine que nous pouvons observer aujourd'hui.

Cette évolution, due aux paramètres abiotiques et biotiques sélectifs du milieu, implique de nombreux changements adaptatifs tant au point de vue morphologique que métabolique. Ainsi, l'absence de lumière, les périodes d'hypoxie et les ressources trophiques limitées représentent des contraintes environnementales auxquels la faune souterraine a dû s'adapter. Ces contraintes et les adaptations qui en découlent sont souvent étroitement liées (ex : le métabolisme ralenti peut être considéré comme une adaptation à l'hypoxie ou au jeûne, car dans les deux cas il permet d'augmenter le temps de survie) et convergentes. Ainsi, la similarité des conditions de vie des écosystèmes souterrains (en comparaison de la variabilité des écosystèmes superficiels) a donné naissance à l'apparition d'un morphotype souterrain (troglomorphe) rencontré chez des taxons très éloignés (ex : la dépigmentation et l'anophtalmie retrouvées aussi bien chez des vertébrés que chez des invertébrés hypogés) (Christiansen, 1992). Tous les animaux souterrains ne présentent pas l'ensemble des traits troglomorphiques. Leur expression dépend des caractéristiques génétiques de leurs ancêtres épigés (certains taxons comportent en effet certains prérequis génétiques pour la construction d'un trait).

2.2.1 Modifications morphologiques

L'absence de rayonnement lumineux a pour conséquence l'apparition de modifications morphologiques particulières extrêmement convergentes, parmi lesquelles les plus répandues sont :

-une **dépigmentation générale du corps**, d'intensité variable. Chez les animaux épigés, la pigmentation protège l'organisme des rayons solaires, et en particulier des ultraviolets. Dans les milieux souterrains, ce genre de protection, coûteuse en énergie, peut être considérée comme inutile.

-une **régression oculaire** plus ou moins importante, allant de la microphthalmie jusqu'à l'anophtalmie. La valeur adaptative de l'anophtalmie est très discutée : certains spécialistes n'y voient que le résultat d'une accumulation de mutations neutres des gènes codants pour le développement des yeux, c'est la théorie neutraliste : la sélection naturelle n'a aucune emprise sur le rôle fonctionnel de l'œil, puisque l'obscurité est totale, les mutations s'accumulent sans qu'elles soient contre-sélectionnées. D'autres pensent au contraire que la régression ophtalmique est le résultat d'un processus évolutif dû au milieu. Le caractère adaptatif de l'anophtalmie tiendrait alors du fait que l'énergie utilisée lors du développement, de l'entretien et de « l'utilisation » de l'œil serait allouée à d'autres processus, dont le développement « compensatoire » d'autres organes sensoriels telles que des antennes plus longues. (Culver et Wilkens, 2000).

-La perte de la vue est compensée par une **hypertrophie des autres organes sensoriels** : allongement des appendices et une multiplication des récepteurs chimiques et mécaniques (Huppopp, 1986).

2.2.2 Modifications comportementales, physiologiques et métaboliques

-Traits d'histoire de vie : longévité et reproduction

Contrairement à leurs homologues superficiels, les animaux souterrains ne présentent aucune périodicité au cours de leur vie. En effet, n'étant pas soumis à l'alternance jour/nuit, ils ne présentent pas de variation journalière de l'activité ou du métabolisme (Hervant et al., 2000). De même, la reproduction, en générale cyclique chez beaucoup d'épigés, est relativement constante chez les hypogés lorsque les conditions environnementales sont favorables (Ginet et Decou, 1977 ; Mathieu et Turquin, 1992).

Le régime alimentaire des animaux souterrains est directement lié à la rareté de la nourriture et à la stochasticité des apports extérieurs. Les organismes hypogés sont donc principalement détritivores (avec une faible proportion de carnassiers) et optimisent ainsi la prise alimentaire.

Les animaux souterrains se distinguent également des animaux épigés par leur forte longévité. Par exemple, l'amphipode stygobie *Niphargus rhenorhodanensis* vit environ 10 ans alors que son homologue superficiel *Gammarus fossarum* ne vit que 2 ans. L'urodèle *Proteus anguinus* ou les poissons cavernicoles du genre amblyopsid peuvent atteindre des longévités records de 90 et 150 ans respectivement (Poulson, 1963). Il existe de nombreuses modèles expliquant la longévité des organismes vivants parmi lesquels deux théories semblent particulièrement fonctionner chez les animaux souterrains : (i) la théorie radicalaire et (ii) la théorie évolutionniste du vieillissement.

(i) Selon la théorie radicalaire, la longévité pourrait s'expliquer par le métabolisme très bas caractérisant ces animaux. Selon cette théorie, le métabolisme crée des sous-produits (notamment les radicaux libres) capables d'endommager les cellules et qui représentent un des mécanismes importants du vieillissement (Finkel and Holbrook, 2000). Ainsi, plus le métabolisme est lent, comme c'est le cas chez les animaux souterrains, plus la production de sous-produits est faible, et donc plus la durée de vie est longue (Speakman et al., 2002). Cependant, de nombreux exemples diminuent la véracité de cette hypothèse (ex : les chauves-souris, qui maintiennent un métabolisme élevé alors qu'elles vivent environ 20 ans) (Brunet-Rossinni and Austad, 2004).

(ii) La forte longévité observée chez les animaux souterrains pourrait aussi s'expliquer par la théorie évolutionniste du vieillissement. Un des aboutissants de cette théorie prévoit que les animaux ne subissant pas de prédation vieillissent moins vite que ceux qui vivent sous une forte pression de prédation (Brunet-Rossinni and Austad, 2004). Ce phénomène s'expliquerait

par une utilisation différente de l'énergie (principe d'allocation des ressources) : ils investiraient leur énergie dans les mécanismes de protection contre la sénescence plutôt que dans ceux visant à lutter contre la prédation. Les animaux souterrains tels que les macrocrustacés sont au sommet de la pyramide trophique, ils n'ont donc pas de prédateurs, ils n'auraient donc plus de raison de développer de protections contre la prédation. Cette énergie pourrait donc être utilisée afin de prolonger la longévité, par exemple au travers de mécanismes antioxydants. Les organismes bénéficiant d'une telle longévité maximiseraient leur succès reproducteur. En effet, les animaux souterrains sont des organismes itéropares, c'est-à-dire qu'ils se reproduisent de nombreuses fois durant leur cycle de vie. Les individus qui vivent plus longtemps augmentent leur succès reproducteur puisqu'ils peuvent se reproduire un plus grand nombre de fois (et augmenter le nombre de leurs descendants). Ainsi les gènes responsables (directement ou indirectement) de la longévité sont retenus par la sélection naturelle et transmis aux générations suivantes.

-Adaptations à l'absence de nourriture

La rareté de la nourriture est le paramètre considéré comme étant à l'origine de l'une des adaptations les plus rencontrées chez les animaux souterrains, à savoir un métabolisme réduit par rapport à celui des espèces épigées voisines (Ginet et Mathieu, 1968 ; Hüppop, 1986 ; Hervant et al., 1997).

Lors d'un jeûne de longue durée, les animaux souterrains mettent en jeu un certain nombre d'adaptations métaboliques. Ainsi, la réponse à un jeûne de longue période chez les invertébrés aquatiques épigés est généralement monophasique, montrant une diminution immédiate de tous les types de réserves énergétiques (Hervant et al., 1999). A l'inverse, on observe chez les crustacés épigés *N. rhenorhodanensis* et *N. virei* une utilisation séquentielle des réserves énergétiques, avec un catabolisme à dominance glucidique durant les premiers

jours de jeûne (qui ne représente que 5 % de l'alimentation en énergie durant une période de 180 jours de jeûne), puis lipidique (représentant 51 % de l'énergie consommée durant cette même période) et enfin protéino-lipidique (44 % de l'énergie mobilisée) durant la dernière phase du jeûne (Hervant et al., 1999 ; 2001).

La meilleure survie au jeûne alimentaire observée chez ces organismes a également été reliée à i) des réserves énergétiques plus importantes (arginine phosphate, triglycérides, glycogène), et ii) un taux d'utilisation des métabolites beaucoup plus bas que chez des espèces épigées morphologiquement proches, permettant d'alimenter en énergie l'organisme pendant une plus longue période de jeûne. Enfin, les organismes souterrains assimilent plus rapidement les aliments présents dans le milieu lors de la période de récupération post-jeûne (réalimentation), leur permettant une meilleure préparation pour une nouvelle phase de stress alimentaire (Hervant et al., 1999 ; 2001).

-Adaptations à l'hypoxie

En condition anoxique expérimentale, il a été observé chez de nombreux crustacés aquatiques épigés une hyperactivité (tout comme lors d'une carence en nourriture) correspondant probablement à la fuite vers un habitat plus oxygéné. À l'inverse, les animaux souterrains montrent, une diminution drastique de l'activité locomotrice (Hervant and Malard, 2005). Cette adaptation comportementale a pour effet de réduire les coûts énergétiques durant les périodes de basse teneur en oxygène (en diminuant les besoins en oxygène) et par conséquent, d'augmenter le temps de survie dans les eaux souterraines hypoxiques.

L'hypométabolisme caractérisant les animaux hypogés a longtemps été relié à la pauvreté en nourriture (Hervant and Malard, 2005), mais il a été émis plus récemment l'hypothèse que ce métabolisme réduit était également le reflet d'une adaptation aux basses teneurs en oxygène des eaux souterraines : un hypométabolisme se traduit par une demande

en oxygène plus faible et donc par une augmentation de la survie en anoxie (Hervant and Renault, 2002). De nombreux crustacés aquatiques peuvent maintenir une consommation d'oxygène indépendante de la pression partielle en oxygène (PO_2) de l'environnement (l'organisme est appelé oxyrégulateur) jusqu'à une certaine valeur critique de PO_2 (pression critique, P_c) à partir de laquelle cette indépendance est perdue (l'organisme devient alors un oxyconformeur). Cette valeur de P_c est significativement plus basse chez les animaux souterrains, traduisant ainsi une plus grande capacité à maintenir leur métabolisme aérobie quand la teneur en O_2 chute (Hervant et al., 1995). Lorsque P_c est atteinte, les voies métaboliques aérobies (production d'ATP en présence d'oxygène) sont progressivement remplacées par les voies métaboliques anaérobies (production d'ATP en absence d'oxygène avec un rendement beaucoup plus faible, fermentation).

La plupart des animaux souterrains présentent de nombreuses adaptations métaboliques (classiquement trouvée chez les organismes tolérants à l'hypoxie) permettant d'optimiser ce métabolisme anaérobie (en augmentant son rendement en terme de production d'ATP). Ces réponses sont caractérisées par une fermentation couplée du glycogène et de certains acides aminés conduisant à l'accumulation de produits terminaux du métabolisme anaérobie tels que le lactate, l'alanine et le succinate. Le lactate, potentiellement néfaste pour les cellules lorsqu'il est hautement concentré (acidose), est fortement excrété chez les espèces hypogées durant le stress hypoxique. Les « combustibles » utilisés dans la fermentation en condition hypoxique sont présents en plus grandes quantités chez les animaux souterrains que chez les épigés (1.5 à 3.2 fois plus de glycogène chez le crustacé hypogé *N. virei* que chez le crustacé épigé *G. fossarum* ; Hervant et al., 1996 ; 1997). Ainsi, une plus grande quantité de ces « combustibles », utilisable lors des fermentations, permet de survivre plus longtemps lors d'un stress hypoxique. Durant les phases de réoxygénation (récupération en condition normoxique), les animaux souterrains resynthétisent plus rapidement leur stock de glycogène

à partir d'un produit terminal, le lactate (glyconéogenèse) accumulé lors du stress hypoxique alors que les organismes épigés ont plutôt tendance à l'excréter, ce qui est plus coûteux pour l'organisme (Hervant et al., 1995, 1996 ; 1999).

Les animaux souterrains font essentiellement partie des organismes ectothermes, c'est-à-dire que leur température corporelle est totalement dépendante de la température extérieure. Bien que l'impact de la température sur la biologie des organismes stygobies semble mineur (les variations thermiques des biotopes hypogés étant très faibles), elle demeure une contrainte majeure pour les ectothermes épigés.

TROISIEME PARTIE - LA SURVIE AUX BASSES TEMPERATURES : UN CHALLENGE POUR LES ECTOTHERMES.

1. Impact de la température sur le métabolisme des ectothermes

Pour bien comprendre l'impact de la température chez les ectothermes, il est nécessaire tout d'abord de décrire la corrélation existant entre métabolisme/performance et température, avant de passer en revue les dommages occasionnés par le froid sur l'organisme puis les adaptations permettant de réduire leur impact.

1.1 Relation entre la température et le métabolisme

La température compte parmi les paramètres abiotiques influençant le plus la vie des organismes. C'est particulièrement le cas chez les végétaux et les animaux ectothermes qui ne

produisent pas du tout ou pas suffisamment de chaleur pour maintenir une température corporelle constante, et sont donc totalement dépendants de la température environnementale. La raison fondamentale de cette dépendance provient du fait que la vitesse des réactions biochimiques dépend en grande partie de la température. L'augmentation de la température a pour effet d'augmenter la vitesse d'agitation des molécules, et par conséquent leur énergie cinétique favorisant ainsi les interactions, et donc les réactions entre plusieurs molécules. Le métabolisme, en tant que somme des processus chimiques et physiques de l'organisme, ne fait pas exception à la règle, et suit logiquement cette corrélation positive entre cinétique chimique et température.

1.2 La performance : spécialiste ou généraliste ?

L'activité métabolique globale d'un organisme comprend l'ensemble des réactions physiques et chimiques (*i.e.* l'anabolisme, le catabolisme et l'énergétique cellulaire) qui sont dépendantes de catalyseurs enzymatiques (Eckert *et al*, 1999). Or, comme pour toutes molécules, l'activité enzymatique est dépendante de la température, le métabolisme des ectothermes est par conséquent étroitement lié aux conditions thermiques de leur milieu de vie.

La performance est un terme englobant l'ensemble des paramètres écologiques (nombre de descendant, vitesse de déplacement) ou physiologiques (consommation d'oxygène, ventilation...) d'un organisme. La corrélation existant entre la performance d'un organisme ectotherme et la température corporelle peut être décrite comme une fonction (Angilletta *et al.*, 2002) dont la courbe en cloche (Figure 3) prévoit les températures critiques minimum et maximum (respectivement les températures inférieure et supérieure pour lesquelles la performance est nulle), ainsi que l'optimum thermique (plage de température dans laquelle la performance est maximale, Huey and Stevenson, 1979). Cette courbe peut

être expliquée par le *Principe d'Allocation* : il existe un compromis (trade-off) entre le maximum et l'étendue de la performance. En effet, un individu dont la performance est meilleure à son optimum thermique (par rapport à celle d'autres individus), aura une performance réduite aux températures non optimales (Huey and Hertz, 1984).

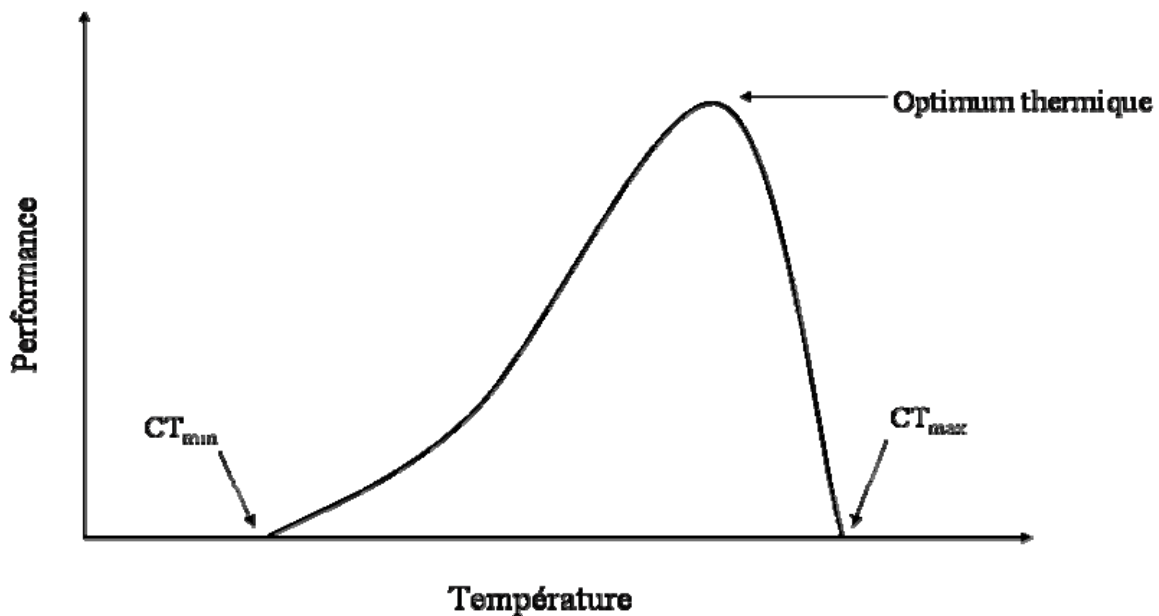


Figure 3 - Courbe théorique de performance en fonction de la température corporelle chez les ectothermes. La limite thermique critique minimum (CT_{min}) et la limite critique maximum (CT_{max}), sont respectivement les températures corporelles minimale et la maximale pour lesquelles la performance est possible. Adapté de Huey and Stevenson (1979).

Dans un environnement thermiquement constant, la sélection naturelle devrait donc théoriquement retenir les individus "spécialistes" (ou sténothermes) présentant une courbe de performance haute et étroite, (*i.e.* maximisant leur performance sur une plage de température

réduite). A l'inverse, dans un environnement variable, la courbe de performance de ces mêmes individus devrait évoluer vers un profil plus écrasé (montrant une performance optimisée sur une large plage de température, mais dont l'optimum thermique est plus faible (Huey and kingsolver, 1989) (Figure 4) ; ils seront alors caractérisés de "généralistes" (ou eurythermes).

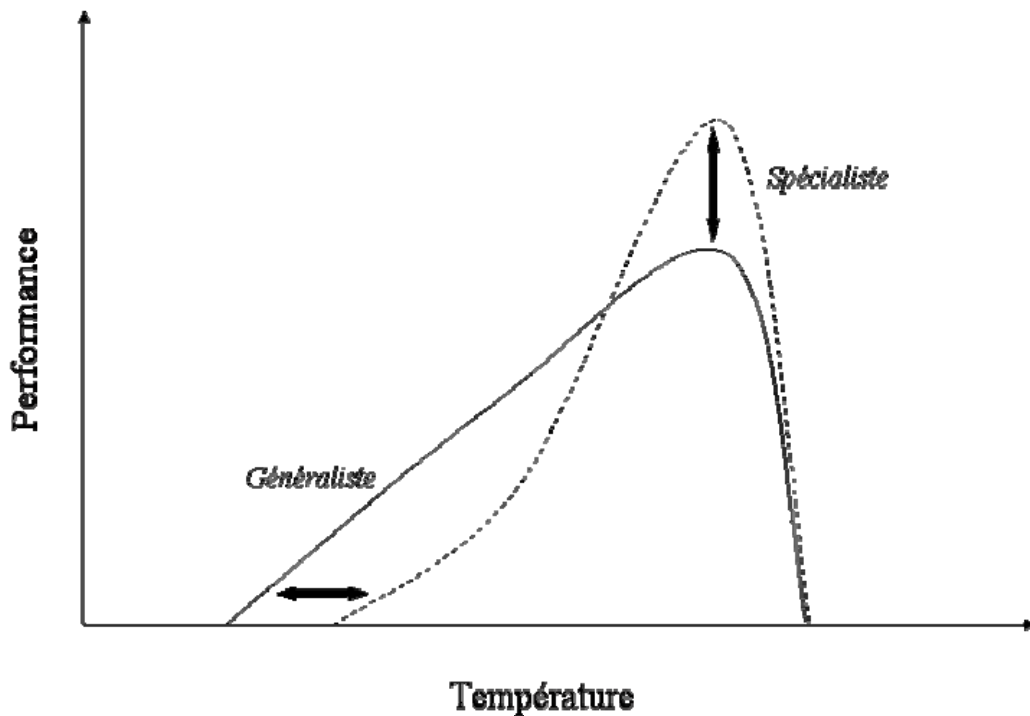


Figure 4 - Evolution théorique des courbes de performance d'un organisme spécialiste vers un profil de généraliste selon le principe d'allocation d'énergie. Adapté de Huey and Hertz (1984).

D'un point de vue purement physiologique, ce trade-off existant entre spécialistes et généralistes peut refléter un compromis entre la flexibilité et la stabilité des enzymes. Ces dernières doivent posséder une conformation flexible permettant la catalyse des réactions, tout

en restant suffisamment stables pour minimiser les risques de dénaturation lors d'exposition aux températures extrêmes. Il est certain que des enzymes peuvent supporter des plages de température plus larges, mais cela n'est possible qu'aux dépens de leur efficacité, d'où la forme écrasée de la courbe de performance des généralistes (Huey and Kingsolver, 1989).

2. Les dommages occasionnés par le froid

2.1. Notion d'échelle thermobiologique

Nous nommons « froid » la gamme de température comprise entre l'optimum thermique et la température critique minimum. Cette plage de températures corporelles peut être décomposée en différentes zones définissant l'échelle thermobiologique de l'organisme (Figure 5).

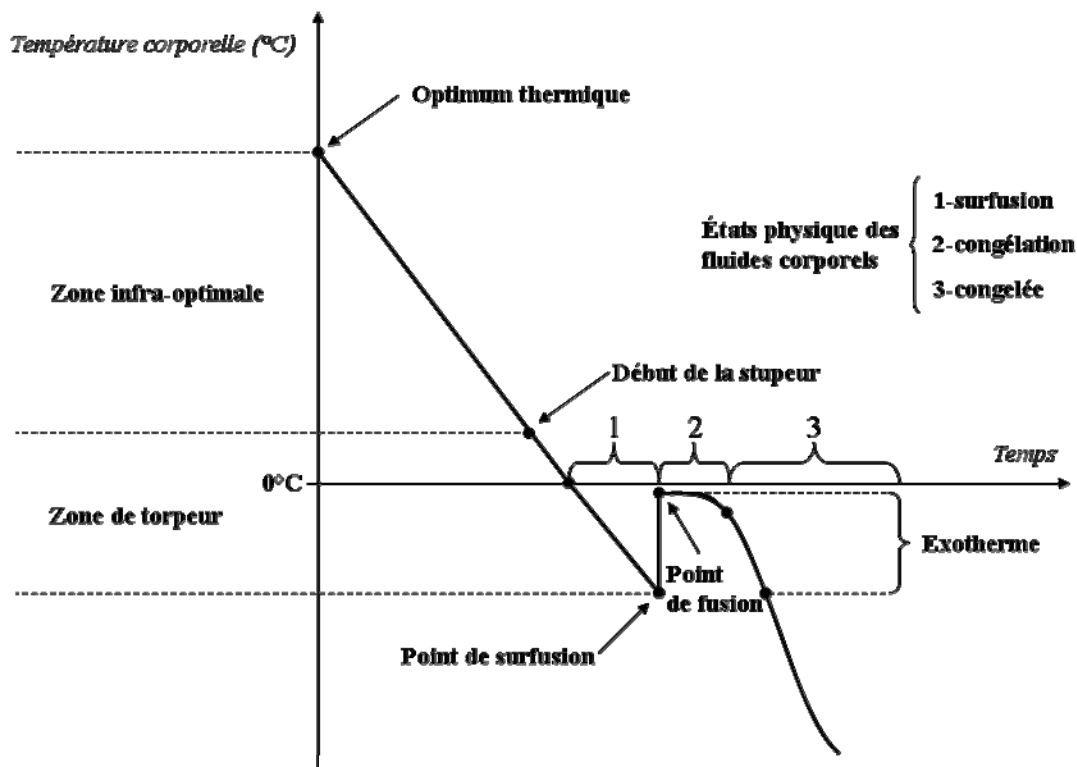


Figure 5 - Echelle thermobiologique d'un ectotherme. Adapté d'après Vannier (1994) et Uvarov (1931)

Lorsque la température environnementale diminue, l'organisme entre en premier lieu dans la zone infra-optimale durant laquelle ses fonctions essentielles sont progressivement ralenties. Si la décroissance de la température se poursuit, l'organisme atteint la zone de torpeur (ou coma) : l'activité est fortement ralentie jusqu'à son arrêt total (chill coma) (Renault et al., 1999). En dessous de cette zone, l'organisme est susceptible d'atteindre son point de congélation, c'est-à-dire la température à laquelle des cristaux de glace commencent à se former dans ses tissus. La température la plus basse à laquelle les fluides corporels passent à l'état solide est appelée température de cristallisation : T_c (ou point de surfusion : Supercooling Point, SCP). Le passage de l'eau liquide à l'état solide se manifeste par une dissipation thermique dans l'environnement. C'est cette augmentation de température (appelée exotherme, Fig. 5) qui indique que l'animal a atteint sa température de cristallisation. Il y a formation de glace tant que la température corporelle ne décroît pas de nouveau. L'exposition au froid produit des effets variés sur la biologie des ectothermes. L'ensemble des traits d'histoire de vie peut être altéré. Le ralentissement global du métabolisme va se répercuter sur des fonctions biologiques essentielles telles que la reproduction ou la croissance.

2.2. Les blessures occasionnées par le froid

Les dommages causés par le froid débutent à des températures supérieures au point de congélation des fluides corporels et peuvent même intervenir à des températures positives (Sømme, 1999). Ces « dégâts » dues au froid mais non à la congélation peuvent provenir d'une altération des membranes plasmiques, de l'activité de certaines enzymes ou d'un bouleversement de l'homéostasie ionique (Ramløv, 2000 ; Renault et al., 2004 ; Kostal et al., 2006). Il a été démontré chez un coléoptère (*Alphitobius diaperinus*) exposé au froid qu'elles étaient réversibles à condition que les insectes soient replacés à une température plus haute

pendant un temps suffisant, leur permettant ainsi de « réparer » les dommages causés par le froid (Renault et al., 2004).

2.3. Altérations de la membrane plasmique

Le premier effet du froid sur la membrane est une augmentation de sa viscosité (Grout et Morris, 1987 ; Ramlov, 2000). Ainsi, Les fonctions membranaires essentielles, depuis la barrière physique à la diffusion libre des solutés, jusqu'au transport spécifique de soluté ainsi que la production et la régulation du gradient d'ions transmembranaire peuvent être altérées et même interrompues si la viscosité membranaire devient trop forte (Eckert et al., 1999).

2.4. Altérations des protéines et des acides nucléiques

Les protéines tiennent une place prépondérante dans le fonctionnement de la cellule car elles sont impliquées dans la structure cellulaire et interviennent sous la forme d'enzymes dans les voies métaboliques de catabolisme et d'anabolisme. Le froid diminue l'effet stabilisant des groupes hydrophobes des acides aminés composant une protéine, causant ainsi sa dénaturation (Hochachka and Somero, 2002). La dénaturation des protéines due au froid est souvent réversible (Franks, 1985). Par exemple, la tubuline se dépolymérise lors d'une exposition aux basses températures mais peut se re-polymériser lors du retour à la normale de la température (Timasheff, 1978). Cependant, certaines protéines peuvent être dénaturées de façon irréversible en formant des agrégats (Ramløv, 2000).

Le problème structurel lié au froid est très différent pour les acides nucléiques. Les liaisons entre paires de bases, stabilisant la structure secondaire des acides nucléiques, se renforcent parallèlement à la diminution de la température. Ainsi, les basses températures ont pour effet de rendre ces molécules « trop stables », empêchant le changement de conformation nécessaire à leur activité (réplication, traduction...) (Hochacka and Somero, 2004). De plus,

cette stabilité accrue peut mener à la formation d'éléments structurels anormaux qui altèrent le système.

Le froid peut donc engendrer des dommages aux protéines et aux acides nucléiques, en déstabilisant les uns et en stabilisant trop fortement les autres. L'action cumulée de ces dysfonctionnements peut provoquer un ralentissement de la synthèse protéique, jusqu'à son arrêt complet si la température devient trop basse (Grout and Morris, 1987).

Ces dégâts cellulaires se traduisent au niveau de l'organisme par le *chill coma*.

2.5. *Chill coma*

Lorsqu'un ectotherme est refroidi au dessous de son optimum thermique, celui-ci peut tomber dans un état de torpeur appelé *chill coma* (Vannier, 1987). Outre le rôle évident que joue l'altération des membranes et des protéines dans l'entrée en *chill coma*, la perte de l'activité pourrait également s'expliquer par le non maintien de l'homéostasie ionique. Chez le cafard *Nauphoeta cinerea*, il a été démontré que les individus en état de *chill coma* présentaient des concentrations extra-cellulaires en ions Na^+ , K^+ et Mg^{2+} significativement différentes de celles des témoins. Ainsi, cette altération des gradients ioniques transmembranaires pourrait être à l'origine du dysfonctionnement du système nerveux central, provoquant l'entrée en *chill coma* (Renault et al., 1999 ; Kostal et al., 2004 ; 2006).

2.6. *Le processus de nucléation : notions biophysiques*

Lorsque la température atteint le point de fusion des fluides corporels (MP, Melting Point), la probabilité de formation spontanée de cristaux de glace devient très forte (Ramløv, 2000). Dans une solution aqueuse, la nucléation (i.e. la formation de cristaux de glace) peut se produire à n'importe quelle température en dessous de son point de fusion. Si la nucléation ne se produit pas à la température de fusion de la solution, cette dernière est considérée en état de

surfusion. Cet état est métastable, la cristallisation peut dès lors se produire spontanément par agrégation des molécules d'eau autour d'un noyau de glace (nucléation homogène), d'une substance ou encore autour d'une irrégularité d'une surface (nucléation hétérogène) (Franks, 1985). La nucléation est un processus stochastique qui dépend de la probabilité qu'un nombre suffisant de molécule d'eau forme un embryon de cristal de glace (Vali, 1995). La nucléation est régie par trois facteurs physiques :

- La température : plus elle est basse, moins le nombre de molécule d'eau nécessaire à la formation d'un embryon de glace est important, donc plus la probabilité de nucléation augmente.
- Le volume : plus le volume de la solution est grand, plus la probabilité qu'un embryon de glace se forme est grande.
- La présence d'agents nucléants causant une nucléation hétérogène.

Une fois que la congélation est initiée, la formation progressive de glace entraîne une augmentation de la concentration des solutés au sein de la fraction liquide restante. La progression de la glace stoppe lorsque les tensions de vapeur d'eau de la solution restante et celle de la glace s'égalisent (Ramløv, 2000). Ce phénomène physique est appelée « concentration par congélation » (Freezing concentration), et repose sur le fait que la glace n'est composée que d'eau pure, et que seulement très peu de substances peuvent y être incorporée. La glace va donc « chasser » les solutés vers la fraction liquide restante, dont la concentration va augmenter.

2.7. Congélation dans un système biologique

Chez les animaux, la congélation est généralement initiée dans le compartiment extracellulaire, à partir d'agents nucléants exogènes (tels que les aliments présents dans le

tube digestif), de protéines membranaires ou en solution dans le sang ou l'hémolymphe. La congélation peut également être initiée par inoculation lors d'un contact avec un cristal de glace extérieur (inoculative freezing) (Salt, 1963 ; Layne et al., 1990 ; Packard et al., 1993 ; Issartel et al., 2006). La congélation intracellulaire est létale, hormis chez quelques rares organismes (ex : le nématode arctique *Panagrolaimus davidi* ; Wharton and Ferns, 1995). Lorsque la cristallisation se propage dans le compartiment extracellulaire, les solutés dissous dans les fluides corporels se concentrent.

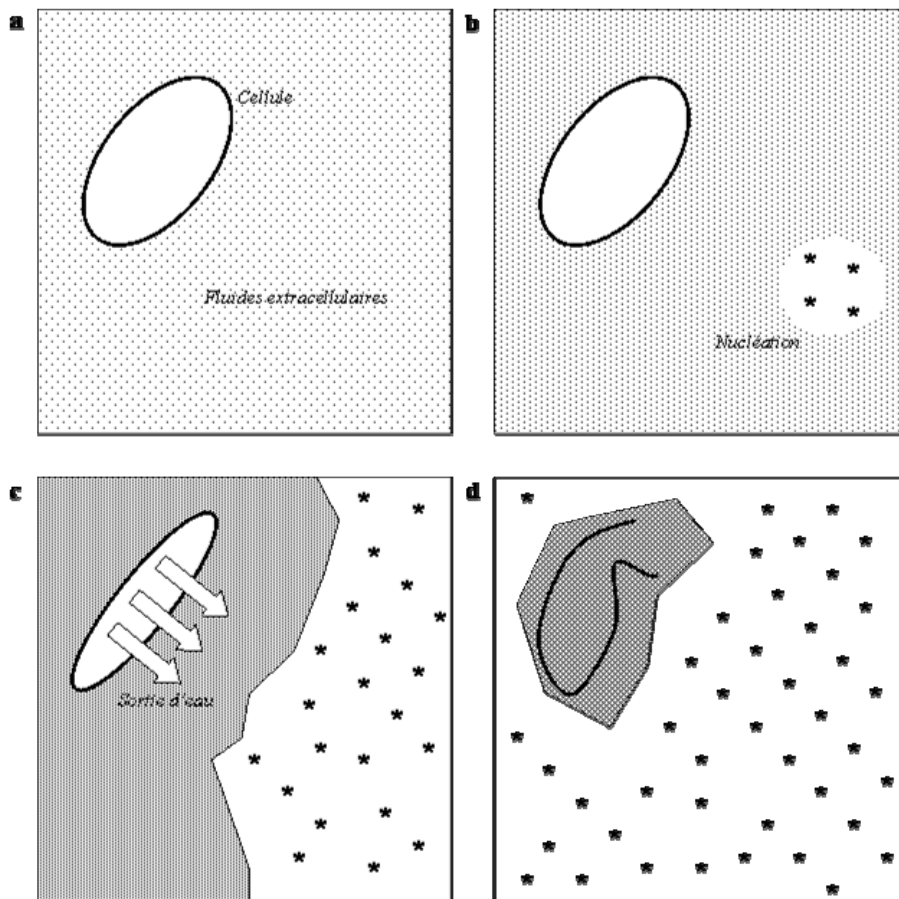


Figure 6 – Processus de congélation. a : une cellule en solution ; b : nucléation extracellulaire (*) = glace ; c : concentration des fluides extracellulaires due à la congélation et écrasement de la cellule due au flux osmotique d'eau résultant (\Rightarrow) ; d : rupture de la membrane due au dépassement du volume minimum cellulaire. Adapté d'après Ramløv (2000).

L'augmentation des concentrations de certaines substances ainsi que le changement de pH qui en découle peuvent mener à l'altération de l'activité des enzymes et à la précipitation et à la dénaturation des protéines contenues dans les fluides (Hochachka and Somero, 2004).

L'osmolarité du milieu extracellulaire augmente au fur et à mesure que la glace se propage, et cela a pour effet de provoquer une sortie d'eau des cellules vers l'extérieur (Figure 6b) jusqu'à ce que les pressions de vapeur d'eau des compartiments gelés et liquides s'équilibrent (Mazur, 1984). Si la température descend de nouveau, la glace progresse de nouveau et le flux osmotique vers l'extérieur de la cellule la conduit à s'écraser davantage jusqu'au volume minimum cellulaire (Figure 6c), typiquement atteint lorsque 65% de l'eau corporelle est prise en glace (Storey and Storey, 1993). Le dépassement de ce volume minimum peut mener à la rupture de la membrane (Figure 6d).

3. Adaptations des ectothermes aux basses températures

De par leur incapacité à maintenir une température corporelle constante, les ectothermes peuvent paraître totalement dépendants des conditions thermiques régnant au sein de leur environnement. Pourtant, des groupes tels que les insectes, les crustacés et les poissons ont réussi à coloniser des milieux présentant des températures (constamment ou épisodiquement) particulièrement basses (Ramløv, 2000). Ces remarquables succès évolutifs impliquent l'existence d'adaptations particulières leur permettant de surmonter ces conditions thermiques hostiles. Ces mécanismes peuvent être comportementaux, physiologiques ou biochimiques.

3.1. Adaptations comportementales

Lorsque le milieu ne présente temporairement plus les conditions thermiques sub-optimales, certains ectothermes fuient leur milieu initial et cherchent de nouveaux habitats « refuges » offrant des températures moins stressantes pour l'organisme (Eckert et al., 1999).

Durant les nuits fraîches d'été, on observe par exemple la migration de la punaise *Pyrocoris* sous l'écorce des arbres ou sous les pierres, où il règne une température et une humidité plus propice à leur survie.

Les insectes qui vivent dans des régions où les saisons favorables alternent avec des saisons froides survivent en entrant périodiquement en dormance profonde ou diapause. Celle-ci peut se produire à n'importe quel stade du cycle évolutif, et ce stade varie selon l'espèce. L'insecte se préparant à entrer en dormance cherche un endroit protégé (thermiquement plus stable) sous des feuilles ou de l'écorce ou encore dans le sol.

Une stratégie bien différente pour contrer la saison difficile est la migration sur de longues distances. En utilisant le vent, certaines espèces migrent sur plusieurs milliers de kilomètres dans des régions où le climat est plus favorable.

3.2. Adaptations cellulaires

- Au niveau membranaire

Lors d'une exposition au froid, les animaux ectothermes ont la capacité de maintenir une fluidité membranaire nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. Ce phénomène est appelé adaptation homéovisqueuse de la membrane. Il consiste à modifier progressivement le taux de saturation des phospholipides membranaires. Les acides gras (composant les phospholipides) dits *insaturés* contiennent des liaisons « double carbone » (C=C) dans leur squelette et ont des points de fusion plus bas que les acides gras dits *saturés* ne possédant pas ce type de liaison dans leur chaîne. Plus le squelette comporte de liaisons double carbone, plus la molécule reste en mouvement aux basses températures. Il a été démontré que suite à une exposition au froid, les membranes plasmiques comportaient davantage de lipides insaturés,

maintenant ainsi la fluidité membranaire aux basses températures (permettant ainsi la continuité des processus tels que l'exocytose ou l'endocytose) (Hochachka et Somero, 2004). Bien que cette adaptation semble importante lors du processus d'acclimatation au froid, elle ne peut suffire à l'expliquer en totalité (Eckert et al., 1997). En effet, certains ectothermes survivants aux changements de températures ne présentent pas d'adaptation homéovisqueuse de la membrane (Hazel, 1951). Cela sous-entend qu'il existerait chez ces animaux d'autres mécanismes physiologiques ou métaboliques leur permettant de conserver l'intégrité de la membrane plasmique.

- Au niveau enzymatique

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe une relation étroite entre la cinétique enzymatique et la température. Certains ectothermes eurythermes peuvent pourtant être confrontés à des températures extrêmement différentes au cours de l'année tout en conservant leur activité. C'est le cas des poissons des rivières tempérées, où la température peut varier de 3 à 25°C selon les saisons. D'autres animaux, tels que les poissons des régions polaires, sont spécialistes des température extrêmes et vivent parfaitement bien à -1.8°C. Comment un organisme eurytherme peut-il présenter des activités similaires à 5 ou à 25°C ? Comment un ectotherme peut-il développer une activité à des températures proche de 0°C ?

L'une des explications à ces phénomènes réside dans la modulation de l'activité ou des propriétés des enzymes intervenant dans le métabolisme. Il a été mis en évidence qu'il existait une corrélation entre la température moyenne de l'habitat d'un ectotherme et i) la température de dépolymérisation de certaines de ses enzymes, ou/et ii) l'optimum thermique auquel ces enzymes fonctionnent. Cela démontre l'existence de différences structurelles entre les enzymes provenant d'espèces vivant dans des environnements thermiquement différents. Prenons le cas des biotopes froids. Les enzymes fonctionnant aux basses températures doivent

i) pouvoir tout d'abord résister à ces températures, ii) présenter une conformation suffisamment flexible pour que les interactions catalytiques se réalisent efficacement, et iii) doivent présenter des énergies d'activations basses (Somero, 2004). C'est cette grande flexibilité structurelle qui autorise une énergie d'activation basse, et qui permet donc de fonctionner aux températures froides. Mais c'est également cette grande flexibilité qui est à l'origine de leur grande instabilité thermique. Ainsi, l'exposition de l'enzyme à une température supérieure de quelques degrés à la valeur usuelle peut engendrer son inactivation, puis sa dépolymérisation (Hochachka and Somero, 2002).

Certains mécanismes adaptatifs enzymatiques mettent en jeu une compensation thermique résultant simplement de la variation de la concentration des enzymes plutôt que de la modification de leurs caractéristiques fonctionnelles ou structurelles. Ainsi, chez certains ectothermes vivant en milieu thermiquement variable, lorsque la température quitte l'optimum thermique d'une enzyme donnée, un signal est émis et induit une « surproduction » de cette enzyme afin de compenser sa diminution d'activité (Eckert et al., 1999). Un autre mécanisme permettant également de conserver une activité sur une grande plage thermique consiste à synthétiser des iso-enzymes présentant des optimums thermiques à des températures différentes. Ainsi, certains organismes peuvent synthétiser toute une gamme d'enzymes ayant la même fonction mais fonctionnant de manière optimale à des températures différentes. Leur synthèse est induite lors de l'acclimatation à une nouvelle température (Richmond and Zimmerman, 1978 ; Lesser and Kruse, 2004 ; Zakhartsev et al., 2004 ; Somero, 2004).

3.3. Stratégies de tolérance au froid

Deux grandes stratégies ont été mises en évidence chez les ectothermes pour survivre au froid (Tableau 2) : l'intolérance à la congélation et la tolérance à la congélation.

Intolérance à la congélation	Tolérance à la congélation
Point de surfusion = CTmin	Point de surfusion \neq CTmin
Formation de glace létale	Survie à la formation de glace extracellulaire
Grande capacité de surfusion	Capacité de surfusion limitée
Polyols agissant comme antigel, stabilisant membranes et protéines	Polyols stabilisant les membranes et protéines
Élimination des agents nucléants	Conservation/synthèse d'agents nucléants

Tableau 2 – Les deux stratégies de tolérance aux basses températures chez les ectothermes. Adapté d'après Block (1991).

Les animaux intolérants au gel, comme leur nom l'indique, ne tolèrent pas la formation de cristaux de glace dans leurs tissus, le point de surfusion correspond donc chez eux à la CTmin (ou LLT ; Lower Lethal Temperature). Ces animaux présentent en général une importante capacité à diminuer leur SCP. Malgré la métastabilité de cet état, certains ectothermes en surfusion peuvent endurer des températures atteignant -25°C durant de longues périodes (Ring, 1982).

Les animaux tolérant la congélation survivent aux cristaux de glace extracellulaires, leur LLT est par conséquent différente de leur température de cristallisation. Du fait de la présence d'agents nucléants ou de l'inoculation des fluides corporels, la capacité de surfusion des tolérants au gel est très limitée. Ainsi, le point de surfusion est relativement proche du point de fusion de l'animal (entre -2 et -10°C ; Zachariassen, 1980 ; Block, 1991). La tolérance au gel implique en outre la capacité de l'organisme à contrôler le site de nucléation, la vitesse de progression de la glace et la quantité de glace formée (Ramløv, 2000). Différents mécanismes ont été développés par les animaux afin de remplir ces conditions.

-Les substances de faible poids moléculaires

La plupart des animaux tolérants au froid synthétisent et accumulent des molécules cryoprotectrices. Ces substances de faibles poids moléculaires (Low Molecular Weight, LMW) appartiennent en général aux familles des polyols (glycerol, mio-inositol...), des sucres (glucose, tréhalose...) ou encore des acides aminés (proline, alanine). Les substances cryoprotectrices sont des solutés compatibles, c'est-à-dire qu'elles ne perturbent pas le fonctionnement des systèmes biochimiques, même à forte concentration (Hochachka and Somero, 2002). Ces molécules jouent des rôles essentiels dans chacune des deux stratégies de tolérance au froid, que ce soit pour prévenir des dommages dus au froid ou au gel (action non-colligative), ou pour diminuer la température de cristallisation (action colligative) des fluides corporels. Leur action spécifique dépend de leur nature et de leur concentration (Ramløv, 2000).

Certaines substances de faible poids moléculaire accumulées en quantité modérée ont des actions spécifiques au niveau de la stabilisation des membranes plasmiques (Storey, 1997). Les acides aminés ainsi que le tréhalose ont été décrits par de nombreux auteurs comme des molécules hautement impliquées dans la stabilisation des membranes lors de stress tels que les basses températures, le gel ou la déshydratation (Rudolph and Crowe 1988; Storey, 1997). Ces substances minimisent l'accroissement de la viscosité des membranes dû au froid en interagissant avec les têtes phospholipidiques, maintenant ainsi la fluidité et l'intégrité de la bicouche lipidique nécessaires au bon fonctionnement de la cellule durant l'exposition au froid (Storey, 1997). Les molécules cryoprotectrices protègent également les protéines des dommages du froid. En effet, il a été démontré que l'activité de certaines enzymes ayant été congelées en présence de molécules cryoprotectrices était conservée (Carpenter and Crowe, 1988 ; Carpenter et al., 1990). Les molécules tels que le tréhalose ou la glycine possèdent la

propriétés d'être tenues éloignées de la surface des protéines (répulsion due aux charges négatives portées par la protéine) et de lier les molécules d'eau (par formation d'une liaison hydrogène avec l'oxygène de l'eau). Ainsi, la présence de telles substances autour d'une protéine crée un réseau de molécules d'eau stable, qui a pour conséquence de diminuer le risque de dénaturation dû au froid ou à la congélation (Carpenter and Crowe, 1988 ; Ring and Danks, 1998).

-Diminution du point de congélation et notion d'eau liée

Dans un système biologique, l'eau peut exister sous une forme libre et une forme liée. L'eau libre correspond à la fraction de molécules d'eau circulant librement et pouvant intervenir dans des réactions chimiques ou des processus physiques telle que la nucléation. Par opposition, la fraction liée correspond aux molécules d'eau qui sont si intimement associées à des composants cellulaires ou autres qu'elles ne peuvent participer à aucun processus chimique ou physique telle que la nucléation (Hazelwood, 1977). Lorsqu'ils sont accumulés en grande quantité (généralement entre 0.2 et 2 M et peuvent représenter jusqu'à 50% de la masse corporelle), les LMW peuvent jouer le rôle de substances antigels (Storey, 1997). L'augmentation d'une osmole de soluté dans les fluides corporels conduit à diminuer le point de surfusion de 1.86°C (Storey, 1997). Ce phénomène est fondamentalement corrélé à leur nature hydrophile. Il a été mesuré chez la larve du diptère *Eurosta solidaginis* (Storey et al., 1981) et chez le crustacé *Niphargus rhenorhodanensis* (Issartel et al., 2006) que la fraction d'eau liée augmente avec la diminution de la température d'acclimatation, conjointement à la synthèse de LMW ;. Ainsi, l'accumulation massive de LMW chez les ectothermes intolérants au gel conduit à la diminution du SCP des fluides corporels bien en dessous du point de fusion, en augmentant la fraction d'eau non disponible à la congélation. La synthèse de LMW et donc la diminution du SCP sont initiées chez les ectothermes intolérants au gel par

différents facteurs environnementaux, comme la diminution de la température ou la variation de la photopériode.

L'eau liée jouerait également un rôle prépondérant chez les ectothermes tolérants au gel. L'augmentation de l'eau liée intracellulaire induite par l'accumulation de LMW conduit à diminuer le point de congélation des fluides contenus dans la cellule (Storey et al., 1981). D'autre part, l'hydratation des macromolécules joue un rôle essentiel dans le maintien de la stabilité de toutes les structures biologiques (Hochachka and Somero, 2002). Ainsi, lors de la fuite osmotique d'eau vers l'extérieur de la cellule, la présence de LMW (ainsi que de certaines macromolécules comme le glycogène) autour des composants cellulaires maintient une couche d'eau liée suffisante pour éviter les dommages engendrés par la déshydratation (arrêt de l'activité enzymatique, dénaturation des protéines...). Enfin, l'eau liée serait impliquée dans la régulation du métabolisme lorsque l'organisme est gelé (Storey et al., 1983).

3.4. Protéines antigels

Mis à part les substances de faibles poids moléculaires, il existe d'autres composés, de nature protéique, qui interviennent dans la diminution du point de cristallisation des animaux intolérants au gel. Ces protéines antigels, présentes majoritairement chez les poissons polaires et certains insectes polaires (Ramløv, 2000), ont un mode d'action totalement différent des LMW : suite à la nucléation dans les fluides extracellulaires, elles agiraient en s'insérant dans les cristaux de glace en formation, empêchant ainsi leur expansion, en créant des ponts hydrogènes entre les atomes d'oxygène de la glace et les groupes hydroxyles de la protéine (DeVries and Lin, 1977). Cela a pour effet de diminuer le SCP sans pour autant diminuer le point de fusion des liquides, et c'est cette particularité biophysique qui les rend détectables expérimentalement.

3.5. Protéines de nucléation et agents nucléants exogènes

Les animaux tolérant la congélation doivent impérativement contrôler le site de nucléation, la température à laquelle la nucléation va se produire et la vitesse de propagation de la glace dans le corps (Ramløv, 2000). Cela est possible par la présence d'agents nucléants (qui déclenchent la nucléation) dans des sites spécifiques de l'organisme. Ces agents nucléants peuvent être d'origine exogènes (particules ou bactéries dans les tubes digestifs), ou endogènes, *i.e.* synthétisés par l'organisme (protéines de nucléation). Ils ont en commun de limiter la surfusion des fluides corporels en initiant la nucléation en de très nombreux sites extracellulaires. La formation simultanée de glace en différents sites semble empêcher la formation de cristaux de glace de grande taille, particulièrement dommageables pour la cellule. Enfin, la nucléation se produisant à relativement haute température (entre -2 et -10°C), la progression de la glace s'en retrouve ralentie et contrôlée (le taux de glace dans le corps ne dépasse jamais la limite létale de 65 %) (Lee and Costanzo, 1998), permettant un ajustement physiologique aux stress osmotiques et mécaniques provoqués par le gel, grâce à la synthèse et l'accumulation de stabilisateurs de membranes et de protéines (Storey, 1997).

3.6. Vers une troisième stratégie : la déshydratation protectrice

Certains auteurs s'accordent pour dire qu'il existerait une troisième stratégie baptisée « déshydratation protectrice », mise en évidence chez certains annélides (Holmstrup and Zachariassen, 1996) et arthropodes du sol (Block and Worland, 2003). Ces organismes subissent une lente déshydratation de leurs tissus jusqu'à ce que les pressions de vapeur d'eau de l'environnement et de leur corps s'égalisent. La teneur en eau dans leurs tissus est alors très faible, et la concentration des fluides corporels très forte ; le risque de formation de cristaux de glace devient dans ces conditions quasiment inexistant (Holmstrup et al., 2002).

Les animaux utilisant cette stratégie accumulent également des LMW dans leurs tissus afin de prévenir les dégâts de la déshydratation sur les composants cellulaires.

QUATRIEME PARTIE : PROBLEMATIQUE, OBJECTIF, METHODOLOGIE ET PRESENTATIONS DES PUBLICATIONS

1. Problématique générale et objectifs

Les organismes peuplant les écosystèmes superficiels sont généralement sujets aux variations journalières ou saisonnières de la température. Ils ont donc dû s'adapter à ces variations thermiques afin de minimiser leur impact sur leur biologie. A l'inverse, les animaux souterrains, eux, ne subissent jamais de variation de la température car leur habitat compte parmi les environnements les conditions thermique les plus stables de la planète ($\pm 1^\circ\text{C}$ sur l'année, Ginet et Mathieu, 1968).

Selon les modèles théoriques développés en écophysiologie, un organisme qui évolue dans un milieu aux températures stables est un spécialiste (sténotherme) d'une étroite gamme de température. A l'inverse, un organisme qui évolue dans un milieu aux températures variables est un généraliste (eurytherme) qui maximise sa performance sur une large plage de température (voir troisième partie, chap. 1.2) (Huey et Hertz, 1984).

Conformément à ces prévisions, les animaux souterrains (ne subissant aucune variation de la température durant leur cycle de vie) devraient présenter des caractéristiques de sténothermes, se traduisant par une faible capacité d'acclimatation et une courbe de performance étroite, ainsi que par une mortalité élevée aux températures infra-optimales.

Pourtant, des travaux préliminaires ont montré que le crustacé aquatique souterrain *Niphargus rhenorhodanensis* montrait une étonnante résistance à des températures supra et

infra-optimales (Ginet et Mathieu, 1968 ; Mathieu, 1982). Bien que ces études n'aient pas ou peu pris en compte l'effet de l'acclimatation, ni l'impact des températures extrêmes sur la biologie de cette espèce, elles ont néanmoins permis de mettre en évidence une capacité de survie surprenante chez un animal souterrain. Certains biospéologues attestent même l'avoir accidentellement « congelé », suite à quoi un nombre important d'individus avait survécu (Mathieu ; Hervant, com. pers).

Ces observations suggèrent l'existence d'adaptations complexes telles celles rencontrées chez les ectothermes terrestres épigés habitant les zones tempérées ou froides. La survie aux basses températures sous-entend tout d'abord que *N. rhenorhodanensis* a la capacité de s'acclimater donc de pouvoir réaliser les ajustements physiologiques et métaboliques nécessaires au maintien de son homéostasie à des températures différentes de celles qu'il rencontre habituellement dans son milieu.

Cela conduit à poser les questions suivantes : **(1) quelle est sa capacité d'acclimatation et quelle est son échelle thermobiologique ?** Nous serons alors en mesure de déterminer **le profil de cet organisme (eurytherme ou sténotherme).**

D'autre part, la tolérance au froid et au gel a été largement étudiée chez les insectes terrestres, mais très rarement chez les crustacés. Une étude de Tanaka and Udagawa (1993) sur le crustacé terrestre *Porcellio scaber* montre que ce dernier accumule du trehalose ainsi que du myo-inositol lors d'une acclimatation au froid mais ne tolère pas la congélation. Aucune étude concernant la tolérance aux basses températures et au gel chez des macro-crustacés aquatiques n'a été réalisée (à notre connaissance) jusqu'à maintenant. Ainsi, dans une approche plus mécanistique, nous chercherons à savoir **(2) quels sont les mécanismes adaptatifs permettant au crustacé aquatique *N. rhenorhodanensis* de tolérer les basses températures et le gel ?**

Une fois ces mécanismes identifiés, il sera alors possible de les replacer dans un contexte comparatif. En effet, les études traitant de la tolérance au froid chez les ectothermes sont principalement focalisées sur des organismes terrestres. Le milieu aquatique présente des contraintes considérablement différentes de celles du milieu terrestre, en particulier vis-à-vis de la température. **(3) Ces mécanismes adaptatifs sont-ils les mêmes que ceux rencontrés chez les ectothermes terrestres ? Et (4) sont-ils répandus chez les espèces souterraines ?**

Enfin, se pose la question de l'origine de ces adaptations, le « pourquoi ». En effet, la présence de tels mécanismes chez des animaux qui ne subissent pas de variation de la température durant leur cycle de vie demeure paradoxale car ils n'ont en apparence aucune logique écologique, en d'autres termes : **(5), quel est le sens écologique de telles adaptations ?**

Mon travail de thèse a consisté à identifier et comprendre les mécanismes adaptatifs permettant la survie aux variations de la température (en particulier au froid) chez les organismes souterrains, en replaçant ces adaptations dans un contexte évolutif. Son originalité réside dans son approche intégrative, utilisant des outils et des concepts de l'écologie souterraine, de la physiologie et de la biogéographie.

2. Organisme étudiés

Nous avons testé l'effet des températures sur deux crustacés amphipodes stygobies largement représentés dans les milieux aquatiques souterrains de France et d'Europe :

-*Niphargus rhenorhodanensis* (Figure 7A) est un amphipode stygobie ubiquiste, c'est-à-dire qu'il est capable de coloniser aussi bien les milieux karstiques que phréatiques. A l'âge

adulte, il peut mesurer jusqu'à 1.5 cm de long et peser entre 10 et 15 mg. L'échantillonnage de *N. rhenorhodanensis* a été réalisé à Chalamont (forêt de Chassagne, Ain). La nappe phréatique dans laquelle vivent ces animaux communique entre 15 et 30 jours par an lors de fortes précipitations avec le fond de canaux de drainage de la forêt de Chassagne. Les crustacés sont capturés en tombant dans des pots en verre enfoncés de quelques centimètres dans les sédiments.

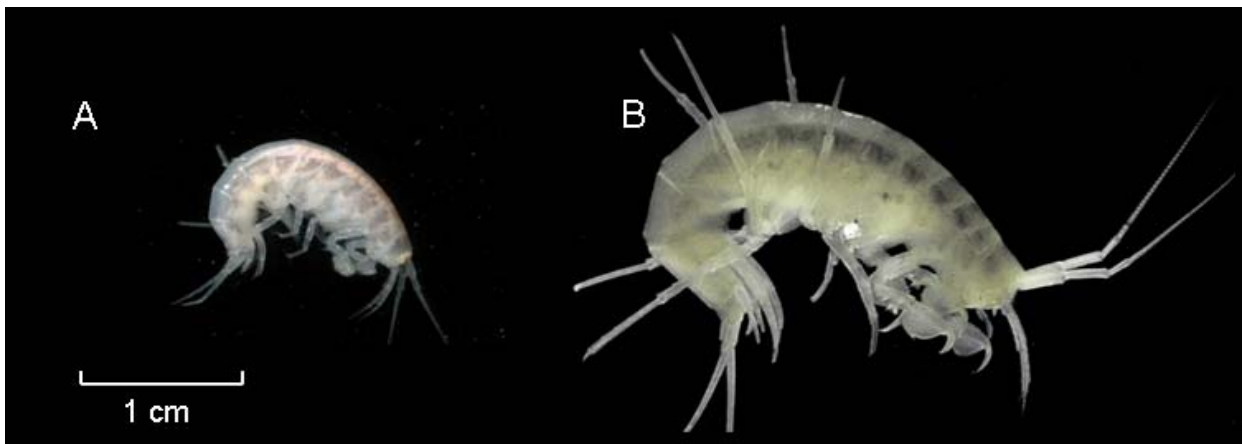


Figure 7 – (A) *Niphargus rhenorhodanensis* (Shellenberg) et (B) *Niphargus virei* (Chevreux).

-*Niphargus virei* (Figure 7B) est un amphipode strictement karstique, il peut mesurer jusqu'à 2.5 à 3.5 cm et peser entre 90 et 150 mg. Les spécimens utilisés pour cette étude ont été prélevés à différentes exurgences (évacuation d'eau d'un aquifère karstique) du Jura ou de la région de Dijon par filtration en tendant un filet perpendiculairement au cours d'eau.

A titre de comparaison, et pour mettre en relief les réponses aux variations de températures des organismes souterrains, un crustacé épigé, vivant donc en milieu thermiquement variable, a été étudié :

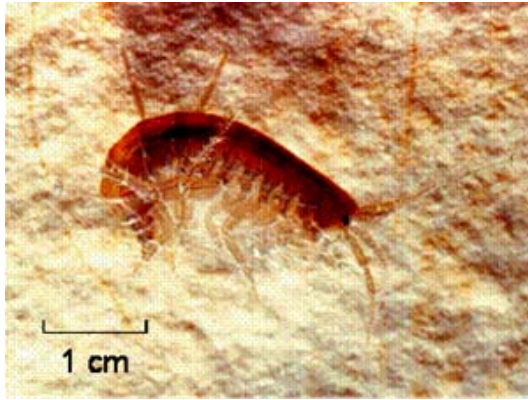


Figure 8 – *Gammarus fossarum* (Koch).

-*Gammarus fossarum* (Figure 8) est un crustacé amphipode morphologiquement proche des amphipodes du genre *Niphargus*. Il vit dans les étangs et dans les rivières bien oxygénées en milieu tempéré et se nourrit principalement de débris végétaux. Il atteint une taille moyenne de 1.5 cm (pour 30 mg en moyenne). La collecte de *G. fossarum* est effectuée dans une petite rivière (La Verna, Hyères sur Amby, Ain) à l'aide d'un filet.

3. Méthodologie et présentation des publications

Pour déterminer l'impact des températures sur les animaux souterrains, nous avons comparé les réponses de deux crustacés amphipodes aquatiques hypogés, *Niphargus rhenorhodanensis* et *N. virei* à celles d'un amphipode épigé morphologiquement proche, *Gammarus fossarum*.

Acclimatation

Ces expériences ont nécessité des temps d'acclimatation de 6 mois à 12 et à 3°C en chambres climatisées ($T \pm 0.1^\circ\text{C}$). Les acclimations à -2°C (2 semaines) ont été réalisées à partir des animaux préalablement acclimatés à 3°C. Les organismes ont été individuellement placés dans des tubes contenant 3 ml d'eau issue des bacs d'élevage. Cette eau, chargée des produits de la dégradation des feuilles d'arbres présentes dans les bacs d'élevage, peut demeurer en surfusion jusqu'à -3,5°C.

Expérimentations et publications

-Nous avons mesuré **les capacités de survie** de ces animaux pour des températures allant de -2°C à 28°C, grâce à la mesure de la durée létale pour 50 % de la population ou DL₅₀. Cette expérience préliminaire donne une excellente indication des potentialités d'un organisme face à un stress thermique (**Publication 1**).

-L'évolution de la **consommation d'oxygène** en fonction de la température (de -2°C à 28°C), afin de déterminer plus finement l'échelle thermobiologique des organismes. Cette expérience permet de mesurer la capacité de chaque espèce à maintenir son métabolisme lors de l'exposition à des températures non optimales. Il a dès lors été possible de déterminer les optimums thermiques, ainsi que les B₈₀ (plage de température pour laquelle la performance peut être maintenue au dessus de 80 % de la valeur maximale) de chaque espèce, et enfin de déterminer si l'organisme étudié peut être considéré comme un eurytherme ou un sténotherme (**Publication 1**).

-L'évolution du **comportement locomoteur** (fréquence des déplacements) lors d'une exposition à différentes températures (de -2°C à 28°C). Cette étude permet de connaître le comportement global adopté par les organismes lors d'un stress thermique, ainsi que les températures critiques minimum et maximum pour lesquelles la locomotion devient nulle. Nous avons également mesuré **l'évolution de la ventilation** (fréquence des battements des appendices ventilatoires, les pléopodes) pour les mêmes températures avec les mêmes objectifs que pour la consommation d'oxygène et l'activité locomotrice (**Publication 1**).

Aux vues de l'étonnante capacité de survie aux basses températures de *N. rhenorhodanensis*, nous avons entrepris d'explorer plus profondément les mécanismes adaptatifs responsables de la tolérance au froid chez ces trois espèces.

-L'évolution de la **teneur en substances cryoprotectrices** mesurées sur des animaux acclimatés à 12, 3 et -2°C. Le dosage des acides aminés libres, ainsi que les sucres et polyols chez des organismes acclimatés à différentes températures a permis de mesurer leur capacité d'acclimatation au froid (**Publication 2**).

-La mesure de la **température de congélation** et la survie à la congélation chez des animaux acclimatés à 12, 3 et -2°C a permis de déterminer si l'acclimatation induit une diminution du point de surfusion chez ces organismes (**Publication 3**).

-La **tolérance à la congélation par inoculation**, *i.e.* déclenchement de la congélation des fluides corporels par un agent extérieur (ex : cristaux de glace) à une température supérieure au point de congélation de l'organisme chez des spécimens acclimatés à 12, 3 et -2°C. Cela nous a permis de déterminer les capacités de survie au gel dans des conditions plus proches de celles que rencontrent les organismes aquatiques lorsque ceux-ci rencontrent les températures négatives. Suite à la congélation par inoculation, le pourcentage de glace corporelle a été quantifié et nous a permis de vérifier si ces organismes avaient la capacité de « contrôler » leur quantité de glace intratissulaire, ce qui représente un trait hautement adaptatif chez les animaux tolérants à la congélation (**Publication 3**).

-La **proportion d'eau liée** (*i.e.* le pourcentage d'eau se trouvant associée à des composants cellulaires ne pouvant pas participer au processus de congélation) en fonction de la

température d'acclimatation (12, 3, et -2°C) (**Publication 3**), nous permettant de savoir si ces crustacés diminuent leur quantité d'eau disponible pour la congélation en fonction de l'acclimatation.

Publication 1



Received 3 September 2004; received in revised form 23 February 2005; accepted 24 February 2005
Available online 11 May 2005

Behavioural, Ventilatory and Respiratory Responses of Epigeal and Hypogeal Crustaceans to Different Temperatures

Julien Issartel ^{a,*}, Frédéric Hervant ^a, Yann Voituron ^b, David Renault ^c
and Philippe Vernon ^c

^a *Hydrobiologie et Ecologie Souterraines, UMR CNRS 5023, Université Lyon 1, 69622
Villeurbanne, France*

^b *Physiologie des Régulations Energétiques, Cellulaires et Moléculaires, UMR CNRS 5123,
Université Lyon 1, 69622 Villeurbanne, France*

^c *Impact des Changements Climatiques, Station biologique, UMR CNRS 6553, Université
Rennes 1, 35380 Paimpont, France*

* Corresponding author. Fax: (33) 04 72 43 15 23.

E-mail address: julien.issartel@univ-lyon1.fr

ABSTRACT

Impact of temperature (from -2°C to 28°C) on survival, oxygen consumption, locomotory and ventilatory activities was measured in two aquatic subterranean crustaceans (*Niphargus rhenorhodanensis* and *Niphargus virei*) and in a morphologically close surface-dwelling crustacean (*Gammarus fossarum*). The hypogean *N. virei* presented all characteristics of a stenothermal organism: it showed small thermal plasticity and optimised its performance on a narrow range of temperature. In contrast, the epigean *G. fossarum* and more surprisingly the hypogean *N. rhenorhodanensis* can be both characterized as eurythermal organisms: they exhibited important survival times and conserved their performance optimum throughout a large range of temperature. Such differences of survival and performance patterns in two hypogean organisms were unexpected since they both live in very thermally buffered biotopes. Our data suggest fresh hypotheses about the role of glaciations in the history and adaptation of hypogean crustaceans.

KEY WORDS: subterranean crustacean, temperature, survival, oxygen consumption, ventilatory activity, locomotory activity, thermal plasticity, eurytherm, stenotherm.

INTRODUCTION

Temperature may critically affect animal life and play a predominant role in establishing the distribution limits and the survival of ectotherm organisms (Addo-Bediako et al., 2000; Chown, 2001). Moreover, metabolic rates of ectotherms are highly temperature-dependent and all physiological processes slow down with decreasing temperatures (Hochachka and Somero, 2002). During exposure to a broad range of temperatures, the relationship between body temperature and metabolism can be described by an asymmetric function, where metabolic rate is maximized at an intermediate temperature: the thermal optimum (Huey and Kingsolver, 1989; Angilletta et al., 2002). From an ecological standpoint, this bell-shaped curve can be explained by the Principle of Allocation (Huey and Slatkin, 1976): there is a trade-off between the maximum and the range of the performance. An individual that performs well (relatively to other individuals) in its optimal temperature zone should perform relatively poorly at non-optimum temperatures (Huey and Hertz, 1984). In stable thermal environments, natural selection should favour stenothermal organisms, *i.e.* organisms which maximize their performance along a very narrow range of temperature. Conversely, the performance of the same organisms in a fluctuating environment should evolve to a eurythermal profile, with a flatter shape, a smaller thermal optimum, but extended throughout a broader range of temperatures (Huey and Kingsolver, 1989).

Ectotherms occupy various cold or warm habitats, but few of them show stable temperatures varying of only one or two degrees along the year (Eckert et al., 1997; Peck et al., 2004). This is the case in subterranean ecosystems, mainly because of the sedimentary and rocks layer that strongly buffer these habitats (Ginet and Mathieu, 1968). Therefore, subterranean animals should exhibit reduced survival abilities as soon as the temperature leaves the optimum thermal zone. Consequently, such organisms should be classified as stenothermal organisms.

However, some biospeleologists noticed that the subterranean aquatic crustacean *Niphargus rhenorhodanensis* survived exposure at sub-zero temperatures (Hervant and Ginot, unpublished data). These observations raise three questions: (1) what is the thermobiological span of these organisms, (2) should we classify them as “stenotherms”, and (3) what is the ecological significance of such survival ability?

There are few experiments that deal with the impact of temperature on the biology in these species and no comparative studies on the behavioural, ventilatory and respiratory responses have been undertaken in hypogean (*i.e.* subterranean) and epigean (*i.e.* surface-dwelling) crustaceans until now. Thus, to investigate the impact of temperature on the hypogean fauna, we compared the responses of aquatic subterranean crustaceans (*Niphargus rhenorhodanensis* and *Niphargus virei*) to those of a morphologically close aquatic epigean crustacean (*Gammarus fossarum*). *G. fossarum* regularly endures large temperature variations during its life cycle and therefore is likely to be considered as a eurythermal species (Rinderhagen et al., 2000; Wijnhoven et al., 2003). Measurements of survival, oxygen consumption, locomotory and ventilatory activities over a -2°C / 28°C gradient were performed in these three crustacean species.

MATERIALS AND METHODS

Animals, rearing and acclimation conditions

Niphargus rhenorhodanensis (freshwater amphipod; fresh weight = 13-14 mg) is an ubiquitous subterranean crustacean that lives in both porous and karstic aquifers. Specimens of *N. rhenorhodanensis* were collected from an interstitial system (Chalamont, Dombes Forest, France, 46° 0.4' N, 5° 10' E), with traps sunk into the sediment. *Niphargus virei* (freshwater amphipod; fresh weight = 90-100 mg) is a subterranean crustacean living only in

karstic systems. The specimens of this species were collected using a net placed at the emergence spring of a karst system at Geux, near Dijon, France (47° 26.4' N, 5° 5.7' E). *Gammarus fossarum* (freshwater amphipod; fresh weight = 33–34 mg) is a common surface-dwelling crustacean. Specimens of this epigeal species were collected from a swiftly flowing river (La Verna, Hyères sur Amby, France, 45° 48' N, 5° 17' E) with a net. All species were placed in the dark, in separate aquaria kept in thermostated chambers as described by Hervant et al. (1997a, 1997b). The tanks with *N. rhenorhodanensis* and *N. virei* contained clay and stones; these organisms were fed with minced meat every week. Tanks with *G. fossarum* contained leaves; these organisms were fed with carrots once a week. All animals were maintained at 12°C for 15 days. They were directly afterwards separated into two groups: the first group was acclimated at 3°C, and the second group was kept at 12°C. These two groups were acclimated at their respective temperatures for 6 months. Water was changed twice a week and all physico-chemical parameters did not change during this acclimation.

Survival experiments

Survival was assessed at 9 temperatures (–2, 3, 7, 11, 14, 17, 21, 26 and 28°C). For survival measurements at –2°C, 30 individuals of each species were individually put in 6 mL plastic tubes containing 3 mL of tank water. For survival measurements from 3 to 28°C, pools of 30 animals were transferred into tanks containing 100 mL of tank water. For each species, tanks were placed in the dark at each experimental temperature. Survival was measured (i) from –2 to 7°C with the 3°C-acclimated organisms, and (ii) from 11 to 28°C with the 12°C-acclimated organisms. The 3°C and the 12°C acclimated individuals were both exposed at –2°C and 28°C in order to emphasize the acclimation process. Survival was checked twice a day. When the survival reached 3 months, we considered that no mortality was observed at the experimental temperature.

Measurement of oxygen consumption, ventilatory and locomotory activities

Oxygen consumption, ventilatory and locomotory activities were investigated at all temperatures in all three species. Food was removed from experimental tanks two days before sampling the animals to ensure that the digestive tract was empty and that an overshoot in O₂ consumption due to digestive metabolism did not affect the results. Oxygen consumption was measured with a Warburg constant flow system (Hervant et al., 1995, 1996), which allows simultaneous measurement of 14 replicates. Small reaction vials of 12–14 mL were used for the experiment. The respirometers were not shaken, allowing the animals to respire without stress. The respirometer system was maintained at the experimental temperature in thermostated chamber for 12 hours before the beginning of the measurements. The oxygen consumption was recorded every 15 minutes during 2 hours (under a very low energy red light). At the end of the experiment, each animal was weighed (Scaltec SBC 31, accuracy 10⁻⁴ g).

Q_{10} values of all three species were calculated between -2°C and 14°C, and between 21°C and 28°C using the formula:

$Q_{10} = (R_2/R_1)^{10/(T_2-T_1)}$, where R_2 and R_1 are the oxygen consumptions at temperatures T_2 and T_1 (Hochachka and Somero, 2002).

Ventilatory activity was recorded by observation of the frequency of pleopod (ventilatory appendages of malacostracean crustaceans) beats during 1 minute according to Hervant et al. (1997a, 1997b). Locomotory activity was performed by measuring the number of moving animals in 800 mL tanks containing 10 individuals.

Performance breadth

Measurements of oxygen consumption, ventilatory and locomotory activities are all measurements of performance, an ecophysiological term including all physiological traits of a given organism (Huey and Kingsolver, 1989; Angilletta et al., 2002).

We calculated the performance breadth at 80% (B_{80}). B_{80} is the range of body temperature (equal to environmental temperature in ectotherms) over which performance is superior or equal to 80% of maximum performance value (Angilletta et al., 2002).

Statistical Analysis

Lethal lapse of time for 50% of each sample (Lt_{50}) was determined using a Minitab probit analysis to compare survival at each temperature studied. If the fiducial limits ($\alpha = 0.05$) of the two Lt_{50} values did not overlap, the Lt_{50} s were significantly different. Intra-specific differences in oxygen consumptions, locomotory and ventilatory activities were determined by an ANOVA. Inter-specific differences were measured using a two-way ANOVA. These statistical analyses were performed using Minitab software (Minitab Inc, version 13.32, State College, PA).

RESULTS

Survival

All Lt_{50} s (Table 1) showed significant inter- and intra-specific differences ($P < 0.05$). At -2°C , Lt_{50} of all three species showed significant inter-specific and inter-acclimation group differences. Specimens acclimated at 3°C exhibited significantly higher Lt_{50} s than the specimens acclimated at 12°C . Such acclimation effect was very low in *N. virei* that always

presented the shortest survival times. Lt_{50} measured in *G. fossarum* were highly significantly shorter than those of *N. rhenorhodanensis*.

	-2°C	3°C	7°C	11°C	17°C	21°C	26°C	28°C
<i>G. fossarum</i>	2.70 ± 0.21^a	*	*	*	*	137.28 ± 7.98^a	27.01 ± 0.51^a	8.23 ± 0.26^a
	21.36 ± 0.51^b							6.89 ± 0.25^b
<i>N. rhenorhodanensis</i>	8.72 ± 0.35^a	*	*	*	*	111.58 ± 4.17^a	6.94 ± 0.26^a	1.60 ± 0.08^a
	54.95 ± 1.17^b							0.85 ± 0.03^b
<i>N. virei</i>	1.02 ± 0.03^a	*	*	*	126.52 ± 8.20^a	8.89 ± 0.33^a	0.93 ± 0.03^a	0.42 ± 0.01^a
	2.09 ± 0.07^b							0.34 ± 0.01^b

Table 1 - Lethal times for 50 % of the population (days) \pm SE in *Gammarus fossarum*, *Niphargus rhenorhodanensis* and *Niphargus virei* exposed to different temperatures ($N = 30$).a: individuals acclimated at 12°C; b: individuals acclimated at 3°C. * = no mortality measured during the whole experience (3 months)

The epigeal *G. fossarum* and the hypogean *N. rhenorhodanensis* did not die in the temperature range 3-17°C whereas a significant mortality was observed in *N. virei* at 17°C. At 21°C, similar durations of survival were found in *N. rhenorhodanensis* and *G. fossarum*, whereas the Lt_{50} of *N. virei* was 10 times lower. From 26°C to 28°C, *G. fossarum* showed significantly higher Lt_{50} 's than *N. rhenorhodanensis* and *N. virei*.

Oxygen consumption, ventilatory and locomotory activities

Oxygen consumption curves (Fig. 1.1) of all three species followed a classical bell-shaped profile: aerobic metabolism was correlated with temperature. Mean values of oxygen consumption were 30% and 143% higher in the epigeal crustacean *G. fossarum* than in the hypogean *N. rhenorhodanensis* and *N. virei*, respectively ($P < 0.001$).

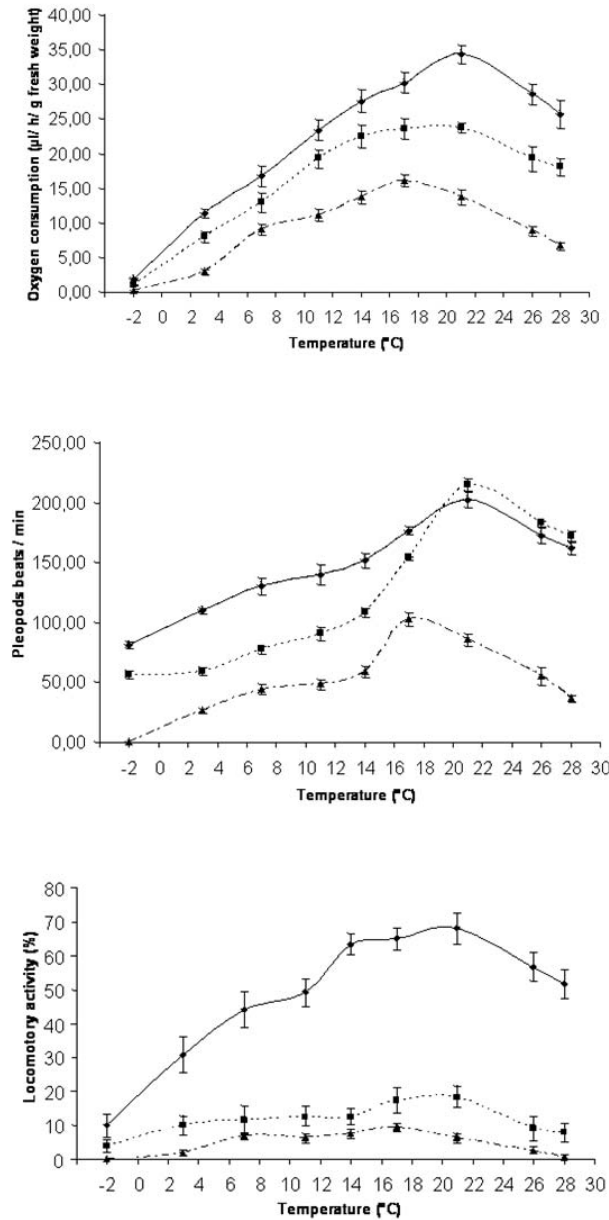


Figure 1 - Effect of temperature on (1) oxygen consumption, (2) ventilatory activity, and (3) locomotory activity in (◆) *Gammarus fossarum*, (■) *Niphargus rhenorhodanensis*, and (▲) *Niphargus virei*. Values are means ± SEM (N = 10).

Q_{10} values were different among the three species (Table 2): Q_{10} s between -2°C and 14°C were greater than 1 and it was largely higher in *N. virei* than in the other two species. In contrast, Q_{10} values between 21°C and 28°C were smaller than 1 in all three species.

G. fossarum and *N. rhenorhodanensis* had similar Q_{10} values, that are apparently twice higher of *N. virei*.

	<i>G. fossarum</i>	<i>N. rhenorhodanensis</i>	<i>N. virei</i>
Q_{10} (-2°C;14°C)	5.33	7.13	16.13
Q_{10} (21°C;26°C)	0.66	0.68	0.36

Table 2 - Q_{10} calculated for *Gammarus fossarum*, *Niphargus rhenorhodanensis* and *Niphargus virei*.

In all three crustaceans, temperature had a strong effect on ventilatory activity (Fig. 1.2), and mean values were significantly different between species ($P < 0.001$). Ventilatory activity values of *G. fossarum* were 16% and 190% higher than those of *N. rhenorhodanensis* and *N. virei*, respectively. The 14°C temperature appeared to be an important threshold: ventilatory activity increased largely above this temperature in the three organisms. Ventilation doubled between 14°C and 21°C in all three animals.

Locomotory activity (Fig. 1.3) presented contrasted profiles. Indeed, in *G. fossarum*, the percentage of individuals in movement varied largely with temperature since values were 6.8 times higher at 21°C than at -2°C. Conversely, in both hypogean species, locomotory activity varied very little.

The performance breadths measured at 80% (B_{80}) of the maximal value are listed in Table 3. *N. virei* showed the smallest B_{80} s regardless of the physiological trait. Except for oxygen consumption, the epigean crustacean *G. fossarum* presented higher B_{80} s than the hypogean crustaceans. *N. rhenorhodanensis* maintained its oxygen consumption at 80% of

maximum on a broader range of temperature than the other species, showing a B_{80} of 15.6°C vs. 13.2°C in *G. fossarum* and 9°C in *N. virei*.

	Oxygen consumption (°C)	Locomotory activity (°C)	Ventilatory activity (°C)
<i>Gammarus fossarum</i>	13,2	14	12,7
<i>Niphargus rhenorhodanensis</i>	15,6	8	10
<i>Niphargus virei</i>	9	5,5	6

Table 3 - B_{80} s of oxygen consumption, ventilatory and locomotory activities in *Gammarus fossarum*, *Niphargus rhenorhodanensis* and *Niphargus virei*.

DISCUSSION

A majority of ecosystem is subjected to daily and/or seasonal temperature variations (Eckert et al., 1997), consequently, studies in ectotherm thermal tolerance were principally focused in organisms inhabiting these fluctuating environments. Few studies have investigated the importance of temperature variations in species living in thermally buffered biotopes (for a review see Somero et al., 1996) and even less in subterranean organisms until now.

In this study, the crustaceans *Gammarus fossarum*, *Niphargus rhenorhodanensis* and *N. virei* exhibited three distinct survival patterns: the epigeal species *G. fossarum*, was characterised by the highest thermal plasticity, showing a significantly longer duration of survival than the hypogean *N. virei* and *N. rhenorhodanensis* in the thermal range 3–28°C. This is relevant to the habitats of *G. fossarum*: in streams (or rivers), temperature may fluctuate from 2°C to 28°C along the seasons. The reduced survival ability noticed in *N. virei* as soon as it was out from its temperature optimum is concomitant with its ecology:

subterranean ecosystems are characterized by highly reduced variations of the temperature throughout the year (Ginet and Mathieu, 1968). However, the large survival capacity found in *N. rhenorhodanensis* is unexpected. Both *N. rhenorhodanensis* and *N. virei* live in similar habitats, and therefore, never endure temperature variations. Thus, we may wonder the ecological significance of such survival ability.

As also found in many other species (Fields et al., 1998; Holmstrup et al., 1999; Bale et al., 2000; Renault et al., 2004), acclimation had a significant impact on the duration of survival in all three species. In crustaceans, thermal acclimation may induce several physiological changes in haemolymph (Tanaka and Udagawa, 1993) but also in enzyme properties (Mulkiwicz et al., 2000) or haemoglobin affinity (Paul et al., 2004). Such changes confer protection against injuries induced by temperature (Hochachka and Somero, 2002). In *N. virei*, which displays a very low thermal plasticity ecologically relevant with its habitat, acclimation had a much-reduced effect. Such results were also found in few stenothermal polar fishes inhabiting highly thermal stable environments (Wilson et al., 2001), and we might hypothesize that the inability to thermally acclimate could be found in most of the stenotherm species.

Groundwater ecosystems are generally very poor in nutrients and oxygen (Spicer, 1998; Malard and Hervant, 1999). In order to reduce energetic expenditures, ectotherms living in these biotopes present very low metabolic rates when compared to epigean species (Hüppop, 1985; Hervant et al., 1997a, 1997b). Our results are concomitant with these findings: the highest values of performance (oxygen consumption, ventilatory and locomotory activities) were found in the epigean amphipod *G. fossarum*. Moreover, visual predator-prey interactions are reduced in subterranean environments. As a result, hypogean organisms did not develop high capacities for locomotion (Hervant et al., 2001), which may explain the reduced impact of temperature on activity in *N. rhenorhodanensis* and *N. virei*. However, *N.*

rhenorhodanensis preserved a basal level of locomotory activity even at extreme experimental temperatures, ensuring a basal predatory activity when its environment cools down, therefore avoiding starvation. In all three species, oxygen consumption and ventilatory activity increased with temperature, until a maximum value. This critical temperature is lower in *N. virei* than in *G. fossarum* and *N. rhenorhodanensis*. At -2°C , *N. virei* showed a very low oxygen consumption, and no ventilatory activity. We could hypothesise that the metabolism of this species was so low at this temperature that it no longer needed to create a water flow across the respiratory surface. Thus, -2°C could be the threshold temperature of the chill coma in this species. Furthermore, a 10°C temperature variation (Q_{10} values) had a stronger impact on the metabolic rate of *N. virei* than in the other two crustaceans, suggesting a lower capacity to maintain optimal enzymatic activities. A very low or high Q_{10} signifies that temperature is damaging the properties of the underlying physiological and biochemical system, until the irreversible loss of function (Hochachka and Somero, 2002). Thus, these results may explain the limited survival of *N. virei* as soon as it was out of its optimal thermal range. The lower Q_{10} s and higher B_{80} s measured in *G. fossarum* and *N. rhenorhodanensis* (see tables 2 and 3) indicated that these animals maximized their performance on broader ranges of temperature. The epigeal *G. fossarum* and the hypogean *N. rhenorhodanensis* displayed similar physiological patterns on the temperature range we tested. These two crustaceans can be characterised as eurythermal species. Conversely, *N. virei*, exhibited a stenothermal profile.

From a physiological point of view, differences between stenotherms and eurytherms performance may reflect structural constraints resulting from a compromise between the flexibility and the stability of enzymes (Alexandrov, 1977). Moreover, in ectotherms, several studies pointed out that an exposure at non optimum temperatures involves an increase in “metabolic key” enzymes expression or the induction of enzymes (isozymes) with different

kinetic properties (Richmond and Zimmerman, 1978; Lesser and Kruse, 2003; Zacharstef et al., 2004; Somero, 2004). Further studies should determine whether “metabolic key” enzymes are quantitatively or qualitatively modulated during exposure to different temperatures in the eurythermal *G. fossarum* and *N. rhenorhodanensis* in comparison with the stenothermal *N. virei*.

From an evolutionary point of view, we may wonder why the two hypogean species, *N. rhenorhodanensis* and *N. virei*, exhibited such differences in their performance patterns. The strong selection pressures characterising thermally buffered environments as subterranean ones (Edwards, 1986; Malard and Hervant, 1999) is likely to eliminate individuals keeping energetically costly mechanisms that may not be needed (Huey and Kingsolver, 1989). The eurythermal profile found in *N. rhenorhodanensis* might thus result from its life history. Glaciations represent one of the most important factors explaining current hypogean species distribution (Ginet, 1971, 1988). *N. rhenorhodanensis* and *N. virei* have both been identified in the massif mountain of Jura (France), but in distinct sites: *N. virei*'s current location exactly corresponds to the inferior limit of the Pleistocene glaciers (8 000 years ago) whereas *N. rhenorhodanensis* can be found in sites that were entirely covered by these glaciers (Ginet, 1971). Thus, we may hypothesize that *N. rhenorhodanensis* endured and survived the Pleistocene glaciations below the ice, in phreatic and karstic refugium-habitats. Furthermore, other works dealing with the hypogean species distribution areas revealed that some subterranean amphipods may survive below the ice during glaciations of the Pleistocene in Europe and North America (Holsinger, 1983; Strayer et al. 1995; Proudlove et al., 2003). The highest cold tolerance than that of *N. virei* and the eurythermal profile found in *N. rhenorhodanensis* might be a relict adaptation (as it has been observed in several invertebrates, Baust, 1980; Baust and Rojas, 1982; Mulkiewicz et al., 2000; Lee et al., 2003) which enabled the survival of these populations during glaciation periods.

The survival of *N. rhenorhodanensis* under the ice refugiums during the last glaciation period cannot fully explain the current location of its populations. It has been suggested that few hypogean species have recolonised subterranean biotopes immediately after the last quaternary deglaciation using river corridor (Henry, 1976; Magniez, 1976, 1997). An alternative hypothesis would be that glaciations destructed most of *N. rhenorhodanensis* populations, but individuals living at the frontier of glaciers, in a mix of cold glacial water and cool groundwater, could have survived and recolonised subterranean biotopes that were formerly covered by glacier. This survival and recolonization may have selected eurythermal individuals with strong efficiency at cold temperatures.

As a result, *N. virei* and *N. rhenorhodanensis* may not possess the same phylogenetical baggage, which may partly explain the observed differences.

Our work shows rather atypical results if compare to theoretical expectations. The hypogean *N. rhenorodanensis* showed characteristics of eurythermal organisms whereas it lives in strongly buffered habitats. The differences in physiological patterns, regarding the temperature, between the two hypogean species clearly bring new elements allowing a better comprehension of their biogeographical history. Nevertheless, the greater cold-tolerance found in *N. rhenorhodanensis* is not yet fully understood. Further studies should investigate the possible roles of cryoprotective substances in *N. rhenorhodanensis*, *N. virei* and *G. fossarum* for a better understanding of the cold hardiness of these species.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by funds from the University Claude Bernard-Lyon I and the National Centre of French Scientific Research (CNRS). The authors thank Dr F. Malard and Dr T. Lefebure for their valuable assistance in collecting individuals of *Niphargus virei*,

and Prof. E. Pattee for his assistance in checking a first version of the manuscript. We are also grateful to the referee who provided helpful suggestions on the draft manuscript.

REFERENCES

- Addo-Bediako, A., Chown, S.L., Gaston, K.J., 2000. Thermal tolerance, climatic variability and latitude. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267, 739-745.
- Alexandrov, Y.Y., 1977. *Cells, molecules and temperature*. Springer-Verlag. New York.
- Angilletta, M.J., Niewiarowski, P.H., Navas, C.A., 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *J. Therm. Biol.* 27, 249-268.
- Bale, J.S., Block, W., Worland, M.R., 2000. Thermal tolerance and acclimation response of larvae of the sub-Antarctic beetle *Hydromedion sparsutum* (Coleoptera: *Perimylopidae*). *Polar Biol.* 23, 77-84.
- Baust, J.G., 1980. Low temperature tolerance in an antarctic insect: a relict adaptation? *Cryo-Letters* 1, 360-371.
- Baust, J.G., Rojas, R.R., 1985. Insect cold hardiness: facts and fancy. *J. Insect Physiol.* 31, 755-759.
- Chown, S.L., 2001. Physiological variation in insects: Hierarchical levels and implications. *J. Insect Physiol.* 47, 649-660.

Eckert, R., Randall, D., Burggren, W., French, K., 1997. *Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. Freeman and Company, New York.

Edwards, J.S., 1986. How small ectotherms thrive in the cold without really trying. *Cryo-Letters* 6, 388-390.

Fields, P.G., Fleurat-Lassard, F., Lavenseau, L., Febvay, G., 1998. The effect of cold acclimation and deacclimation on cold tolerance, trehalose and free amino acid levels in *Sitophilus granarius* and *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera). *J. Insect Physiol.* 44, 995-965.

Ginet, R., Mathieu, J., 1968. Comparaison des températures létales supérieures de *Niphargus longicaudatus* (Crust. Amphipodes) hypogés et épigés. *Ann. Biospéléo.* 23, 425-440

Ginet, R., 1971. Biogéographie de *Niphargus* et *Caecosphaeroma* (Crustacés troglobies) dans les départements français du Jura et de l'Ain - Origine; influence des glaciations. *Proceedings of the 4th International Congress of Speleology, Neuchâtel, Switzerland.*

Ginet, R., 1988. The biogeographical distribution of invertebrate animals in French karst. Second part: the terrestrial fauna. *Karstologia* 11-12, 61-71.

Henry, J.-P., 1976. Recherches sur les Asellidae hypogés de la lignée cavaticus (Crustacea *Isopoda Asellota*). Ph.D. thesis, University of Dijon, France.

- Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D., Fréminet, A., 1995. Behavioral, ventilatory and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and the epigean *Gammarus fossarum*. *Physiol. Zool.* 68, 223-244.
- Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D., Fréminet, A., 1996. Behavioral, ventilatory and metabolic responses of the hypogean amphipod *Niphargus virei* and the epigean isopod *Asellus aquaticus* to severe hypoxia and subsequent recovery. *Physiol. Zool.* 69, 1277-1300.
- Hervant, F., Mathieu, J., Barré, H., Simon, K., Pinon, C., 1997a. Comparative study on the behavioral, ventilatory and respiratory responses of hypogean and epigean crustacean to long-term starvation and subsequent feeding. *Comp. Biochem. Physiol. A* 118, 1277-1283.
- Hervant, F., Mathieu, J., Messana, G., 1997b. Locomotory, ventilatory and metabolic responses of the subterranean *Stenasellus virei* (Crustacea, Isopoda) to severe hypoxia and subsequent recovery. *C. R. Acad. Sci. (Life Sciences)* 320, 139-148.
- Hervant, F., Mathieu, J., Durand, J., 2001. Behavioral, physiological and metabolic responses to long-term starvation and refeeding in the blind cave-dwelling (*Proteus anguinus*) and a surface-dwelling (*Euproctus asper*) salamander. *J. Exp. Biol.* 204, 269-281.
- Hervant, F., Renault, D., 2002. Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigean isopods: a proposed adaptive strategy for groundwater organisms. *J. Exp. Biol.* 205, 2079-2087.

- Hochachka, P., Somero, G., 2002. Biochemical adaptation, mechanism and physiological evolution. Oxford University Press, New York
- Holmstrup, M., Costanzo, J.P., Lee Jr., R.E., 1999. Cryoprotective and osmotic responses to cold acclimation and freezing in freeze-tolerant and freeze-intolerant earthworms. *J. Comp. Physiol. B* 169, 207-214.
- Holsinger, J.R., Mort, J.W., Recklies, A.D., 1983. The subterranean crustacean fauna of Castle guard Cave, Columbia Icefields, Alberta, Canada, and its zoogeographic significance. *Arct. Alp. Res.* 15, 543-549.
- Huey, R.B., Slatkin, M., 1976. Costs and benefits of lizards thermoregulation. *Q. Rev. Biol.* 51, 363-384.
- Huey, R.B., Hertz, P.E., 1984. Is a jack-of-all-temperatures a master of none? *Evolution*, 38, 441-444.
- Huey, R.B., Kingsolver, J.G., 1989. Evolution of ectotherm performance. *Trends Ecol. Evol.* 4, 131-135.
- Hüppop, K., 1985. The role of metabolism in the evolution of cave animals. *Nat. Speleol. Soc. Bull.* 47, 137-146.
- Kostal, V., Slachta, M., Simek, P., 2001. Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapause adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera:

- Insecta). *Comp. Biochem. Physiol. B* 130, 365-374.
- Lee, C.E., Remfert, J.L., Gelembiuk, G.W., 2003. Evolution of physiological tolerance and performance during freshwater invasions. *Integr. Comp. Biol.* 43, 439-449.
- Lesser, M.P., Kruse, V.A., 2004. Seasonal temperature compensation in the horse mussel, *Modiolus modiolus*: metabolic enzymes, oxidative stress and heat shock proteins. *Comp. Biochem. Physiol. A* 137, 495-504.
- Magniez, G., 1976. Contribution à la connaissance de la biologie des Stenasellidae (Crustacea *Isopoda Asellota* des eaux souterraines). Ph.D. thesis, University of Dijon, France.
- Magniez, G., 1997. Facteurs intrinsèques et extrinsèques de la distribution actuelle des Crustacés Isopodes des eaux souterraines d'Europe. Proceedings of the 12th International Congress of Speleology, La Chaux-de-Fonds, Switzerland, 10-17 August 1997, 341-344.
- Malard, F., Hervant, F., 1999. Oxygen supply and the adaptations of animals in groundwater. *Freshwat. Biol.* 41, 1-30.
- Mulkiewicz, E., Zietara, M.S., Stachowiak, K., Skorkowski, E.F., 2000. Properties of lactate dehydrogenase from the isopod, *Saduria entomon*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 126, 337-346.
- Paul, R.J., Lamkemeyer, T., Maurer, J., Pinkhaus, O., Pirow, R., Seidl, M., Zeis, B., 2004. Thermal acclimation in the microcrustacean *Daphnia*: a survey of behavioural,

physiological and biochemical mechanisms. *J. Therm. Biol.* 29, 655-662.

Peck, L.S., Webb, K.E., Bailey, D.M., 2004. Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species. *Func. Ecol.* 18, 625-630.

Proudlove, G.S., Wood, P.J., Harding, P.T., Horne, D.J., Gledhill, T., Knight, L.R.F.D. 2003. A review of the status and distribution of the subterranean aquatic Crustacea of Britain and Ireland. *Cave and Karst Science* 30, 53-74.

Renault, D., Vernon, P., Nedved, O., Hervant, F., 2004. The importance of fluctuating thermal regimes for repairing chill injuries in the tropical beetle *Alphitobius diaperinus* (*Coleoptera: Tenebrionidae*) during exposure to low temperature. *Physiol. Entomol.* 29, 139-145.

Richmond, M.C., Zimmerman, E.G., 1978. Effect of temperature on activity of allozymic forms of supernatant malate dehydrogenase in the red shiner, *Notropis lutrensis*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 61, 415-419.

Rinderhagen, M., Ritterhoff, J., Zauke G.P. 2000. Crustaceans as bioindicators. In: Gerhardt, A. *Biomonitoring of Polluted Water. Reviews on Actual Topics*, Trans Tech Publications, Scitech Publications, Ütikon-Zürich, Environmental Research Forum Vol. 9, 161-194.

Somero, G.N., Dahloff, E., Lin, J.J., 1996. Stenotherms and eurytherms: mechanisms establishing thermal optima and tolerance ranges. In: Johnston I.A., Bennett, A.F. *Animals and temperature: phenotypic and evolutionary adaptation*. Society for

Experimental Biology Seminar Series 59. Cambridge University Press, Cambridge.

Somero, G.N., 2004. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies".

Comp. Biochem. Physiol. B 139, 321-333.

Spicer, J.I., 1998. Is the reduced metabolism of hypogean amphipods solely a result of food

limitation? Hydrobiol. 377, 201-204.

Strayer, D.L., May, S.E., Nielsen, P., Wollhein, W., Hausam, S., 1995. An endemic

groundwater fauna in unglaciated eastern North America. Can. J. Zool. 73, 502-508.

Tanaka, K., Udagawa, T., 1993. Cold adaptation of the terrestrial isopod, *Porcellio scaber*, to

subnivean environments. J. Comp. Physiol. B 163, 439-444.

Wilson, R.S., Franklin, C.E., Davison, W., Kraft, P., 2001. Stenotherms at sub-zero

temperatures: Thermal dependence of swimming performance in Antarctic fish. J. Comp.

Physiol. B 171, 263-269.

Wijnhoven, S., van Riel, M.C., van der Velde, G., 2003. Exotic and indigenous freshwater

gammarid species: physiological tolerance to water temperature in relation to ionic

content of the water. Aquat. Ecol. 37, 151-158.

Zakhartsev, M., Blust, R., Johansen, T., Pörtner, H.O., Zakhartsev, M., 2004. Effects of

temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): Genetic,

kinetic and thermodynamic aspects. J. Exp. Biol. 207, 95-112.

Publication 2

Metabolic Responses to Cold in Subterranean Crustaceans

Julien Issartel, David Renault, Yann Voituron, Alain Bouchereau, Philippe Vernon and Frédéric Hervant

Accepted 7 June 2005

J. Issartel¹, F. Hervant. Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux, UMR CNRS 5023, Université Lyon 1, 69622 Villeurbanne cedex, FRANCE.

D. Renault., P. Vernon. Fonctionnement des Ecosystèmes et Biologie de la Conservation, UMR CNRS 6553, Université Rennes 1, 35042 Rennes cedex, FRANCE.

Y. Voituron. Physiologie des Régulations Energétiques, Cellulaires et Moléculaires, UMR CNRS 5123, Université Lyon 1, 69622 Villeurbanne cedex, FRANCE.

A. Bouchereau. Osmoadaptation et Métabolismes de Stress, UMR CNRS 6026, Université Rennes 1, 35042 Rennes cedex, FRANCE.

¹ Corresponding author (e-mail: julien.issartel@univ-lyon1.fr)

Summary

Changes in polyol, sugar and free amino acid (FAA) body contents were investigated in the aquatic subterranean (*i.e.* hypogean) crustaceans *Niphargus rhenorhodanensis* and *N. virei*, and in a morphologically close aquatic surface-dwelling (*i.e.* epigean) crustacean *Gammarus fossarum* acclimated to 12°C, 3°C and -2°C. *G. fossarum* significantly increased its alanine and glutamine level with decreasing temperature, and trehalose body content was found to increase only at -2°C. *N. virei* showed moderate increases of alanine and glycine, and no change of trehalose level was observed in this species. In contrast, *N. rhenorhodanensis* was the only one showing a significant rise of its total FAA pool mainly explained by alanine, glycine, arginine and glutamine accumulations. This species also gradually increased its trehalose body content with decreasing temperature. Several cold-hardy ectotherms show metabolic responses to cold that are identical with those we pointed out in *N. rhenorhodanensis*. A previous comparative study showed that the hypogean *N. rhenorhodanensis* exhibited survival time (Lt_{50}) at -2°C 26.3 times and 2.6 times higher than the hypogean *N. virei* and the epigean *G. fossarum*, respectively. Thus, crustacean levels of FAA and trehalose were correlated with their respective cold tolerances. Such differences in metabolic responses to cold in both hypogean organisms were unexpected since they both live in very thermally buffered biotopes. Considering the current distribution areas of the two subterranean crustaceans studied, we assume that the cold-hardiness found in the hypogean *N. rhenorhodanensis* could be correlated with its biogeography history during the quaternary glaciations.

Key words: hypogean crustacean, cold hardiness, free amino acid, trehalose, life history.

Introduction

The capacity to survive temporary or constant cold environment is a crucial challenge for ectotherms. Many physiological and biochemical mechanisms are known to extend the survival of freezing-susceptible species, at subzero temperatures by avoiding injuries induced by the formation of ice crystals in tissues (Zachariassen, 2000). However low but positive temperatures may also induce severe damages (Turnock, 1991, 1993; Tanaka and Udagawa, 1993; Ramløv, 2000; Hochachka and Somero, 2002; Renault et al., 2004). The mechanism of chill injury is not well understood, although it may be related to protein denaturation (Carpenter and Crowe, 1988; Ramløv, 2000; Hochachka and Somero, 2002), phase changes in membrane lipids, and/or a complex metabolic disorder (Grout and Morris, 1987; Ramløv, 2000; Hochachka and Somero, 2002). Such injuries may induce chill coma and even death (Vannier, 1987; Renault et al., 1999; Ramløv, 2000). There are several low molecular weight sugars and polyols that may be accumulated and may prevent lethal injuries (Kostal et al., 2001; Slachta et al., 2002). The importance of glycerol, mannitol, trehalose and sucrose is widely recognized in insects during thermal acclimation and cold-exposure (Salt, 1961; Ring and Danks, 1998). Though the importance of free amino acids (FAA) during cold exposures has been less investigated, authors found a positive correlation between the increase in content of few FAAs (*i.e.* proline, alanine, leucine) in insects' body fluids and their acclimation to cold (Storey, 1984, 1997; Fields et al., 1998).

Even if the literature on insect cold-hardiness is overwhelming, very few studies deal with cold adaptations in crustaceans. An accumulation of trehalose and myo-inositol was found in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Tanaka and Udagawa, 1993). Moreover, the FAA composition is known to widely vary versus seasons in this taxon (Graney and Giesey, 1986). Alanine, but also arginine, leucine and glycine, are the major FAAs found in crustacean hemolymph and, as well as other amino acids, are involved in several metabolic

processes including protein synthesis/catabolism, gluconeogenesis and oxidative pathways (Graney and Giesy, 1986). However, their roles in crustacean cold tolerance are still obscure.

In a previous work, Issartel et al. (in press) undertook a comparative study on the behavioural, ventilatory and respiratory responses in hypogean (*i.e.* subterranean) and epigeal (*i.e.* surface-dwelling) crustaceans when exposed to different temperatures. Subterranean environments (mainly porous and karstic aquifers) are basically energy- and oxygen-poor habitats and several complex behavioural and physiological adaptations to hypoxia (Hervant et al., 1995, 1996, 1997b, 1999a) and food shortage (Hervant et al., 1997a, 1999b; Hervant and Renault, 2002) were previously found in hypogean crustaceans. Moreover, such biotopes are also characterised by an extreme thermal stability (Ginet and Mathieu, 1968); and hypogean organisms should theoretically be classified as stenothermal species (Huey and Kingsolver, 1989; Angilleta et al., 2002). Unexpectedly, an opposite conclusion was found in the aquatic subterranean crustacean *Niphargus rhenorhodanensis*. Indeed, this species exhibited eurythermal characteristics (from -2 to 28°C), with particularly high survival times and a large capacity to maintain its metabolism at cold temperatures (Issartel et al., in press).

In this study, we focused on the cold hardiness of this species. We investigated the changes in polyol, sugar and free amino acid contents in the aquatic hypogean crustaceans *N. rhenorhodanensis* and *N. virei*, and in a morphologically close aquatic epigeal aquatic crustacean *Gammarus fossarum* acclimated at 12°C, 3°C and -2°C. We thus tried to determine whether biochemical mechanisms are involved in *N. rhenorhodanensis* cold-hardiness and if such mechanisms may also be found in another aquatic subterranean species.

Materials and methods

Animals, rearing and acclimation conditions

Specimens of *Niphargus rhenorhodanensis* (Shellenberg) (Amphipoda, 12-13 mg fresh weight) were collected from an interstitial aquatic environment (Chalamont, Dombes Forest, France, 46° 0.4' N, 5° 10' E), with traps sunk into the sediment. *Niphargus virei* (Chevreux) (Amphipoda, 97-101 mg fresh weight) was collected using a net placed at the emergence spring of a karst system at Geux, near Dijon, France (47° 26.4' N, 5° 5.7' E). *Gammarus fossarum* (Koch) (epigean aquatic Amphipoda, 32-34 mg fresh weight) was collected from a swiftly flowing river (La Verna, Hyères sur Amby, France, 45° 48' N, 5° 17' E) with a net. All species were placed in the dark, in separate tanks kept in thermostated chambers as described by Hervant et al. (1997a, 1997b). The tanks with *N. rhenorhodanensis* and *N. virei* contained clay and stones; these organisms were fed with minced meat every week. Tanks with *G. fossarum* contained leaves; these organisms were fed with carrots once a week. All animals were maintained at 12°C for 15 days. Then they were separated into three groups: the first group was kept at 12°C for 6 months, the second group was acclimated to 3°C for 6 months. Except for *N. virei* which showed too low survival time at -2°C (Issartel et al., in press), the third group was first acclimated to 3°C during 6 months and next acclimated to -2°C for two weeks. For acclimation at -2°C, crustaceans were individually put in 6 ml plastic tubes containing 3 ml of filtered rearing tank water. For all acclimation groups, water was changed twice a week and all physico-chemical parameters did not change during acclimation.

Sample preparation

For each experimental condition, 10-15 pools of 3 animals were weighed before being lyophilised during 6 hours. Food was removed from experimental tanks one week before

sampling the animals to ensure that the presence of food in the gut would not affect the results.

Metabolite extraction

Amino acids, sugars and polyols were extracted from dry material. Pools of 3 animals were homogenised in 1.5 ml 70° ethanol and Fontainebleau sand, before adding 1.5 ml 40° ethanol. The homogenate was centrifuged for 10 minutes at 5000 rpm and 4°C, and the supernatant collected. The first pellet was re-suspended in 1.5 ml 70° ethanol and centrifuged 10 minutes at 5000 rpm and 4°C and the supernatant collected. The second pellet was re-suspended in 1.5 ml ultra-pure water and centrifuged 10 minutes at 5000 rpm and 4°C. The combined supernatant (N = 3) was pooled in a balloon flask and dried by evaporation using a rota-vapor system. The insoluble residue was re-suspended in 1 ml ultrapure water. Samples were stored at -80°C until metabolite essays.

Analytical procedure

Free amino acids assay

Free amino acids were assayed as described by Bouchereau et al. (1999). Amino acids were characterized and quantified with HPLC after pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidylcarbamate (AQC) (using a Waters Accq-Tag amino acid analysis system) and reversed-phase liquid chromatographic separation. Twenty µl aliquots of the crude aqueous extracts were reacted using the procedure optimised by Cohen and Michaud (1993).

Polyols and Sugars assay

Derivatization was achieved according to Adams and co-workers (Adams et al. 1999). A known volume of supernatant was transferred in a cap vial and lyophilised (0.120 mbar, -40°C). The dried residue was redissolved in pyridine containing hydroxylamine (30 mg.ml⁻¹). The solution was then heated at 75°C for 30 min which allows conversion of sugars to their oximes. Sugars oximes and polyols were converted to their TMS (trimethylsilane) derivatives by addition of a mixture of HDMS (hexamethyldisilazane) containing trifluoroacetic acid (10:1, v/v) and then sonicated at 50°C for 30 min before being heated at 100°C for 60 min. One microliter of this solution was then injected into a gaz chromatograph equipped with a 30 m HP-1 capillary column with 0.25 µm film thickness. Injection was made in the split mode (30:1) at 260°C. Hydrogen was used as the carrier gas at a flow rate of 1ml.min⁻¹. The HP-1 column was held in an oven at an initial temperature of 60°C for 2 min, and then heated to 150°C at a rate of 20°C.min⁻¹ and to 300°C at 6°C.min⁻¹ and finally held at this temperature for 20 min. Temperature of injector and detector were kept at 260°C and 300°C, respectively. Calibration plots were constructed by external standards and compounds were identified on the basis of retention time.

Statistical analyses

Values are presented as means ± SEM. The statistical differences in metabolite concentrations were investigated by a Student t-test for 2 samples comparisons and a one-way ANOVA with a Tukey post-hoc test for comparisons between 3 samples. Data were log or square-root transformed to homogenize variances when homoscedasticity was not observed. Statistical analyses were performed with Minitab software (Minitab Inc, version 13.32, State College, PA).

Results

Free amino acids

Seventeen free amino acids (FAA) were found with the described analytical method in all three species (Fig. 1, Fig. 2 and Fig. 3). Total FAA contents were significantly different among species, whatever the acclimation temperature ($P < 0.01$).

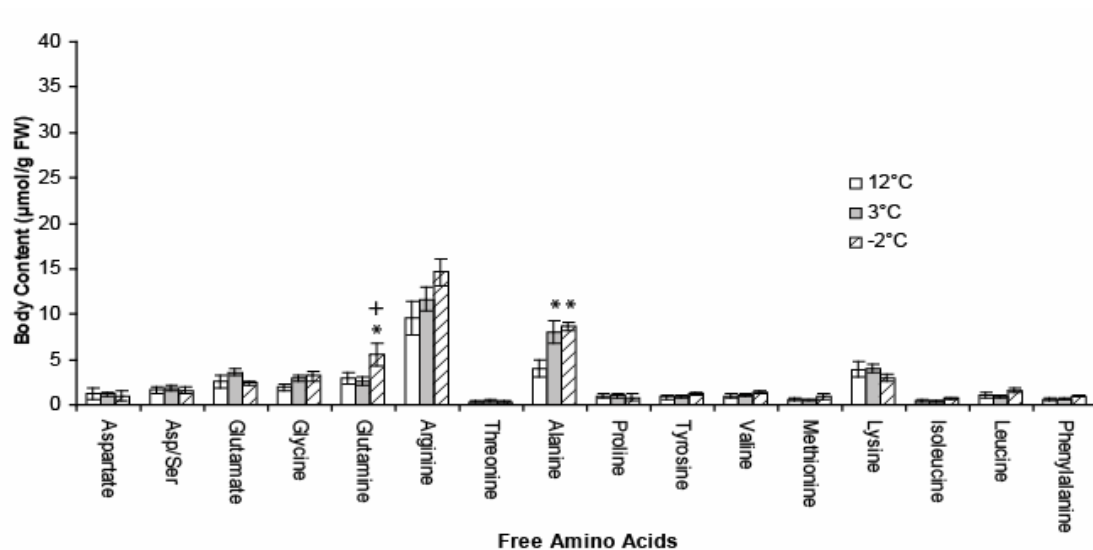


Figure 1 - Free amino acid (FAA) body contents in the epigean aquatic crustacean *Gammarus fossarum* acclimated at 12°C (control), 3°C, and -2°C. Values are means \pm SEM ($N = 6-8$). FW=Fresh Weight. Significant differences between FAA means are expressed as: * = significant differences between cold-acclimated and control groups; + = significant differences between groups acclimated at 3°C and groups acclimated at -2°C.

In the epigean crustacean *G. fossarum* maintained at 12°C (control temperature), 3 FAAs predominated and constituted 52 % of the total FAA pool (Fig. 1): arginine (9.56 ± 1.88 $\mu\text{mol/g FW}$), alanine (4.02 ± 0.98 $\mu\text{mol/g FW}$) and lysine (3.90 ± 0.84 $\mu\text{mol/g FW}$). *G. fossarum* total FAA content did not statistically change when it was acclimated at 3°C and -2°C (Table 1). Alanine was twice higher after an acclimation at 3°C ($P < 0.01$) and remained constant till -2°C. Glutamine was the only FAA found to significantly increase (+ 90 %) after an acclimation at -2°C.

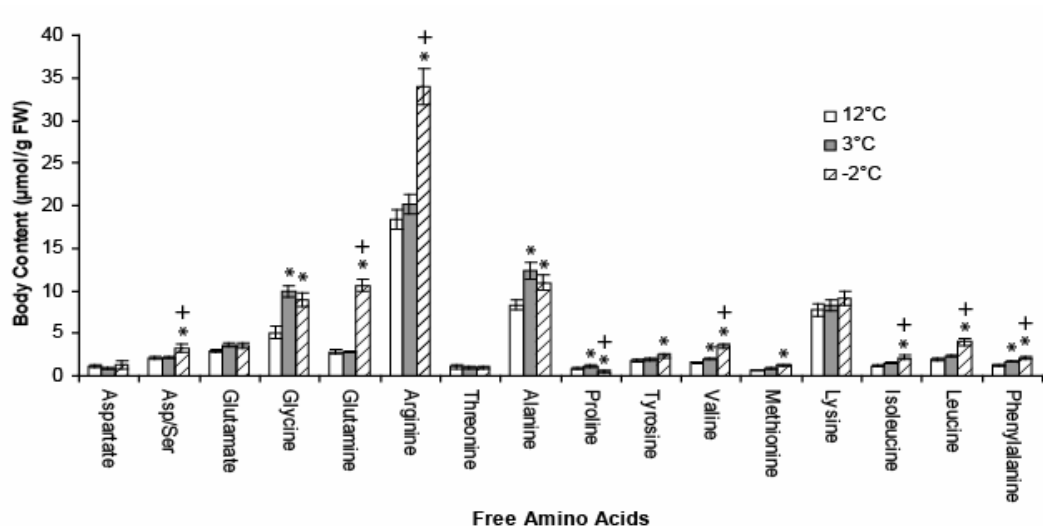


Figure 2 - FAA body contents in the hypogean aquatic crustacean *Niphargus rhenorhodanensis* acclimated at 12°C (control), 3°C, and -2°C. Values are means \pm SEM ($N = 6-8$). FW=Fresh Weight. Significant differences between FAA means are expressed as: * = significant differences between cold-acclimated and control groups; + = significant differences between groups acclimated at 3°C and groups acclimated at -2°C.

In the subterranean crustacean *N. rhenorhodanensis* (Fig. 2), arginine (18.36 ± 1.11 $\mu\text{mol/g FW}$), alanine (8.32 ± 0.56 $\mu\text{mol/g FW}$) and lysine (7.75 ± 0.72 $\mu\text{mol/g FW}$) also constitute the three major FAAs in control animals. Decrease in the acclimation temperature induced a significant increase of the total FAA content of 23 % at 3°C and 68 % at -2°C (Table 1). At 3°C, 6 of the 17 FAAs detected in *N. rhenorhodanensis* increased: glycine and alanine rose significantly by 95 % and 48 % ($P < 0.01$), contents in glutamate, proline, valine and phenylalanine also increased significantly but more slightly ($P < 0.05$). When *N. rhenorhodanensis* was acclimated at -2°C, all FAA body contents were significantly higher than in the controls and/or 3°C acclimated individuals, except for aspartate, glutamate, proline, threonine and lysine.

	Total FAA content ($\mu\text{mol/g FW}$)			
	12°C	3°C	-2°C	
<i>G. fossarum</i>	33.83 \pm 6.79	41.87 \pm 4.71	47.02 \pm 3.63	ns
<i>N. rhenorhodanensis</i>	58.83 \pm 3.88	72.61 \pm 3.94	98.63 \pm 6.89	**
<i>N. virei</i>	71.85 \pm 9.64	79.55 \pm 7.02	†	ns

Table 1 - Effect of cold acclimation on the total FAA body content in *G. fossarum*, *N. rhenorhodanensis* and *N. virei*. Values are means \pm SEM (N = 6-8). FW=Fresh Weight. P-values of statistical analysis between total FAA contents were expressed as: ns = not significant; * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$.

At control temperature, the subterranean crustacean *N. virei* (Fig. 3) showed high body levels of arginine (26.63 \pm 3.50 $\mu\text{mol/g FW}$), glutamine (14.77 \pm 1.62 $\mu\text{mol/g FW}$) and alanine (5.68 \pm 0.76 $\mu\text{mol/g FW}$) compared to the other FAAs. No significant change in the total FAA content was observed after an acclimation at 3°C (Table 1). The contents in glycine and alanine increased consistently ($P < 0.05$) respectively by 68 % and 119 % with the decrease in the acclimation temperature.

	Trehalose content ($\mu\text{mol/g FW}$)		
	12°C	3°C	-2°C
<i>G. fossarum</i>	1.19 \pm 0.20	1.05 \pm 0.35	5.65 \pm 1.69 ^{d+}
<i>N. rhenorhodanensis</i>	1.54 \pm 0.20	6.31 \pm 0.51 ^d	19.66 \pm 5.17 ^{d+}
<i>N. virei</i>	0.61 \pm 0.36	2.00 \pm 0.66	†

Table 2 - Effect of cold acclimation on trehalose body content in *G. fossarum*, *N. rhenorhodanensis* and *N. virei*. Values are means \pm SEM (N = 4-6). FW=Fresh Weight. d = significant differences between cold-acclimated and control groups; + = significant differences between groups acclimated at 3°C and groups acclimated at -2°C.

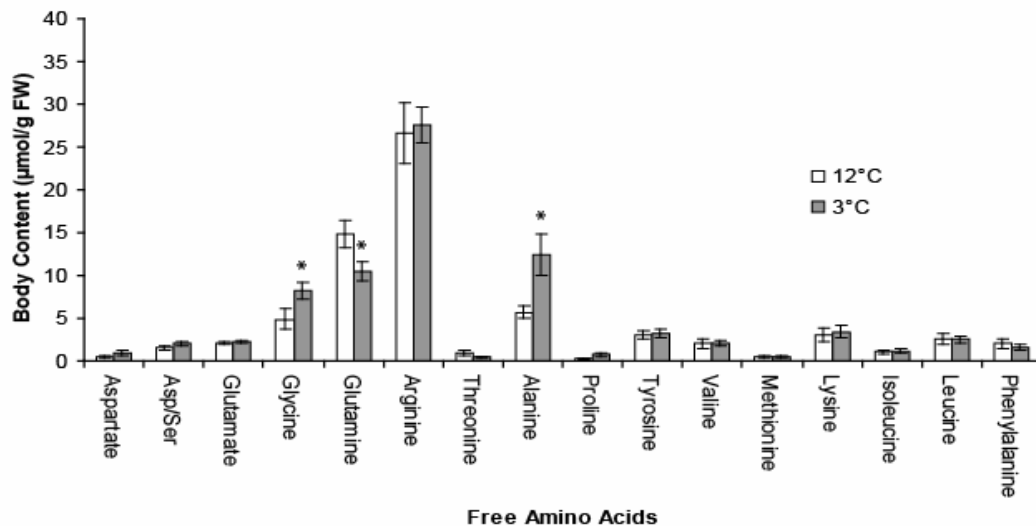


Figure 3 - FAA body contents in the hypogean aquatic crustacean *Niphargus virei* acclimated at 12°C and 3°C. Values are means \pm SEM ($N = 6-8$). FW=Fresh Weight. Significant differences between FAA means are expressed as: * = significant differences between both groups.

Sugars and polyols

Among all substances quantified by the method described, trehalose was the only one which accumulated in crustaceans cold-acclimated (see Table 2). In *G. fossarum*, no difference in the trehalose body content was observed between groups acclimated at 12 and 3°C. However, trehalose level was found to be 5 times higher at -2°C than in control organisms in this species ($P < 0.01$).

In *N. rhenorhodanensis* acclimated at 3°C and -2°C, trehalose values were 6- ($P < 0.01$) and 12-folds higher than in 12°C individuals, respectively.

Last, no variation in trehalose was observed in the hypogean *N. virei* over the range of acclimation temperatures.

Discussion

For several years, groundwater biologists considered subterranean crustaceans as strictly stenothermal (Leclerq, 1943; Dresco-Derouet, 1959), as recently found in *Niphargus virei* (Issartel et al., in press). The low survival times noticed in *N. virei* as soon as it was out of its temperature optimum is concomitant with its ecology: subterranean ecosystems are characterized by greatly reduced temperature variations throughout the year (Ginet and Mathieu, 1968). However, Issartel et al. (in press) highlighted an unexpected tolerance to low temperatures in another hypogean crustacean, *N. rhenorhodanensis*. The significantly higher cold tolerance found in this species is ambiguous since it also never experiences temperature variation during its life cycle (Ginet and Mathieu, 1968) and this may be related to different capacities to cope with chill injuries.

The three species investigated responded differently after being cold-acclimated: the subterranean crustacean *N. rhenorhodanensis* was the only one showing a significant rise in the total FAA pool (see Table 1). Such an accumulation of FAAs during cold-acclimation has previously been shown in insects (Zachariassen, 1985; Fields et al., 1998), and is believed to play a major role in cold-hardening. Proline, alanine and glycine seem to be the common feature accompanying insect acclimation to cold (Hanzal and Jegorov, 1991; Storey et al., 1993). Interestingly, alanine and glycine were largely accumulated in the hypogean *N. rhenorhodanensis* and *N. virei* during cold exposure, whereas glycine level did not change in the surface-dwelling *Gammarus fossarum*. *In vitro* experiments demonstrated that glycine and alanine act as cryoprotectants by stabilizing enzymes and by preserving their activity at cold temperatures (Carpenter and Crowe, 1988, Carpenter et al., 1990). Thus, alanine and glycine may play a similar cryoprotective function in both hypogean crustaceans during cold acclimation. Moreover, glutamine and arginine were also significantly accumulated at -2°C in *N. rhenorhodanensis*, as a result, we hypothesise that they play a possible role in the cold

hardening of this crustacean. Though the implication of such FAAs have never been shown in cold hardy ectotherms before, Anchoroguy et al. (1988) suggested that amino acids containing positively charged amine groups in their side chain, like arginine and glutamine, minimize membrane mixing by interacting directly with negatively charged membrane phospholipids. Regarding these data, obtained *in vitro* with artificial membranes, the authors suggest that these two FAAs prevent the close apposition of two bilayers during low temperature exposures. However, the cryoprotective role of such complex sidechain amino acids in *in vivo* conditions remains to be explored more accurately. Furthermore, FAAs such as arginine play an important role in the metabolism. As a result, the accumulation of such molecules could also result from an alteration (induced by low temperatures) of metabolic pathways (Fields et al., 1998).

Proline, which is generally found in large amounts in cold-exposed insects, occurred at low levels in *N. rhenorhodanensis*, *N. virei* and *G. fossarum* whatever the temperature studied. This suggested that this FAA is not as essential as it is in insects for energy metabolism (Auerswald and Gäde, 1999; Yi and Adams, 2000; Gäde and Auerswald, 2002) or cold hardiness: a positive correlation was found between proline level and cold-acclimation in insects (Hanzal and Jegorov, 1991; Fields et al., 1998). The constant low level of proline during temperature decrease is surprising as this amino acid increased strongly in several stressed ectotherms (Danks, 2000; Ramlov, 2000).

Among all sugars detected, trehalose was the only one which accumulated in cold-acclimated crustaceans. Thus, the hypogean *N. rhenorhodanensis* gradually increased its trehalose level versus the decreasing temperature, reaching the maximum concentration observed in cold-acclimated insects (Fields et al., 1998). The epigeal *G. fossarum* trehalose body content was found to increase only at -2°C and no variation was observed in the hypogean *N. virei*. An increasing trehalose content has already been detected in cold-

acclimated terrestrial crustaceans (but never in aquatic or hypogean ones as far as we know), as in the overwintering isopod *Porcellio scaber* (Tanaka and Udagawa, 1993). These organisms inhabit a cold buffered environment below the ice during winter and its trehalose level increases consistently when the temperature reaches down to 0°C. Trehalose is widely recognized as a compatible solute: it has been identified as a membrane and protein protectant under desiccating conditions and thermal stress in a variety of organisms (Crowe, 1998; Ring and Danks, 1998; Fields et al., 1998). No variation of the body water content was found in the studied animals during these experiments, indicating that the trehalose rise measured in cold-acclimated crustaceans is not due to a desiccation stress.

In vitro experiments showed that this sugar appears to (i) interact with polar head groups of membrane lipids to stabilize the bilayer structure (Rudolph and Crowe, 1985), and (ii) stabilize proteins by replacing the extensive shell of water molecules around them and thus maintain their tertiary structure (Carpenter and Crowe, 1988, Carpenter et al., 1990).

In a previous work, Issartel et al. (in press) found that *N. virei* showed survival times (Lt_{50}) of 2 days at -2°C whereas *G. fossarum* and *N. rhenorhodanensis* presented Lt_{50} values of 21 and 55 days respectively. The present study clearly demonstrated that the distinct physiological responses exhibited by the three crustaceans during cold exposure appeared to be correlated with their survival at cold temperatures. *N. rhenorhodanensis* which combined high durations of survival at low temperatures and significant accumulations of alanine, glycine and trehalose, may therefore be classified as a cold-hardy crustacean, although it never experiences temperature variations in its natural environment. We should hypothesise that these elevations of FAAs and trehalose measured in cold-acclimated *N. rhenorhodanensis* remain probably too low to involve a depression of the supercooling point (Storey, 1997). *N. virei* which showed a very low survival time at -2°C, moderate levels of glycine and alanine, and no change in its trehalose content, may be classified as a cold-

susceptible crustacean. The epigeal *G. fossarum* showed an intermediary pattern, with significant accumulations of FAA (mainly alanine) and trehalose (only at -2°C).

In subterranean biotopes, temperature is strongly buffered and generally shows an annual variation of less than 1°C (Ginet, 1960). Consequently, the *N. rhenorhodanensis* cold-hardiness does not make any ecological sense in the present climatic conditions. However, the mechanisms pointed out in our study may result from the biogeographic history of this species. It is well established that glaciations represent one of the most important factors explaining present hypogean species distribution (Ginet, 1971, 1988). In France, *N. rhenorhodanensis* and *N. virei* are presently found inside and outside the Pleistocene glaciation areas, respectively (Ginet, 1971, Ginet and Juberthie, 1987). Some biogeography studies give many proofs of a sub-glacial survival and/or a post-glacial recolonisation of some subterranean amphipods in Europe and North America (for a review, see Proudlove et al., 2003). Thus, we assume that *N. rhenorhodanensis* may have survived the Pleistocene glaciations in refugium-habitats at the outskirts of the glaciers, in a mixture of cold glacial water and cool groundwater, and may have subsequently recolonised subterranean biotopes that were formerly covered by the ice using river corridors. Such survival and recolonization could have selected a eurythermal profile with high efficiency at cold temperatures. After the last quaternary deglaciation, *N. virei* might have shown a lower individual variability than *N. rhenorhodanensis*, and thus no selection of any eurythermal profile occurred in this species. As a result, *N. virei*'s current distribution outside from glaciation areas may be explained by its inability to cope with cold temperatures.

Acknowledgments

This research was supported by funds from Universities Claude Bernard-Lyon I and Beaulieu-Rennes I, and the National Centre for French Scientific Research (CNRS). The

authors thank Dr F. Malard and Dr T. Lefebure for their valuable assistance in collecting individuals of *Niphargus virei*, and Prof. E. Pattee for his assistance in checking a first version of the manuscript. We are also grateful to the referees who provided helpful suggestions on the draft manuscript.

References

Adams, M. A., Chen, Z., Landman, P. and Colmer, T. D. (1999). Simultaneous determination by capillary gas chromatography of organic acids, sugars, and sugar alcohols in plant tissue extracts as their trimethylsilyl derivatives. *Anal. Biochem.* **266**, 77-84.

Anchordoguy, T., Carpenter, J. F., Loomis, S. H. and Crowe, J. H. (1988). Mechanisms of interaction of amino acids with phospholipid bilayers during freezing. *Biochim. Biophys. Acta* **946**, 299-306.

Angilletta, M. J., Niewiarowski, P. H. and Navas, C. A. (2002). The evolution of thermal physiology in ectotherms. *J. Therm. Biol.* **27**, 249-268.

Auerswald, L. and Gade, G. (1999). The fate of proline in the African fruit beetle *Pachnoda sinuata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**, 687-700.

Baust, J. G. (1980). Low temperature tolerance in an antarctic insect: a relict adaptation? *Cryo-Letters* **1**, 360-371.

Baust, J. G. and Rojas, R. R. (1985). Insect cold hardiness: facts and fancy. *J. Insect Physiol.* **31**, 755-759.

Bouchereau, A., Duhaze, C., Martin-Tanguy, J., Guegan, J.-P. and Larher, F. (1999). Improved analytical methods for determination of nitrogenous stress metabolites occurring in Limonium species. *J. Chromatogr. A* **836**, 209-221.

Carpenter, J. F. and Crowe, J. H. (1988). The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiol.* **25**, 244-255.

Carpenter, J. F., Crowe, J. H. and Arakawa, T. (1990). Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. *J. Dairy Sci.* **73**, 3627-3636.

Cohen S. A. and Michaud D. P. (1993). Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, and Its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino Acids via High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* **211**, 279-287.

Danks, H. V. (2000). Dehydration in dormant insects. *J. Insect physiol.* **46**, 837-852.

Dresco-Derouet, L. (1959). Contribution a l'étude de la biologie de deux crustacés aquatiques cavernicoles : *Caecosphaeroma burgundum* D. et *Niphargus orcinus virei* Ch. *Vie et milieu* **10**, 321-346.

Edwards, J. S. (1986). How small ectotherms thrive in the cold without really trying. *Cryo-Letters* **6**, 388-390.

Fields, P. G., Fleurat-Lassard, F., Lavenseau, L. and Febvay, G. (1998). The effect of cold acclimation and deacclimation on cold tolerance, trehalose and free amino acid levels in *Sitophilus granarius* and *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera). *J. Insect physiol.* **44**, 995-965.

Gade, G. and Auerswald, L. (2002). Beetles' choice--proline for energy output: control by AKHs. *Comp. Biochem. Physiol. B* **132**, 117-129.

Ginet, R. (1960). Ecologie, Ethologie et Biologie de *Niphargus* (Amphipodes Gammaridés hypogés). *Ann. Spéléo.* **15**, 1-254.

Ginet, R. (1971). Biogéographie de *Niphargus* et *Caecospharoma* (Crustacés troglobies) dans les départements français du Jura et de l'Ain - Origine; influence des glaciations. *Proceedings of the 4th International Congress of Speleology, Neuchâtel, Switzerland.*

Ginet, R. and Juberthie, C. (1987). Le peuplement animal des karsts de France (Eléments de biogéographie souterraine pour les Invertébrés). Première partie: la faune aquatique. *Karstologia* **10**, 43-51.

Ginet, R. and Mathieu, J. (1968). Comparaison des températures létales supérieures de *Niphargus longicaudatus* (Crust. Amphipodes) hypogés et épigés. *Annales de biospéléologie* **23**.

Ginet, R. (1988). The biogeographical distribution of invertebrate animals in French karst. Second part: the terrestrial fauna. *Karstologia* **11-12**, 61-71.

Graney, R. and J.P. Giesy, J. (1986). Seasonal changes in the free amino acid pool of the freshwater Amphipod *Gammarus Pseudolimnaeus* bousfield (Crustacea: Amphipoda). *Comp. Biochem. Physiol. A* **85**, 535-543.

Grout, B. W. W. and Morris, G. J. (1987). The Effects of Low Temperature on Biological Systems. London: Edward Arnold.

Hanzal, R. and Jegorov, A. (1991). Changes in free amino acid composition in haemolymph of larvae of the wax moth, *Galleria mellonella* L., during cold acclimation. *Comp. Biochem. Physiol. A* **100**, 957-962.

Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D. and Freminet, A. (1995). Behavioral, ventilatory and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and the epigean *Gammarus fossarum*. *Physiol. Zool.* **68**, 223-244.

Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D. and Freminet, A. (1996). Behavioral, ventilatory and metabolic responses of the hypogean amphipod *Niphargus virei* and the epigean isopod *Asellus aquaticus* to severe hypoxia and subsequent recovery. *Physiol. Zool.* **69**, 1277-1300.

Hervant, F., Mathieu, J., Barré, H., Simon, K. and Pinon, C. (1997a). Comparative study on the behavioral, ventilatory and respiratory responses of hypogean and epigean crustacean to long-term starvation and subsequent feeding. *Comp. Biochem. Physiol. A* **118**, 1277-1283.

Hervant, F., Mathieu, J. and Messana, G. (1997b). Locomotory, ventilatory and metabolic responses of the subterranean *Stenasellus virei* (Crustacea, Isopoda) to severe hypoxia and subsequent recovery. *C. R. Acad. Sc. (Life Sciences)* **320**, 139-148.

Hervant, F., Garin, D., Mathieu, J. and Freminet, A. (1999a). Lactate metabolism and glucose turnover in the subterranean crustacean *Niphargus virei* during post-hypoxic recovery. *J. Exp. Biol.* **205**, 579-592.

Hervant, F., Mathieu, J. and Barré, H. (1999b). Comparative study on the metabolic responses of the subterranean and surface-dwelling amphipods to long-term starvation and subsequent refeeding. *J. Exp. Biol.* **202**, 3587-3595.

Hervant, F. and Renault, D. (2002). Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigean isopods: a proposed adaptive strategy for groundwater organisms. *J. Exp. Biol.* **205**, 2079-2087.

Hochachka, P. and Somero, G. (2002). Biochemical adaptation, mechanism and physiological evolution: Oxford university press.

Huey, R. B. and Kingsolver, J. G. (1989). Evolution of ectotherm performance. *Trends Ecol. Evolut.* **4**, 131-135.

Issartel, J., Hervant, F., Voituron, Y., Renault, D. and Vernon, P. (2005). Behavioural, Ventilatory and Respiratory Responses of Epigean and Hypogean Crustaceans to Different Temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* **A In press.**

Kostal, V., Slachta, M. and Simek, P. (2001). Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapause adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Insecta). *Comp. Biochem. Physiol. B* **130**, 365-374.

Kostal, V., Vambera, J. and Bastl, J. (2004). On the pre-freezing mortality in insects: water balance, ion homeostasis and energy charge in the adult of *Pyrrhocoris apterus*. *J. Exp. Biol.* **207**, 1509-1521.

Leclercq, J. (1943). Notes d'hydrobiologie souterraine. IX. Nouvelles observations sur *Niphargus aquilex* Schiödte (Amphipode Gammaridé). *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège* **6**, 471-476.

Lee, C. E., Remfert, J. L. and Gelembiuk, G. W. (2003). Evolution of physiological tolerance and performance during freshwater invasions. *Integr. Comp. Biol.* **43**, 439-449.

Malard, F. and Hervant, F. (1999). Oxygen supply and the adaptations of animals in groundwater. *Freshwater Biol.* **41**, 1-30.

Mulkiewicz, E., Zietara, M. S., Stachowiak, K. and Skorkowski, E. F. (2000). Properties of lactate dehydrogenase from the isopod, *Saduria entomon*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **126**, 337-346.

Proudlove, G. S., Wood, P. J., Harding, P. T., Horne, D. J., Gledhill, T. and Knight, L. R. F. D. (2003). A review of the status and distribution of the subterranean aquatic *Crustacea* of Britain and Ireland. *Cave and Karst Science* **30**, 53-74.

Slachta, M., Vambera, J., Zahradnickova, H. and Kostal, V. (2002). Entering diapause is a prerequisite for successful cold-acclimation in adult *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae). *J. Insect Physiol.* **48**, 1031-1039.

Storey, K. (1997). Organic solutes in freezing tolerance. *Comp. Biochem. Physiol. A* **117**, 319-326.

Ramløv, H. (2000). Aspects of cold tolerance in ectothermic animals. *Hum. Reprod.* **15**, 26-46.

Renault, D., Salin, C., Vannier, G. and Vernon, P. (1999). Survival and chill-coma in the adult lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), exposed to low temperatures. *J. Therm. Biol.* **24**, 229-236.

Renault, D., Vernon, P., Nedved, O., Hervant, F. and Renault, D. (2004). The importance of fluctuating thermal regimes for repairing chill injuries in the tropical beetle *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) during exposure to low temperature. *Physiol. Entomol.* **29**, 139-145.

Ring, R. A. and Danks, H. V. (1998). The role of trehalose in cold-hardiness and desiccation. *Cryo-Letters* **19**, 275-282.

Rudolph, A. S. and Crowe, J. H. (1985). Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiol.* **22**, 367-377.

- Salt, R. W.** (1961). Principles of insects cold-hardiness. *Ann. Rev. Entomol.* **6**, 55-74.
- Storey, K.** (1984). A metabolic approach to cold hardiness in animals. *Cryo-Letters* **5**, 147-161.
- Storey, K. B., Churchill, T. A. and Joannise, D. R.** (1993). Freeze tolerance in hermit flower beetle (*Osmoderma eremicola*) larvae. *J. Insect physiol.* **39**, 737-742.
- Storey, K.** (1997). Organic solutes in freezing tolerance. *Comp. Biochem. Physiol. A* **117**, 319-326.
- Tanaka, K. and Udagawa, T.** (1993). Cold adaptation of the terrestrial isopod, *Porcellio scaber*, to subnivean environments. *J. Comp. Physiol. B* **163**, 439-444.
- Turnock, W. J.** (1991). Latent cold injury and its conditional expression in the bertha armyworm, *Mamestra configurata* (Noctuidae: Lepidoptera). *Cryo-Letters* **12**, 377-384.
- Turnock, W. J. and R.P., B.** (1993). The reversal of cold injury and its effect on the response to subsequent cold exposures. *Cryo-Letters* **14**, 2512-256.
- Yi, S.-X. and Adams, T. S.** (2000). Effect of pyriproxyfen and photoperiod on free amino acid concentrations and proteins in the hemolymph of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *J. Insect Physiol.* **46**, 1341-1353.

Zachariassen, K. E. and Kristiansen, E. (2000). Ice nucleation and antinucleation in nature.
Cryobiol. **41**, 257-279.

Publication 3

Freezing or supercooling: how does an aquatic subterranean crustacean survive exposures at subzero temperatures?

Julien Issartel, Yann Voituron, Valentina Odagescu, Anne Baudot, Geneviève Guillot, Jean-Pierre Ruaud, David Renault, Philippe Vernon and Frédéric Hervant.

Accepted 15 June 2006

Julien Issartel¹, Frédéric Hervant. Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux, UMR CNRS 5023, Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne cedex, FRANCE.

Yann Voituron, Laboratoire Souterrain de Moulis (CNRS), 09200 Moulis, FRANCE.

Anne Baudot, Valentina Odagescu. Centre de Recherches sur les Très Basses Températures, CNRS, BP 166, 38042, Grenoble cedex 9, FRANCE.

Geneviève Guillot, Jean-Pierre Ruaud. Unité de Recherche en Résonance Magnétique Médicale, UMR 8081 CNRS-Université Paris-Sud 91405 Orsay, FRANCE.

David Renault, Philippe Vernon. Ecosystèmes – Biodiversité – Evolution, UMR CNRS 6553, Université Rennes 1, 35042 Rennes cedex, FRANCE.

¹ Corresponding author (e-mail: julien.issartel@univ-lyon1.fr)

Abstract

Crystallization temperature (T_c), resistance to inoculative freezing (IF), ice contents, bound water, protein and glycogen body contents were measured in the aquatic subterranean crustacean *Niphargus rhenorhodanensis* and in the morphologically close surface-dwelling aquatic crustacean *Gammarus fossarum*, both acclimated at 12, 3, and -2 °C. Cold-acclimation induced an increase in the T_c values in both species but no survival was observed after thawing. However, after being inoculated at high sub-zero temperatures, cold-acclimated *N. rhenorhodanensis* survived whereas all others, including 3 and -2 °C *G. fossarum* died. In its aquatic environment, *N. rhenorhodanensis* is likely to encounter inoculative freezing before reaching the T_c and IF tolerance appears as a highly adaptive trait in this species. Bound water and glycogen were found to increase in 3 and -2 °C *N. rhenorhodanensis* whereas no variation was observed in *G. fossarum*. Considering glycogen hydrophilic properties, such a rise may be correlated with the increased bound water measured in cold-acclimated *N. rhenorhodanensis*, and may be linked to the survival of this species when it was inoculated. The ecological significance of the survival of the aquatic subterranean crustacean to inoculative freezing is paradoxical, as temperature is currently highly buffered in its habitat. However, we assume that past geographical distribution and resulting life history traits of *N. rhenorhodanensis* are key parameters in the current cold-hardiness of the species.

Key words: crustaceans, subterranean, epigeal, freezing tolerance, bound water, crystallisation temperature, inoculative freezing, ice content, cold acclimation, glycogen.

Short title: Freeze tolerance in two aquatic crustaceans

Introduction

Groundwater ecosystems are generally described as very poor in nutrients and oxygen (Spicer, 1998; Malard and Hervant, 1999), they are also characterized by cool but highly buffered temperatures throughout the year ($11 \pm 1^\circ\text{C}$ in French plains; Ginet and Mathieu, 1968). Thus, most of the aquatic crustacean species living in these environments should exhibit stenothermal characteristics (Huey and Kingsolver, 1989). However, Issartel et al. (2005a) recently found that the hypogean amphipod *Niphargus rhenorhodanensis* paradoxically survived -2°C for 60 days, whereas they currently never endure such thermal conditions. This ability to survive low-temperature exposure may correspond to a relict adaptation dating back to the European quaternary glaciations (Issartel et al., 2005a; b; Lefébure, 2005). During that cold palaeoclimate period, sub-zero temperatures presumably occurred, perhaps even in sub-surface groundwater habitats (Tweed et al., 2005). Thus if organisms such as *N. rhenorhodanensis* did face sub-zero temperatures, they had to avoid freezing by extensive supercooling or tolerate ice formation in their tissues (Salt, 1961).

In freeze-avoiding species, the freezing temperature of body fluids, i.e. the lowest temperature they can endure, is depressed (supercooled state) particularly by accumulating large amounts of cryoprotectants (e.g. polyols, sugars, free amino acids or antifreeze proteins: see Salt, 1961; Storey, 1997 and Ramløv, 2000 for a review). By their hydrophilic nature, cryoprotectants bind water molecules and reduce their probability to form an ice embryo (Ramløv, 2000). In freezing tolerant ectotherms, ice-nucleating agents are synthesized and trigger nucleation at high sub-zero temperatures (Lee and Costanzo, 1998). This mechanism prevents the extensive supercooling of cells and thus reduces the probability of lethal intracellular freezing (Holmstrup and Zachariassen, 1996). Moreover, ice progression results in a strong increase of the extracellular fluid concentration and causes a water loss from the cell to the extracellular compartment (Zachariassen and Kristiansen, 2000). In order to

prevent the deleterious effects due to the cells “freezing” dehydration (causing membrane and protein denaturation), cryoprotective substances, such as glycerol, trehalose and free amino acids may also be accumulated (Ramløv, 2000). In *N. rhenorhodanensis*, large accumulations of trehalose and amino acids were found during low temperature acclimation (Issartel et al., 2005b); but until now no studies have accurately investigated whether this subterranean species is freeze tolerant or avoiding.

Besides, some authors have studied the changes in the free water / bound water ratio during low temperature acclimation in cold-hardy ectotherms. The bound water is the water that is so closely associated with cellular or other components in an organism that it is not available to participate in the freezing processes (Hazelwood, 1977). Storey et al. (1981) have shown that the bound water content of the freeze-tolerant larvae *Eurosta solidaginis* increased with cold acclimation, and reported that this was due to changes in water binding by cryoprotectants and macromolecules (mainly glycogen and proteins). In freeze-tolerant species, bound water will not participate in ice formation and would result in non-freezable shells of water surrounding cellular components, protecting them from the denaturation due to freezing dehydration (Storey et al., 1981).

The data dealing with freezing survival in invertebrates are overwhelming, but very few studies have investigated the problem of freezing in aquatic invertebrates (Moore and Lee, 1991; Frisbie and Lee, 1997; Lencioni, 2004). When water from aquatic environments freezes, the physical constraints differ significantly from terrestrial ones: aquatic invertebrates may be subjected to anoxia or mechanical stress due to external ice (Frisbie and Lee, 1997; Lencioni, 2004). Moreover, contact with external ice may trigger ice growth inside the body, which strongly increases the probability that freezing occurs. As a result, supercooling in aquatic invertebrates may not be a likely strategy (Frisbie and Lee, 1997).

In this study, we compared the responses of two freshwater amphipod crustaceans, the hypogean (i.e. subterranean) *N. rhenorhodanensis* and the morphologically close epigean (i.e. surface-dwelling) *Gammarus fossarum* when exposed to subzero temperatures. Thus, in both species we investigated the influence of cold acclimation on 1) the supercooling point, 2) the freezing resistance by inoculation 3) the ice contents and 4) biophysical parameters such as the bound water content determined by a non-invasive method.

Materials and Methods

Animals, rearing and acclimation conditions

Specimens of *Niphargus rhenorhodanensis* (Shellenberg) (subterranean aquatic Amphipod, 12-13 mg fresh weight) were collected from an interstitial aquatic environment (Chalamont, Dombes Forest, France, 46° 0.4' N, 5° 10' E), with traps sunk into the sediment. *Gammarus fossarum* (Koch) (epigean aquatic Amphipod, 32-34 mg fresh weight) was collected from a swiftly flowing river (La Verna, Hyères-sur-Amby, France, 45° 48' N, 5° 17' E) with a net. All species were placed in the dark, in separate tanks kept in thermostated chambers as described by Hervant et al. (1997a; b). The tanks with *N. rhenorhodanensis* contained clay and stones. Tanks with *G. fossarum* contained leaves. Both sets of organisms were fed once a week. They were first maintained at 12°C for 15 days. Then they were separated into three groups: the first group was kept at 12°C for 6 months, the second group was acclimated to 3°C for 6 months. The third group was first acclimated to 3°C during 6 months and next acclimated to -2°C for two weeks as described by Issartel et al. (2005b). For acclimation at -2°C, crustaceans were individually put in 6 ml plastic tubes containing 3 ml of filtered rearing tank water. For all acclimation groups, water was changed twice a week and no physico-chemical parameters changed during acclimation. Food was removed from experimental tanks

one week before the measurements to ensure that the presence of food in the gut would not affect the results.

Glycogen and protein assays

The glycogen content was determined by standard enzymatic methods as described in Hervant et al. (1995, 1996). Total proteins were extracted according to the methods of Elendt (1989) and Barclay et al. (1983), and then determined using specific test-combinations. All assays were performed in a recording spectrophotometer (Beckman DU-6) at 25 °C. Enzymes, coenzymes and test-combination substrates used for enzymatic assays were purchased from Boehringer (Mannheim, Germany) and Sigma Co. (St Louis, USA).

Cryobiological experiments

Supercooling point measurement

To determine the crystallisation temperature (T_c) of body fluids, we used a differential scanning calorimeter DSC₇ system (Perkin–Elmer). The experiments were conducted using standard hermetically sealed aluminium pans (Perkin-Elmer, 0219-0062) designed for volatile samples. In order to check the sealed pans insulation, their weights were measured at the end of the experiments and compared with the weights obtained before the DSC₇ measurements. We used a micro-balance (Sartorius, type 1712 001; accuracy = ± 0.1 mg). A single individual was removed from the rearing tanks and placed briefly on a filter paper to remove excess water as described by McAllen and Block (1997). It was then placed in the pan before sealing and weighing. The pan was placed in the DSC₇ oven manually. Each sample was run against an empty sealed aluminium pan for reference. Temperature and heat flow DSC₇ calibration were evaluated from the melting of the ice of deionized water ($T = 0^\circ\text{C}$ and $\Delta H = 333.8$ J/g)

and from the crystallographic transition of cyclohexane to its solid state ($T = -87.1^{\circ}\text{C}$). Temperature values were found to be reproducible within $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. The samples were cooled from 20°C to -15°C at a rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Thermograms were recorded on a computer (Pentium II), and T_c was obtained using the Pyris 3.7.A software.

Inoculative freezing

To emphasize the possible role of acclimation, the experiment was run on both crustacean species acclimated to 12, 3 and -2°C . The animals were tested out of the water because of the unnatural mechanical stress that ice filled containers can produce on the organisms (Frisbie and Lee, 1997). Thus, according to the methods described by these authors, individuals were placed in contact with a thermocouple connected to a Consort data logger. Then the animal and the thermocouple were wrapped in a water-saturated strip of paper towel. The wrapped animal was closely fitted into a 5 ml pipette cone. The cone was then lowered into a 15 ml plastic tube immersed in an alcohol-filled low temperature bath, the temperature of which was adjusted at -2°C . Ice crystal formation was initiated in the wet paper towel by contact with a metal rod cooled in liquid nitrogen. The inoculative freezing of the water in the paper was verified by observing an exotherm (heat release during the freezing process). Once the temperature had again reached the set temperature (i.e. 2 hours after the onset of the exotherm), the structure containing the animal was heated to 3°C . To check the effect of inoculative freezing, control structures were not inoculated, organisms were cooled and reheated in the low temperature bath at the same time as the inoculated structures. Survival of the organisms was noted 24 h after the end of the experiment.

Ice content

To determine the ice content of frozen individuals, we used the whole-body calorimetry technique described by Layne and Lee (1987; 1991). The calorimeter consisted of an insulated flask that was imbedded in a block of styrofoam insulation and fitted with a styrofoam plug that fitted down into the flask leaving a space of only about 200 μ l at the bottom of the flask. Thawing was done in a volume of 200 μ l water for all the animals. A thermocouple was positioned below the water surface and connected to a digital thermometer. The change in water temperature caused by thawing the crustacean was recorded. Calculations of body ice content used experimentally determined values for our system which were: F factor for the calorimeter = 1.17, the percentage of body mass that is water for *N. rhenorodanensis* and *G. fossarum* = 73.44 ± 0.36 % and 76.10 ± 0.38 % respectively (values do not vary with acclimation), specific heat of the dry mass measured by calorimetry (Sd) = 0.18 ± 0.04 and the melting point of body fluids as estimated from osmolality determinations = -0.54°C for both species. Ice content was expressed in percentage of total body water.

Bound water contents using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy

NMR measurements were performed on a 4.7 Tesla horizontal bore MR scanner, controlled with a TECMAG sequencer (Apollo, Tecmag, Houston, Texas), using a 16 mm-diameter parallel plate resonator (Gonord and Kan, 1994) built in the laboratory. All NMR measurements were performed at room temperature (20°C), at the proton NMR frequency of 200 MHz. Each specimen was transferred into a 5 mm-diameter Plexiglas sample holder placed at the centre of the NMR probe. For each sample, the whole NMR measurement lasted about 10 min: first the radiofrequency (RF) power was adjusted within 1 dB to obtain the required flip angles; then a multi-echo Carr Purcell Meiboom Gill sequence (CPMG) (Meiboom and Gill, 1958) was run to obtain the transverse relaxation curve, with an interecho

time t_{cp} of 5 ms, a repetition time of 8 s, 100 to 400 echoes and 16 averages. The specimens were also weighed with an accuracy of ± 0.1 mg. The relaxation $S(t)$ curves systematically diverged from monoexponentials, and they were analysed as sums of exponential decays with a Laplace inversion algorithm, following:

$$S(t) = \sum_{i=1toN} A_i e^{-t/T_i}, \text{ where } A_i \text{ represents the relative weight of the exponential decay with the}$$

time constant T_i . Choosing 12 components with times equally spaced in log scale between 2 and 500 ms gave excellent fits of the data (chi-square lower than 2×10^{-4}) and relatively robust distribution curves with a bimodal shape. The relative weight p of the peak of the short-time constant thus reflects the relative amount of bound water in the specimen. It was checked on one specimen that the interecho time t_{cp} chosen in the experiment did not influence the bimodal aspect of the decay curve and the resulting value of p , as compared to inter individual variations.

Statistical analysis

All results are presented as mean \pm SEM. The intra- and inter-specific differences in metabolite concentrations, T_c , and bound water contents were investigated by a two-way ANOVA. When significant differences were found, the Tukey HSD post-hoc test was performed. Data were log or square-root transformed to homogenize variances when homoscedasticity was not observed. Statistical analyses were performed with Statistica 6 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

Results

Protein and glycogen contents

The hypogean *N. rhenorhodanensis* presented protein body contents of 0.134 ± 0.008 , 0.133 ± 0.005 and 0.128 ± 0.005 g/g FW (fresh weight) when respectively acclimated at 12, 3, and -2°C (Fig. 1). The surface-dwelling *G. fossarum* showed quite similar values with protein amounts of 0.139 ± 0.003 , 0.139 ± 0.007 and 0.129 ± 0.004 g/g FW after being acclimated at 12, 3, and -2°C . No intra- and inter-specific differences in protein content were found ($P > 0.3$).

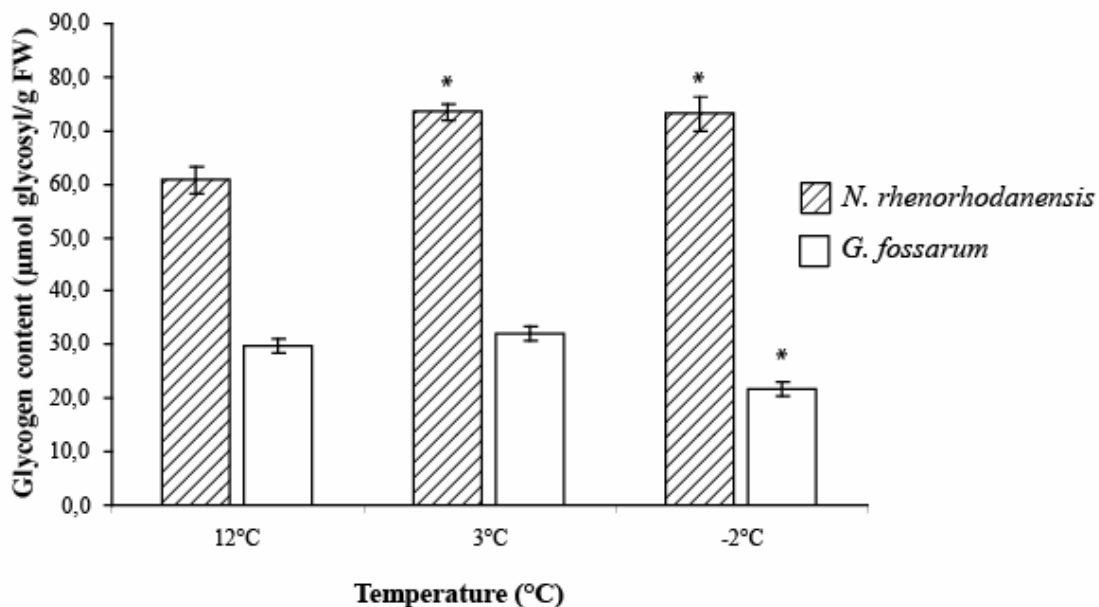


Figure 1 - Glycogen content in *N. rhenorhodanensis* and *G. fossarum* after acclimations at 12, 3, and -2°C . Values are means \pm SEM ($N = 10$). FW = fresh weight.

* = significant differences ($p < 0.05$) between the acclimated and the control (12°C) groups.

Whatever the acclimation temperature, glycogen body content was statistically higher in the hypogean *N. rhenorhodanensis* than in the epigean *G. fossarum* ($P < 0.001$).

In *N. rhenorhodanensis*, the glycogen body amount rose significantly by 21 % ($P < 0.001$), changing from 60.8 ± 2.4 $\mu\text{mol glycosyl/g FW}$ at 12°C to 73.5 ± 1.5 and 73.3 ± 3.2 μmol

glycosyl/g FW when acclimated at 3 and -2°C, respectively (Fig. 1) In *G. fossarum*, acclimation at 3°C did not affect the glycogen level (29.8 ± 1.3 μmol glycosyl/g FW at 12°C, and 32.1 ± 1.4 μmol glycosyl/g FW at 3°C), but a significant decrease of 32 % ($P < 0.001$) was measured at -2°C (21.8 ± 1.3 μmol glycosyl/g FW; Fig. 1).

Crystallisation temperature

The Tc values are presented in Table 1. The mean crystallisation temperature was statistically lower in *N. rhenorhodanensis* than in *G. fossarum*, whatever the acclimation temperature ($P < 0.05$).

	Acclimation	Tc (°C)	N
<i>G. fossarum</i>	12°C	-8.4 ± 0.31	6
	3°C	-5.09 ± 0.46 *	10
	-2°C	-3.57 ± 0.20 *	7
<i>N. rhenorhodanensis</i>	12°C	-12.88 ± 0.42	12
	3°C	-8.17 ± 0.44 *	14
	-2°C	-7.07 ± 0.48 *	11

Table 1 - Supercooling point (Tc) in *N. rhenorhodanensis* and *G. fossarum* after acclimations at 12, 3, and -2°C. Values are means \pm SEM. * = significant differences ($p < 0.05$) between the acclimated and the control (12°C) groups.

A cold acclimation induced a significant increase in the Tc in both species: the Tc rose by 37 % ($P < 0.001$) in *N. rhenorhodanensis* and by 40 % ($P < 0.01$) in *G. fossarum*.

No survival was observed in either species after thawing.

Inoculative freezing

Survival values are presented in Table 2. In *G. fossarum*, no survival was observed after inoculation, whatever the acclimation temperature. In *N. rhenorhodanensis*, no survival was observed after inoculation in 12°C acclimated individuals. After acclimations at 3°C and -2°C

survival rose to 90 % and 100 %, respectively. No mortality was recorded in control (non inoculated) individuals of either species.

	12°C		3°C		-2°C	
	Control	I.F.	Control	I.F.	Control	I.F.
<i>N. rhenorhodanensis</i>	10/10	0/10	10/10	9/10	10/10	10/10
<i>G. fossarum</i>	9/10	0/10	10/10	0/10	10/10	0/10

Table 2 - Survival to inoculative freezing (I.F.) in *N. rhenorhodanensis* and *G. fossarum* after acclimations at 12, 3, and -2°C. Numbers indicate the number of live individual/total.

Ice content

The percentages of crustaceans' body water transformed into ice after inoculation are presented in the figure 2. No variation of the ice content was pointed out in *G. fossarum* whatever the temperature (54.40 ± 6.41 , 58.52 ± 3.80 and 61.25 ± 7.59 % at 12, 3 and -2°C respectively). *N. rhenorhodanensis* showed ice contents of 62.07 ± 4.30 , 52.72 ± 4.32 when acclimated at 12 and 3°C respectively. The ice percentage is significantly lower in specimens acclimated at -2°C (40.07 ± 4.1 %; $P < 0.05$) than in the control group.

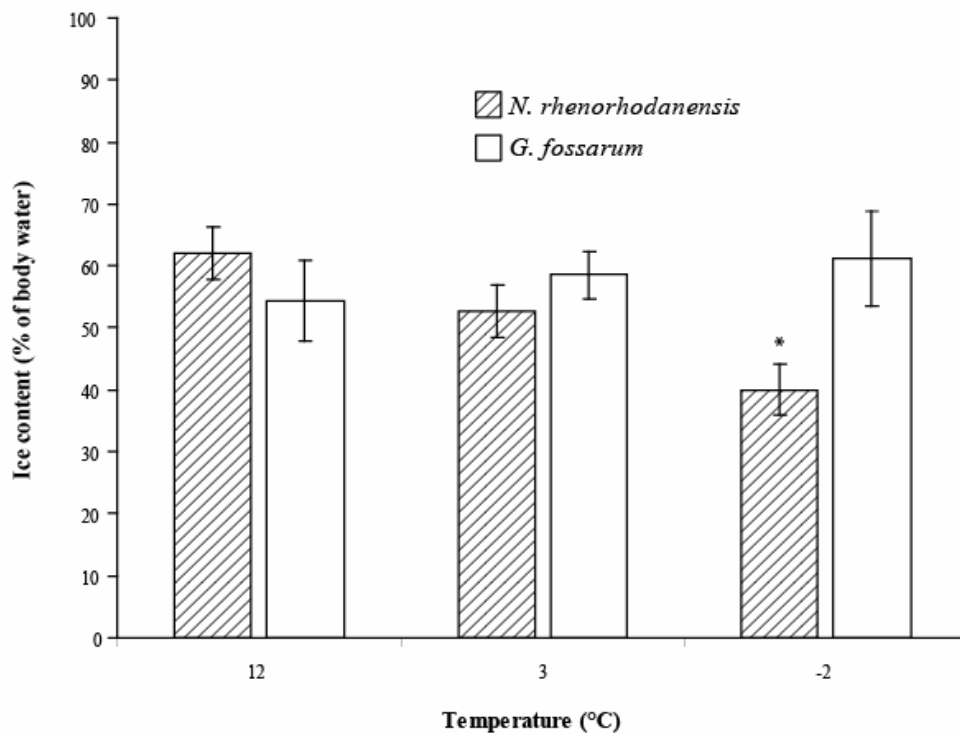


Figure 2. Ice content (% of body water) after being inoculated at -2°C and completion of the exotherm in *N. rhenorhodanensis* and *G. fossarum* acclimated at 12, 3, and -2°C . Values are means \pm SEM ($N = 10$). * = significant differences ($p < 0.05$) between the acclimated and the control (12°C) groups.

Bound water content

Figure 3 represents the relative bound water contents in *N. rhenorhodanensis* and *G. fossarum* when acclimated to 12, 3, and -2°C . No bound water variation was observed in the epigeal *G. fossarum* whatever the acclimation temperature. After being acclimated to 3 and -2°C , the subterranean *N. rhenorhodanensis* showed a significant increase in its bound water content ($P < 0.001$).

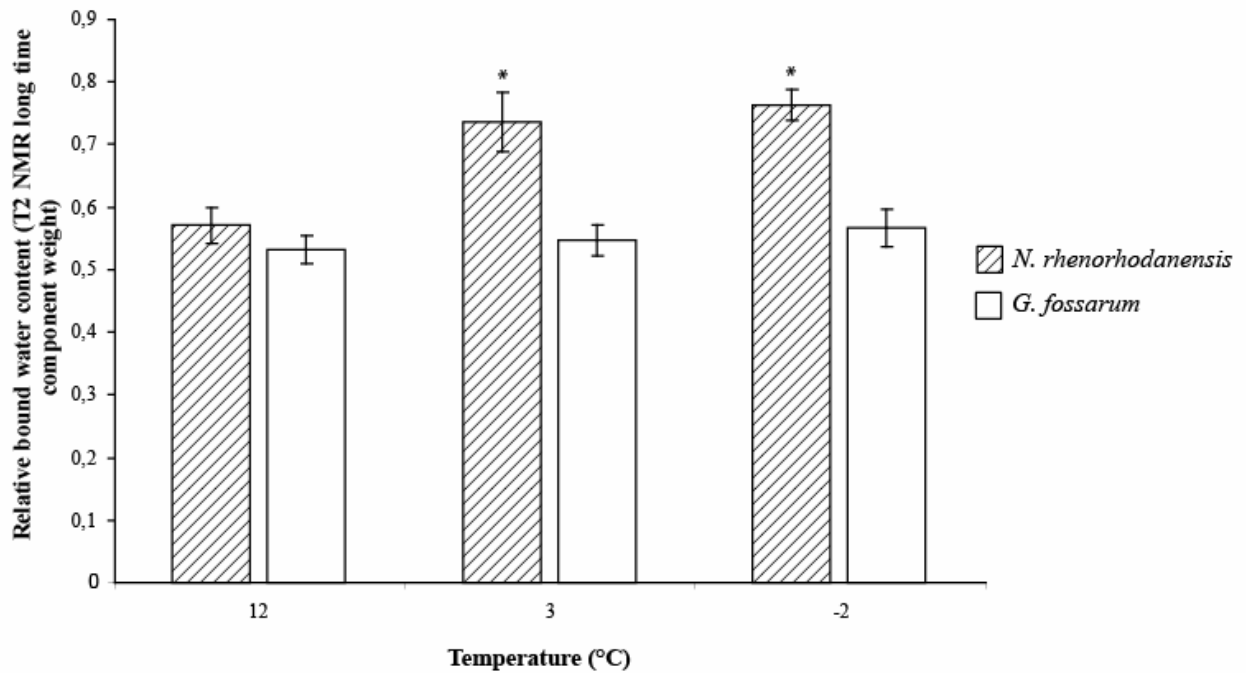


Figure 3. Relative bound water amount according to the NMR measurements in *N. rhenorhodanensis* and *G. fossarum* after acclimations at 12, 3, and -2°C. Values are means \pm SEM ($N = 7$). FW = fresh weight. * = significant differences ($p < 0.05$) between the acclimated and the control (12°C) groups.

Discussion

Traditionally, two main strategies of cold-hardiness are used in ectotherms that are exposed to temperatures below the freezing point of their body fluids (Salt, 1961; Vernon and Vannier, 2002). Ectotherms are either freeze-tolerant or freeze-avoiding species, depending on their ability to survive the formation of extracellular ice (Bale, 1987; Lee, 1989). In freeze-avoiding species, temperature of crystallisation (T_c) is relatively low, often below -10°C , whereas many freeze-tolerant animals have limited abilities to supercool, i.e. ice formation occurs at relatively high temperatures (T_c above -10°C ; Bale, 1996; Sinclair, 1999; Sømme, 1999). Moreover, cold-acclimation generally leads to a T_c decrease in freezing avoiding species (Danks 1978, Duman et al. 1991). In our study, Amphipods exhibit a relatively high T_c and cold-acclimation induced a T_c increase in both *G. fossarum* and *N. rhenorhodanensis*,

but no survival was observed after thawing whatever the acclimation temperature. Mc Allen and Block (1997) also reported a higher T_c at the lowest acclimation temperature in the intertidal copepod *Tigriopus brevicornis*. Meanwhile, though increased, T_c remained very low (about -20°C) when the animals were acclimated at 0 or 10°C . Such a T_c elevation in *G. fossarum* and *N. rhenorhodanensis* when cold-acclimated is thus probably non-adaptive but may result from endogenous or exogenous ice nucleating agents.

If temperature falls below 0°C , *N. rhenorhodanensis* and *G. fossarum* likely encounter external ice crystals and thus become vulnerable to inoculative freezing (IF). In such cases, supercooling is not likely to work as a strategy (Frisbie and Lee, 1997). We observed distinct patterns in the two crustaceans: after they were in contact with ice crystals, only 3°C and -2°C *N. rhenorhodanensis* survived whereas all others, including 3°C and -2°C *G. fossarum*, died. Specimens that survived IF showed a recovery time of a few hours whereas all control organisms (exposed at -2°C but non-inoculated) were immediately active when reheated at 3°C . This survival is probably linked to the lower ice contents endured by cold acclimated *N. rhenorhodanensis* that do not exceed 53% ice within body unlike the other groups. Contact with external ice induced inoculative freezing of body fluids as external ice lattice propagates through a body orifice or directly through the cuticle (Salt, 1963; Lee and Hankinson, 2003). The very thin cuticle characterising amphipod gills (allowing gas diffusion) may be the preferential sites from which ice will propagate through the body.

A number of terrestrial arthropods that live in wet habitats require IF in order to survive extracellular ice formation, since if contact with external ice is prevented, they will supercool and die when spontaneous freezing occurs (Lee et al., 1996). Cold-acclimated *N. rhenorhodanensis* survived freezing if nucleation occurred after an inoculation at high subzero temperature. A similar feature was previously reported in the Centipede *Lithobius forficatus*: it survived freezing only when nucleation was initiated at temperatures of almost -

1°C by inoculative freezing (Tursman et al., 1994). In nature, if temperature drops to almost -1°C, *N. rhenorhodanensis* will experience inoculative freezing before reaching its T_c, as it will be surrounded by ice. Consequently, the tolerance to inoculative freezing seems to be an adaptive trait in these organisms (Tursman et al., 1994).

The physiology of cold tolerance of many arthropods is based on water and its activity at low temperatures. Water content influences the supercooling capacity of freezing susceptible species, and in freezing tolerant ones, a proportion of body water remains unfrozen in order to allow a low level basal metabolism (Block, 2003). Thus, one of the key features that has been rarely studied in arthropods is the capacity to bind water molecules (Storey et al., 1981; Storey, 1983). In our study, we used an original non-invasive protocol to determine the relative bound water content in crustacean bodies from proton NMR transverse relaxation measurements performed on the whole live organisms. The hypogean *N. rhenorhodanensis* contained 25% more bound water when cold-acclimated, whereas no changes occurred in the epigean *G. fossarum*. Adaptations that increase the amount of bound water are used to ensure that the lethal limit is not exceeded (Storey and Storey, 1989). Our results are in agreement with these findings, as ice contents decrease with increasing bound water in *N. rhenorhodanensis*. Furthermore, the present results confirm previous works showing that both low-molecular weight compounds (LMW; mainly polyols and sugars) and high-molecular weight compounds (mainly glycogen and proteins) participate to this phenomenon (Storey et al., 1981; Storey, 1983). Indeed, cold-acclimated *N. rhenorhodanensis* accumulate both glycogen (this study) and amino-acids and trehalose (Issartel et al., 2005). A rise of glycogen is rather paradoxical as numerous studies have reported a decrease of glycogen during ectotherms cold acclimation: glycogen being generally used as a fuel for synthesis of polyols and sugars. In *G. fossarum* which exhibited no changes in the amount of bound water, glycogen remained stable. Furthermore, glycogen levels are twice higher in *N.*

rhenorhodanensis than in *G. fossarum*, which may partly explain the larger bound water content found in the former. However, even if the increased glycogen in cold acclimated *N. rhenorhodanensis* may be, at least partly, responsible for the increased bound water (together with increase of AA and trehalose), its function in the freeze tolerance adaptation still remains unclear and needs further investigations.

Storey and Storey (1989) reported that the most important mechanism for controlling the freezing process is the accumulation of low-molecular weight compounds (LMW). Moreover, total levels of polyols and sugars are usually significantly lower in freezing tolerant species than in freeze-avoiding ones. In *N. rhenorhodanensis*, we found a significant accumulation of the total free amino acids pool (from 58.93 ± 3.88 to 98.63 ± 6.89 $\mu\text{mol/g}$ FM at 12 and -2°C , respectively) and trehalose (from 1.19 ± 1.2 to 19.66 ± 5.2 $\mu\text{mol/g}$ FM at 12 and -2°C , respectively; Issartel et al., 2005b). These findings may also explain the increased bound water found in *N. rhenorhodanensis* and we may hypothesize that accumulated LMW are used for controlling ice amount in the body rather than for supercooling. On the other hand, LMW concentrations measured in both species are may be too small to involve a decrease of the glycogen content as it is usually observed in cold hardy invertebrates. From an adaptive standpoint, the amount of bound water has been found to vary in direct proportion to cold hardiness (Danks, 1978; Storey et al., 1981, Ring, 1981). By increasing the amount of water-binding micro and macro-molecules, a greater fraction of intracellular water can exist as bound water and therefore the probability of intracellular freezing (which is lethal for organisms) is strongly decreased (Storey et al., 1981; Ramløv, 2000). On the other hand, the osmotic water loss out of the cell during extracellular freezing exposes the intracellular components to a dramatic dehydration stress (Zachariassen and Kristiansen, 2000). It is hypothesised that unfrozen water shells surrounding sub-cellular components could prevent

irreversible protein denaturation due to freezing desiccation and cold temperatures (Hazelwood, 1977; Storey, 1981).

Thus, the presence of such adaptations in the subterranean *N. rhenorhodanensis* may explain its survival capacity when exposed to inoculative freezing.

According to the data in the literature, Sinclair (1999) proposed that freezing tolerance is divisible into four groups according to T_c and lower lethal temperature: partially freeze-tolerant, moderately freeze-tolerant, strongly freeze-tolerant and freeze-tolerant. Partially-freezing tolerant species survive the conversion of a small proportion of their body water into ice, but do not survive if ice formation reaches an equilibrium at or above the T_c , which is visually represented by the total completion of the exotherm at a given temperature (Sinclair, 1999). The epigeal crustacean *G. fossarum* that does not survive nucleation, whatever its acclimation, is a intolerant freezing species; it belongs to the chill-susceptible species (species that die after brief chilling to high sub-zero temperatures). The subterranean crustacean *N. rhenorhodanensis* exhibited responses to subzero temperatures similar to those found in freeze-tolerant species which survive IF. However, it appears from our results that *N. rhenorhodanensis* can neither be classified as a partially freeze-tolerant nor as a moderately freeze-tolerant species since: (i) survival was observed after the total completion of the exotherm which is lethal in partially freeze-tolerant individuals (Sinclair, 1999), and (ii) no survival was observed after the animals reached the T_c , whereas moderately freeze-tolerant species survive after T_c is reached. Thus, like numerous arthropods showing similar characteristics (see Lee et al., 1996), *N. rhenorhodanensis* seems to belong to a still indeterminate category.

The presence of such complex adaptations in an organism that currently never endures cold during its life cycle seems at first very paradoxical. However, from recent biogeographical and phylogenetic studies, there are now several proofs that the subterranean

amphipod *N. rhenorhodanensis* survived the quaternary glaciations at the limit or within the nunataks, i.e. the mountain top surrounded by ice never covered by the glaciers (Lefébure, 2005). Thus, in such palaeo-environments, freshly-melted water coming from the glacier (at temperatures near, or even just below 0°C; Tweed et al., 2005) may have infiltrated the sediment and considerably influenced the subterranean temperatures. As a result, the hypogean crustacean *N. rhenorhodanensis* may have encountered sub-zero temperatures and ice, and may thus have been subjected to inoculative freezing.

To conclude, our results converge with this evolutionary scenario, and the possible *N. rhenorhodanensis* “near-glacial” survival during that period may explain (i) the cold-induced accumulation of cryoprotectants (Issartel et al., 2005b), (ii) the bound water increase, and the resulting inoculative freezing tolerance (this study).

Acknowledgements

This research was supported by funds from University Claude Bernard-Lyon I and the National Centre for French Scientific Research (CNRS). The authors thank Dr. C. Romestaing for her valuable assistance in protein assays, M. D. Hürlimann, for providing access to a fast Laplace inversion routine and Prof. E. Pattee for his assistance in checking a first version of the manuscript.

References

Bale, J. S. (1987). Insect cold hardiness: freezing and supercooling: an ecophysiological perspective. *J. Insect Physiol.* **33**, 899–908.

Bale, J. S. (1996). Insect cold hardiness: a matter of life and death. *Eur. J. Entomol.* **93**, 369-382.

Block, W. (2003). Water or ice? The challenge for invertebrate cold survival. *Science Progress* **86**, 77-101.

Barclay, M. C., Dall, W. and Smith, D. M. (1983). Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **68**, 229–244.

Danks, H. V. (1978). Modes of seasonal adaptation in the insects. *Can. J. Entomol.* **110**, 1167-1205.

Duman, J. G., Wu, D. W., Xu L., Tursman D. and Olsen, T. M. (1991). Adaptations of insects to subzero temperatures. *Quart. Rev. Biol.* **66**, 387-410.

Elendt, B. P. (1989). Effects of starvation on growth, reproduction, survival and biochemical composition of *Daphnia magna*. *Arch. Hydrobiol.* **116**, 415–433.

Frisbie, M. P. and Lee, R. E. (1997). Inoculative freezing and problem of winter survival for freshwater macroinvertebrates. *J. N. Am. Benthol. Soc.* **16**, 635-650.

Ginet, R. and Mathieu, J. (1968). Comparaison des températures létales supérieures de *Niphargus longicaudatus* (Crust. Amphipodes) hypogés et épigés. *Annales de biospéléologie* **23**, 425-440.

Gonord, P. and Kan, S. (1994). Multigap parallel-plate bracelet resonator frequency determination and applications. *Rev. Sci. Instrum.* **65**, 3363–3366

Hazelwood, C. (1977). Bound water in biology. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **12**, 263-273.

Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D. and Freminet, A. (1995). Behavioral, ventilatory and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and the epigean *Gammarus fossarum*. *Physiol. Zool.* **68**, 223-244.

Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D. and Freminet, A. (1996). Behavioral, ventilatory and metabolic responses of the hypogean amphipod *Niphargus virei* and the epigean isopod *Asellus aquaticus* to severe hypoxia and subsequent recovery. *Physiol. Zool.* **69**, 1277-1300.

Hervant, F., Mathieu, J., Barré, H., Simon, K. and Pinon, C. (1997a). Comparative study on the behavioral, ventilatory and respiratory responses of hypogean and epigean crustacean to long-term starvation and subsequent feeding. *Comp. Biochem. Physiol. A* **118**, 1277-1283.

Holmstrup, M. and Zachariassen, K. E. (1996). Physiology of cold hardiness in earthworms. *Comp. Biochem. Physiol. A* **115**, 91-101.

Huey, R. B. and Kingsolver, J. G. (1989). Evolution of ectotherm performance. *Trends Ecol. Evolut.* **4**, 131-135.

Issartel, J., Hervant, F., Voituron, Y., Renault, D. and Vernon, P. (2005a). Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigean and hypogean crustaceans to different temperatures. *Comp. Biochem. Physiol. A* **141**, 1-7.

Issartel, J., Renault, D., Voituron, Y., Bouchereau, A., Vernon, P. and Hervant, F. (2005b). Metabolic Responses to Cold in Subterranean Crustaceans. *J. Exp. Biol.* **208**, 2923-2929.

Layne, J.R and Lee R.E. (1987). Freeze tolerance and the dynamics of ice formation in wood frogs (*Rana sylvatica*) from southern Ohio. *Can. J. Zool.* **65**, 2062–2065.

Layne, J.R and Lee R.E. (1991). The importance of body tissue composition to calorimetric assessments of ice content in whole animals. *J. Therm. Biol.* **16**, 61–64.

Lee, R.E. (1989). Insect cold hardiness: to freeze or not to freeze. How insects survive low temperatures, *BioScience* **39**, 308–312.

Lee, R. E., Costanzo, J. P. and Mugnano, J. A. (1996). Regulation of supercooling and ice nucleation in insects. *Eur. J. Entomol.* **93**, 405-418.

Lee, R. E. and Costanzo, J. P. (1998). Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals. [Annu. Rev. Physiol.](#) **60**, 55-72.

Lee, R. E. and Hankison, S. J. (2003). Acquisition of freezing tolerance in early autumn and seasonal changes in gall water content influence inoculative freezing of gall fly larvae, *Eurosta solidaginis* (Diptera, Tephritidae). *J. Insect Physiol.* **49**, 385-393.

Lefébure, T. (2005). Origine, évolution et mesure de la biodiversité des eaux souterraines: analyse moléculaire du genre *Niphargus* (Crustacea). *PhD. thesis, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon.* pp.122.

Lencioni, V. (2004). Survival strategies of freshwater insects in cold environments. *J. Limnol.* **63**, 45-55.

Malard, F. and Hervant, F. (1999). Oxygen supply and the adaptations of animals in groundwater. *Freshwater Biol.* **41**, 1-30.

McAllen, R. and Block, W. (1997). Aspects of the Cryobiology of the Intertidal Harpacticoid Copepod *Tigriopus brevicornis* (O. F. Muller). *Cryobiology.* **35**, 309-317.

Meiboom, S. and Gill, D. (1958). Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation rates. *Rev. Sci. Instrum.* **29**, 688-691

Moore, M. V. and Lee, R.E. (1991). Surviving the big chill: overwintering strategies of aquatic and terrestrial insects. *American Entomologist* **37**, 111-118.

Ramløv, H. (2000). Aspects of cold tolerance in ectothermic animals. *Hum. Reprod.* **15**, 26-46.

Ring, R. A. (1981). Adaptations to Cold in Canadian Arctic Insects. *Cryobiology* **18**, 199-211.

Salt, R. W. (1961). Principles of insect cold-hardiness. *Annu. Rev. Entomol.* **6**, 55-74.

Salt, R. W. (1963). Delayed inoculative freezing of insects. *Can. J. Entomol.* **95**, 1190-1202.

Sinclair, B.J. (1999). Insect cold tolerance: how many kinds of frozen? *Eur. J. Entomol.* **96**, 157-164.

Sømme, L. (1999). The physiology of cold hardiness in terrestrial arthropods. *Eur. J. Entomol.* **96**, 1-10.

Spicer, J.I. (1998). Is the reduced metabolism of hypogean amphipods solely a result of food limitation? *Hydrobiol.* **377**, 201-204.

Storey, K. (1997). Organic solutes in freezing tolerance. *Comp. Biochem. Physiol. A* **117**, 319-326.

Storey, K. (1983). Metabolism and bound water in overwintering insects. *Cryobiology* **20**, 365-379.

Storey, K., Baust, J. G. and Buescher, P. (1981). Determination of water "bound" by soluble subcellular components during low-temperature acclimation in the gall fly larva, *Eurosta solidagensis*. *Cryobiology* **18**, 315-321.

Storey, K. B. and Storey, J.M. (1989). Freeze tolerance and freeze avoidance in ectotherms. In *Animal Adaptation to Cold* (ed. L.C.H. Wang), *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Vol.4 (ed-in-chief R. Gilles), pp. 51-82. Berlin Heidelberg: Springer Verlag.

Tursman, D., Duman, J. and Knight, C. A. (1994). Freeze tolerance adaptations in the centipede, *Lithobius forficatus*. *J. Exp. Zool.* **268**, 347-353.

Tweed, F. S., Roberts, M. J. and Russell, A. J. (2005). Hydrologic monitoring of supercooled meltwater from Icelandic glaciers. *Quaternary Sci. Rev.* **24**, 2308-2318.

Vernon, P. and Vannier, G. (2002). Evolution of freezing susceptibility and freezing tolerance in terrestrial arthropods. *C.R. Biologies* **352**, 1185- 1190.

Zachariassen, K. E. and Kristiansen, E. (2000). Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology* **41**, 257-279.

CINQUIEME PARTIE – SYNTHÈSE ET CONCLUSION

I. CADRE THEORIQUE

La température est l'un des paramètres environnementaux affectant le plus la biologie des animaux. Elle joue un rôle déterminant dans l'établissement des limites de distribution et la survie des organismes ectothermes. De par leur incapacité à maintenir une température corporelle constante, ceux-ci peuvent paraître totalement dépendants des conditions thermiques régnant au sein de leur environnement. Pourtant, des groupes tels que les insectes, les crustacés et les poissons ont réussi à coloniser des milieux présentant des températures (constamment ou épisodiquement) particulièrement basses. Ces remarquables succès évolutifs impliquent l'existence d'adaptations particulières leur permettant de surmonter ces conditions thermiques hostiles. Ces mécanismes peuvent relever :

(i) du comportement : lorsque le milieu ne présente plus les conditions thermiques sub-optimales, certains ectothermes fuient leur milieu initial et cherchent de nouveaux habitats « refuges » offrant des températures moins stressantes pour l'organisme,

(ii) de la physiologie : les ectothermes subissant les basses températures, mais n'ayant pas la possibilité de fuir leur environnement doivent obligatoirement faire face aux stress thermiques. L'activité enzymatique, dont dépend l'ensemble des fonctions vitales, est le premier paramètre susceptible d'être altéré par une variation de la température (Hochachka and Somero, 2002). Certains ectothermes possèdent la capacité de générer des isozymes fonctionnant dans des gammes de températures différentes, préservant ainsi les voies métaboliques essentielles à la vie (Lesser and Kruse, 2004). Lorsque la température tombe en dessous de zéro degré, la probabilité que la glace se forme spontanément dans l'organisme s'accroît. Ainsi, on peut observer chez les ectothermes deux grandes stratégies visant à

survivre aux températures négatives : (1) soit diminuer le point de congélation de ses fluides corporels en dessous de la température environnementale (il est alors considéré comme « intolérant au gel») en accumulant massivement des substances antigels (sucres, polyols), (2) soit les organismes contrôlent la formation de cristaux de glace dans leurs tissus (ils sont alors « tolérants au gel ») tout en limitant cette formation de glace au compartiment extracellulaire (voir troisième partie).

II. PROBLEMATIQUE

De par leur structure, les écosystèmes souterrains présentent des variations thermiques extrêmement faibles ($\pm 1^{\circ}\text{C}$ sur l'année, Ginet et Mathieu, 1968). Selon les modèles théoriques développés en écophysiologie, un organisme qui évolue dans un milieu aux températures stables est un spécialiste (sténotherme) d'une étroite gamme de température. A l'inverse, un organisme qui évolue dans un milieu aux températures variables est un généraliste (eurytherme) qui maximise sa performance sur une large plage de température (Huey and Hertz, 1984). Conformément à ces prévisions, l'ensemble des animaux souterrains devraient présenter des caractéristiques de sténothermes, puisqu'ils ne subissent aucune variation de la température durant leur cycle de vie. Pourtant, plusieurs biospéologues ont constaté que le crustacé souterrain *Niphargus rhenorhodanensis* pouvait supporter des températures négatives (Ginet, Mathieu, Hervant : com. pers.). Ces observations contredisent les prévisions théoriques et soulèvent quatre questions fondamentales : **(1)** quelle est l'échelle thermobiologique de ces organismes, **(2)** quels sont les mécanismes adaptatifs leur permettant de tolérer les basses températures, **(3)** ces mécanismes sont-ils répandus chez les espèces souterraines, et enfin **(4)**, quel est le sens écologique et évolutif de telles adaptations ?

III. METHODOLOGIE

Pour déterminer l'impact d'une variation de la température sur les animaux souterrains, nous avons comparé les réponses de deux crustacés amphipodes aquatiques hypogés (ou souterrains), *Niphargus rhenorhodanensis* et *N. virei* à celles d'un amphipode morphologiquement proche, vivant dans les cours d'eau de surface, *Gammarus fossarum*. Dans un premier temps, nous avons mesuré les **capacités de survie** de ces animaux pour des températures allant de -2°C à 28°C, ainsi que l'évolution de la **performance** (les activités locomotrice et ventilatoire ainsi que la consommation d'oxygène) sur cette même gamme de température. Aux vues de l'étonnante capacité de survie aux basses températures de *N. rhenorhodanensis*, nous avons entrepris dans un deuxième temps d'explorer les mécanismes adaptatifs responsables de la tolérance au froid chez ces trois espèces. Pour cela, il a été mesuré sur *N. rhenorhodanensis*, *N. virei* et *G. fossarum*, l'évolution des **teneurs en substances cryoprotectrices** (sucres, polyols, acides aminés libres), suite à des acclimations de 6 mois à 12, 3, et 2 semaines à -2°C. Il a également été mesuré chez *N. rhenorhodanensis* et *G. fossarum* l'évolution de la **température de congélation**, de la **tolérance à la congélation par inoculation**, *i.e.* le déclenchement de la congélation des fluides de l'organisme par un agent extérieur (ex : cristaux de glace) à une température supérieure au point de congélation de l'organisme, ainsi que le **pourcentage de glace corporelle** formée après congélation induite par inoculation et enfin, la **proportion d'eau liée** (*i.e.* le pourcentage d'eau se trouvant associée à des composants ne pouvant pas participer au processus de congélation) en fonction de la température d'acclimation (6 mois à 12 et 3°, 2 semaines à -2°C).

IV. SYNTHÈSE DES RESULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

1. Survie (publication 1)

Les crustacés *G. fossarum*, *N. rhenorhodanensis* et *N. virei* présentent trois patterns de survie distincts (Tableau 1) : de 3 à 28°C, le crustacé épigé (ou superficiel) *G. fossarum* montre des DL₅₀ (durée létale pour 50 % de la population) plus longues que celles mesurées chez les crustacés hypogés *N. rhenorhodanensis* et *N. virei*. Cela concorde avec les caractéristiques thermiques du milieu de vie de *G. fossarum* : dans certains cours d'eau de surface, la température peut fluctuer de 3 à 28°C au cours de l'année. Les faibles temps de survie mesurés chez *N. virei* dès que la température s'éloigne de son optimum thermique sont en accord avec son écologie, les milieux souterrains étant des biotopes extrêmement tamponnés. Par contre, l'importante capacité de survie trouvée chez *N. rhenorhodanensis* semble paradoxale : *N. rhenorhodanensis* et *N. virei* vivent tous deux dans des milieux thermiquement très stables, il semble donc surprenant qu'ils montrent des échelles thermobiologiques si différentes.

	-2°C	3°C	7°C	11°C	17°C	21°C	26°C	28°C
<i>G. fossarum</i>	2.70 ± 0.21 ^a	*	*	*	*	137.28 ± 7.98 ^a	27.01 ± 0.51 ^a	8.23 ± 0.26 ^a
	21.36 ± 0.51 ^b							6.89 ± 0.25 ^b
<i>N. rhenorhodanensis</i>	8.72 ± 0.35 ^a	*	*	*	*	111.58 ± 4.17 ^a	6.94 ± 0.26 ^a	1.60 ± 0.08 ^a
	54.95 ± 1.17 ^b							0.85 ± 0.03 ^b
<i>N. virei</i>	1.02 ± 0.03 ^a	*	*	*	126.52 ± 8.20 ^a	8.89 ± 0.33 ^a	0.93 ± 0.03 ^a	0.42 ± 0.01 ^a
	2.09 ± 0.07 ^b							0.34 ± 0.01 ^b

Tableau 1-Durées létales (en jours) pour 50% de la population (DL₅₀ ± SEM) chez *G. fossarum*, *N. rhenorhodanensis* et *N. virei* exposés à différentes températures (N = 30).

* Pas de mortalité observée durant l'expérience (3 mois), ^a individus acclimatés à 12°C, ^b individus acclimatés à 3°C.

Enfin, cette expérience montre que l'acclimatation présente un impact beaucoup plus fort chez *G. fossarum* et *N. rhenorhodanensis* que chez *N. virei*. Or, il a été démontré que l'incapacité à s'acclimater était un trait spécifique aux espèces décrites comme sténothermes (Wilson et al., 2001).

2. Performance (publication 1)

Les animaux souterrains sont, sauf rares exceptions, bradymétaboliques : ils présentent en permanence un métabolisme réduit par rapport aux espèces épigées afin de réduire les dépenses énergétiques (Hervant et al., 1997a, b), un phénomène très courant dans les écosystèmes énergétiquement pauvres. Ainsi, l'épigé *G. fossarum* présente des valeurs de performance supérieures (consommation d'oxygène, Figure 1) à celles des deux crustacés hypogés.

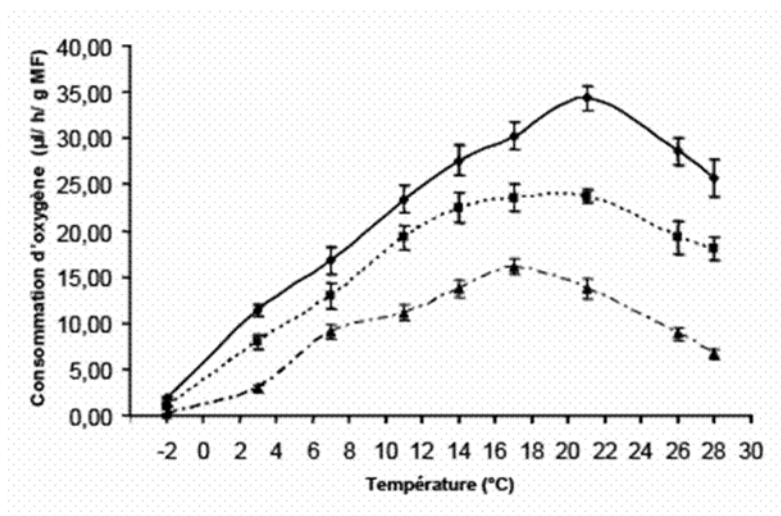


Figure 1-Impact de la température sur la consommation d'oxygène chez (◆) *G. fossarum*, (■) *N. rhenorhodanensis* et (▲) *N. virei*. Les valeurs sont de moyennes \pm SEM ($N = 10$).

Néanmoins, le calcul de la B_{80} (tableau 2) (i.e. la plage de température pour laquelle la performance est maintenue entre 80 et 100 %) révèle que l'épigé *G. fossarum* et le souterrain *N. rhenorhodanensis* maximisent leur performance sur une large plage de température,

contrairement à *N. virei*, chez qui les valeurs de B_{80} sont beaucoup plus faibles. Cela sous-entend que ce dernier présente une plus faible capacité à maintenir une activité enzymatique optimale lors d'un stress thermique (Angilletta et al., 2002, Hochachka and Somero, 2002).

	Consommation d'oxygène (°C)	Activité locomotrice (°C)	Activité ventilatoire (°C)
<i>Gammarus fossarum</i>	13,2	14	12,7
<i>Niphargus rhenorhodanensis</i>	15,6	8	10
<i>Niphargus virei</i>	9	5,5	6

Tableau 2- B_{80} de la consommation d'oxygène, de la locomotion et de la ventilation chez *G. fossarum*, *N. rhenorhodanensis* et *N. virei*.

De plus, une variation de 10°C (valeurs de Q_{10}) influe davantage sur le métabolisme de *N. virei* que sur celui des deux autres crustacés. Des valeurs de Q_{10} très élevées, comme celles mesurées chez *N. virei*, signifient que la température détériore les propriétés des systèmes biochimiques sous-jacents (Hochachka and Somero, 2002). Les valeurs de Q_{10} et de B_{80} mesurées chez *G. fossarum* et *N. rhenorhodanensis* sont significativement plus faibles que celles de *N. virei*, elles indiquent que ces organismes maximisent leur performance sur une plus large plage de température.

Le crustacé épigé *G. fossarum* et l'hypogé *N. rhenorhodanensis* présentent des profils physiologiques relativement proches, et peuvent être tout deux considérés comme des organismes eurythermes, alors que *N. virei* montre les caractéristiques typiques d'un organisme sténotherme.

3. Substances cryoprotectrices (publication 2)

Au vue de l'étonnante capacité de survie à -2°C mise en évidence chez le crustacé souterrain *N. rhenorhodanensis*, nous avons entrepris de mesurer sur les 3 crustacés l'évolution des teneurs corporelles de diverses molécules jouant un rôle dans la cryoprotection (acides aminés libres, polyols), suite à une acclimatation à 12, 3 et -2°C . Etant donnée la trop faible survie à -2°C observée chez *N. virei*, les concentrations en acides aminés et en polyols n'ont été mesurées chez ce dernier que pour 12 et 3°C .

Chez le crustacé épigé *G. fossarum*, aucune variation significative du contenu total en acides aminés n'a été observée suite à une acclimatation à 3°C et -2°C . Seule l'alanine et la glutamine augmentent suite à l'acclimatation au froid. Le contenu en tréhalose augmente significativement seulement lors d'une acclimatation à -2°C . Le souterrain *N. virei* présente des accumulations significatives d'alanine et de glycine (Tableau 3) après acclimatation à 3°C , mais aucune variation de la teneur total en acides aminés ni du contenu corporel en tréhalose n'a été observée chez cette espèce.

	<i>G. fossarum</i>		<i>N. rhenorhodanensis</i>		<i>N. virei</i>
	3°C	-2°C	3°C	-2°C	3°C
Aspartate	-	-	-	-	-
asp/ser	-	-	-	++	-
Glutamate	-	-	+	-	-
Glycine	-	-	+	+	+
Glutamine	-	++	-	++	-
Arginine	+	+	-	++	-
Threonine	-	-	-	-	-
Alanine	-	-	+	+	+
Proline	-	-	+	++	-
Tyrosine	-	-	-	+	-
Valine	-	-	+	++	-
Methionine	-	-	-	+	-
Lysine	-	-	-	-	-
Isoleucine	-	-	+	++	-
Leucine	-	-	-	++	-
Phenylalanine	-	-	+	++	-

Tableau 3-Evolution des teneurs corporelles en acides aminés libres chez *G. fossarum*, *N. rhenorhodanensis* et *N. virei* acclimatés à 12, 3 et -2°C. (+) : augmentation significative par rapport au témoin. (++) : augmentation significative par rapport à 12 et 3°C

Le crustacé hypogé *N. rhenorhodanensis* est le seul à montrer une augmentation significative du pool total d'acide aminé libre. A 3°C, 6 des 17 acides aminés détectés augmentent significativement, la glycine et l'alanine étant les 2 composés augmentant le plus (95% et 48%). A -2°C, mis à part l'aspartate, le glutamate, la proline, la thréonine et la lysine, tous les AA montrent des teneurs corporelles plus élevées que celle mesurées à 12 et/ou 3°C. Enfin,

les teneurs corporelles en trehalose des individus acclimatés à 3 et à -2°C sont respectivement 6 et 12 fois supérieures à celles mesurée à 12°C.

	Teneur corporelle en tréhalose ($\mu\text{mol/g MF}$)		
	12°C	3°C	-2°C
<i>G. fossarum</i>	1.19 \pm 0.20	1.05 \pm 0.35	5.65 \pm 1.69 ^{d†}
<i>N. rhenorhodanensis</i>	1.54 \pm 0.20	6.31 \pm 0.51 ^d	19.66 \pm 5.17 ^{d†}
<i>N. virei</i>	0.61 \pm 0.36	2.00 \pm 0.66	†

Tableau 4-Teneurs corporelles en tréhalose chez *G. fossarum*, *N. rhenorhodanensis* et *N. virei* acclimatés à 12, 3 et -2°C. Les valeurs sont de moyennes \pm SEM

^d : différence significative entre le témoin et le groupe acclimaté. [†] : différence significative entre les 2 groupes acclimatés.

Les trois crustacés répondent donc différemment à une exposition de longue durée au froid : le crustacé souterrain *N. rhenorhodanensis* est le seul à présenter une augmentation du pool total d'acides aminés libres. Une telle augmentation d'acides aminés suite à une acclimatation au froid a déjà été mesurée chez des insectes adaptés aux basses températures (Zachariassen, 1985; Fields et al., 1998). En effet, une élévation des concentrations en alanine, glycine et proline semble être un caractère relativement répandu chez les insectes durant leur acclimatation. Or, l'alanine et la glycine sont justement significativement accumulées dans les tissus de *N. rhenorhodanensis* et *N. virei* lors d'une exposition au froid. Des expériences in vitro ont montré que lors d'une exposition aux basses températures, l'alanine et la glycine préservent la structure tertiaire des enzymes, sauvegardant ainsi leur activité (Carpenter and Crowe, 1988; Carpenter et al., 1990). Ainsi, ces deux acides aminés pourraient jouer le même rôle cryoprotecteur chez *N. rhenorhodanensis* durant l'acclimatation au froid. D'autres acides aminés tels que la glutamine et l'arginine sont accumulés chez *N. rhenorhodanensis* en grande quantité à -2°C. Anchoroguy et al. (1988) ont montré que les acides aminés comportant des

groupes amines chargés positivement dans leurs chaînes, tels que l'arginine et la glutamine, minimisaient l'altération des membranes artificielles, lorsque celles-ci étaient exposées aux basses températures. Ces composés interagissent en créant des liaisons avec les têtes hydrophobes des phospholipides négativement chargés, maintenant ainsi la fluidité et l'intégrité de la bicouche lipidique. L'arginine et la glutamine sont justement les acides aminés libres qui sont le plus accumulés chez *N. rhenorhodanensis* et bien que l'implication de tels composés n'ait jamais été démontrée auparavant chez des ectothermes adaptés aux basses températures, il est probable qu'ils jouent un rôle dans la survie au froid chez ces organismes.

Le « potentiel cryoprotecteur » de ces molécules dans un système *in vivo* reste néanmoins à étudier plus précisément. De plus, les acides aminés tels que l'arginine sont des substances jouant un rôle important dans le métabolisme intermédiaire et énergétique. Ainsi, l'accumulation de certains acides aminés pourrait également provenir d'une altération des voies métaboliques due aux basses températures (Fields et al., 1998).

Parmi tous les sucres et polyols dosés, le tréhalose fut la seule substance montrant une variation en fonction des différentes acclimatations. Le trehalose augmente graduellement chez *N. rhenorhodanensis* dès qu'il est exposé au froid, atteignant des valeurs comparables à celles mesurées chez les insectes tolérants au froid (Fields et al., 1998), alors que le contenu en tréhalose n'augmente qu'à partir de -2°C chez *G. fossarum*, et qu'aucune variation n'a été détectée chez *N. virei*. Une élévation du tréhalose a été mesurée chez un crustacé terrestre, l'isopode *Porcellio scaber* (Tanaka and Udagawa, 1993), mais cela n'a jamais été mis en évidence chez un crustacé aquatique ou souterrain à notre connaissance. Le tréhalose est généralement reconnu comme un *soluté compatible* : il a été décrit comme un protecteur de membranes et de protéines lors de différents stress (température, dessiccation) chez de

nombreux organismes tels que les insectes mais également les bactéries, les levures ou encore les tardigrades (Crowe, 1998; Ring and Danks, 1998; Fields et al., 1998). Des expériences *in vitro* ont démontré que le tréhalose (i) interagit avec les têtes polaires des phospholipides membranaires, ce qui aurait comme effet de stabiliser la bicouche lipidique (Rudolph and Crowe, 1985), et (ii) stabilise les protéines en liant les molécules d'eau les entourant, maintenant ainsi une hydratation suffisante au maintien de la structure tertiaire (Carpenter and Crowe, 1988; Carpenter et al., 1990).

4. Tolérance au gel (publication 3)

Les mesures de la température de congélation réalisées sur *N. rhenorhodanensis* et *G. fossarum* montrent que l'acclimatation au froid a paradoxalement pour effet d'augmenter leur point de congélation, alors que chez la majorité des ectothermes adaptés au froid, une acclimatation conduit à une diminution de T_c . Dans ces conditions (la température est expérimentalement abaissée jusqu'à ce que les animaux atteignent leur T_c), les crustacés étudiés ne tolèrent pas la formation de glace dans leurs tissus, quelle que soit leur température d'acclimatation. Par contre, les tests de survie à la congélation initiée par contact avec la glace (inoculative freezing) à une température de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tableau 5) révèlent que *N. rhenorhodanensis* tolère le gel intra-tissulaire pendant 2 heures lorsque celui-ci est acclimaté au froid, contrairement à l'épigé *G. fossarum* chez qui la congélation reste mortelle, même après acclimatation à 3 et -2°C . Cette deuxième mesure de survie au gel est probablement plus respectueuse des exigences écologiques des crustacés étudiés (atmosphère saturée en humidité, température de cristallisation contrôlée...) et des conditions environnementales qu'ils sont susceptibles de rencontrer : les animaux aquatiques sont potentiellement très vulnérables à la congélation par inoculation puisqu'ils sont en contact avec les cristaux de glace dès que la température l'eau de leur biotope descend en dessous 0°C .

	12°C	3°C	-2°C
<i>N. rhenorhodanensis</i>	0/10	9/10	10/10
<i>G. fossarum</i>	0/10	0/10	0/10

Tableau 5-Survie à la congélation par inoculation chez *N. rhenorhodanensis* et *G. fossarum* (nombre de survivants sur 10) acclimatés à 12, 3 et -2°C.

Il a également été observé chez *N. rhenorhodanensis* une diminution significative du contenu en glace chez les individus acclimatés à -2°C (Fig. 2). Le pourcentage de glace corporelle est un paramètre physiologique très important chez les espèces tolérantes à la congélation (Ramløv, 2000). En effet, lorsque la quantité de glace corporelle devient trop importante (le seuil est en général de 65%), le stress osmotique induit par la congélation est suffisamment important pour mener à la rupture des membranes plasmique. Ainsi, le contrôle de la quantité de glace apparaît comme un trait hautement adaptatif et permet à *N. rhenorhdanensis* de diminuer les dommages occasionnés par la glace intratissulaire, ce qui implique un investissement d'énergie moins important dans la « réparation » des dégâts causés par le gel et donc une de sa survie post congélation.

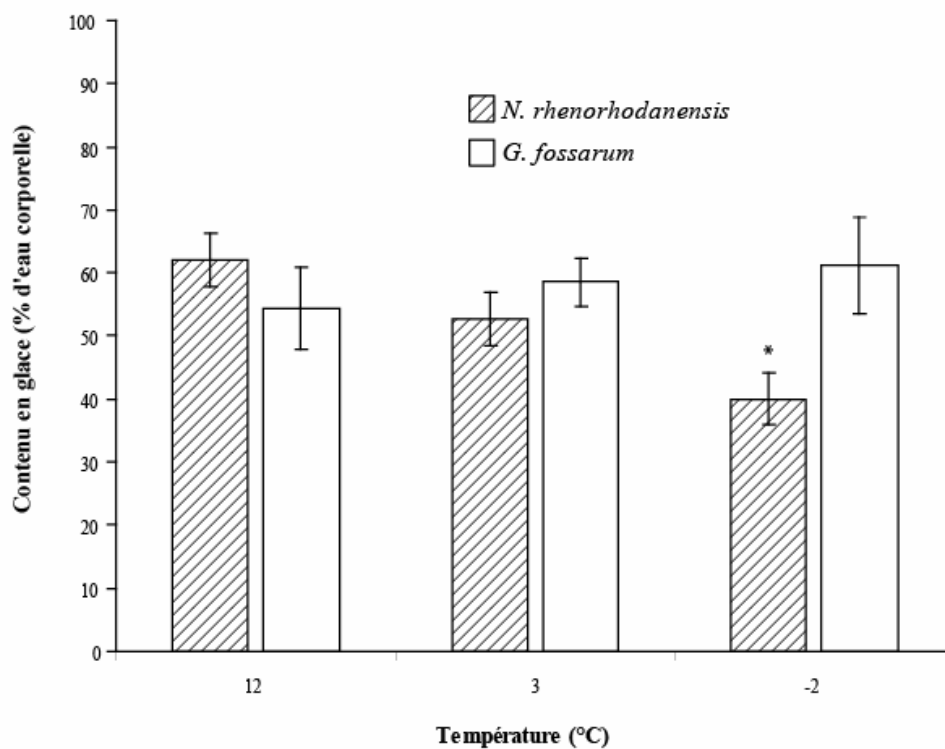


Figure 2-Pourcentage de glace corporelle suite à la congélation initiée par inoculation chez *N. rhenorhodanensis* et *G. fossarum* acclimatés à 12, 3 et -2°C. Les valeurs sont de moyennes \pm SEM. * : différence significative entre le témoin (12°C) et le groupe acclimaté.

Les mesures d'eau liée réalisées sur les crustacés (vivants) par Résonance Magnétique Nucléaire (Fig. 3) montrent que l'acclimatation au froid induit une augmentation significative du contenu en eau liée chez le souterrain *N. rhenorhodanensis*, alors qu'aucune variation n'a été mesurée chez *G. fossarum*.

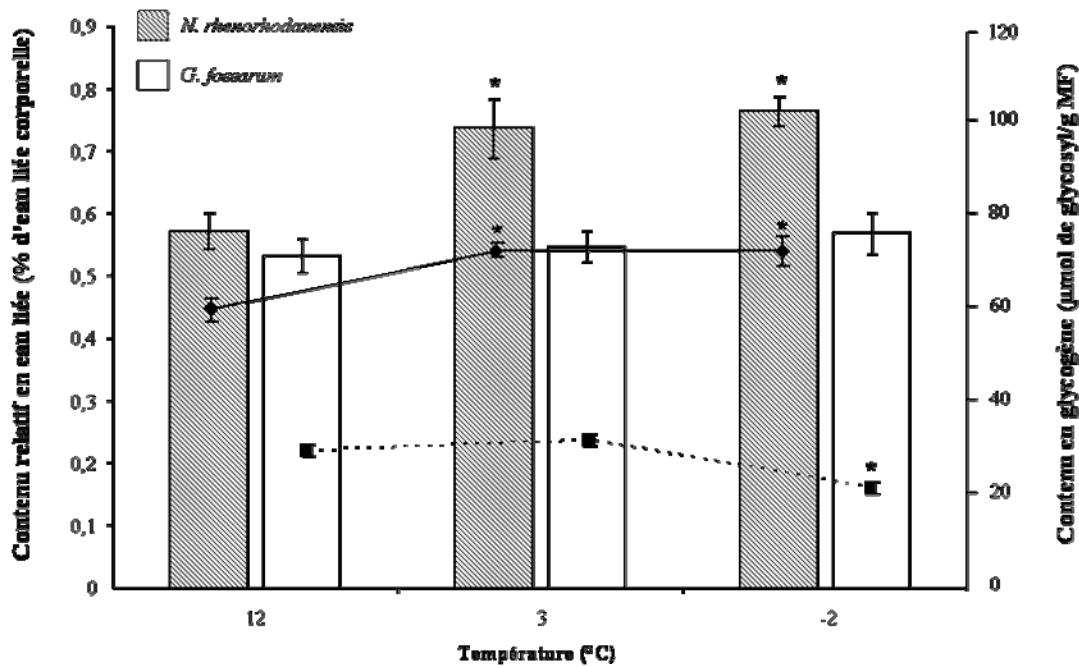


Figure 3-Contenus en eau liée (axe de gauche, histogrammes) et teneurs corporelles en glycogène (axe de droite, graphes) chez *N. rheorhodanensis* et *G. fossarum* acclimatés à 12, 3 et -2°C. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM

* : différence significative entre le témoin (12°C) et le groupe acclimaté.

Parallèlement, le contenu en glycogène (Fig. 3) augmente significativement chez *N. rheorhodanensis* dès lors qu'il est acclimaté au froid, alors que chez *G. fossarum*, c'est une diminution significative de la teneur en glycogène qui est mesurée suite à une exposition prolongée aux basses températures.

Il a été démontré chez les ectothermes tolérants au froid que la proportion d'eau liée était directement corrélée avec leur capacité de survie aux basses températures (Storey et al., 1981). En accumulant des macro- et/ou micromolécules hydrophiles (glycogène, tréhalose), et donc en associant davantage de molécules d'eau, la proportion d'eau intracellulaire « liée » augmente, et la probabilité que la congélation intracellulaire (létale chez la majorité des organismes) se produise est par conséquent fortement diminuée (Ramløv, 2000).

D'autre part, le flux d'eau sortant de la cellule durant le processus de congélation induit une dessiccation sévère des composants intracellulaires (Zachariassen and Kristiansen, 2000).

L'eau liée entourant les composants intracellulaires pourrait prévenir de la dénaturation irréversible des protéines, due à la dessiccation par congélation (Hazelwood, 1977 ; Storey, 1981).

Ainsi, la présence de telles adaptations chez le crustacé souterrain *N. rhenorhodanensis* peut expliquer sa tolérance à la congélation par inoculation.

5. Classification des organismes étudiés

D'après les données existant dans la littérature, Sinclair (1999) propose que la tolérance à la congélation soit partagée en 4 catégories. Ces 4 familles regrouperaient respectivement les organismes (i) partiellement tolérants à la congélation ; (ii) modérément tolérants à la congélation ; (iii) tolérants à la congélation et enfin (iv) fortement tolérants à la congélation.

Les animaux partiellement tolérants ne survivent qu'à de très faibles quantités de glace dans leurs tissus : ils meurent si la formation de glace atteint l'équilibre (la glace cesse de se former) à une température égale ou supérieure à la T_c , ce qui est visuellement représenté par la complétion de l'exotherme (cf première partie, figure 5) (Sinclair, 1999). Le crustacé épigé *G. fossarum*, qui ne survie pas à la congélation, quelle que soit la température d'acclimatation, est un animal intolérant au gel ; il appartiendrait à la famille des organismes sensibles au froid (*chill-susceptible*), qui meurent suite à une brève exposition aux températures négatives proches de zéro degré. *N. rhenorhodanensis* présente des réponses comparables à celles obtenues chez des insectes tolérant la congélation par inoculation. Néanmoins, il apparaît que *N. rhenorhodanensis* ne peut être classé dans la famille des organismes partiellement tolérants au gel, ni dans la famille des organismes modérément tolérants au gel. En effet, ce crustacé souterrain survit à la complétion totale de l'exotherme suite à l'initiation de la congélation par

inoculation, ce qui est létal chez les espèces partiellement tolérantes au gel (Sinclair, 1999). D'autre part, aucune survie n'a été enregistrée après que *N. rhenorhodanensis* ait atteint sa T_c , alors que les animaux modérément tolérants au gel survivent après avoir atteint leur température de cristallisation. Ainsi, comme de nombreux arthropodes montrant des caractéristiques similaires (Lee et al., 1996), *N. rhenorhodanensis* semble appartenir à une catégorie intermédiaire entre les organismes partiellement tolérants au gel et les organismes modérément tolérants au gel.

V. CONTEXTE ECOLOGIQUE ET EVOLUTIF

Les milieux souterrains sont caractérisés par leur extrême stabilité thermique. Par conséquent, l'eurythermie et la tolérance au gel mesurées chez le crustacé hypogé *N. rhenorhodanensis* ne semble avoir aucun « sens écologique » dans les conditions climatiques actuelles.

1. Exaptation ou adaptation ?

L'antagonisme existant entre la réponse au froid et les caractéristiques thermiques du milieu de vie de *N. rhenorhodanensis* peut s'expliquer soit par (i) l'exaptation, soit par (ii) l'adaptation fossile.

i) Théorie de l'exaptation

Une exaptation est une adaptation « détournée » de son sens premier (Gould and Vrba, 1982). Ainsi, la tolérance aux basses températures peut parfois être la conséquence de réponses

adaptatives développées pour survivre à un autre stress. Il a par exemple été démontré qu'une importante résistance à la dessiccation ou à la salinité permettait d'accroître la survie au froid (Bayley et al., 2000). En effet, certains arthropodes vivant en milieu (périodiquement ou continuellement) pauvre en eau tolèrent la déshydratation de leurs tissus en compartimentant l'eau corporelle, en régulant les flux osmotiques et en augmentant leur fraction d'eau liée (définition page 37) (Danks, 2000). Ces ajustements sont en partie réalisés grâce à l'accumulation et la synthèse de carbohydrates (principalement le tréhalose) dans les tissus, ces molécules ayant des propriétés hydrophiles et des effets stabilisants sur les composants cellulaires (Danks, 2000). Il est maintenant largement reconnu qu'il existe une convergence entre les stress thermiques et hydriques. En effet, lorsqu'un environnement se refroidit, il s'assèche, car l'air froid est plus sec que l'air chaud (Ring and Danks, 1994). Ainsi, les animaux terrestres tolérants les environnements secs présentent conjointement une potentialité de survie aux basses températures, car les deux stress impliquent des réponses adaptatives très proches (Danks, 2000). La tolérance au froid observées chez certaines espèces initialement tolérantes à la déshydratation peut être considérée comme une exaptation.

N. rhenorhodanensis est un crustacé aquatique, il semble dès lors prévisible que sa capacité de survie en milieu aérien soit limitée. Des résultats préliminaires confirment cette hypothèse puisque *N. rhenorhodanensis* ne présente que de très faibles temps de survie (quelques heures) lorsqu'il est exposé à une atmosphère humide (Hervant, données non publiées). Les capacités de survie au froid de ce dernier ne résuleraient donc pas d'une adaptation « première » à la déshydratation, puisque cette dernière semble inexistante. A l'heure actuelle, nous ne disposons d'aucune donnée étayant significativement l'hypothèse de l'exaptation.

ii) Adaptation fossile

Les mécanismes adaptatifs mis en évidence dans cette étude peuvent résulter de l'histoire de vie de cette espèce. L'aire de répartition de *N. rhenorhodanensis* est relativement grande pour une espèce souterraine, puisqu'il a été recensé tout le long du bassin du Rhône, dans les Alpes et le Jura, au sein d'habitats très différents (aquifères poreux, karsts, aquifères fissurés). Nombre de ces habitats sont récents, et ont été recouverts par les glaciers du Quaternaire (Fig. 4). L'aire de distribution de *N. virei* diffère de celle de *N. rhenorhodanensis* dans le sens où il est absent des zones d'altitude (haut Jura et massif des Alpes).

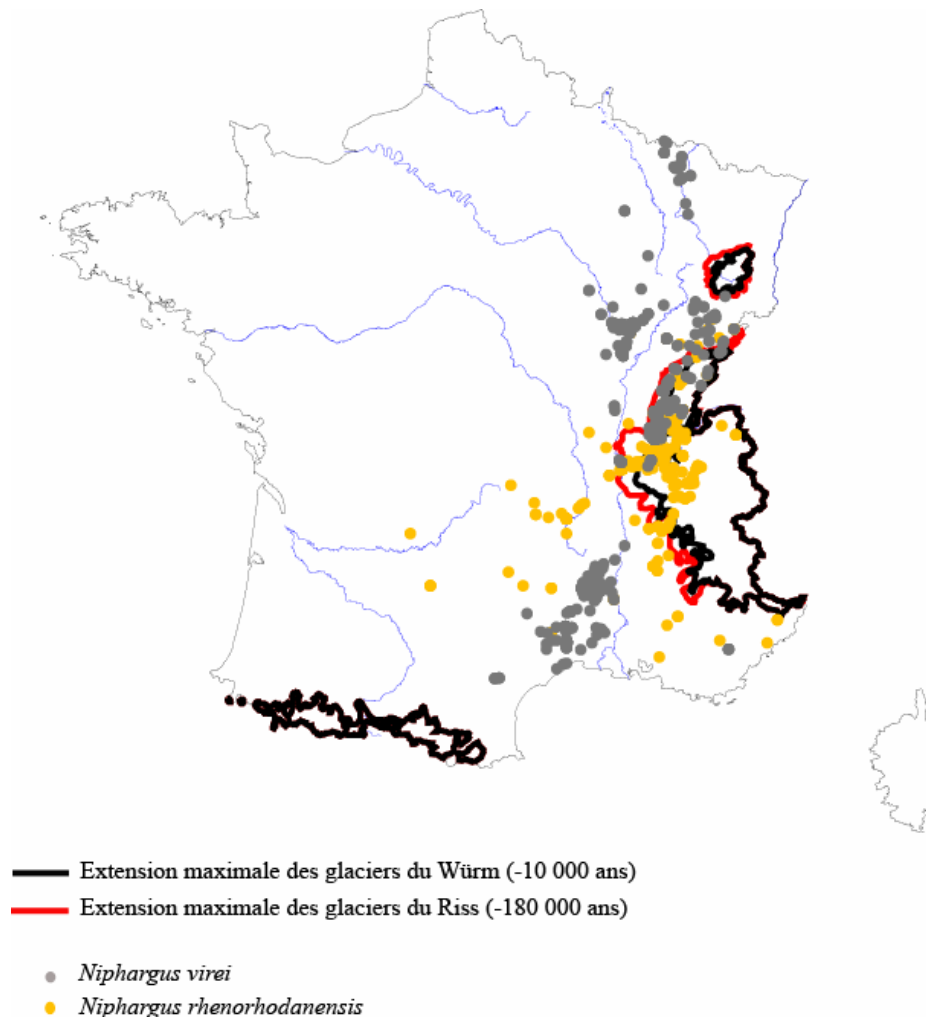


Figure 4 – Répartition géographique actuelle de *Niphargus rhenorhodanensis* et *N. virei*, et extensions maximales des glaciers durant les deux dernières ères glaciaires, le Würm et le Riss (Malard et Ferreira, données non publiées).

Deux principaux scénarii expliquent la colonisation par la faune et la flore Holarctique de zones anciennement englacées durant le Pléistocène. Le premier, la théorie de la *tabula rasa*, propose que tous les organismes vivant dans la zone de recouvrement furent exterminés par les glaciers du Pléistocène, et que les espèces recolonisèrent les milieux durant les périodes interglaciaires. Un autre scénario, l'hypothèse des nunataks, propose que des refuges non englacés présents au cœur même des régions glacées (i.e. les nunataks, Fig. 5) servirent de zones refuges pour les espèces animales et végétales (Dahl, 1989; Brochmann et al., 2003). Les organismes survécurent donc « sur place », sous les glaciers.



Figure 5 - Photographie d'un nunatak (Istund Peak, Antarctique ; par E. Grosch, 2003).

A partir de ces deux paradigmes, il est possible d'établir deux histoires évolutives expliquant les patrons de distributions actuels et les réponses aux basses températures observées chez les hypogés *N. rhenorhodanensis* et *N. virei*.

Selon le premier scénario (la *tabula rasa*), les glaciers auraient chassé ou détruit la plupart des populations de *N. rhenorhodanensis* et *N. virei* vivant dans les zones d'expansion des glaciers. *N. rhenorhodanensis* aurait par la suite recolonisé les biotopes anciennement recouverts par la calotte glaciaire durant le Quaternaire, en utilisant les corridors fluviaux, comme l'ont fait de nombreux invertébrés aquatiques épigés des régions Holarctiques (Taberlet et al., 1998 ; Hewitt, 2004). C'est au contact du front de glaciation, dans des eaux souterraines alimentées par la fonte des glaciers, que des adaptations aux basses températures (accumulations de tréhalose, d'acides aminés libres...) auraient été sélectionnées chez *N. rhenorhodanensis*. Suite au retrait des glaciers, *N. virei* se serait cantonné aux zones situées en dehors des aires de recouvrement des glaces : il n'aurait pas recoloniser les milieux souterrains (peut être à cause d'une capacité de dispersion plus limitée) et n'aurait ainsi pas enduré les mêmes pressions de sélection que *N. rhenorhodanensis*. Cela expliquerait donc les tolérances au froid très différentes observées entre les deux taxons lors d'une exposition aux basses températures.

Le second scénario implique lui aussi une destruction des populations de *N. virei* vivant dans l'aire de recouvrement des glaciers, mais pas celles de *N. rhenorhodanensis*. En effet, *N. rhenorhodanensis* pourrait avoir survécu aux glaciations du Pléistocène au sein des nunataks. Ces derniers sont reconnus comme étant des zones refuges pour les organismes peuplant les zones polaires ou de haute altitude (Dahl, 1989; Brochmann et al., 2003). De telles structures géologiques pourraient également constituer des aquifères karstiques ou fissurés alimentés par les eaux de fonte des glaces. Un tel environnement devrait avoir sélectionné des individus possédant une importante capacité de survie au froid/gel. *N. virei* se serait limité à des zones plus éloignées du front de glaciation, et n'aurait par conséquent pas enduré les mêmes pressions de sélection que *N. rhenorhodanensis*.

Hewitt (2004) a montré que les espèces ayant recolonisé des milieux suite à la retraite des glaciers du Quaternaire présentaient une divergence génétique (mesurée sur l'ADN mitochondriale) inter-populationnelle relativement faible (typiquement inférieure à 10 %). A l'inverse, *N. rhenorhodanensis* présente une importante divergence inter-populationnelle, et une distribution haplotypique restreinte (Lefébure et al., 2006b). Plus précisément, des analyses phylogénétiques (Lefébure et al., 2006a ; 2006b) basées sur deux gènes mitochondriaux (CO1 et 16S) et un gène nucléaire (28S) de *N. rhenorhodanensis* ont mis à jour l'existence d'une biodiversité cachée au sein même de cette « espèce ». Ainsi, l'étude phylogénétique de 12 populations morphologiquement indifférenciables a mis en évidence 6 super-groupes cachés, montrant d'importantes divergences génétiques. Ces patrons phylogéographiques témoignent d'une isolation de chaque population conformément à l'un des points fondateurs de l'écologie évolutive souterraine : la non-dispersion. Selon ce paradigme, une fois le milieu souterrain colonisé, les organismes se retrouvent « piégés » dans un habitat très fragmenté, générant ainsi des distributions restreintes en « patch » (Barr, 1968). Le fait que la plupart des sites d'échantillonnage forment des groupes phylogénétiquement éloignés supporte l'hypothèse de la non-dispersion, et donc de la survie sous glaciaire, au sein de nunataks.

iii) Conservation d'une adaptation en environnement non sélectif

La sélection naturelle tend à éliminer un trait s'il présente un désavantage pour l'organisme. Si ce trait ne présente ni avantage, ni désavantage, il peut alors être altéré jusqu'à perdre sa fonctionnalité originale (Christiansen, 1992).

Dans un environnement énergétiquement pauvre, comme c'est le cas au sein de la grande majorité des écosystèmes souterrains (Malard and Hervant, 1999), et en supposant que les adaptations au froid mesurées chez *N. rhenorhodanensis* présentent un coût énergétique

« de maintenance » pour l'organisme (l'adaptation coûterait de l'énergie, même si elle n'est pas activée), les gènes codant pour ces mécanismes devraient être contre-sélectionnés : les individus ne possédant pas cette adaptation économiseraient davantage leur énergie, ou/et l'alloueraient à des mécanismes plus « utiles » à leur survie dans les conditions environnementales actuelles des aquifères souterrains (température tamponnée), maximisant ainsi leur fitness par rapport aux individus porteurs des gènes « adaptation au froid », par exemple en l'allouant à des processus augmentant la fitness tel que les réserves énergétiques investies dans l'ovogenèse.

Il est également envisageable que dans le milieu actuel de *N. rhenorhodanensis*, le trait « adaptation au froid » ne présente ni coût particulier pour l'organisme, ni aucun impact (positif ou négatif) sur la fitness de l'individu. Dans ces conditions, l'environnement n'opère alors plus aucune pression de sélection sur le trait et les gènes codant pour le caractère peuvent alors être altérés par des mutations neutres au fil des générations (théorie neutraliste). Cela peut conduire à une altération du trait, celui-ci pouvant selon l'importance des mutations perdre sa fonctionnalité (une des théories explicatives de l'anophtalmie des animaux souterrains).

Afin de mieux comprendre les phénomènes pouvant expliquer la conservation des mécanismes de survie au froid chez le crustacé souterrain *N. rhenorhodanensis*, il semble tout d'abord important d'en définir « les bases génétiques ». Les substances impliquées dans la tolérance au froid/gel de cet organisme sont des molécules jouant un rôle dans le métabolisme intermédiaire ou énergétique de l'organisme : les acides aminés sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques et dans la synthèse des protéines ; le tréhalose est une molécule de faible complexité (formée de deux molécules de glucose) appartenant à la famille des *solutés compatibles* (*i.e.* non toxique même à forte concentration) et joue divers rôles dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Hochachka and Somero, 2002). Chez *N.*

rhenorhodanensis, les gènes du trait « adaptation au froid » ne sont donc pas directement responsables de la synthèse de molécules cryoprotectrices spécifiques (protéines antigels, protéines de nucléation) mais plutôt dans la régulation (production/stockage/dégradation) de molécules qui sont « ancestralement » impliquées dans des voies du métabolisme intermédiaire ou énergétique.

La conservation des adaptations au froid dans le génome de *N. rhenorhodanensis* pourrait résulter d'un phénomène de pléiotropie (un seul et même gène conduisant à différentes expressions phénotypiques). Ainsi, il est possible que ces gènes de régulation interviennent régulièrement au cours de la vie de l'animal dans un (ou plusieurs) autre mécanisme vital pour l'organisme. Dans ces conditions, les gènes codant pour le trait « adaptation au froid » devraient être conservés, quelles que soient les conditions thermiques rencontrées par l'organisme.

Outre la pléiotropie, la conservation d'un trait en absence de sélection peut également s'expliquer par le taux de mutation de l'organisme étudié et le temps écoulé entre la dernière période sélective et le présent. En d'autres termes, le temps séparant la dernière époque glaciaire (durant laquelle l'adaptation au froid fut sélectionnée) n'est peut être pas suffisamment long pour engendrer la disparition de l'adaptation au froid. Cela suppose un taux de mutation suffisamment bas pour que les gènes considérés ne soient pas altérés. Il a été démontré chez les végétaux qu'il existait une corrélation positive entre la richesse énergétique de l'environnement et le taux de mutation (Davies et al., 2004). Plus le milieu de vie d'un organisme est énergétiquement riche, plus le taux de mutation est élevé. Le milieu souterrain est un environnement typiquement pauvre en énergie (absence de rayonnement solaire et de production primaire...), les animaux souterrains pourraient donc présenter des taux de mutation assez bas comparativement aux animaux épigés. Cela pourrait ainsi expliquer que la dérive génétique n'ait pas altéré le trait « adaptation au froid » depuis la dernière ère glaciaire.

PERSPECTIVES

1. Poursuite et approfondissement des travaux concernant la tolérance au froid chez *Niphargus rhenorhodanensis*

De par ses adaptations aux basses températures, *N. rhenorhodanensis* semble être une exception car, à notre connaissance, il est l'unique crustacé aquatique (épigé comme hypogé) à présenter de tels mécanismes. Néanmoins, force est de constater que, contrairement aux insectes terrestres, la bibliographie concernant les adaptations au froid des crustacés, et plus largement des organismes aquatiques, est très restreinte. Pour ces raisons, *N. rhenorhodanensis* est un excellent modèle d'étude pour mieux comprendre i) les mécanismes mis en jeu par un crustacé face des variations de la température, et ii) les adaptations physiologiques et métaboliques permettant à un organisme aquatique de survivre aux basses températures.

Dans un cadre plus général, ces travaux constituent une base en vue de comparer les différents mécanismes utilisés par les organismes aquatiques et ceux utilisés par les organismes terrestres lors d'une exposition aux basses températures. En effet, les contraintes qu'offre le milieu aquatique sont fondamentalement différentes de celles du terrestre lorsque la température diminue et avoisine 0°C (formation de glace dans l'environnement provoquant la congélation par inoculation, hypoxie tissulaire...). Ces différences environnementales peuvent ainsi engendrer des adaptations différentes qui méritent d'être étudiées pleinement.

a) Aspects mécanistiques

La tolérance à la congélation

L'étude de la survie à la congélation chez *N. rhenorhodanensis* nécessite d'être approfondie afin d'en connaître les limites. En effet, il a été démontré chez les ectothermes tolérants à la congélation qu'il existait une corrélation entre le temps pendant lequel l'organisme est congelé et sa survie après dégel (Murphy and Johnson, 1980 ; Layne et al., 1998). Cette aptitude à tolérer le gel dans le temps peut varier selon la durée d'acclimatation de l'organisme étudié. En effet, l'acclimatation est une phase durant laquelle les mécanismes adaptatifs permettant la survie durant la phase de congélation sont activés. Il est donc attendu d'observer une meilleure survie post-congélation chez des organismes ayant bénéficié d'une acclimatation plus longue. Ainsi, nous proposons de vérifier cette hypothèse chez *N. rhenorhodanensis* en mesurant (i) l'effet de la durée d'acclimatation au froid sur la survie à la congélation, puis (ii) l'effet de la durée de congélation sur la survie de *N. rhenorhodanensis*.

D'autre part, nous n'avons pas d'information concernant l'évolution des substances cryoprotectrices et des réserves énergétiques corporelles (glycogène, glucose, triglycérides) durant la phase de congélation. La présence de glace dans les tissus induit un stress considérable qui peut nécessiter la mise en œuvre de mécanismes limitant les dommages immédiats causés par les cristaux de glace. Nous proposons donc de quantifier les acides aminés libres et le tréhalose, ainsi que le glycogène, le glucose et l'ATP durant la congélation afin de mieux cerner les mécanismes mis en œuvre par *N. rhenorhodanensis* durant ce stress. La récupération post-congélation est également une phase critique pour l'organisme, car celui-ci doit être capable de « réparer » les dégâts occasionnés par le gel dès que la température le permet, qu'ils soient directement liés à la formation de cristaux de glace (cellules écrasés, tissus lésés...) ou qu'ils soient une conséquence indirecte de la phase de congélation, (stress oxydant, bouleversement de l'homéostasie...) (Costanzo et al., 1995). De façon à mettre en

évidence les stratégies physiologiques mises en œuvre par *N. rhenorhodanensis* lors de la phase de récupération, il serait possible de quantifier les acides aminés libres et le tréhalose, ainsi que le glycogène, le glucose et l'ATP après 24h de récupération, et de comparer leur évolution durant trois phases : i) avant le stress, ii) durant le stress, et iii) après le stress.

La gestion du stress oxydant : convergence entre stress hypoxique et stress thermique

Les deux stratégies majeures de tolérance au froid, la surfusion et la tolérance au gel, induisent toute deux une réduction drastique du métabolisme (Storey, 1983 ; Voituron et al., 2006). Cette dépression métabolique résulte du dysfonctionnement des enzymes dont l'activité ne peut être maintenue aux basses températures. De plus, lorsque la glace se forme dans les tissus, le stress osmotique induit une importante déshydratation cellulaire. Or l'activité enzymatique est positivement corrélée à la teneur en eau (Somero, 1995). Ainsi, la surfusion et la congélation induisent une diminution, voire un arrêt de l'activité enzymatique. La respiration cellulaire est un processus hautement dépendant de catalyseurs enzymatiques, par conséquent lors d'une exposition aux basses températures, l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale est fortement diminuée, voire totalement arrêtée. Lorsque la température environnementale le permet, les chaînes respiratoires reprennent leur activité, mais engendrent à cette occasion une forte production de radicaux libres (Voituron et al., 2006). Les radicaux libres sont des molécules qui dérivent de l'oxygène (accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire des mitochondries) et sont hautement réactives (ex : le radical superoxyde O_2^- ou le radical hydroxyle HO^{\cdot}), ils sont donc susceptibles d'interagir avec des composants cellulaires vitaux comme l'ADN et de les altérer. D'autres molécules dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène sont aussi réactives et peuvent également être des précurseurs de radicaux libres (ex : le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou le nitroperoxyde

ONOOH ; Favier, 2003). L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est appelé espèces réactives de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species).

N. rhenorhodanensis est un crustacé tolérant à l'hypoxie (Hervant et al., 1995) et nous venons de démontrer qu'il tolère la congélation par inoculation (Issartel et al., 2006). Ces deux stress conduisent à une production de radicaux libres (Hermes-Lima and Storey, 1993) ; *N. rhenorhodanensis* semble donc être un modèle particulièrement pertinent pour mieux comprendre les mécanismes de résistance au stress oxydant induit par la congélation ainsi que par l'hypoxie.

Les principaux mécanismes antioxydants consistent à neutraliser les radicaux libres en les combinant avec d'autres molécules pour en faire un produit terminal non réactif et non toxique (en général H₂O ; Favier, 2003). Ces transformations sont catalysées par des enzymes spécifiques dont les plus connues sont la *superoxyde dismutase* (SOD) qui convertit l'anion superoxyde (O₂⁻), en eau oxygénée (H₂O₂) qui sera à son tour pris en charge par la *glutathion peroxydase* (GPx) et la *catalase* (CAT).

Nous proposons de mesurer dans un premier temps la tolérance au stress oxydant au travers de mesures d'activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPx chez *N. rhenorhodanensis* durant la congélation puis lors de la phase de dégel. Une protéine effectrice de la réponse anti-radicalaire appartenant à la famille des protéines découplantes (uncoupling proteins, UCPs) sera également quantifiée. Ces UCPs peuvent en effet contribuer aux défenses antioxydantes protégeant la cellule des effets délétères des radicaux libres en réduisant la production mitochondriale de radicaux libres par la chaîne respiratoire (Ricquier and Bouillaud, 2006).

En vue de comparer les réponses antioxydantes induites par la congélation et un stress hypoxique associé, ces mesures d'activité enzymatique et les quantifications des UCPS seront également réalisées en normoxie, en anoxie, puis durant une phase de récupération post-

anoxique. En parallèle, les variations de la teneur en 4-hydroxy-2,3-nonéanal (4-HNE), qui constitue un marqueur pertinent du stress oxydatif, seront analysées afin d'estimer le statut oxydatif des animaux durant le cycle de congélation/dégel et d'anoxie/ré-oxygénation.

La tolérance au gel et la tolérance à l'hypoxie devraient impliquer des mécanismes antiradicalaires relativement convergents. Ces expériences nous permettront ainsi de vérifier l'hypothèse selon laquelle la tolérance à l'hypoxie est un prérequis à la tolérance au gel chez les ectothermes.

b) Aspects écologiques

D'un point de vue strictement évolutif et écologique, la survie au gel n'a d'intérêt pour l'organisme que si ce dernier demeure apte à la reproduction après avoir vécu un épisode de gel/dégel. En effet, un organisme tolérant au gel doit être doté de mécanismes suffisamment efficace pour que les dommages occasionnés sur sa fitness reproductive soient limités, car dans le cas contraire, le trait « survie au gel » n'a plus aucune valeur sélective. Il paraît alors légitime de mesurer l'impact de la congélation par inoculation chez *N. rhenorhodanensis* sur sa fitness reproductive. Ainsi, des comparaisons du nombre de femelles ovigères, de la taille de ponte des femelles, ainsi que de la survie des juvéniles pourraient être réalisées entre des accouplements de mâles congelés avec des femelles congelées et des accouplements de mâles témoins et des femelles témoins.

c) Aspects évolutifs

Les travaux en phylogénie moléculaire effectués par Tristan Lefebvre et Christophe Douady ont démontré que « l'espèce » *Niphargus rhenorhodanensis* était composée de plusieurs clades montrant des divergences phylogénétiques importantes, ce qui confortait l'hypothèse d'une survie sous glaciaire de ces clades durant le Pléistocène. Ainsi, dans le prolongement de

l'étude menée par Céline Colson et Frédéric Hervant, nous proposons de comparer les capacités de tolérance à la congélation par inoculation des différents clades (methode calorimetrique decrite dans Issartel et al., 2006), ainsi que l'impact de la congélation sur leur fitness reproductive (cf Aspects ecologiques).

2. Etude de la tolérance aux variations de la température et à l'hypoxie et chez un vertébré souterrain : *Proteus anguinus*

La température et l'hypoxie sont des phénomènes qui, chez les ectothermes, sont fortement liés. En effet, les basses températures réduisent les demandes métaboliques, permettant ainsi une survie prolongée malgré une diminution de la production d'énergie. Dans les années 80, Hochachka fit l'hypothèse que, froid et anoxie diminuant tous deux les demandes métaboliques et les processus de production d'énergie, la tolérance au froid et la tolérance à l'anoxie devaient impliquer les mêmes mécanismes, en particulier au niveau des pompes transmembranaires (telle que la pompe Na^+/K^+ ATP-ase) et les canaux maintenant les gradients ioniques. Ainsi, la tolérance à l'hypoxie est un domaine de recherche qui va de paire avec l'étude de la tolérance aux variations de la température.

Le protéé est le seul vertébré souterrain d'Europe, il vit naturellement dans les karsts de Slovénie. Cet amphibiens urodèle présente une forte résistance au jeûne (Hervant et al., 2001), mais sa capacité de résistance aux variations de la température ainsi qu'au manque d'oxygène demeurait inconnue.

Tolérance aux variations de la température

Nous proposons dans un premier temps de mesurer la consommation d'oxygène du Protée à 7, 12 et 17°C, après avoir été préalablement acclimaté 2 mois à chaque température. Nous pourrons ensuite mesurer ses capacités d'acclimatation en comparant ses réponses à celles d'individus non acclimatés. Ainsi, nous vérifierons si l'unique vertébré d'Europe présente les caractéristiques d'un organisme sténotherme ou celle d'un organisme eurytherme.

Tolérance à l'hypoxie

Afin de déterminer l'impact d'un stress hypoxique sur *Proteus anguinus*, nous avons comparé ses réponses à celles d'un urodèle vivant dans les petits cours d'eau pyrénéens de surface (riches en oxygène), l'Euprocte (*Euproctus asper*).

Une première série d'expériences nous a permis de quantifier les temps de survie en anoxie et la consommation d'oxygène à des pressions partielles en oxygène (PO₂) décroissantes chez ces deux espèces. Ces expériences préliminaires ont été réalisées avec la collaboration de Yann Voituron (Post-doc, UMR 5023) et Frédéric Hervant (MCU, UMR 5023). Les temps de survie en anoxie sont 6 fois supérieurs chez le Protée que chez l'Euprocte (respectivement 12 et 2 heures). Par ailleurs, la quantification de l'évolution de la consommation d'oxygène à des PO₂ décroissantes montre un décalage vers les basses PO₂ de la mise en oxyconformation (et donc de la pression critique) d'environ 2 kPa chez le Protée, indiquant une plus forte aptitude à conserver un métabolisme aérobie (et donc une forte production d'ATP) en hypoxie. Ces résultats montrent clairement une étonnante adaptation du Protée aux faibles teneurs en oxygène, mais il reste de nombreuses questions quant aux mécanismes responsables de cette tolérance. Nous proposons donc de quantifier les variations du métabolisme intermédiaire et énergétique en normoxie, en anoxie, puis lors d'une phase de récupération post-anoxique chez ces deux espèces, ainsi que les activités de trois enzymes antioxydantes : la superoxyde

dismutase (SOD), la glutathion peroxydase et la catalase (CAT). En parallèle, les variations de la teneur en 4-hydroxy-2,3-nonéanal (4-HNE), qui constitue un marqueur pertinent du stress oxydatif, seront analysées afin d'estimer le statut oxydatif des animaux durant le cycle d'anoxie/ré-oxygénation. Enfin, Nous étudierons l'expression d'une protéine régulatrice (Hypoxia Induced Factor, HIF-1) constituant le régulateur principal de plusieurs fonctions essentielles lors d'un stress anoxique (transport de l'oxygène, augmentation de la capillarité, métabolisme anaérobie).

