

**Analyse de l'importance d'un dysfonctionnement de la
reproduction dans le déclin observé de populations de
cyprinidés du Rhône – phase 3**

Rapport final

Action n°34

au titre de l'accord cadre Agence de l'Eau ZABR



ZABR

Alain Devaux LEHNA IPE et Jean-Michel Olivier LEHNA BEL

le 21 juin 2013



Les personnes ayant contribué à ce travail sont dans l'ordre alphabétique :

Athanaze D.
Barnasson J.
Bony S.
Devaux A.
Hombert T.
Forcellini M.
Mathieu C.
Novak M.
Olivier J.M.
Pattard L.
Péru N.
Plénet S.
Ploquin L.
Reynaud D.
Sagnes P.
Segura S.
Suaire R.
Stolzenberg N.
Tavel A.
Tronchère X.
Vallès J.
Vienney A.

1) Contexte scientifique

Le contexte général du sujet est celui de l'analyse des effets de la pression chimique sur les écosystèmes d'eau douce et en particulier sur le déclin observé de certaines populations de poissons dans des hydrosystèmes anthropisés à l'exemple du bassin du Rhône.

Parmi les contaminants issus d'activités urbaines, industrielles et agricoles susceptibles d'atteindre les masses d'eau, environ un tiers présentent des propriétés génotoxiques qui conduisent à des effets sur la structure et le fonctionnement du génome des organismes exposés (Claxton *et al.*, 1998). Les altérations de l'intégrité génétique peuvent en théorie affecter plusieurs niveaux d'organisation biologique, de la cellule à la population, en affectant des fonctions telles que le développement, la

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

reproduction et la survie des individus, compromettant ainsi la dynamique des populations (Anderson et Wild, 1994). Cependant, l'évaluation des risques écologiques associés à l'exposition à des composés génotoxiques est généralement basée sur des mesures individuelles, alors que les implications à long terme au niveau de la population intéressant plus directement les gestionnaires des hydrosystèmes, restent peu connues. Une étape vers une meilleure compréhension de ces impacts à long terme est d'examiner le transfert d'effets d'une génération aux suivantes (Lewis et Galloway, 2009).

Il a été récemment mis en évidence au laboratoire en conditions contrôlées que les dommages au niveau du génome des gamètes pouvaient avoir une influence sur le succès de la reproduction chez les poissons et les crustacés *via* des perturbations du développement des stades précoces de la F1 (Dietrich *et al.*, 2010 ; Devaux *et al.*, 2011 ; Lacaze *et al.*, 2011 ; Santos *et al.*, 2013 a, b). La prise en compte d'un effet au niveau populationnel prend ainsi tout son intérêt dans le cadre du déclin avéré de certaines populations de poissons, constaté en Europe et plus largement à l'échelle mondiale depuis plusieurs décennies (Kottelat et Freyhof, 2007 ; Moyle *et al.*, 2011). Si les paramètres pouvant expliquer ce déclin sont nombreux, il ressort que, 1) la détérioration de l'habitat et de la qualité chimique des écosystèmes aquatiques et 2) l'impact subséquent sur le succès de la reproduction conduisant à une baisse significative du recrutement, sont retenus comme étant les facteurs de causalité principaux (Economidis, 1995 ; de Lafontaine *et al.*, 2002 ; Burkhardt-Holm et Scheurer, 2007).

D'autre part, la gestion actuelle des écosystèmes aquatiques comporte un certain nombre d'actions destinées à améliorer les conditions d'habitat physique des organismes aquatiques (programmes de restauration, D.C.E.). La réponse attendue à ces modifications des caractéristiques d'habitat est une augmentation des densités de certaines populations ou de certaines communautés (les poissons sont en général de bons indicateurs de l'intégrité écologique des cours d'eau). Cependant, la réponse ne peut être effective que si les populations en place possèdent une *fitness* suffisante pour exprimer, à travers le succès de leur reproduction, une capacité à (re)coloniser ces habitats.

2) But de l'action 34 dans le contexte de l'accord cadre AERMC-ZABR

Le Plan Rhône a réaffirmé dans son action 5.18 le besoin de développer des biomarqueurs permettant d'évaluer la génotoxicité des substances déversées dans le fleuve. Par ailleurs, la réflexion sur le potentiel écologique du Rhône ne peut être conduite complètement sans clarifier le rôle éventuel des pollutions chimiques sur le recrutement des populations de poissons et donc sur la fonction de reproduction.

Le but de ce travail était donc d'étudier chez une espèce de cyprinidé, le hotu (*Chondrostoma nasus*) qui présente depuis plusieurs décennies un déclin démographique marqué dans le bassin du Rhône, le lien pouvant exister entre pression chimique du milieu – intégrité du génome des spermatozoïdes et qualité de la descendance dans des conditions réelles d'exposition à un environnement anthropisé.

Des travaux préliminaires ont ainsi été réalisés en 2010 dans le cadre de l'action 18 AERMC-ZABR (phase 1) et ont permis 1) d'explorer plusieurs sites de reproduction potentielle du hotu sur le bassin du Rhône permettant d'évaluer la fenêtre temporelle de reproduction pour les expérimentations futures, 2) de mettre en place une méthodologie de prélèvement des gamètes *in situ*, 3) d'identifier des effets génotoxiques mesurables dans les gamètes de hotus mâles provenant de différentes stations du bassin du Rhône. Par la suite l'action 26 AERMC-ZABR menée en 2011 (phase 2) a été consacrée à la mise en place d'un protocole expérimental optimisé : prélèvement des gamètes mâles et femelles sur le terrain, fécondation *in vitro* réalisée en bord de rivière, rapatriement et incubation des œufs fécondés après installation au laboratoire d'un système d'incubation adapté, suivi du développement des alevins (morphométrie).

L'ensemble de ces acquis a permis d'envisager la troisième phase de ce programme (action 34) à savoir étudier sur des échantillons de hotus pêchés dans différentes stations du bassin du Rhône chimiquement contrastées, le lien entre la qualité du génome des spermatozoïdes et le développement embryo-larvaire.

3) Protocole expérimental

D'un point de vue pratique, l'expérimentation a consisté à capturer par pêche électrique dans des stations sélectionnées pour leur représentativité chimique (d'un milieu «témoin» soumis à une faible anthropisation, à un milieu exposé à des flux contaminants avérés), des géniteurs de hotu au moment du frai et de réaliser à partir de leurs gamètes des fécondations artificielles puis un suivi au laboratoire des stades embryo-larvaires afin de pouvoir étudier le développement de la descendance produite.

Plusieurs paramètres ont été étudiés pour caractériser les populations de hotus sélectionnées et étudier le lien génotoxicité/efficacité de la reproduction :

- la morphométrie des géniteurs (poids, longueur, âge par scalimétrie),
- la structure génétique des populations échantillonnées par analyse microsatellites sur échantillons de nageoires (l'analyse étant en cours, les résultats correspondants ne seront pas fournis dans le présent rapport),
- le niveau de dommage à l'ADN du sperme par l'essai des comètes,
- la qualité physico-chimique du sperme (pH, concentration en ATP...),
- le taux de fécondation,
- le suivi de la descendance obtenue par fécondation artificielle à différents stades clés du développement (survie et qualité du développement).

L'étude du lien entre l'intégrité du génome des gamètes et la qualité de la reproduction a fait l'objet d'un examen particulier.

3.1) Prélèvement des individus sur le terrain

Choix des stations

Afin de pouvoir étudier la relation endommagement de l'ADN du sperme et perturbation de la reproduction chez le hotu, il convenait tout d'abord de choisir avec soin les stations sur lesquelles ont été prélevés les géniteurs.

Pour ce faire, différentes informations sur la qualité chimique de cours d'eau du Bassin du Rhône ont pu être recueillies à partir des données de l'Agence de l'Eau RMC. Ces données nous ont conduits au choix de 5 stations qui ont fait l'objet à la

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

fois d'une surveillance assidue du déroulement de la fraie des hotus, et de sorties sur le terrain répétées afin d'obtenir par pêche électrique l'effectif de géniteurs mâles et femelles nécessaire à l'étude.

Les cours d'eau (et les stations d'étude choisies sur ces cours d'eau) du bassin du Rhône qui ont été retenus durant la campagne de terrain menée de début mars à début mai 2012, ont été :

- « Le Suran » : affluent de l'Ain, le Suran présente un profil intéressant pour notre étude en tant qu'hydrosystème «témoin». En effet ce cours d'eau, dont le débit moyen se situe aux alentours de 6,5 m³/s, présente un bassin versant faiblement anthropisé susceptible de fournir des géniteurs de hotu peu exposés à des polluants génotoxiques (la station se situe sur la commune de Pont d'Ain à 300m en amont de la confluence avec l'Ain).
- « L'Azergues » : affluent de la Saône, l'Azergues est une rivière soumise à des pollutions d'origine anthropique notoires (effluents industriels, urbains et agricoles) (la station se situe sur la commune d'Anse, 2 km à l'amont du centre ville) et 3 km à l'amont de sa confluence avec la Saône.
- «Canal de Miribel » : station située directement sur un des bras du Rhône (commune de Nievroz, 400 m à l'aval du pont de l'autoroute A432), en amont de l'agglomération lyonnaise mais à l'aval d'activités agricoles et industrielles diffuses. Notons que cette zone est cloisonnée vers l'aval du fait d'obstacles multiples, paramètre important pour l'origine génétique de la population de hotus en place.
- « Péage de Roussillon » : station située sur le cours du Rhône, à noter qu'elle se situe en aval de Lyon elle aussi dans un contexte local relativement exposé à divers effluents d'origine anthropique (la station se situe sur la commune d'Arcoules).
- « Baix » : présentant un profil similaire à la station de Péage de Roussillon, la station de Baix s'inscrit elle aussi dans un cadre marqué par une pollution anthropique avérée (elle se situe à l'aval du couloir de la chimie au Sud de Lyon et à l'aval de la confluence avec l'Isère, 300 m à l'aval du barrage du Pouzin, sur le contre canal situé à cet endroit).

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Une fois le choix des stations d'étude arrêté, s'est posé le problème logistique du prélèvement des individus au moment précis de la fraie. Les chroniques historiques disponibles concernant la période de reproduction du hotu et les différents paramètres pouvant l'influencer (température, hydrologie) ont été prises en compte afin de choisir un protocole de surveillance optimal pour les différentes stations, en tenant compte également de l'expérience acquise lors de la phase 1 de ce projet.

Pour ce suivi, la température de l'eau et la mesure du débit ont été sélectionnés comme étant de bons indicateurs permettant d'estimer plus précisément la période de fraie. Ceci a permis d'établir la fréquence des visites sur le terrain, qui seules permettent de confirmer la présence du poisson sur les frayères et son activité (afin de pouvoir prélever le matériel biologique nécessaire, les hotus doivent être pêchés au moment de leur pic d'activité reproductrice, c'est à dire à une température de 9 à 15°C selon les stations et un débit favorable à l'existence de radiers de granulométrie adéquate présentant une hauteur d'eau de 20 à 40 cm en fonction de l'hydrosystème, le tout dépendant également d'une photopériode précise).

En fonction de ces paramètres, des visites ont été organisées régulièrement sur les sites choisis, et, lorsque l'activité des hotus constatée sur le terrain nous est apparue optimale, les pêches électriques ont été réalisées.

Protocole des pêches électriques sur les sites sélectionnés

Le protocole utilisé pour les pêches électriques est le même pour tous les sites concernés, hormis quelques adaptations logistiques mineures dues à des particularités du terrain (accessibilité, largeur et débit de la rivière...).

Les stations rencontrées étant de moyenne à grande largeur (avec une largeur de l'hydrosystème comprise entre 5 à 50 m), le dispositif utilisé est composé d'un groupe électrogène à terre, de quatre à huit porteurs d'épuisettes (en fonction des stations) et de bacs-viviers pour stocker les poissons (photo 1).

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône



Photo 1. Capture par pêche électrique de géniteurs sur le Suran

Contrairement à une pêche électrique visant à estimer les stocks de poissons sur une station donnée (toutes tailles et espèces confondues), la capture de géniteurs en période de fraie est plus délicate car elle ne permet généralement pas plusieurs posés d'anode, les géniteurs présents sur le radier s'échappant très vite (la contrainte étant d'essayer de capturer en une seule fois le maximum de poissons pour disposer de l'effectif mâle et femelle nécessaire à l'étude).

3.2) Prélèvement des gamètes et fécondation

Lorsque la pêche permet de récolter suffisamment d'individus pour l'étude il convient de préparer les échantillons sur place pour les acheminer directement au laboratoire avec une conservation optimale. Pour cela une attention particulière doit être portée au conditionnement des échantillons sur le terrain, à leur transport et leur stockage ultérieur (congélation pour le sperme et mise en incubation pour les œufs fécondés).

Nous avons prélevé sur chaque mâle un échantillon de sperme destiné à l'étude de l'intégrité de l'ADN par le test des comètes, ainsi qu'à la fécondation *in vitro* des ovocytes qui ont été récupérés sur les femelles pêchées sur la même station. Parallèlement un échantillon de sang est prélevé également sur les mâles afin de disposer d'un biomarqueur d'exposition complémentaire (Devaux *et al.*, 1998). Cette information ne sera pas traitée dans le présent rapport.

Dans un premier temps, 5 à 10 mL de sperme sont prélevés par stripping abdominal sur les géniteurs de hotu (photo 2) et placé dans un tube immédiatement stocké sur

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

glace, en veillant à l'absence de fécès ou d'urine dans le prélèvement et de contact avec l'eau pour ne pas activer les spermatozoïdes (Perchec Pourpard *et al.*, 1998).



Photo 2. Prélèvement de sperme et d'ovocytes par stripping abdominal

Deux μL de sperme sont prélevés par mâle puis dilués ($\times 100$) dans un milieu de cryopréservation (voir composition en annexe 2) avant congélation dans l'azote liquide pour transfert au laboratoire.

Afin de garantir la qualité des mesures qui seront effectuées sur la descendance des géniteurs de hotus pêchés lors de la campagne de terrain, une attention toute particulière doit être portée au protocole employé pour la fécondation artificielle réalisée le plus rapidement possible après la pêche électrique.

Dès prélèvement du sperme, les ovocytes sont rapidement récoltés par stripping abdominal des femelles (photo 2). Les œufs provenant de plusieurs femelles (si possible $n=5$) sont ensuite poolés afin « d'écraser » un éventuel effet femelle sachant qu'il n'est pas possible à ce jour d'évaluer les dommages à l'ADN sur le gamète femelle. Pour chaque mâle, environ 10 g d'ovocytes issus de ce pool (soit $n=1000$ à 1200 ovocytes) sont fécondés par $100 \mu\text{L}$ de sperme par mâle après ajout de 100 mL d'eau de la rivière pour activer les spermatozoïdes (photos 3 à 5). Les œufs sont alors mis à incuber dans des boîtes hermétiques placées dans l'eau de la rivière pendant au moins une heure jusqu'à durcissement du chorion. Après lavage des

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

œufs par l'eau de la rivière afin d'éliminer l'excès de sperme, les œufs sont rapportés au laboratoire dans des glacières pour prévenir les chocs thermiques.



Photo 3. Prélèvement et pesée de 10g du pool d'ovocytes



Photo 4. Mélange des gamètes



Photo 5. Activation du sperme par l'eau de la rivière après mélange des gamètes

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Afin de caractériser les spermatozoïdes récoltés, divers paramètres biochimiques ont été mesurés de retour au laboratoire :

- la concentration en ATP rapportée à la densité cellulaire, par bioluminescence après extraction de l'ATP du sperme à chaud,
- la quantité de protéines totales dans le liquide séminal par fluorimétrie,
- l'osmolarité du sperme (osmomètre à effet Peltier),
- le spermatozoïde (mesuré après centrifugation 30 min à 1000 rpm) et la numération cellulaire dans le sperme évaluée en cellule de Malassez.

Le détail des protocoles est reporté en annexes 3, 4 et 5.

3.3) Mesure des dommages à l'ADN du sperme par l'essai des comètes

L'intégrité du génome des spermatozoïdes a été évaluée par l'essai des comètes en conditions alcalines (Devaux et Bony, 2013). Pour chaque sperme un mélange d'une solution d'agarose à bas point de fusion et d'un volume identique de suspension cellulaire (préalablement diluée dans du tampon PBS pour obtenir environ 25000 cellules /lame) est déposé sur une lame de microscope puis recouvert d'une lamelle. Les lames de microscope ont été préalablement immergées dans un gel d'agarose « normal » et laissées à sécher à température ambiante pendant toute une nuit, ce premier gel servant de gel d'accroche.

Après polymérisation sur une plaque de métal placée à 4°C, les lamelles sont retirées. Les lames sont ensuite traitées par une solution de lyse (pH 10) riche en sels et en détergent pendant 1h 30. Cette étape et les suivantes sont réalisées sous lumière inactinique afin d'éviter tout dommage artificiel à l'ADN pouvant être causé par les rayons ultraviolets. Les lames sont alors placées pendant 40 minutes dans une cuve remplie d'un tampon d'électrophorèse très alcalin (pH > 13) pour permettre le déroulement de l'ADN par rupture des liaisons hydrogène. Puis l'électrophorèse est réalisée (20 V, 300 mA) pendant une durée de 24 minutes, les lames sont ensuite neutralisées par du tampon Tris (pH 7,5) et déshydratées pendant 10 minutes dans de l'éthanol absolu. Le protocole détaillé et la composition de l'ensemble des solutions utilisées sont présentés en annexes 1 et 2.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

L'analyse de 100 cellules par lames se fait en microscopie à épifluorescence (Zeiss, modèle Axioskop 40) couplée à une caméra numérique et grâce au logiciel d'analyse d'images Comet Assay IV (Perceptive Instruments Ltd), après marquage de l'ADN par un intercalant de base (bromure d'éthidium). L'analyse des dommages à l'ADN consiste en la mesure de la quantité l'ADN dans la queue ou « tail intensity » de chaque comète et le calcul de la médiane de ce paramètre sur 100 cellules analysées (voir figure 1).

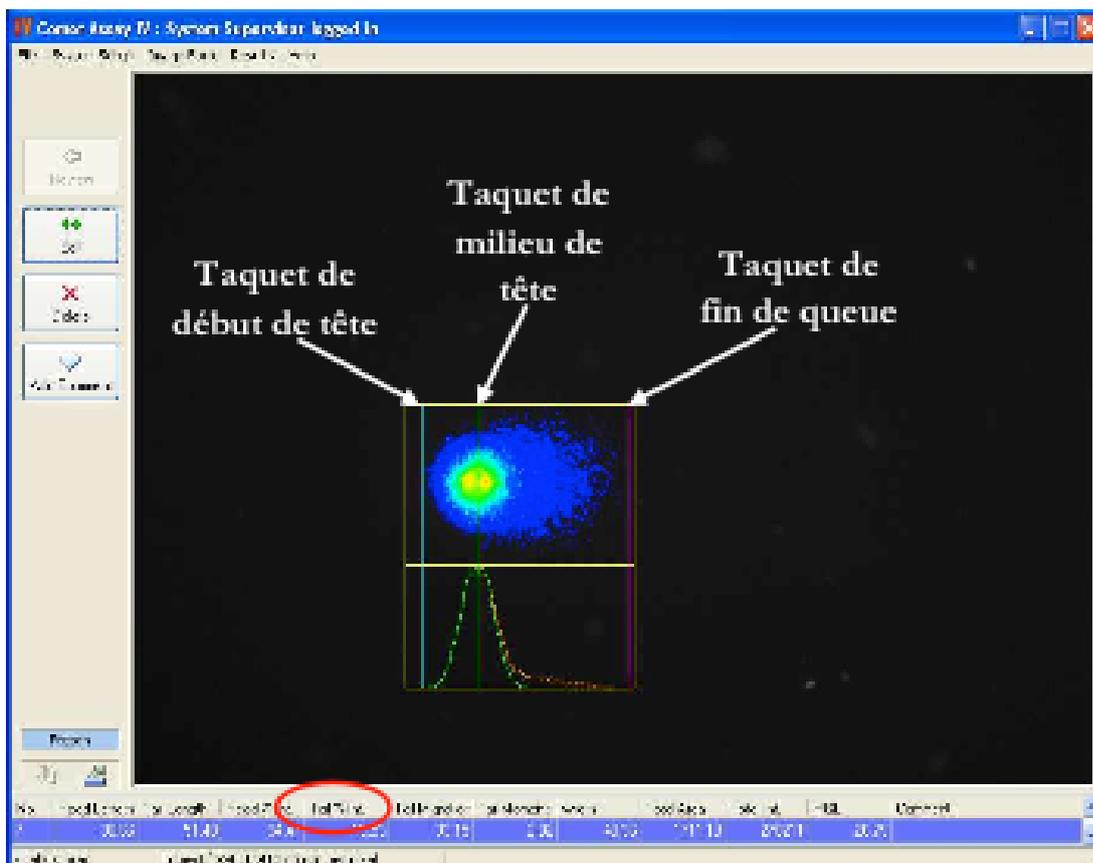


Figure 1. Mesure du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète à l'aide du logiciel Comet Assay IV

Analyses statistiques

Les données ont été analysées soit en utilisant les logiciels Statistica et XLSTAT (ANOVA I, test post-hoc, test Khi2, tests de corrélation de Pearson et de Spearman, test de rang Mann-Whitney, comparaison de distributions par le test de Kolmogorov-Smirnov), soit sous « R » (Kruskal Wallis et fonction lmer).

3.4) Analyse de la qualité de la descendance

Incubation des œufs dans un dispositif d'élevage

Une fois fécondés sur le terrain les œufs sont rapatriés au laboratoire dans une glacière où ils sont placés dans deux dispositifs d'élevage de marque Zebtech Tecniplast (photo 6). Ces dispositifs sont composés de 5 rangées de 10 bacs de 3,5 L chacun et sont alimentés par un générateur d'eau osmosée. Ils permettent d'alimenter en circuit semi-ouvert (possibilité de régler le débit journalier de renouvellement d'eau) chacun des bacs dont le débit individuel d'alimentation en eau peut lui-même être réglé. La température de l'eau est maintenue à 12°C par un groupe froid relayé par la chambre froide dans laquelle est installé le dispositif. La conductivité de l'eau est régulée à 300 µS et le pH à 7.0, grâce à des pompes péristaltiques pilotées par des sondes. De bonnes conditions biologiques sont assurées par filtration mécanique, passage dans un filtre biologique, puis passage sur charbon actif et sous rampe UV afin d'éliminer d'éventuels microorganismes pathogènes.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône



Photo 6. Dispositif Zebtech mis en place au LEHNA (équipe BEL)

Mesure du taux de fécondation et du taux d'anomalies

Le taux de fécondation est calculé comme le taux d'embryonnement 24 heures après la fécondation artificielle réalisée sur le terrain. Cinquante œufs sont prélevés pour chaque pool d'œufs fécondé par un mâle d'une station donnée et observés par transparence à la loupe binoculaire pour déterminer le taux d'embryonnement à environ 12°C.jour. L'embryon est visible sous forme d'une blastula s'il y a eu fécondation, dans le cas contraire les œufs non fécondés sont très clairs et les œufs avortés sont d'aspect cotonneux (car contaminés par des champignons) (photo 7).

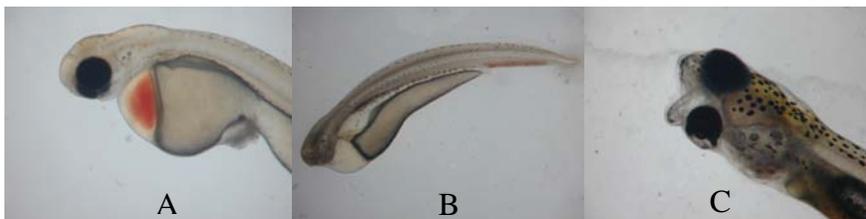


Photo 7. Œufs de hotus fécondés au stade blastula visible à travers le chorion transparent

Le taux d'anomalies a été calculé par observation à la loupe binoculaire de 50 larves par mâle et par station à 2 stades critiques du développement : l'éclosion puis la résorption totale du sac vitellin.

Suite aux premières observations et à l'expérience acquise lors de la campagne de pêche de l'année précédente (phase 2), les anomalies ont été classées selon les catégories suivantes (voir photo 8 A-F) :

- œdème cardiaque (A),
- malformation au niveau de l'œil ou de la bouche (B, C)
- nombre anormal d'otolithes (D),
- oedème ou nécrose du vitellus (E),
- déformation dorsale (F).



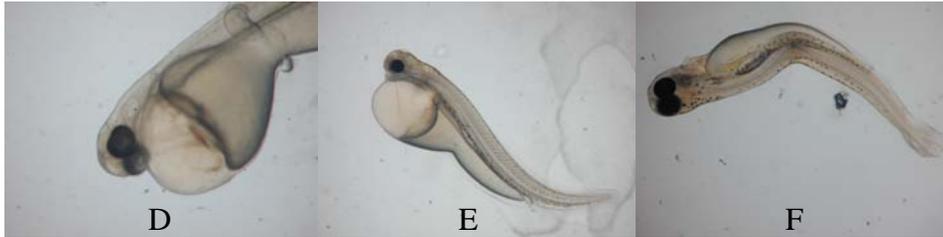


Photo 8 : Différentes anomalies recensées chez les larves de hotus

Résistance au jeûne et taux de mortalité

Afin de tester la qualité de la descendance, 300 œufs sont prélevés sur chaque lot fécondé par mâle et pour chaque station, puis isolés dans un bac dans lequel nous avons par la suite décompté chaque jour :

- Le nombre d'œufs éclos par bac, les larves écloses étant alors isolées des œufs dans un pondeur placé dans le même bac,
- Le nombre de morts et le stade de la mort (une fois l'éclosion terminée les larves atteignant le stade de la vessie natatoire étaient isolées de celles étant encore au stade vésicule vitelline).

Ces comptages ont permis d'établir un taux de mortalité embryonnaire, un taux de mortalité larvaire au stade vésicule vitelline, et de mesurer la résistance des alevins au jeûne.

4. Principaux résultats et discussion

4.1) Résultats des pêches

La campagne de pêche a eu lieu durant les mois de mars et d'avril 2012. La complexité de cette étape tient au fait que la reproduction du hotu sur une station peut être très rapide (il se passe parfois seulement 24 heures entre le début du pic d'activité « observable » des géniteurs et la fin de la fraie) et par conséquent des visites quasi quotidiennes des différentes stations ont du être organisées, ce qui a demandé un effort logistique très significatif.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Le récapitulatif des pêches est présenté ci-dessous par station et ordre chronologique (il fait apparaître le problème récurrent du déficit en génitrices sur les stations investiguées) :

- « Miribel »: une première pêche a pu être réalisée à Miribel dès la mi-mars, alors que des premiers signes d'activité de reproduction étaient visibles chez les géniteurs de hotus. Cette première pêche a permis de récolter 27 mâles spermants mais une seule femelle mature.
- « Azergues »: malgré l'activité sexuelle manifeste des géniteurs présents sur la station, 20 mâles spermants ont été récoltés mais aucune femelle mature.
- « Péage de Roussillon »: à nouveau aucune femelle n'a pu être récoltée lors de cette pêche et seulement 15 mâles spermants.
- « Miribel » : une nouvelle période d'activité intense des géniteurs ayant été constatée sur ce site, une deuxième pêche a été organisée début avril. Celle-ci n'a permis à nouveau la capture que d'une seule femelle mature alors que 10 mâles spermants ont été capturés.
- « Baix » : 13 mâles spermants et 5 femelles matures capturés.
- « Suran » : 10 mâles spermants et 5 femelles matures capturés.

Notons qu'en moyenne les géniteurs pêchés sur ces différentes stations avaient un aspect général normal à l'exception des poissons pêchés sur le site de Baix qui présentaient pour leur majorité des atteintes cutanées sévères (ulcères sur les flancs et les nageoires, déformations vertébrales importantes, desquamation marquée de l'épiderme avec décollement des écailles ; voir photos 9 à 11 ci-dessous).

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

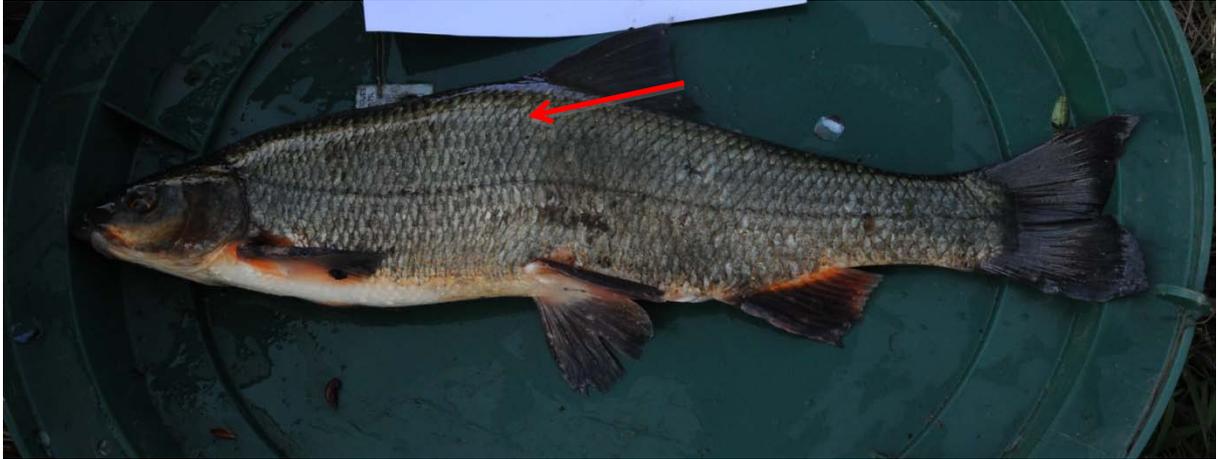


Photo 9. Hotu mâle de la station Baix présentant une lordose marquée



Photo 10. Hotu mâle de la station Baix présentant des lésions cutanées importantes



Photo 11. Hotu mâle de la station Baix avec absence de nageoires pelviennes

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Il faut souligner ici l'investissement très important qu'a représenté ce travail de terrain à savoir l'implication de 6 à 13 personnes selon les stations, et un nombre élevé de sorties de repérage ou ayant conduit à des pêches infructueuses (soit au total environ 30 sorties sur la période et les stations considérées). Il a pu être observé un comportement différent en fonction du sexe sur la frayère, à savoir la présence plus précoce des mâles sur le radier, les femelles restant généralement en amont de ce dernier et ne dévalant qu'au dernier moment. La fenêtre temporelle permettant de capturer simultanément les 2 sexes est de ce fait très étroite et n'aura permis au bilan de récupérer suffisamment de mâles et femelles matures uniquement sur les stations de Baix, du Suran et de Miribel (tableau 1). L'étude du lien génotoxicité gamètes-qualité de la descendance a donc été réalisée sur les individus provenant de ces 3 stations uniquement.

Station	Nombre de mâles matures pêchés	Nombre de femelles matures pêchées	Nombre de mâles utilisés pour la fécondation	Poids moyen mâle (kg)	Longueur totale moyenne mâle (cm)	Coefficient de condition (100P/L ³)
Suran	20	5	10	1,289	48	1,17
Miribel (13/03)	27	1	10	1,697	49	1,44
Baix	13	4	10	1,725	51,5	1,26
Miribel (02/04)	10	1	10	1,532	48,5	1,34
Péage de Roussillon	15	0	0	1,925	51	1,45
Azergues	20	0	0	0,856	41,5	1,20

Tableau 1. Récapitulatif des résultats obtenus sur les pêches électriques

Se pose le problème de l'effet femelle que nous souhaitons minimiser en regroupant les œufs de 5 femelles au minimum pour chaque station. N'ayant pu procéder de la

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

sorte pour la station de Miribel, nous avons pris la décision de « pooler » les deux pêches de Miribel effectuées à des dates différentes pour limiter l'influence de cet effet femelle.

L'indice de condition est basé sur une relation d'allométrie linéaire entre le poids et la taille au cube d'un individu. Il est important de garder à l'esprit que ce coefficient rend compte avant tout de la croissance des individus en fonction des ressources trophiques du lieu et de leur capacité à les utiliser. Il ne permet pas de qualifier la qualité chimique d'un milieu. Il faut souligner que les différences concernant le coefficient de condition sont ici ténues et le fait que l'âge des géniteurs n'est pas connu (analyses de scalimétrie non réalisées à ce jour) alors qu'il influence le coefficient de condition. A titre d'illustration, les mâles pêchés sur la station Azergues présentaient une moyenne de poids inférieure de 0,5 à 1 kg et une taille moyenne inférieure de 7 à 10 cm par rapport aux géniteurs des autres stations, ceci étant manifestement dû à la présence de géniteurs assez jeunes sur le site de fraie.

4.2) Caractéristiques biochimiques du sperme

La qualité globale du sperme a été évaluée *via* la mesure de différents paramètres biochimiques. Ils sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Station	Numération cellulaire (10 ⁹ spz/mL)	Osmolarité mOsm/kg	pH	Spermatocrite (% spz)
Suran	8	268	7,9	17
Baix	12	242	7,9	28
Miribel	16	253	7,8	22
Péage de Roussillon	19	228	7,7	27
Azergues	20	252	7,6	26

Tableau 2. Résultats de l'analyse de la qualité du sperme des géniteurs

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

De manière globale, les caractéristiques biochimiques des spermatozoïdes sont voisines pour les hotus pêchés dans les différentes stations, hormis en ce qui concerne la densité en spermatozoïdes qui apparaît plus faible chez les mâles de la station Suran (soit une diminution moyenne de 40% environ par rapport à l'ensemble des autres stations). Ceci peut être expliqué par la période tardive à laquelle les géniteurs ont été capturés sur cette station du fait de conditions hydrologiques incompatibles avec la reproduction, à savoir une crue soutenue pendant plusieurs jours (soit 45 jours après la première pêche et plus de 20 jours après la dernière pêche effectuées sur les autres stations). Il est en effet connu que la densité en spermatozoïdes croît du début de la période de reproduction pour atteindre un pic puis diminue en fin de reproduction où le sperme est alors beaucoup plus dilué (Billard, 1986).

Une autre remarque concerne le spermatozoïde élevé à la station Baix comparé à la valeur de numération cellulaire. En effet, bien que fournissant une information légèrement différente, ces deux paramètres sont théoriquement corrélés, mis à part dans le cas d'anomalies physiologiques telles qu'une modification de la viscosité du sperme et/ou des problèmes d'infection (Rohlenova et Simkova, 2010). Sans être trop spéculatif, ceci pourrait être rapproché du mauvais état physiologique constaté sur les géniteurs de Baix.

Ont également été mesurés la concentration en ATP du sperme et la concentration en protéines du liquide séminal, qui rendent compte respectivement de la charge énergétique de la cellule et de la charge protéique nécessaire à la survie et au fonctionnement des spermatozoïdes. Les résultats concernant le contenu en ATP sont présentés dans la figure 2 (dosage réalisé uniquement pour les 3 stations Miribel, Baix et Suran).

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

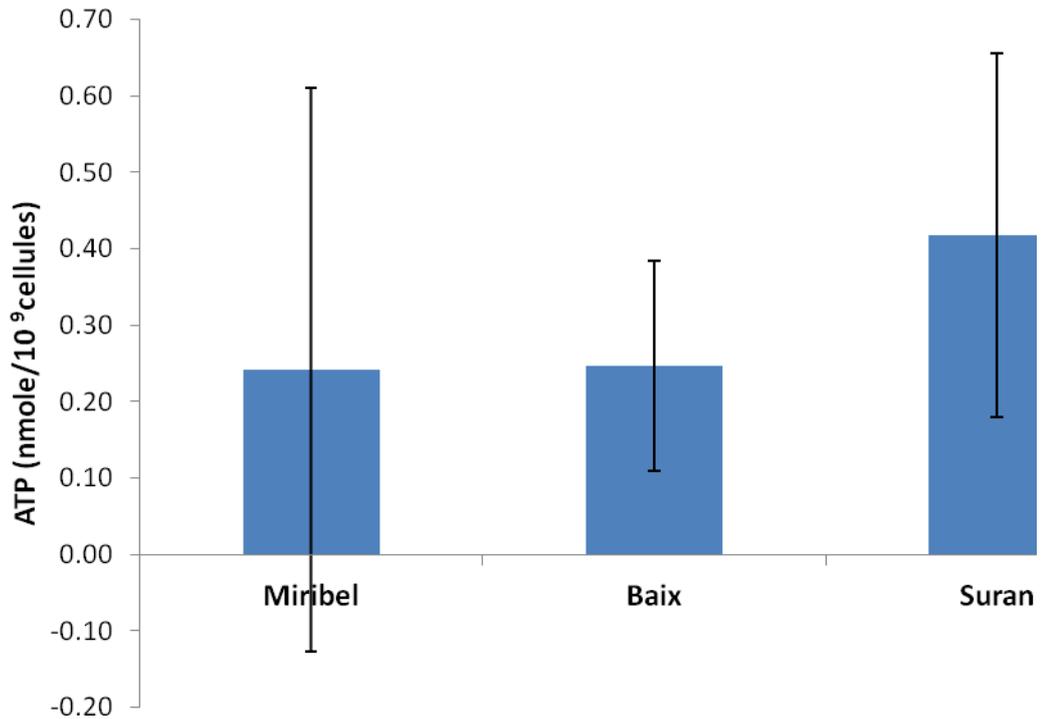


Figure 2. Concentration en ATP des spermatozoïdes

Il n'est pas mis en évidence d'effet station ($p_{\text{value}}=0,343$). La concentration en ATP dans les spermatozoïdes est corrélée à la motilité du sperme qui conditionne en partie le pouvoir fécondant comme cela a pu être démontré chez le poisson (Perchec Pourpard *et al.*, 1995 ; Rurangwa *et al.*, 2004). La concentration en ATP des spermatozoïdes de poisson peut décroître significativement suite à l'exposition à des contaminants chimiques (Rurangwa *et al.*, 2002). Les résultats obtenus ne montrent pas d'effet significatif de la qualité chimique du milieu sur le contenu en ATP des spermatozoïdes de hotu, ce qui confirme l'absence d'effet également enregistré sur le pouvoir fécondant du sperme (voir résultats suivants).

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

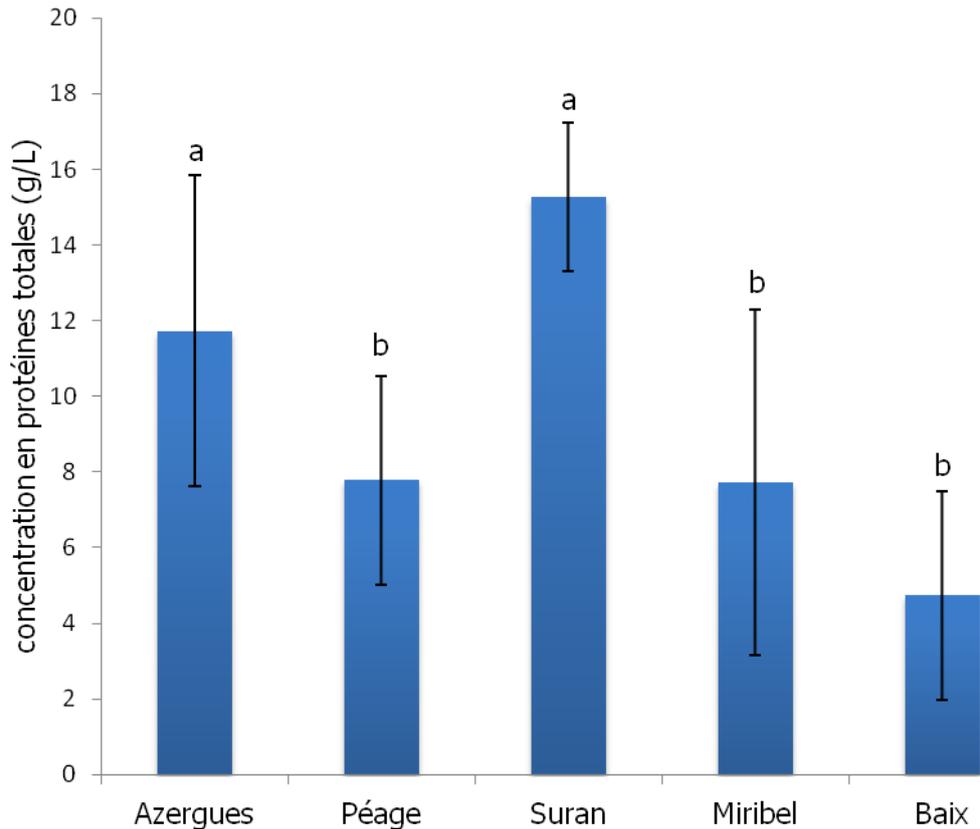


Figure 3. Concentration en protéines du liquide séminal ($a \neq b$, $p < 0,05$)

Concernant la concentration en protéines du liquide séminal, l'analyse statistique met en évidence un effet station, les hotus des stations Azergues et Suran étant significativement différents de ceux provenant des 3 autres stations (figure 3). Pour les individus des stations ayant fait l'objet par la suite de fécondations artificielles on remarque pour ce paramètre un classement Suran > Miribel > Baix avec une forte différence entre le Suran et ces 2 autres stations. Ceci peut signer une meilleure qualité globale du sperme dans les poissons du Suran étant donné que le taux de protéines du liquide séminal joue un rôle capital dans la viscosité du sperme, l'immunologie et le support métabolique pour les spermatozoïdes (Ciereszko *et al.*, 1996). Sachant par ailleurs que le sperme des hotus du Suran a été récolté en fin de saison de reproduction, période à laquelle la quantité de protéines baisse dans le liquide séminal (Ciereszko *et al.*, 1996), cette différence pourrait marquer d'autant plus la bonne qualité au sens biochimique du sperme des hotus du Suran.

4.3) Intégrité de l'ADN des spermatozoïdes

La figure 4 résume les niveaux d'endommagement à l'ADN spermatique mesuré dans les hotus pêchés aux différentes stations par l'essai des comètes en conditions alcalines.

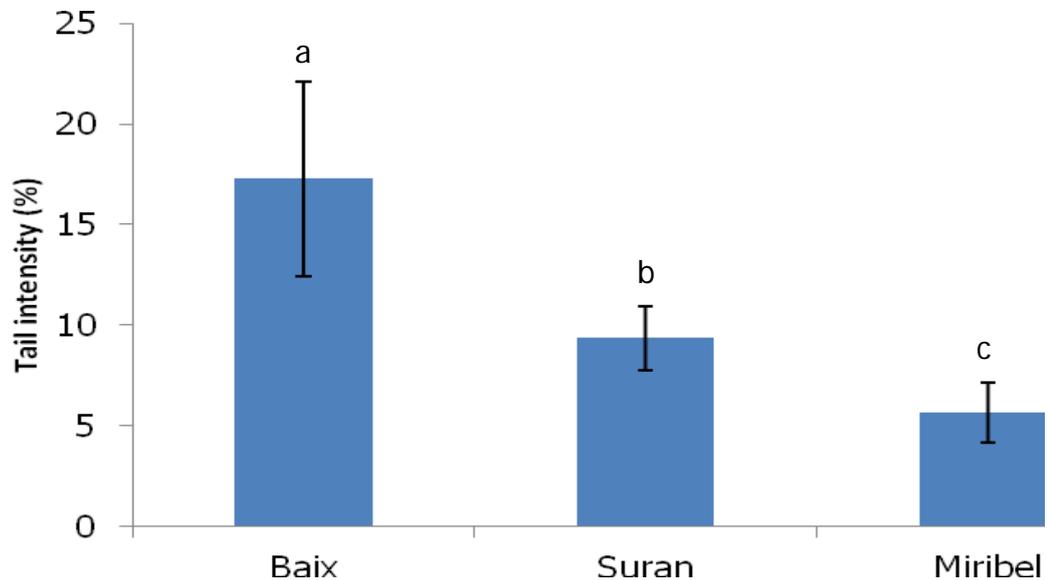


Figure 4. Endommagement de l'ADN spermatique (moyennes des médianes du tail intensity) ($a \neq b$, $p < 0,05$)

L'analyse statistique signe un effet station sur l'intégrité de l'ADN du sperme des hotus. Le classement des stations pour le paramètre dommages à l'ADN du sperme est : Miribel < Suran < Baix. Ces résultats confirment la sensibilité de la réponse des spermatozoïdes à l'environnement, comme cela a été mis en évidence lors d'expositions contrôlées et/ou sur le terrain chez le poisson et le crustacé gammaré (Lacaze *et al.*, 2010 ; Devaux *et al.*, 2011 ; Lacaze *et al.*, 2011 ; Santos *et al.*, 2013 a, b).

4.4) Qualité de la descendance

Taux de fécondation

Le tableau 3 illustre les valeurs du taux de fécondation (exprimé ici comme le taux d'embryonnement à 12°C.jour) par les mâles des stations Baix, Miribel et Suran.

Station	Taux de fécondation
Baix	97,2 %
Miribel	98,5 %
Suran	100 %

Tableau 3. Taux de fécondation à 12°C.jour

Les résultats montrent une différence significative concernant le taux de fécondation entre les différentes stations Baix et Suran d'une part ($p_{\text{value}}=0,0001$) et à un moindre titre entre Miribel et Suran d'autre part ($p_{\text{value}}=0,006$). Ils sont en accord avec la tendance observée quant à la qualité globale du sperme évaluée précédemment par la mesure de la teneur en ATP des spermatozoïdes et de la concentration en protéines du liquide séminal. Il convient à nouveau de rappeler que l'effet sur le taux de fécondation d'un stress génotoxique visible au niveau des gamètes dépend certainement à la fois de la nature de ce stress (au plan qualitatif et quantitatif) et de l'espèce considérée. Ainsi Perez-Cereales *et al.* (2010) ont montré une diminution du taux de fécondation chez la truite suite à la cryopréservation du sperme ayant conduit à un endommagement significatif de l'ADN spermatique. A l'opposé, des travaux menés chez le gammare (*Gammarus fossarum*), la truite fario (*Salmo trutta fario*), l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) et l'épinoche à 3 épines (*Gasterosteus aculeatus*) exposés à des composés génotoxiques n'ont pas montré d'effet sur le taux de fécondation (Devaux *et al.*, 2011 ; Lacaze *et al.*, 2011 ; Santos *et al.*, 2013 b).

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Morphométrie des larves

Afin d'évaluer un différentiel de poids éventuel entre les larves issues de géniteurs des différentes stations, le poids sec de 50 larves par mâle de chaque station a été mesuré à l'éclosion et à la résorption complète du sac vitellin (apparition de la vessie natatoire). Les résultats sont reportés dans le tableau 4 suivant.

	Poids sec moyen de 50 larves à l'éclosion (en mg)	Poids sec moyen de 50 larves à l'apparition de la vessie natatoire (en mg)
Miribel	840	711
Suran	764	635
Baix	654	529

Tableau 4. Résultats sur la morphométrie des larves

Les résultats de l'ANOVA mettent en évidence un effet station sur le poids à l'éclosion ($p_{\text{value}}=0,0003$), mais pas à l'apparition de la vessie natatoire, malgré une tendance similaire ($p_{\text{value}}=0,14$). Seules les larves issues des stations Baix et Miribel présentent une différence significative entre elles de leur poids à l'éclosion. Il est intéressant de noter le classement des stations en ce qui concerne ce paramètre pondéral : $\text{Baix} < \text{Suran} \leq \text{Miribel}$. Il faut rappeler ici l'importance chez le poisson de l'effet femelle sur la quantité de réserves dans l'œuf et donc sur le poids de la future larve (Ojanguren *et al.*, 1996). Cette influence ne peut être écartée dans notre étude eu égard à l'effectif très faible de femelles qui a été pêché quelle que soit la station investiguée.

Taux d'anomalies à l'éclosion et à l'apparition de la vessie natatoire

Le comptage des anomalies nous permet ici d'accéder à une information plus fine que celle apportée par le simple taux de fécondation ou par un taux de mortalité de

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

la descendance. Sont indiqués ci-après les taux d'anomalies (décrites au paragraphe 3.4) à l'éclosion et à la résorption du sac vitellin.

Station	Taux d'anomalies total à l'éclosion	Taux d'anomalies total à la résorption de la vésicule vitelline
Miribel	5,8%	2,4%
Suran	17,6%	6,4%
Baix	30,6%	12,0%

Tableau 5. Taux d'anomalies observées sur les larves provenant de géniteurs du Suran, de Baix et de Miribel

L'analyse statistique montre qu'il existe une différence significative entre les stations considérées 2 à 2 concernant le taux d'anomalies ($pvalue=0,001$), sachant qu'à nouveau les stations peuvent être classées comme suit pour les 2 étapes du développement et ceci par ordre croissant du taux d'anomalies : Miribel<Suran<Baix. Afin de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre le taux de dommages à l'ADN des spermatozoïdes de chaque père et le taux d'anomalies mesuré sur sa descendance nous avons tout d'abord calculé les probabilités d'occurrence des anomalies pour chaque station (ligne de calcul « Imer » sous R). Les résultats sont fournis dans le tableau 6 suivant :

Station	Probabilité d'occurrence d'anomalies sur la descendance
Miribel	0,04
Suran	0,16
Baix	0,28

Tableau 6. Probabilité d'apparition d'anomalies chez les larves issues de géniteurs pêchés sur les différentes stations

Ces probabilités ont été considérées comme l'effet fixe que nous avons comparé à l'effet aléatoire mâle qui est représenté par la médiane des valeurs de tail intensity

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

afin d'établir statistiquement une éventuelle corrélation entre l'endommagement de l'ADN et le taux d'anomalies sur l'ensemble des mâles à l'éclosion.

Les résultats mettent en évidence un lien de corrélation significatif entre le taux de dommage à l'ADN des spermatozoïdes et le taux d'anomalies observé sur la descendance à l'éclosion pour l'ensemble des stations ($p_{\text{value}}=0,007$). Ce résultat conforte ceux obtenus chez d'autres espèces de poisson exposées en conditions contrôlées (Lewis et Galloway, 2009 ; Perez-Cerezales *et al.*, 2010 ; Devaux *et al.*, 2011 ; Santos *et al.*, 2013 b) ou de crustacé en conditions réelles d'exposition (Lacaze *et al.*, 2011).

De la même manière ce lien de corrélation existe entre le taux d'anomalies à l'apparition de la vésicule vitelline et le taux de dommages à l'ADN des spermatozoïdes ($p_{\text{value}}=0,002$).

Taux de mortalité à l'éclosion, à l'apparition de la vessie natatoire et suivi de la résistance au jeûne

Le suivi du taux de mortalité à l'éclosion a été réalisé en comptant les éclosions et en éliminant les embryons morts parmi les 300 œufs mis en incubation pour chaque mâle et chaque station. Par la suite les morts ont été comptés chaque jour parmi les larves et sur ces morts a été noté le stade auquel ils se trouvaient (pré ou post apparition de la vessie natatoire). Les résultats obtenus sur les taux de mortalité sont présentés en figure 5 :

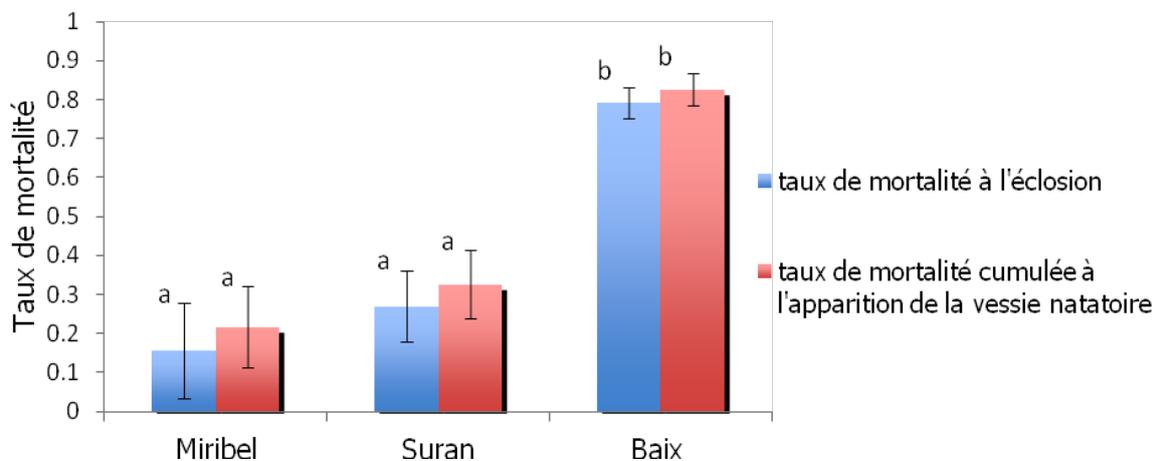


Figure 5. Taux de mortalité observé à 2 étapes-clés du développement embryolaire ($a \neq b$, $p < 0,05$)

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

L'analyse statistique dégage un effet de la station sur le taux de mortalité larvaire mesuré ($p_{\text{value}}=0,0001$ pour les deux stades), mais seule la station de Baix présente une différence significative avec les deux autres stations. Il a également pu être mis en évidence une corrélation entre le taux de mortalité à l'éclosion et le taux de dommage à l'ADN des spermatozoïdes ($p_{\text{value}}=0,001$) ainsi qu'entre le taux de mortalité à l'apparition de la vessie natatoire et l'endommagement de l'ADN des spermatozoïdes ($p_{\text{value}}=0,003$). Ces résultats confirment ceux obtenus sur des invertébrés d'eau douce ou marins exposés *in vitro* ou *in vivo* à des agents génotoxiques (Lewis et Galloway, 2009 ; Lacaze *et al.*, 2011).

On constate en première approche que le taux de mortalité à l'éclosion apparaît bien plus important chez les larves issues de géniteurs de Baix comparé au Suran et à Miribel. Ce résultat est à rapprocher de l'observation d'un nombre très élevé d'individus microphtalmes (yeux de très faible diamètre) chez les embryons de Baix. Il est classiquement démontré chez les poissons qu'un développement strictement gynogénétique des œufs¹ est possible lorsque le sperme ayant un ADN fortement endommagé conserve son pouvoir d'activation mais ne contribue pas à la ploïdie du zygote final (qui est alors haploïde), comme cela a été démontré chez la truite (Chourrout, 1980). Ces individus haploïdes présentent une microphtalmie caractéristique et leur statut génétique s'accompagne d'une mortalité embryonnaire très importante. L'hypothèse d'une proportion significative d'individus haploïdes parmi les descendants des hotus de la station Baix est à rapprocher du taux de fécondation relativement élevé (97,2%) démontrant une activation de l'œuf mais sans contribution du patrimoine paternel du fait d'un niveau d'endommagement plus élevé de l'ADN.

On constate que la mortalité embryonnaire est très importante comparée à la mortalité plus tardive au premier stade alevin (fin de résorption vitelline) et ce pour les 3 stations (sachant que la mortalité totale cumulée à l'apparition de la vessie natatoire est très proche de la mortalité à l'éclosion, voir figure 5). Ce résultat est en contradiction avec ceux obtenus chez 2 espèces de salmonidés (truite commune et omble chevalier) pour lesquels les effets délétères de l'endommagement de l'ADN des spermatozoïdes provenant de mâles exposés à un composé génotoxique étaient

¹ Développement embryonnaire haploïde n'impliquant que le stock génétique femelle.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

de plus en plus « visibles » au cours des 50 premiers jours après l'apparition de la vessie natale (Devaux *et al.*, 2011). Ce différentiel de réponse interspécifique est à rapprocher également de celui observé entre ces 2 études concernant le taux d'anomalies, à savoir un taux d'anomalies augmentant au cours du développement chez ces salmonidés et l'inverse chez le hotu. Ces différences peuvent être partiellement expliquées par le contraste entre une exposition courte à une molécule au laboratoire (expérimentation sur salmonidés) *versus* une exposition de longue durée (durant toute la maturation sexuelle) et multifactorielle dans le milieu (cas de la présente expérimentation) qui peut conduire à des dommages de nature différente sur la descendance.

La résistance au jeûne a été étudiée grâce au décompte journalier du nombre de morts dans chaque lot d'alevins non alimentés. Pour analyser ces résultats nous avons déterminé pour chaque mâle de chaque station le nombre de jours au bout duquel 90% des larves vivantes à l'éclosion étaient mortes. Les résultats de ce suivi sont présentés dans le tableau 7 ci-dessous.

Station	Nombre de jours moyen pour atteindre 90% de mortalité parmi les éclos
Baix	57,8
Suran	57,4
Miribel	55,1

Tableau 7. Résistance au jeûne des larves de hotus provenant des différentes stations

L'analyse statistique met en évidence un effet station global ténu ($p_{\text{value}}=0,04$) mais aucune différence significative entre les stations considérées deux à deux. De plus, le test de corrélation de Pearson souligne ici l'absence de lien significatif entre la résistance au jeûne et l'endommagement de l'ADN. Ce résultat peut être partiellement expliqué par le fait que comme montré précédemment la mortalité précoce survenue au cours du développement des larves peut être très importante (de 20 à 80 % en fonction de la station) ce qui a certainement conduit à une

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

sélection en faveur des individus les plus résistants en général et en particulier au jeûne.

Analyse en composantes principales de tous les paramètres étudiés sur les populations de hotu

En vue d'un traitement global des résultats, une analyse en composante principale a été réalisée sur les paramètres suivants :

- Sur les géniteurs :
 - La taille,
 - Le poids,
 - Le coefficient de condition,
 - la concentration en protéines totales dans le liquide séminal,
 - la concentration en ATP,
 - l'osmolarité du sperme,
 - la concentration en spermatozoïdes,
 - le spermatocrite,
 - le pH,
 - les médianes du tail DNA des spermatozoïdes

- Sur la descendance :
 - Le taux d'anomalies à l'éclosion et à l'apparition de la vésicule vitelline,
 - Le taux de mortalité à l'éclosion et à l'apparition de la vésicule vitelline,
 - Les données de survie à la résistance au jeûne.

Les représentations graphiques en figure 6 et 7 issues des résultats de cette analyse sont celles donnant le meilleur pourcentage d'explication du modèle (les axes F1 et F2 combinés « expliquent » 42,1% du modèle représenté par l'ACP).

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

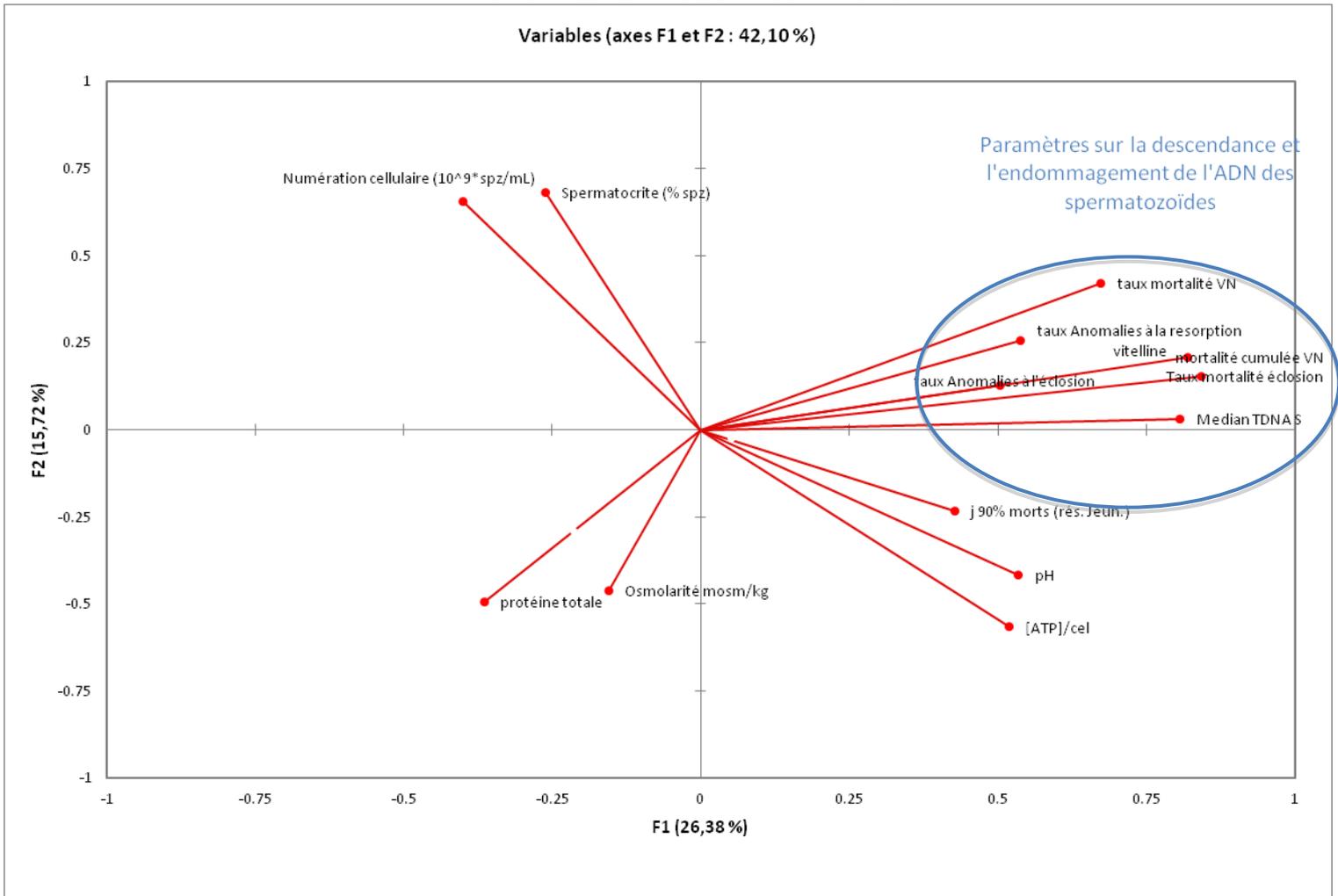


Figure 6. Cercle des corrélations de l'analyse en composantes principales

On constate ici que plusieurs tendances se dégagent. Tout d'abord une corrélation significative, ainsi qu'un caractère explicatif certain (étant donné leur proximité de l'axe F1 et leur distance avec le centre), au sein d'un jeu de paramètres concernant soit la qualité de la descendance (taux d'anomalies ou de mortalité) soit les dommages à l'ADN des spermatozoïdes, qui sont regroupés à l'intérieur de l'ellipse bleue sur la figure 6. La corrélation entre l'endommagement de l'ADN et la qualité de la descendance est donc non seulement confirmée mais ces résultats signent également le caractère prépondérant de ces facteurs dans la différenciation des populations étudiées, sans présager pour l'instant des groupes ou sous-groupes que fait ressortir l'ACP.

Les paramètres sur la qualité du sperme quant à eux se dégagent en 3 groupes distincts de 2 paramètres :

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

- le pH du liquide séminal et la concentration en ATP,
- la numération cellulaire et le spermatocrite,
- l'osmolarité et la concentration en protéines totales.

La figure 7 suivante permet de visualiser d'éventuels groupes d'individus plus ou moins homogènes (et donc de confirmer les différences entre stations si elles existent).

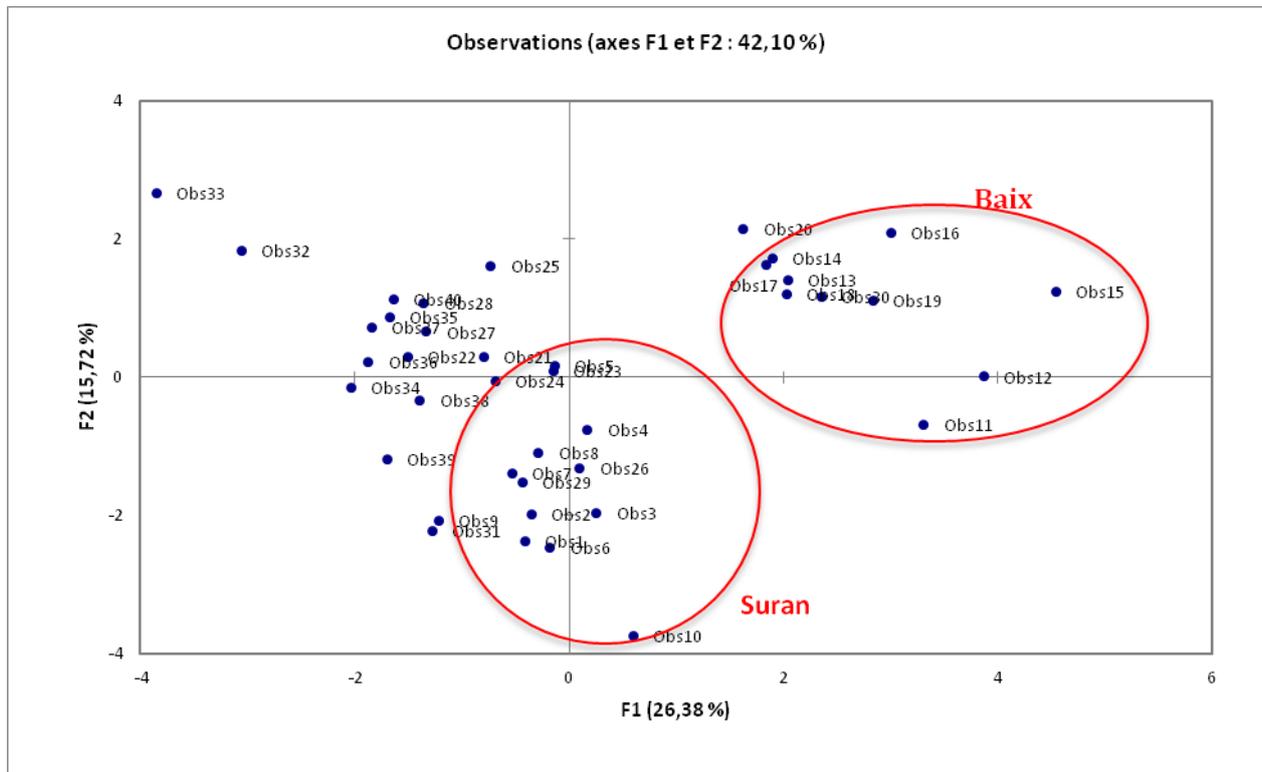


Figure 7. Répartition des individus des stations de Baix, du Suran et de Miribel selon les axes F1 et F2

Notons tout d'abord que les individus de 1 à 10 sont ceux du Suran, de 11 à 20 de Baix et au-delà de Miribel. On constate donc ici que les individus du Suran et de Baix forment des groupes relativement clairs et homogènes tandis que les individus de Miribel présentent une répartition plus diffuse par rapport aux 2 axes.

Pour Baix et le Suran des tendances se dégagent :

- Baix : les individus semblent former une population homogène qui se distingue en étant rapprochée de l'axe F1 et éloignée du centre. Ce sont donc les facteurs qui expliquent l'axe F1 (endommagement de

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

l'ADN et qualité de la descendance) qui font de cette population une population distincte des autres.

- Le Suran : cette fois-ci l'effet station semble plutôt être expliqué par l'axe F2 qui rend compte de la qualité du sperme et plus particulièrement par l'osmolarité et la teneur en protéines totales du liquide séminal. Ce sont donc des paramètres concernant majoritairement la composition du sperme et non l'intégrité de son génome (et donc de la descendance obtenue) qui font du Suran une station distincte des autres.

Il faut souligner le nombre plus important d'individus qui ont été observés sur la station Miribel car provenant de 2 pêches différentes qui pourraient expliquer la dispersion observée dans l'ACP sous hypothèse par exemple d'une hétérogénéité génétique (le fait d'avoir utilisé des individus provenant de populations différentes). Dans la limite des informations actuelles dont nous disposons les hotus pêchés à Miribel appartiennent tous à la même population.

5) Discussion générale et perspectives

Cette étude nous a permis d'aborder pour la première fois à notre connaissance la relation pouvant exister entre l'endommagement de l'ADN des gamètes mâles et certains éléments de la fitness de populations de poissons dans le milieu naturel. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une différence entre l'endommagement de l'ADN de hotus pêchés sur des stations sélectionnées sur la base d'une pression anthropique contrastée (ADN spermatique 3 fois plus endommagé sur la station de Baix par rapport à celle de Miribel). Cette différence significative entre les stations observées a été corrélée positivement à une perturbation de la reproduction. Ce programme confirme l'intérêt de l'analyse des effets génotoxiques en écotoxicologie largement argumenté dans la littérature (Jha *et al.*, 2004 ; Ciereszko *et al.*, 2005 ; Jha, 2008), et plus particulièrement de l'essai des comètes appliqué aux gamètes mâles. Ces cellules germinales sont en effet une cible idéale de par leur sensibilité aux agressions génotoxiques, leur incapacité à réparer les dommages causés à leur ADN et leur rôle dans le processus de reproduction (Lewis et Aitken, 2005 ; Lacaze *et al.*, 2011).

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Le taux d'embryonnement observé par comptage du nombre d'œufs fécondés à 12°C.jour n'a pas pu être corrélé à l'endommagement de l'ADN et pose la question de la méthode employée pour le mesurer, cette méthode ne permettant pas de détecter les activations de type gynogénétique observées par Thorgaard *et al.* (1985). L'observation du taux de fécondation dès le stade 2-8 cellules (proposée par Zhou *et al.*, 2006) pourrait s'avérer plus pertinent bien que plus complexe à mettre en place sur ce type de projet où la fécondation artificielle est réalisée *in situ*. Une perturbation de la fitness a été mise en évidence à travers l'augmentation du taux d'anomalies et de mortalité mesurée aux stades critiques du développement embryonnaire. Ces taux d'anomalies et de mortalité à l'éclosion et à l'apparition de la vessie natatoire marquent en effet un effet station significatif (les stations étant classées comme suit : Miribel<Suran<Baix, à l'image du classement obtenu pour les dommages à l'ADN). Une corrélation positive significative existe donc avec le niveau d'endommagement de l'ADN des spermatozoïdes des géniteurs, comme décrit dans la littérature sur le gammare ou différentes espèces de poissons (Devaux *et al.*, 2011 ; Lacaze *et al.*, 2011 ; Santos *et al.*, 2013 a, b). On observe ici une perturbation de la reproduction lisible à des stades précoces (plus de 2 fois plus importante en moyenne à l'éclosion par rapport à l'apparition de la vessie natatoire en ce qui concerne le taux d'anomalies, et 4 à 10 fois en ce qui concerne le taux de mortalité). Il s'agit là d'un effet « fondateur » qui peut conditionner précocement le devenir d'une population *via* une modification de sa dynamique.

On peut légitimement s'interroger sur le fait que, bien qu'il s'agisse d'une différence ténue, les hotus issus de la station Suran présentent à la fois un endommagement de l'ADN spermatique et corrélativement une qualité de la descendance sensiblement plus faible comparativement à la station Miribel pour laquelle il était estimé à priori un niveau d'anthropisation supérieur. Cela souligne la difficulté de classer une station comme « témoin » sur la base des données physico-chimiques et d'activités humaines sur le bassin versant. L'analyse des flux polluants par exemple ne peut pas par essence même être exhaustive du fait du nombre très élevé de micropolluants susceptibles d'être retrouvés dans les hydrosystèmes (l'analyse chimique ne permet au mieux de retrouver que ce que l'on cherche).

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Dans la limite de ce travail, les paramètres biochimiques mesurés sur le sperme se sont révélés peu discriminants et ne présentent pas de lien de corrélation avec les dommages à l'ADN des spermatozoïdes ou la qualité de la descendance observée, malgré leur importance dans le bon déroulement de la reproduction (Cierieszko *et al.*, 1996 ; Rurangwa *et al.*, 2004).

Ce travail offre plusieurs perspectives. Dans l'éventualité de conforter les résultats acquis, un certain nombre d'éléments doivent être pris en compte pour des expérimentations futures. Le problème du nombre de femelles pêchées sur les sites considérés et celui du choix de ces sites doit faire l'objet d'une réflexion. En effet la sélection dès le départ d'un nombre plus limité de stations identifiées comme pertinentes à partir de nos résultats pourrait permettre d'intensifier l'effort de pêche sur ces stations et d'améliorer la fiabilité et la robustesse des résultats en multipliant le nombre d'individus récoltés par station (mâles et femelles).

Les mesures des dommages à l'ADN pourraient également être complétées par la détection d'effets épigénétiques impliqués dans l'expression génique comme la méthylation des cytosines de l'ADN et l'acétylation des histones qui conditionne la compaction de l'ADN. Ces dommages épigénétiques sont considérés comme potentiellement transmissibles sur plusieurs générations, échappant dans certaines conditions à la reprogrammation observée chez certaines espèces (Bombail *et al.*, 2004). Certains de ces effets épigénétiques, comme la méthylation, présentent par ailleurs la possibilité d'être détectés par un essai des comètes modifié (Wentzel *et al.*, 2010). Ceci permettrait de disposer *in fine* d'une évaluation globale d'une atteinte éventuelle du génome (au plan de la structure et de l'expression), améliorant la compréhension des effets transgénérationnels dans un environnement perturbé.

Dans une démarche plus large d'évaluation du risque d'un milieu soumis à un stress environnemental, il serait important de pouvoir mesurer les effets des génotoxiques sur toutes les étapes du cycle de vie des organismes. En effet la génotoxicité n'agit pas sur la reproduction et indirectement la descendance que par le biais de l'endommagement de l'ADN des gamètes mais également par action directe dans le milieu sur les embryons et les juvéniles (Sanchez Argüello, 2012). La prise en compte

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

du cycle de vie permettrait ainsi d'obtenir des informations sur les impacts potentiels de la naissance à la maturité sexuelle (Diekmann *et al.*, 2004 ; Häfeli *et al.*, 2011).

D'autres approches complémentaires pourraient apporter des informations précieuses sur la vulnérabilité des jeunes stades de hotus provenant de géniteurs vivant dans un environnement chimiquement impacté. Suite à ce travail, une étude préliminaire a permis de tester la résistance à un insecticide organochloré, le chlorpyrifos (très utilisé en agriculture dans la vallée du Rhône sur fruitiers et vigne) d'alevins provenant de hotus pêchés dans les différentes stations du présent travail. Les premiers résultats permettent d'avancer l'hypothèse d'un phénomène de sélection dans les populations les plus exposées, ce qui peut à terme poser le problème d'une diminution significative des capacités d'adaptation des populations en place à des stress d'origine variée (voir annexe 6).

Une autre étude préliminaire a été menée à l'issue de ce travail pour décrire précisément le développement embryolarvaire du hotu dans le contexte rhodanien afin de pouvoir mettre en évidence de manière sensible d'éventuelles modifications de ce développement dans des contextes de contamination avérée (voir annexe 7).

Au bilan, ce travail fournit les premiers éléments de démonstration d'une relation entre intégrité de l'ADN spermatique et la qualité de la descendance d'un poisson sauvage, le hotu. Il offre des pistes explicatives dans un contexte avéré de déclin démographique observé pour les populations de hotus du Bassin du Rhône. Différents éléments d'appréciation de la fitness (qualité générale des géniteurs, intégrité de l'ADN du sperme, qualité de la descendance) montre que la dynamique de la population de hotus présente sur la station Baix pourrait être significativement affectée suite à un recrutement insuffisant pour assurer son maintien. Cette hypothèse doit être confortée par une analyse en parallèle de l'évolution des différentes classes d'âge permettant de signer un déficit reproductif.

Les différentes actions destinées à améliorer les conditions d'habitat physique des organismes aquatiques (programmes de restauration, D.C.E.) devraient être définies également en fonction du type d'informations apportées par la présente étude. Il nous apparaît déterminant de réaffirmer que le succès de ce type d'actions est

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône
conditionné par la capacité des espèces aquatiques à (re)coloniser des habitats
modifiés dans la limite d'une fitness suffisante.

Éléments de valorisation scientifique de ce travail :

- Suaire R. (2012). Impact de l'environnement sur la fitness chez le hotu du bassin du Rhône : étude du lien génotoxicité/reproduction. Master recherche « Sciences de l'Environnement Industriel et Urbain », 53 p. + annexes.
- Devaux A., Bony S., Fiat L., Gillet C., Lacaze E., Geffrad O., Santos R., Sanchez W. (2012). Genotoxicity in germ cells and reproduction impairment in freshwater organisms. Congrès ECOBIM, Reims, 5-8 juin 2012.
- Devaux A., Bony S., Lacaze E., Santos R., Geffard O., Sanchez W., Olivier J.M. (2013). Lien entre impact génotoxique et reprotoxicité chez les organismes aquatiques. Colloque d'Ecophysiologie Animale, Lyon, 7-8 novembre 2013.
- Devaux A., Bony S., Olivier J.M., Plenet S., Sagnes P., Segura S. (à soumettre à *Aquatic Toxicology* en 2013). On-field evidence of reproduction impairment through sperm DNA damage in the nase (*Chondrostoma nasus*).

Bibliographie

- Andersson, S., L., , G.C. Wild (1994). Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environmental Health perspectives* 102, 9-12.
- Billard, R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction Nutrition Développement* 26, 877-920.
- Bombail, V., J.G. Moggs, G. Orphanides (2004). Perturbation of epigenetic status by toxicants. *Toxicology Letters* 149, 51-58.
- Burkhardt-Holm, P., K. Scheurer (2007). Application of the weight-of-evidence approach to assess the decline of brown trout (*Salmo trutta*) in Swiss rivers. *Aquatic Sciences* 69, 51-70.
- Chourrout, D. (1980). Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Reproduction Nutrition Développement* 20, 727-733.
- Ciereszko, A., L. Liu, K. Dabrowski (1996). Effects of season and dietary ascorbic acid on some biochemical characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Fish Physiology and Biochemistry* 15, 1-10.
- Ciereszko, A., T.D. Wolfe, and K. Dabrowski (2005). Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir. *Aquatic toxicology* 73, 128-138.
- Claxton, L.D., V.S. Houk, T.J. Hughes (1998). Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research / Reviews in Mutation Research* 410(3), 237-242.
- De Lafontaine, Y., N. Gilbert, F. Dumouchel et al. (2002). Is chemical contamination responsible for the decline of the copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*), an endangered species, in Canada ? *The Science of the Total Environment*, 298, 25-44.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

- Devaux, A., L. Fiat, C. Gillet, S. Bony (2011). Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquatic Toxicology* 101, 405-411.
- Devaux, A., S. Bony (2013). Genotoxicity of contaminants: Comet assay. In "Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology", Féraud J.F. and Blaise C. (editors), Springer Publishers, in press.
- Diekmann, M., V. Hultsch, R. Nagel (2004). On the relevance of genotoxicity for fish population I: effect of a model genotoxicant on zebrafish (*Danio rerio*) in a complete life-cycle test. *Aquatic Toxicology* 68, 13-26.
- Dietrich, G.J., A. Szpyrka, M. Wojtczak, S. Dobosz, K. Goryczko, L. Zakowski, A. Ciereszko (2005). Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 64, 1809-1822.
- Dietrich, G.J., M., Dietrich, R.K. Kowalski, S. Dobosz, et al. (2010). Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. *Aquatic Toxicology* 97, 277-284.
- Economidis, P.S. (1995). Endangered freshwater fishes of Greece. *Biological Conservation* 72, 201-211.
- Häfeli, N., P. Schwartz, P. Burkhardt-Holm (2011). Embryotoxic and genotoxic potential of sewage system biofilm and river sediment in the catchment area of a sewage treatment plant in Switzerland. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1271-1279.
- Jha, A.N. (2004). Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552, 1-19.
- Jha, A.N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207-221.
- Kottelat, M., J. Freyhof (2007). Handbook of European freshwater species. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany, pp646.
- Lacaze, E., O. Geffard, S. Bony, A. Devaux (2010). Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline comet assay. *Mutation Research* 700, 32-38.
- Lacaze, E. Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gammarus fossarum*: développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel. Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie, Université de Metz, 2011, 368p.
- Lacaze, E., O. Geffard., D. Goye, S. Bony, A. Devaux (2011). Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. *Environmental Research* 111, 626-634.
- Lewis, S.E., R.J. Aitken (2005). DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Research* 322, 33-41.
- Lewis, C. and T.Galloway (2009). Reproductive consequences of paternal genotoxin exposure in marine invertebrates. *Environmental Science and Technology* 43, 928-933.
- Moyle, P.B., J.V.E. Katz, R.M. Quiñones (2011). Rapid decline of California's native inland fishes: A status assessment. *Biological Conservation* 144, 2414-2423.
- Ojanguren, A.F., F.G. Reyes-Gavilan, and F. Brana (1996). Effects of egg size on offspring development and fitness in brown trout, *Salmo trutta* L. *Aquaculture* 147, 9-20.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

- Perchec Pourpard, G., C., Jeulin, J. Cosson, F. Andre, R. Billard (1995). Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science* 108, 747-753.
- Perchec Pourpard, G., C. Paxion, J. Cosson, C. Jeulin, F. Fierville, R. Billard (1998). Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. *Aquaculture* 160, 317-328.
- Pérez-Cereales, S., S. Martinez-Pàramo, J. Beirao, and M.P. Herraiez (2010). Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. *Reproduction* 139, 1470-1626.
- Rohlenova, K., and A. Simkova (2010). Are the Immunocompetence and the presence of Metazoan Parasites in Cyprinid Fish Affected by Reproductive Efforts of Cyprinid Fish?. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, art. 418382.
- Rurangwa, E., A. Biegniowska, E. Slominska, E.F. Skorkowski, F. Ollevier (2002). Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanism of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comparative Biochemistry and Physiology* 131 Part C, 335-344.
- Rurangwa, E., D.E. Kime, F. Ollevier, J.P. Nash (2004). The measurement of sperm motility factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234, 1-28.
- Sanchez Argüello, P., N. Aparicio, and C. Fernández (2012). Linking embryo toxicity with genotoxic responses in the freshwater snail *Physa acuta*: Single exposure to benzo(a)pyrene, fluoxetine, bisphenol A, vinclozolin and exposure to binary mixture with benzo(a)pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 152-160.
- Santos, R., M. Palos-Ladeiro, A. Besnard, J.-M. Porcher, S. Bony, W. Sanchez and A. Devaux (2013 a). Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback. *Reproductive Toxicology* 36, 6-11.
- Santos R., M. Palos-Ladeiro, A. Besnard, J. Reggio, E. Vulliet, J.M. Porcher, S. Bony, W. Sanchez, A. Devaux (2013 b). Parental exposure to a genotoxicant of three-spined stickleback: contribution of DNA damage in male and female germ cells to further development impairment in progeny. *Ecotoxicology*, in press.
- SDAGE Rhône Méditerranée Corse. Fiches d'état des eaux. *L'eau dans le Bassin Rhône Méditerranée Corse*. <http://www.rhone-mediterranee.eaufrance.fr/>.
- Thorgaard, G.H., P.D. Scheerer, J.E. Parsons (1985). Residual paternal inheritance in gynogenetic rainbow trout: implications for gene transfer. *Theoretical and Applied Genetics* 71, 119-121.
- Wentzel, J.F., C. Gouws, C. Huysamen, E. Dyk, G. Koekemoer, P.J. Pretorius (2010). Assessing the DNA methylation status of single cells with the comet assay. *Analytical Biochemistry* 400 (2), 190-194.
- Zhou, B., W. Liu, W.H.L. Siu, D. O'Toole, P.K.S. Lam, and R.S.S. Wu (2006). Exposure of spermatozoa to duroquinone may impair reproduction of the common carp (*Cyprinus carpio*) through oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 77, 136-142.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

ANNEXES

ANNEXE 1 : Protocole du test des comètes

ANNEXE 2 : Composition des solutions utilisées

ANNEXE 3 : Dosage des protéines totales

ANNEXE 4 : Extraction de l'ATP

ANNEXE 5 : Dosage de l'ATP par bioluminescence

ANNEXE 6 : Etude préliminaire « Différence de sensibilité interpopulationnelle aux polluants au cours du stade larvaire »

*ANNEXE 7 : Etude préliminaire « Développement embryolaire chez des populations de hotus (*Chondrostoma nasus*) soumises à diverses pressions toxiques »*

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

ANNEXE 1 : PROTOCOLE DU TEST DES COMETES

INCLUSION DES CELLULES DANS LE GEL

Déposer 40µL de suspension cellulaire et 40µL de gel d'agarose à bas point de fusion sur une lame préalablement recouverte d'un gel d'agarose.

ETAPE DE LYSE CELLULAIRE

Immerger les lames dans la solution de lyse (0,8 M de NaCl, 13,5 mM d'EDTA disodique, 1,3 mM de Tris, 10% de DMSO, 1% de Triton X-100) pendant 1h30 dans une cuvette refroidie à 4°C à l'aide de pain de glace.

DEROULEMENT DE L'ADN

Immerger les lames dans le tampon d'électrophorèse (0,2 M d'EDTA disodique, 11,3 g de NaOH), fermer la cuve et maintenir le dispositif au frais à l'aide de pain de glace pendant 40 minutes.

ELECTROPHORESE

Brancher le générateur et régler les paramètres suivants : voltage : 20 V / ampérage : 300 mA / durée : 24 minutes

NEUTRALISATION ET DESHYDRATATION

Rincer les lames 3 x 5 minutes à l'aide du tampon de neutralisation (0,4 M de Tris, ajusté à pH 7,5 par de l'HCl). Les déshydrater dans l'éthanol absolu pendant 10 minutes puis bien les laisser sécher à l'air libre à température ambiante.

MARQUAGE DES LAMES POUR LA LECTURE

Préparer une solution mère de bromure d'éthidium à 20% soit 10 mg pour 50 mL d'eau distillée. Diluer cette solution 10 fois avant utilisation et déposer 50 µL sur les lamelles ; couvrir d'une lamelle et lire 100 cellules par lame.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

ANNEXE 2 : COMPOSITION DES SOLUTIONS UTILISEES

Cryopréservation

Composition :

- Sucrose 85,5 g.L-1 250 mM,
- Citrate trisodique 11,76 g.L-1 40 mM,
- DMSO 50 mL.L-1 5%

Ajustement à pH 7,6 avec une solution d'acide citrique 1M

Essai des comètes

Tampon PBS (phosphate buffered saline)

Solution stock diluée à 0,1 M.

Solution de lyse :

- NaCl 146,2 g.L-1 2,5 mM,
- EDTA disodique 37,2 g.L-1 0,1 mM,
- Tris 1,2 g.L-1 10 mM

Ajustement à pH 10 avec NaOH solide ; ajout extemporanément de 15 mL de DMSO (10% finaux) et de 1,5 mL de Triton X-100 (1% final) à 135 mL de solution mère.

Tampon d'électrophorèse

- NaCl 200 g.L-1 5 mM,
- EDTA disodique 74,4 g.L-1 0,2 mM,

Extemporément : ajout de 90 mL de NaOH (0,3 M final) et de 7,5 mL d'EDTA disodique (1 mM final) à 1,5 L d'eau distillée

Tampon de neutralisation

Tris : 48,5 g.L-1 0,4 M

Ajustement à pH 7,5 avec de l'HCl concentré

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

ANNEXE 3 : DOSAGE DES PROTEINES TOTALES

Matériel :

- * Balance.
- * Entonnoir.
- * Fiole jaugée.
- * Plaque de 96 puits.
- * Filtre sans cendre.
- * Tube Eppendorf de 1 mL et de 1,5 mL.
- * Flacon brun.
- * Pipettes

Protocole :

☞ Réaliser une gamme étalon de BSA à partir d'une solution mère à 2g/L, préparer la gamme suivante :

Tubes	1	2	3	4	5	6
Concentration de la solution fille ($\mu\text{g/mL}$)	0	25	50	100	200	400
Volume de solution mère de BSA (μL)	0	12,5	25	50	100	200
Volume H_2O_2 (μL)	1000	987,5	975	950	900	800

☞ Pour la réaction :

- Mélanger dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL, soit 500 μL de chaque concentration de la gamme, soit de chaque dilution de l'échantillon avec 500 μL de réactif (solution de fluorescamine) .
- Vortexer immédiatement 10 s.
- Distribuer 150 μL du mélange dans une plaque transparente de 96 puits en triplicat.
- Lire au fluorimètre (Fluostar, BMG Labtech) à 595 nm.

Les concentrations sont déterminées à partir d'une équation linéaire déterminée par régression à partir de la gamme étalon.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

ANNEXE 4 : EXTRACTION DE L'ATP

Matériel :

- Centrifugeuse.
- 2 plaques chauffantes.
- Tubes Eppendorf de 2 mL.
- Chronomètre.
- Tube à essai.

Avant manipulation :

- Faire chauffer de l'eau à ébullition dans une casserole.
- Préparer la centrifugeuse à 4°C avec le rotor F16-48.
- Préparer la solution d'extraction (pH 7,75). La composition est la suivante :
 - 100mM de Tris -HCl
 - 4 mM d'EDTA.

Pour 1 L : 1,49g d'EDTA et 15,76g de Tris-HCl

- Faire bouillir la solution d'extraction au micro-onde puis la placer sur une plaque chauffante.

Protocole :

- ☞ Dans le tube Eppendorf comprenant déjà 2µL de sperme ajouter 1 mL de la solution d'extraction bouillante.
- ☞ Mettre le tout dans un tube à essai.
- ☞ Rincer le tube Eppendorf avec 1 mL de la solution d'extraction.
- ☞ Ajouter la solution obtenue dans le tube à essai.
- ☞ Ajouter 0,5 ml de la solution d'extraction.
- ☞ Mettre le tube 5 min à 100°C puis immédiatement dans la glace.
- ☞
- ☞ Centrifuger 10 min à 2000g à 4°C.
- ☞ Récupérer le surnageant (environ 2 mL) à aliquoter dans des tubes Eppendorf stériles pour dosage immédiat ou pour stockage à -80°C.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

ANNEXE 5 : DOSAGE DE L'ATP PAR BIOLUMINESCENCE

Matériel :

- Plaque de 96 puits
- Fluorimètre Fluostar
- Tube Eppendorf de 1.5 mL
- Kit de dosage de l'ATP par bioluminescence (« ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II » par Roche)
- Pipette de 100 μ L
- Pipette de 1000 μ L
- Pipette de 200 μ L

Protocole

☞ Réalisation de la gamme étalon de l'ATP (de 10^{-8} à 10^{-12} M) dans de l'eau ultrapure.

Substrat utilisé : luciférine

Enzyme utilisée : luciférase Mg-dépendante (elle convertie la luciférine en oxy luciférine, un photon étant produit par molécule d'ATP consommée pour la réaction)

☞ Dans la plaque de 96 puits faire des triplicats de la gamme et des échantillons à doser

 Pour la gamme

 faire un blanc avec 100 μ L de tampon

 faire un zéro avec 50 μ L de tampon + 50 μ L d'enzyme

 Avec les différentes dilutions de la gamme et des échantillons

 mettre 50 μ L de l'échantillon + 50 μ L d'enzyme

☞ Doser au Fluostar

Les résultats permettent de déterminer la concentration en ATP par régression sur la courbe d'étalonnage. Cette équation calculée sur le logiciel en ligne ReaderFit par une régression non linéaire à 4 paramètres logistiques.

ANNEXE 6 : Etude préliminaire « Différence de sensibilité interpopulationnelle aux polluants au cours du stade larvaire »

Objectif

L'objectif est d'essayer de comprendre l'adaptation des populations d'espèces aquatiques en milieu anthropisé et plus particulièrement de mettre en évidence l'influence de l'environnement parental (qualité du milieu) sur les performances larvaires.

Nous nous attendons à observer une fitness moins bonne pour les populations de milieux contaminés du fait : 1) d'une diminution de la qualité globale des individus du fait d'une modification de la diversité génétique ou d'effets génotoxiques liés à une exposition aux contaminants, 2) d'une altération génétique des capacités de tolérance, ou enfin 3) d'un coût énergétique trop important pour des individus de moindre qualité.

La valeur sélective des individus dépend principalement de leur survie entre le stade zygote et le stade adulte et de sa fécondité ; ces 2 paramètres déterminant le nombre de descendants produits en moyenne par génotype. Dans cette partie de l'étude, la fitness est estimée indirectement au travers de l'analyse de la survie et des performances lors de la phase larvaire

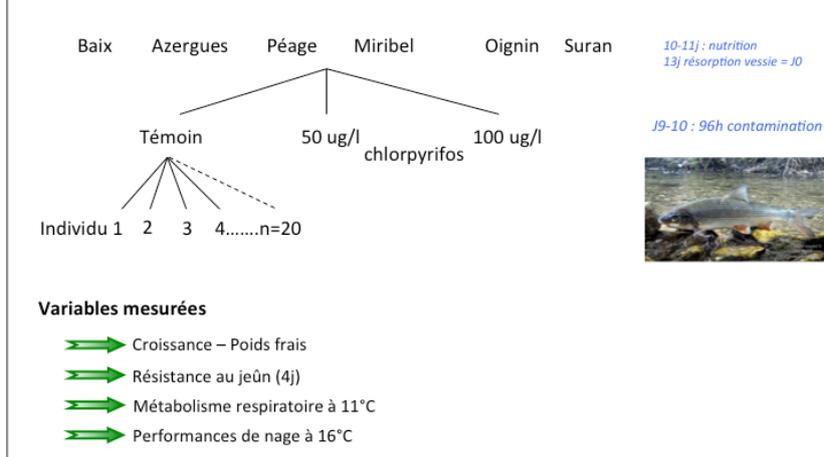
Méthode

De façon à mettre en évidence des différences de sensibilité inter-populations et tester les hypothèses décrites plus haut, nous avons utilisé une approche expérimentale. Nous avons comparé les performances de larves de hotu issues de 6 populations échantillonnées au niveau du Rhône et de ses affluents dans des milieux supposés de qualité différente et exposé à une contamination chimique (Figure 1). Nous avons obtenu des œufs dans les 6 milieux sélectionnés. Nous avons travaillé sur une mixture de plusieurs familles par population et 20 larves par traitement et par test. Après éclosion, les larves ont été élevées en conditions contrôlées (température 17°C, photopériode 12-12) dans des bacs de 200L remplis d'eau déchlorée. A la résorption de la vésicule vitelline, les larves ont été nourries *ad libitum* avec une mixture de microcrustacés. 10j après la résorption de la vésicule vitelline, les larves ont été pesées (poids frais après avoir été tamponnées dans un papier filtre) pour vérifier si il y avait des différences ou non entre les larves des différentes populations.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Figure 1 : Plan expérimental des expériences

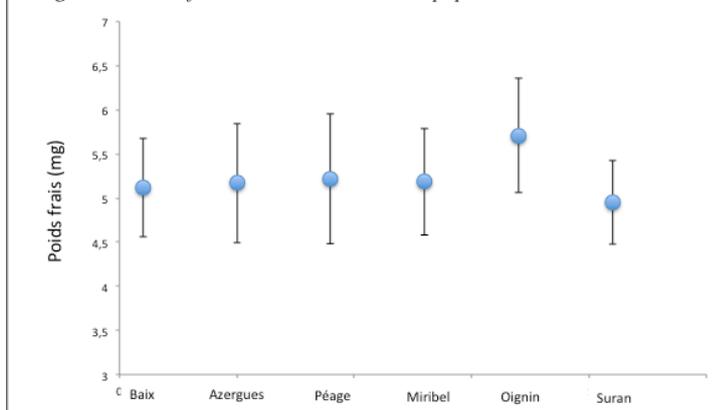


Nous avons ensuite soumis les larves des 6 populations une contamination par un neurotoxique (le chlorpyrifos) pendant 96h afin de déterminer leur sensibilité à un polluant chimique. Trois traitements sont réalisées : témoin, 50ug/l de chlorpyrifos, 100ug/l de chlorpyrifos. Les 2 concentrations testées sont non léthales. En supposant, que certaines populations soient plus résistantes ou tolérantes aux polluants chimiques, et que cela ait un coût, nous avons estimé deux paramètres liés à l'énergétique ou globalement à la qualité des individus. Il s'agit du métabolisme respiratoire des larves et de leur résistance à un jeûne de 4 jours (analyse de la survie). Enfin, les performances de nage des larves après contamination (capacité de nage, % temps actif, distance parcourue, accélération) ont également été mesurées. Pour cette performance, les résultats en cours d'analyse et ne seront pas présentés ici.

Résultats

Tout d'abord, les larves à J17 ont globalement le même poids frais quelle que soit leur population d'origine excepté les larves de l'Oignin qui sont plus lourdes relativement à celles des autres stations (Fig. 2).

Figure 2 : Poids frais des larves issue des 6 populations



Globalement, il existe une variabilité du métabolisme respiratoire larvaire entre les stations avec entre autre les larves du Suran qui ont une consommation moyenne en O₂, dans la situation témoin, plus faible que les larves issues des autres stations et

Z A B R

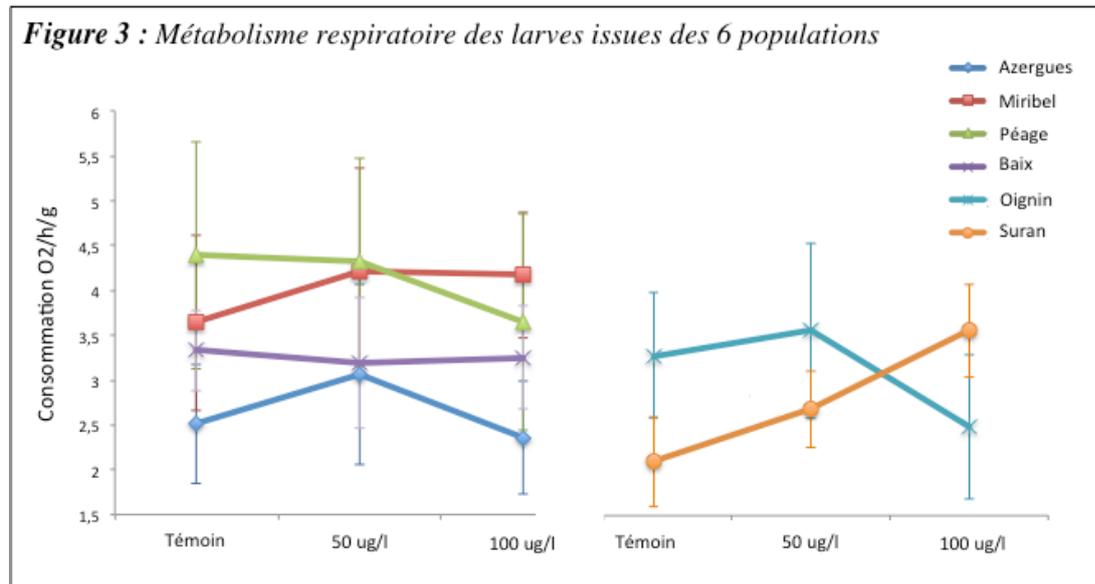
Zone Atelier Bassin du Rhône

les larves de Péage la consommation de base la plus élevée. Lorsque les larves sont soumises à différentes concentrations, nos résultats mettent en évidence 3 patrons de réponse (Fig. 3):

- Le métabolisme respiratoire des larves de Baix (station la plus contaminée) ne diffère pas entre les traitements. Malgré une tendance, les larves de Miribel suivent le même patron.

- Le métabolisme des larves d'Azergues, de Péage et de l'Oignin diminue significativement lorsque les larves sont soumises à une forte concentration de Chlorpyrifos.

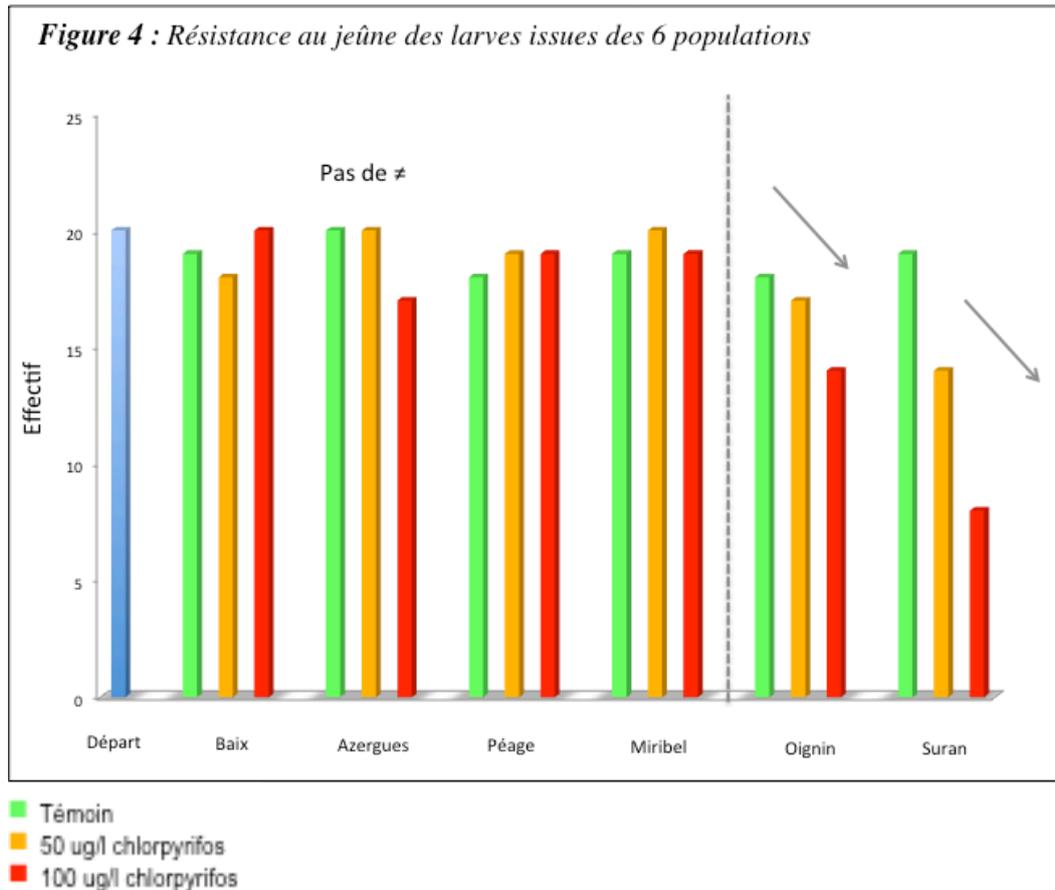
- Le métabolisme des larves de Suran (Station la moins contaminée) augmente progressivement avec le niveau de contamination.



Les larves issues des populations de milieux de moyenne ou mauvaise qualité (Baix, Azergues, Péage, Miribel) survivent bien à une période de jeûne de 4j quel que soit le traitement auxquelles elles ont été exposées préalablement (Fig. 4). En revanche, les larves issues des populations de l'Oignin et du Suran de meilleure qualité ont un taux de survie d'autant plus faible que le niveau de contamination est élevé.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône



Discussion

Nos résultats montrent que les performances des larves de hotu diffèrent en fonction de leur population d'origine en réponse à un stress environnemental.

Les performances des larves issues des milieux contaminés sont meilleures que celles issues des milieux de bonne qualité. Le métabolisme respiratoire larvaire ne diffère pas lorsque les larves de milieux contaminés sont exposées à différentes concentrations de polluants. Leur survie après un jeûne n'est pas altérée malgré une exposition de 96h à un contaminant à différentes doses. A l'inverse, les performances des larves issues de milieux de bonne qualité sont altérées lorsque les larves sont exposées à un contaminant. L'altération est d'autant plus importante que le niveau de contamination est élevé, surtout pour la population du Suran.

Ces résultats suggèrent que ces larves issues d'individus parents exposés naturellement à une contamination environnementale seraient plus résistantes ou tolérantes à un stress chimique relativement aux larves issues d'individus vivant dans un milieu chimiquement moins impacté. Ces résultats pourraient s'expliquer par une adaptation génétique de ces populations à une exposition chronique à des toxiques du fait de pressions sélectives qui favoriseraient certains génotypes plus que d'autres. Cette tolérance à la contamination chimique ne semble pas se traduire par un coût énergétique dans la mesure où la survie et le métabolisme respiratoire ne sont pas affectés lorsque les larves ont été exposées à une contamination. Elle pose cependant le problème d'une perte possible de la diversité génétique (à confirmer par analyse génétique) susceptible d'affaiblir significativement les capacités d'adaptation de la population à un environnement chimiquement perturbé.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

A l'inverse, la différence entre traitements de survie et de réponses physiologiques (métabolisme plus élevé) des larves issues de milieux de meilleure qualité chimique semblent traduire une sensibilité des individus et potentiellement un coût énergétique avec un compromis entre l'énergie investie dans les mécanismes mis en place en réponse à un contaminant et la survie.

ANNEXE 7 : Etude préliminaire « Développement embryolaire chez des populations de hotus (*Chondrostoma nasus*) soumises à diverses pressions toxiques »

Contexte - Objectifs

Les critères actuellement utilisés pour la détermination des différents stades embryonnaires et larvaires de hotu ont été définis sur des populations du Danube (Penáz, 1974). Lors d'une étude préliminaire menée par notre équipe en 2011 (résultats non publiés), les populations du Rhône semblaient répondre à des critères différents. Très peu de larves présentaient la totalité des critères propres à un stade donné *sensu* Penáz ; chaque poisson était plutôt un "composite" de plusieurs stades. L'objectif de cette étude est double :

a) re-définir précisément les critères de détermination de différents stades embryolaires des populations du Rhône, en décrivant très précisément les caractères inhérents à chaque stade et en effectuant des regroupements d'individus (les stades) à partir d'ensembles stables de caractéristiques morpho-anatomiques (les critères).

b) estimer la variabilité inter-populationnelle dans la définition de ces critères *via* des réplicats de cette étude sur des (sous) populations soumises à diverses pressions toxicologiques, et ainsi observer si des effets génotoxiques sont susceptibles d'affecter le développement.

Matériels et Méthodes

Des œufs (reproduction *in vitro*) issus de différents géniteurs capturés dans plusieurs sites contrastés, en termes de pollutions toxiques, ont été incubés dans des conditions expérimentales stables et comparables. Après éclosion, tous les deux jours pendant 3 mois, 2 alevins issus de chacun des mâles étudiés étaient prélevés et conservés dans une solution formolée. De nombreux critères morpho-anatomiques ont ensuite été relevés et/ou mesurés sur chacun des individus observés précisément sous une loupe trinoculaire.

Résultats préliminaires

Seuls les poissons les plus âgés (entre 69 et 95 jours) ont pour l'instant été étudiés. Les critères de définition des stades de développement n'ont pas encore pu être précisés. Toutefois, lors d'analyses préliminaires, il apparaît que les alevins issus de géniteurs capturés sur le site le plus impacté (Baix) semblent être plus développés, à âge égal, que les alevins issus de géniteurs capturés sur le site le moins impacté (Suran). Cette différence est-elle commune à tous les stades de développement ou simplement due à une mortalité différentielle de jeunes stades plus "fragiles" à Baix (nous n'observerions alors chez les individus âgés de ce site, que des survivants, plus robustes) ? L'analyse des individus plus jeunes devrait nous éclairer sur cette question.