

### Conclusion et perspectives de cette action

Cette expérimentation nous a permis de déterminer dans nos conditions expérimentales la chronologie du développement embryo-larvaires du hotu en observant finement les stades décrits par Penaz (1974) de l'éclosion (E8) à la fin de la résorption vitelline (L5).

Les résultats concernant le taux d'embryonnement et d'éclosion et les mesures morphométriques réalisées à différents stades de développement ne montrent pas de différence significative en ce qui concerne les paramètres mesurés pour les différentes stations. Néanmoins, le but de cette action consistant à mettre au point et à valider un système d'incubation permettant le suivi embryo-larvaire du hotu et les protocoles de mesures à réaliser sur les larves pour une action future, a été atteint.

Les informations recueillies dans ce travail ont orienté le choix d'une méthodologie pour tester de manière optimisée le lien pouvant exister entre l'intégrité du génome paternel et la qualité de la descendance chez le hotu dans le bassin du Rhône. Ce travail est en cours dans le cadre de la phase 3 de l'étude (action 34 ZABR-AERMC).

### Cadre d'utilisation:

Projet collectif associant scientifiques et gestionnaires sur le thème d'une évaluation de l'évolution de la qualité biologique du Bassin du Rhône.

A la suite de ces travaux préliminaires qui ont permis de valider la méthodologie à suivre, cette recherche se poursuit au sein de l'action 34-2012. Cette dernière vise à tester l'hypothèse d'un lien entre intégrité de l'ADN des spermatozoïdes et qualité du développement embryo-larvaire chez le hotu prélevé sur des stations chimiquement contrastées du bassin du Rhône,

### Références:

- Baumgartner A., Cemeli E., Anderson D. 2009. *The comet assay in male reproductive toxicology*. *Cell Biol.Toxicol.*, 25, 81-98.
- Braunbeck T., Böttcher M., Grund S., Holler H., Keiter S., Schwartz P., Seitz N., 2008. *Genotoxicity and fish decline- is there a functional connection?* 2<sup>nd</sup> International Symposium, *Genotoxicity in aquatic systems: causes, effects and regulatory needs*, Heidelberg, 26 pp.
- Devaux A., Pesonen M., Monod G. 1997. *Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes*. *Toxicol. In Vitro*, 11, 71-79.
- Lewis C, Galloway T., 2009. *Reproductive consequences of paternal exposure in marine invertebrates*. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 928, 933.

*Analyse de l'importance d'un dysfonctionnement de la reproduction dans le déclin observé de populations de cyprinidés du Rhône – phase 2*

*Mise en place d'un système d'incubation et mesures morphométriques des larves de hotu*

### Résumé :

Le déclin des populations de certaines espèces de poissons a été régulièrement observé dans les grands hydrosystèmes européens durant les dernières décennies. Parmi les différentes hypothèses explicatives, l'impact de l'aménagement des cours d'eau et d'une dégradation de la qualité chimique sur certains tronçons se doivent d'être vérifiés. Après avoir identifié des effets génotoxiques mesurables dans les gamètes de différentes populations de hotus, la présente action vise à mettre en place et à valider un protocole d'échantillonnage, un système expérimental d'incubation des œufs de hotus et le choix des métriques à retenir pour tester l'hypothèse d'un lien entre une pression génotoxique sur le génome gamétique et le dysfonctionnement de la reproduction de populations de hotus de différentes stations du bassin du Rhône. Une troisième phase d'étude (2012) viendra préciser la caractérisation et l'analyse de ces dysfonctionnements.

### Contexte :

Le contexte général du sujet est celui de l'analyse 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 pollués. Actuellement, 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 restent peu connues. Une étape vers une meilleure compréhension de ces impacts à long terme est d'examiner le transfert de ces effets d'une génération aux suivantes (Lewis et Galloway, 2009). En effet, une gestion rationnelle des hydrosystèmes exige la prise en compte d'indicateurs intégrateurs conditionnant la dynamique des populations de poissons. Une revue bibliographique démontre l'intérêt de mesurer l'intégrité du génome des spermatozoïdes comme indicateur pertinent dans un contexte de toxicologie de la reproduction (Baumgartner et al., 2007). Toutefois, peu d'études concernant les organismes aquatiques sont disponibles. Récemment, un certain nombre de laboratoires européens a mis en évidence le fait que parmi la batterie de biomarqueurs étudiée pour expliquer le déclin de populations de poissons, seuls ceux évaluant un impact génotoxique du milieu pouvaient être corrélés avec une diminution de l'effectif des populations (Braunbeck, 2008). 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.

## Contacts :

A. Devaux, UMR 5023 LEHNA, site ENTPE, Vaulx en Velin  
J.-M. Olivier, UMR 5023 LEHNA, site UCB Lyon I, Villeurbanne

## Objectifs:

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. Des travaux de la ZABR ont été initiés en 2010 dans le cadre de l'action 18 et ont permis d'identifier des effets génotoxiques mesurables dans les gamètes de différentes populations de hotus du bassin du Rhône. La présente action 26 a été consacrée au développement d'une méthodologie complète pour améliorer la mesure de ces événements génotoxiques et le couplage avec un impact sur la descendance.

Il était prévu de réaliser des pêches de géniteurs de hotus sur différentes stations du bassin du Rhône afin de tester le caractère opérationnel de la méthodologie décrite ci-dessous et de retenir un certain nombre de stations pour l'action suivante, choisies en fonction de différents paramètres comme la connaissance des populations de hotus en place et éventuellement de leur déclin avéré durant les dernières décennies, la facilité d'intervention au niveau logistique (repérage de la fraie, accessibilité), la connaissance de la qualité chimique du milieu.

Après capture des géniteurs de hotus par pêche électrique et réalisation de fécondation d'un pool d'œufs par chaque sperme individuel, un effort expérimental très significatif a été fourni dans le cadre de cette action 26 afin :

- de mettre en place des mesures multiparamétriques de la qualité du sperme (contenu en ATP, osmolarité, concentration en protéines totales du liquide séminal, spermatocrite et numération cellulaire),
- de mettre en place un système d'incubation des œufs de hotus après fécondation artificielle,
- d'établir une table chronologique du développement des stades embryo-larvaires de hotus dans ce système d'incubation,
- de mettre en place une culture d'algues unicellulaires utilisées comme nourriture pour l'élevage d'invertébrés (cériodaphnie, daphnie, rotifère), ainsi que la production de larves d'artémie, tous ces invertébrés étant destinés à la nourriture des alevins de hotus,
- de mettre en place un protocole des analyses morphométriques réalisées sur les larves de hotus.

## Intérêt opérationnel:

Ce projet porte sur l'analyse des risques environnementaux et de la vulnérabilité des milieux et en particulier sur le Rhône. Cette étude a pour but d'essayer de répondre directement à un des besoins de connaissance exprimé par le Plan Rhône, à savoir le développement de biomarqueurs de génotoxicité et la recherche de leur signification fonctionnelle. La finalité opérationnelle de ce projet est de mettre à disposition du gestionnaire un critère pertinent d'évaluation de l'impact du milieu sur les capacités de reproduction des poissons du Rhône et indirectement sur leur capacité de recolonisation des habitats, en proposant un éclairage complémentaire de l'approche classique de mesure de la perturbation endocrinienne.

## Principaux résultats:

### Stations investiguées

Nous avons déployé durant cette action une logistique importante visant à déterminer le moment précis du frai sur les différentes stations choisies en fonction des données hydrologiques et de température relevées.

Les stations suivantes ont ainsi fait l'objet d'un suivi très régulier dans le temps (au rythme d'une visite hebdomadaire au début de l'étude à une visite journalière en fin d'étude, sur la période mars-avril 2011) :

- stations « amonts » du bassin du Rhône : sur la Bienne, l'Oignin, les Usses, le Chéran, le Suran
- stations « intermédiaires » : le Rhône au niveau de Miribel et l'Azergues
- station « aval » : le Rhône à Péage de Roussillon

Parmi ces différentes stations des géniteurs de hotus n'ont pu être pêchés que sur les stations Suran (25.03.2011) et Oignin (04.04.2011), du fait notamment d'aléas climatiques qui ont perturbé la reproduction. Les gamètes récoltés ont permis de réaliser une fécondation artificielle et de rapatrier au laboratoire des œufs embryonnés afin de tester la méthodologie d'incubation et d'analyse sur les larves.

### Mesures sur la qualité du sperme (intégrité de l'ADN et mesures biochimiques sur liquide séminal)

La synthèse des mesures réalisées sur le sperme des géniteurs des stations Suran et Oignin est fournie dans le tableau suivant (les différentes mesures ont été réalisées sur respectivement 27 mâles du Suran et 21 mâles de l'Oignin) :

Station	Intégrité ADN sperme (% tail intensity)	Densité cellulaire (nbre spermato.x 10 <sup>9</sup> /mL)	Spermatocrite (en %)	Durée motilité sperme après activation (en min)
Suran	8,47 ± 3,12*	11,2 ± 7,85	25,17 ± 8,20	1,06 ± 0,05
Oignin	3,72 ± 1,21	14,35 ± 6,97	37,50 ± 12,15	0,81 ± 0,28

Station	ATP liquide séminal (pmoles/10 <sup>9</sup> spermato.)	Concentration protéines totales liquide séminal (g/L)
Suran	0,29 ± 0,17	6,66 ± 2,76
Oignin	0,26 ± 0,28	3,81 ± 0,85

Tableau 1. Paramètres de qualité du sperme des hotus

(\* moyenne ± écart-type)

On constate que la qualité du sperme des géniteurs des 2 stations investiguées est proche, avec notamment des niveaux de dommages à l'ADN faibles, en accord avec la faible anthropisation des bassins versants correspondants.

### Mise en place du système d'incubation

Deux modules de type Zebtec commercialisés par la société Tecniplast ont été mis en place. Il s'agit à l'origine de modules d'élevage destinés au poisson modèle zèbre (*Danio rerio*) que nous avons adaptés aux exigences de l'expérimentation sur œufs et larves de hotus.

Chaque module a été installé dans une chambre froide permettant d'assurer une régulation optimisée de la température de l'eau (elle-même déjà régulée par un refroidisseur propre au système). Chaque système d'incubation est constitué de 50 unités d'élevage (ou d'incubation) de 3,5 L alimentées en circuit semi-ouvert par de l'eau osmosée filtrée sur gaze, filtre biologique, filtre membrane et charbon actif puis stérilisée sur rampe UV. Le pH et la conductivité de l'eau sont également régulés en continu. La figure suivante montre le système dans son ensemble avec les bacs d'incubation en partie haute et le module de traitement et distribution de l'eau en partie basse.

Après plusieurs essais, nous avons pu déterminer un paramétrage optimal du système permettant d'assurer une survie maximum des stades embryo-larvaires, en particulier concernant la régulation des débits et de la température, de la fréquence de nettoyage des filtres et des grilles arrières sur chaque incubateur, et de la manipulation des différents stades de développement dans le système (depuis les œufs embryonnés jusqu'au stade alevin).

### Suivi du développement et mesures morphométriques sur la descendance

Le but était ici de connaître la table du développement embryo-larvaire du hotu dans nos conditions expérimentales ainsi que de réaliser différentes mesures morphométriques sur les larves susceptibles de renseigner sur des anomalies éventuelles du développement pouvant être reliées à la qualité de la reproduction. Ces mesures ont été réalisées sur les œufs embryonnés obtenus par fécondation artificielle des géniteurs du Suran et de l'Oignin d'une part, mais également à partir d'œufs fécondés récupérés cette-fois-ci in situ dans la rivière Azergues.