

**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 cette recherche se poursuit au sein de l'action 26/2011-2012 après :

- la mise en place au sein du LEHNA d'une salle d'incubation adaptée aux stades embryolarynaires de hotus
- une nouvelle campagne de prospection sur un nombre plus important de stations (Péage de Roussillon et Miribel pour le Rhône, plusieurs stations sur l'Azergues, le Suran, l'Oignin, la Bienne, le Chéran et les Usses)

**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? 2nd 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****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 vérifiées. Nous proposons de tester l'hypothèse d'un dysfonctionnement de la reproduction de populations de hotus suite à une pression génotoxique sur le génome gamétique dans différentes stations du bassin du Rhône.

**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 ont 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 :**

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





## Objectifs:

Cette action constitue la première partie exploratoire d'une étude plus large visant à étudier le lien entre une modulation de la dynamique de population de hotus du Rhône (*Chondrostoma nasus*) et un impact sur la fonction de reproduction lié à un stress chimique génotoxique. Au plan méthodologique, une première étape visait à l'évaluation d'un éventuel impact génotoxique sur les gamètes de poissons provenant de stations du Rhône pour lesquelles on disposait de données démographiques démontrant un déclin ou non des populations en place. Les géniteurs de hotus ont été pêchés sur les sites choisis au moment de la fraie par pêche électrique. Le sperme des mâles a été prélevé par stripping et conditionné au froid dans l'attente de la mesure au laboratoire du niveau de dommages à l'ADN dans le noyau des spermatozoïdes par l'essai des comètes en conditions alcalines (Devaux et al., 1997). La structure génétique des populations en place a été étudiée par analyse de marqueurs neutres (microsatellites) afin de s'assurer de l'existence (ou pas) de populations génétiquement homogènes sur les stations investiguées dans le but de pouvoir réaliser (ou pas) des comparaisons inter-sites. Une seconde étape a concerné l'évaluation du succès de la reproduction par la mesure de différents paramètres descripteurs (fécondité, taux d'embryonnement, anomalies embryonnaires et larvaires) sur les pontes prélevées sur les galets au niveau du lieu de fraie, rapatriées puis incubées au laboratoire. Une troisième étape concernait l'étude par station du couplage entre niveau d'intégrité moyen de l'ADN des spermatozoïdes et réussite de la reproduction.

## Intérêt opérationnel:

Ce projet s'inscrit dans l'axe 1 de l'accord cadre Agence de l'Eau-ZABR concernant l'analyse des risques environnementaux et de la vulnérabilité des milieux, et en particulier dans le Plan Rhône. Cette étude a pour but d'essayer de répondre directement à un des besoins de connaissance exprimé par l'Agence de l'Eau, 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:

Trois stations ont été choisies à la fois au vu des données de qualité (RCS et RCO) et des informations disponibles concernant l'importance des populations de hotus en place. Les stations qui ont été investiguées sont les suivantes (dans un ordre croissant de qualité du milieu et des populations de hotus recensées) : le Rhône à Péage de Roussillon, la Bienne à Lavancia-Epercy et le Suran au niveau de Pont d'Ain. Un protocole a été établi dont les grandes lignes sont :

- surveillance le plus fréquemment possible des sites potentiels de fraie (2 à 3 fois par semaine à partir d'une température de 10°C de l'eau).
- dès la présence constatée des géniteurs sur le radier, 30 mâles spermiantes et au minimum 3 femelles ovulées présentant des oeufs de bonne qualité sont capturés par pêche électrique.
- les poissons sont mesurés, des écailles sont prélevées pour mesure de l'âge ainsi qu'un morceau de nageoire pour analyse génétique.
- les femelles sont strippées et leurs oeufs poolés.
- le sperme des mâles est collecté individuellement et utilisé sur place pour féconder un aliquote de 3000 oeufs environ en utilisant l'eau de la rivière comme dilueur d'insémination. Un faible volume de sperme est dilué dans du tampon de cryopréservation puis congelé dans l'azote liquide.
- les oeufs fécondés sont alors placés à l'ombre et gardés à la température de la rivière durant une heure pendant la phase de durcissement de l'oeuf.
- des oeufs pondus et fécondés sont également prélevés sur le substrat du radier.

De retour au laboratoire, les oeufs issus de la fécondation artificielle et prélevés sur le substrat de la rivière sont mis en incubation dans des aquariums placés en chambre froide à 12°C et oxygénés par bullage.

La chronologie du développement a été suivie en décrivant les différents stades clés du développement exprimé en degrés-jours, certains écarts ayant été mis en évidence par rapport aux tables disponibles dans la littérature (voir exemple figure 1).

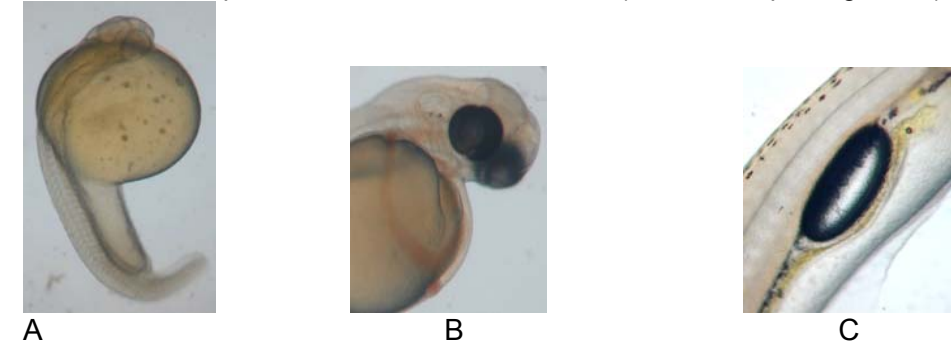


Figure 1. Exemples de stades de développement du hotu dans les conditions du laboratoire. A : Détachement et début de mobilité de la queue, environ 50 somites  
B : Flux sanguin visible autour du vitellus et dans la tête  
C : Vessie natatoire remplie de gaz

Un certain nombre d'anomalies ont également été relevées chez les alevins issus des géniteurs pêchés dans le Rhône à Péage de Roussillon (Figure 2).

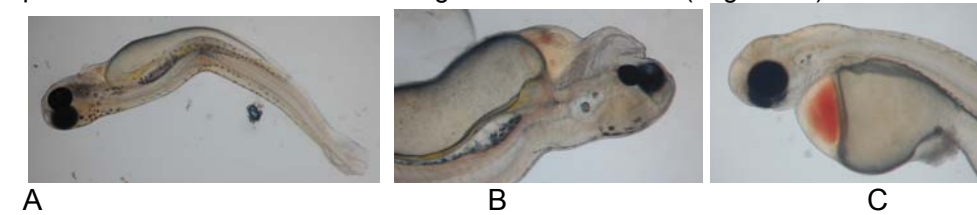


Figure 2. Exemples d'anomalies du développement larvaire du hotu. A : déformation du squelette ; B : anomalie buccale ; C : anomalie cardiaque

Le niveau de dommages présent dans l'ADN des spermatozoïdes a été mesuré par l'essai des comètes en conditions alcalines qui permet de révéler des cassures directes, des sites alcali-labiles et une réparation incomplète des dommages primaires (Devaux et al., 2007). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'ADN dans la queue de la comète, paramètre linéairement lié aux nombres de cassures de l'ADN (Figure 3).

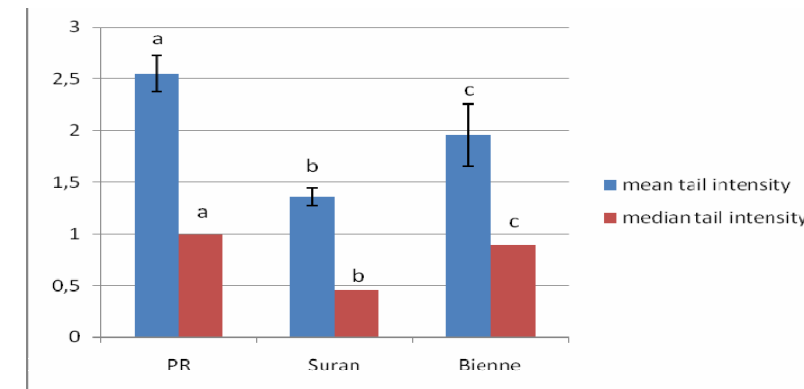


Figure 3. Dommages à l'ADN spermatique exprimés comme la moyenne du pourcentage d'ADN dans la queue (en bleu, mean tail intensity) ou comme la médiane (en rouge, median tail intensity). Les barres représentent l'écart-type et une lettre différente signifie une différence au seuil 5% entre les stations. PR : Péage de Roussillon

Les résultats montrent une différence significative des dommages à l'ADN dans le sperme entre les mâles pêchés aux différentes stations, par ordre croissant de dommages : Suran < Bienne < Péage de Roussillon. Il est à noter cependant que le niveau de dommages reste très faible (<3%) et que le différentiel observé entre ces stations au plan de l'impact génotoxique n'est probablement pas biologiquement significatif en termes d'impact sur la descendance. Le couplage entre niveau de génotoxicité spermatique et qualité de la descendance (mortalité et développement) n'a pu être réalisé durant cette étude exploratoire du fait du caractère inadapté des installations d'incubation au laboratoire, qui ont amenés à une mortalité larvaire importante. Afin de pallier ce problème une demande de financement a été faite auprès de l'Agence de l'Eau pour acquérir un matériel spécifiquement dédié à l'incubation des oeufs de poisson. Cet équipement a pu être mis en œuvre au printemps 2011 dans le cadre de l'action 26/2011-2012 dans la continuité de la présente action 18/2010. La caractérisation génétique des populations de hotus en place est en cours et sera complétée par les échantillons prélevés durant les campagnes 2011 et 2012.