

Cadre d'utilisation :

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.

L'action 34 est ainsi un projet collectif sur le bassin du Rhône associant scientifiques et gestionnaires qui a permis 1) la mesure d'effets génotoxiques liés à la présence de contaminants chez des populations de poissons présentant un déclin démographique, 2) l'analyse des conséquences de ces effets génotoxiques en terme de reprotoxicité avec démonstration de l'atteinte du recrutement chez l'espèce hotu, 3) d'apporter un éclairage complémentaire dans la réflexion à mener sur les actions de remédiation physique de l'habitat dans le bassin du Rhône devant tenir compte des capacités de colonisation des espèces piscicoles.

Références :

- 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.
- 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.
- 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.
- Kottelat, M., J. Freyhof (2007). Handbook of European freshwater species. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany, pp646.
- 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, C., T. Galloway (2009). Reproductive consequences of paternal genotoxin exposure in marine invertebrates. *Environmental Science and Technology* 43, 928-933.
- 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.

Contacts :

A. Devaux, UMR 5023 LEHNA-IPE, USC INRA 1369 IGH
J.-M. Olivier, UMR 5023 LEHNA-BEL

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

Résumé :

Le but de ce travail était 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. La présente étude démontre l'existence de ce lien sur des échantillons de hotus pêchés respectivement sur le Suran (un affluent du bas cours de l'Ain), et les stations du Rhône (Canal de Miribel et vieux-Rhône de Baix le Logis Neuf). Différents éléments d'appréciation de la fitness (qualité générale des géniteurs, intégrité de l'ADN du sperme, qualité de la descendance) montrent 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. Ces résultats doivent être pris en compte dans la réflexion sur le succès des actions destinées à améliorer les conditions d'habitat physique des organismes aquatiques est conditionné par la capacité des espèces aquatiques à (re)coloniser des habitats modifiés dans la limite d'une fitness suffisante.

Contexte :

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 reproduction et la survie des individus, compromettant ainsi la dynamique des populations. 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 (Devaux *et al.*, 2011). 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). Si les causes potentielles de ce déclin sont nombreuses, 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 (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.



Objectifs :

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 potentiel '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.

Intérêt opérationnel :

Ce travail porte sur l'analyse des risques environnementaux et de la vulnérabilité des milieux et en particulier sur le Rhône. Il 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 cette étude 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 identifier le moment précis du frai sur les différentes stations choisies en fonction des données hydrologiques et de température relevées pour échantillonner des hotus matures mâles et femelles.

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 2012) :

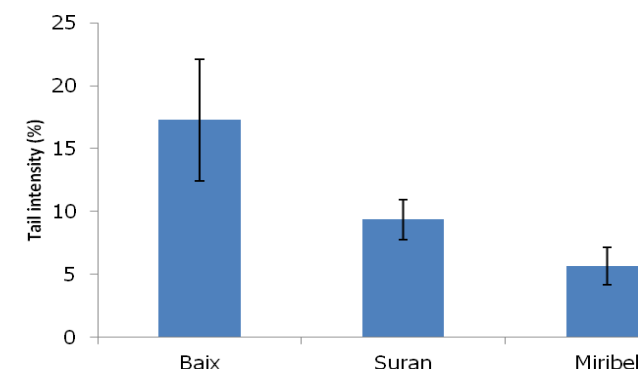
- station « amont » du bassin du Rhône : le Suran
- stations « intermédiaires » : le Rhône au niveau du Canal de Miribel et l'Azergues
- stations « aval » : les vieux- Rhône de Péage de Roussillon et de Baix-le-Logis-Neuf.

Qualité du sperme

Sur les stations ayant permis de pêcher suffisamment de mâles et de femelles pour l'étude (Suran, Miribel et Baix), les mesures biochimiques effectuées sur le sperme (contenu en ATP, densité en spermatozoïdes, concentration en protéines totales, pH et pression osmotique du liquide séminal) ne mettent en évidence que des différences faibles, notamment pour la teneur en protéines suivant le classement Suran>Miribel>Baix. Le contenu en ATP du sperme ne présente pas de différence entre les hotus de ces différentes stations ce qui est cohérent avec l'absence également d'une différence du pouvoir fécondant du sperme.

Intégrité du génome spermatique

A l'opposé, le niveau de dommages à l'ADN des spermatozoïdes mesuré par l'essai des comètes diffère significativement entre les stations avec : Baix>Suran>Miribel.



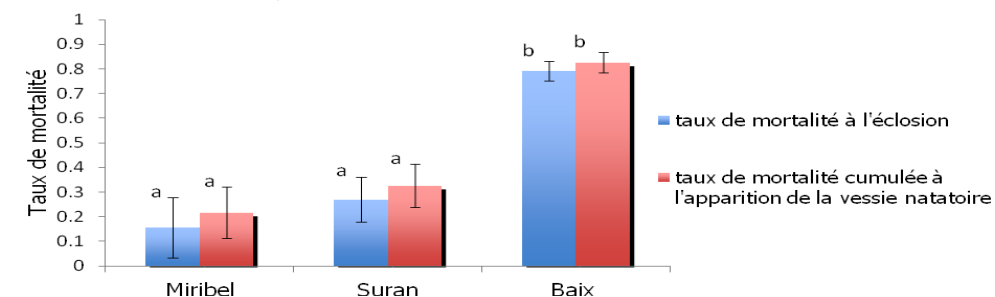
Endommagement de l'ADN spermatique (moyennes des médianes du tail intensity) (Baix>Suran>Miribel, p<0,05)

Qualité de la descendance

La mesure du taux d'anomalies sur la descendance a été réalisée aux 2 stades critiques du développement embryo-larvaire que sont l'éclosion et la fin de résorption de la vésicule vitelline. Les résultats (tableau ci-dessous) montrent des différences significatives entre les descendants issus des géniteurs des différentes stations :

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%

De la même manière le taux de mortalité mesuré à l'éclosion et à l'apparition de la vessie natatoire (fin de résorption) suit la même évolution entre les alevins issus de parents des différentes stations (sachant que dans ce cas Miribel n'est pas différent du Suran) :



Le taux d'anomalies et le taux de mortalité des larves de hotus sont corrélés positivement avec le taux de dommages à l'ADN mesuré dans le sperme des pères de chaque fratrie. Il s'agit de la première démonstration de ce lien réalisée *in situ*. Elle conforte les résultats obtenus en conditions contrôlées chez d'autres espèces de poissons (Devaux *et al.*, 2011 ; Santos *et al.*, 2013) et d'invertébrés (Lewis et Galloway, 2009 ; Lacaze *et al.*, 2011).

Au bilan, cette étude apporte une information centrale sur une diminution avérée de la fitness (lue ici comme une atteinte de la reproduction) chez les populations de hotus vivant dans des zones fortement anthropisées telles que la station de Baix. Dans ce contexte, il convient de s'interroger 1) sur les mesures nécessaires à une réduction significative des intrants polluants dans le Rhône, 2) sur l'intégration d'études sur la fitness des organismes aquatiques dans les problématiques concernant des actions de réhabilitation l'habitat physique lorsque la fitness des poissons est altérée.