

Accord Cadre ZABR- Agence de l'Eau Fiche résumé

Titre du projet : **Etude du lien entre qualité du génome des gamètes et reproduction comme un élément explicatif du déclin des populations de hotus dans le bassin du Rhône**

Personnes responsables : Alain Devaux et Jean-Michel Olivier

Equipes de recherche « ZABR » concernées :

Laboratoire des Sciences de l'Environnement, ENTPE, Vaulx en Velin ; évaluation génotoxique au laboratoire (100 %), suivi développement embryonnaire (50%), expérimentation terrain (50%)

Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux, UMR 5023 Lyon I ; analyse de la variabilité génétique (100%), suivi développement embryonnaire (50 %), expérimentation terrain (50%)

Autres partenaires :

- Recherche : Université de Provence (génétique des populations, EA 3781)
- Institutionnel : Agence de l'Eau, ZABR

Thème de rattachement ZABR :

Flux polluants, écotoxicologie, écosystèmes

Thème de rattachement Agence de l'Eau :

Les risques environnementaux et la vulnérabilité des milieux

Site de rattachement ZABR:

Axe Rhône

Finalités et attendus opérationnels (1/2p):

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. 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.

Ce projet est dans la continuité directe de l'action 18 en cours, inscrite 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. 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 de la contamination chimique sur les capacités de reproduction des poissons du Rhône, en proposant un éclairage complémentaire de l'approche classique de mesure de la perturbation endocrinienne.

D'autre part, dans un contexte de restauration de l'habitat physique du fleuve, et en sachant que le hotu est une des espèces susceptibles de répondre positivement aux actions de restauration, et notamment aux augmentations de débits réservés dans les sections court-circuitées, il est apparu essentiel de rechercher les causes potentielles du déclin et/ou du maintien des populations dans différents secteurs non

connectés du fleuve. Dans ce cadre, la caractérisation génétique des sous-populations ou des populations étudiées est une étape nécessaire qui en complément de l'analyse de l'intégrité génétique des gamètes mâles et du développement embryolaire de la descendance devrait permettre de mieux comprendre les modalités de maintien des populations dans les secteurs étudiés. L'étude du couplage pouvant exister entre génotoxicité au niveau des cellules germinales-impact sur la descendance et à terme sur la dynamique de population de poissons est une question scientifique centrale de l'écotoxicologie aquatique reconnue au plan international (voir SETAC 2010). Il est prévu de valoriser scientifiquement ces points au travers de publications.

Objectifs et méthodologie (1p) :

L'action proposée pour l'année 2011 reprend les points principaux de l'action 18 en cours et a pour but d'étudier d'autres stations sur le bassin du Rhône à la fois pour l'évaluation génotoxique et l'analyse génétique, et d'optimiser le suivi du développement embryonnaire. L'étude dans sa globalité doit être considérée comme un travail initial sur la problématique définie nécessitant à minima 3 années d'expérimentation (2010-2012) (faisabilité, analyse des premiers résultats, réplication des expériences, et définition d'une stratégie de recherche à moyen terme en fonction de l'expérience acquise). Le calendrier prévu est le suivant :

- 2010, première année du projet : identification des contraintes expérimentales qui sont principalement la surveillance des frayères, l'échantillonnage de terrain, la fécondation *in vitro*, l'incubation et le suivi du développement embryonnaire au laboratoire (caractérisation des différentes phases du développement chez le hotu, analyse des anomalies rencontrées). Dans la limite des contraintes évoquées au paragraphe précédent, les premiers résultats justifient le suivi sur 2 ans des populations étudiées.
- 2011 : expérimentations sur les sites investigués en 2010 en élargissant à de nouvelles stations complémentaires sur le Haut-Rhône et le Bas-Rhône. Mise en place du module d'incubation des œufs fécondés. Optimisation du protocole de mesures des anomalies embryonnaires et du suivi de la croissance des alevins à moyen terme (2 à 3 mois).
- 2012 : réplication des expérimentations 2011 en tenant compte des différentes améliorations possibles (optimisation de l'évaluation génotoxique (essai couplé à l'utilisation d'enzymes de réparation spécifiques), du choix des sites, des caractéristiques de l'incubation au laboratoire telles que la température et la photopériode). Analyse des résultats obtenus, rédaction du rapport final, valorisation scientifique. Si les résultats s'avèrent concluants (= permettant de renseigner les questions scientifiques initialement posées et de confirmer l'adéquation des méthodologies employées) une stratégie de recherche à long terme sur cette problématique sera élaborée, avec une possibilité de l'étendre à d'autres espèces piscicoles.

L'action 2011 reprend les points principaux de l'action 18 en cours. La première étape concerne l'évaluation de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes de hotus provenant de stations si possible contrastées en termes de pression chimique anthropique et/ou de déclin de population avéré. Nous avons pu à ce jour suivre 3 stations sur le bassin du Rhône (Bienne, Suran et Bas-Rhône à Péage de Roussillon) sur lesquelles ont été capturés des géniteurs de hotus et ont été prélevées des pontes fécondées présentes sur les galets du site de frai. Lorsque cela était possible, les gamètes (sperme et ovocytes) ont été collectées et une fécondation artificielle a été réalisée *in situ* par fratrie (fécondation d'un aliquote d'un même pool d'œufs par un sperme individuel), les pontes fécondées étant ensuite rapatriées au laboratoire. Des échantillons de sperme ont été également ramenés au laboratoire afin d'évaluer le niveau d'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, ceci individuellement pour chaque sperme en vue d'étudier ultérieurement le lien éventuel avec le développement de la F1 correspondante. **Il convient de confirmer les résultats obtenus lors de cette première étude et de l'étendre à de nouvelles stations du bassin du Rhône en augmentant sensiblement l'investissement humain sur le terrain.** Le choix d'un nombre élevé de stations pour cette action 2011 est délibéré, il prend en compte la possibilité d'un échec de l'échantillonnage des poissons sur les sites de frai (timing de la reproduction, aléas climatiques...) :

- Rhône (sections court-circuitées) : Chautagne (?), Belley (?), Brégnier-Cordon, Canal de Miribel, Pierre-Bénite, Péage-de-Roussillon, Baix-le-Logis-Neuf (?)
- Loue (?)
- Bienne , Ain-Suran

Les « ? » soulignent des incertitudes sur la possibilité de réaliser un échantillonnage pendant le frai.

- La deuxième étape concerne le suivi du développement embryonnaire et larvaire sur les pontes fécondées naturellement ou artificiellement et maintenues au laboratoire dans des aquariums à 13°C oxygénés par bullage. Cette étape est en cours actuellement pour certaines stations. **Après cette première expérience, il apparaît incontournable de se doter d'une structure d'incubation adaptée aux besoins de l'étude .**
- Une démarche complémentaire a été menée en parallèle et concerne une analyse génétique des populations en place qui peut renseigner sur l'existence de populations génétiquement proches ou distinctes. Outre les informations que peut apporter cette approche sur la connaissance du fonctionnement des populations de hotus dans le Bassin du Rhône, les résultats de l'analyse génétique peuvent permettre de comparer d'autres variables biologiques (telle que l'intégrité de l'ADN) en tenant compte d'un contexte génétique donné (plus ou moins homogène entre les sites). Pour ce faire des prélèvements de nageoire pectorale ont été réalisés sur les poissons pêchés aux différentes stations évoquées pour analyse à venir de la diversité génétique via l'étude du polymorphisme de marqueurs neutres tels que les microsatellites.

En résumé, les acquis de 2011 seront donc de disposer : i) de résultats sur un lien entre qualité du génome des gamètes et reproduction du hotu sur un panel de stations du bassin du Rhône, ii) des premiers résultats d'analyse de la structure génétique de la population étudiée (ou des sous-populations étudiées).

Il est prévu pour 2012 : i) de confirmer les tendances observées et d'élargir si possible l'étude à de nouvelles stations pour lesquelles on dispose de données précises du niveau de contamination chimique sur une chronique décennale pouvant être fournies par l'AERMC et l'ONEMA, ceci afin de mieux expliquer l'atteinte génotoxique des gamètes de hotu, ii) de définir une stratégie de recherche à plus long terme permettant d'associer aux études de génotoxicité un suivi de la dynamique et de la génétique des populations étudiées (notamment évolution des structures en taille et effet de sélection), ainsi que la prise en compte du changement climatique (pouvant affecter entre autres la qualité de la production primaire dont dépend directement un organisme brouteur de périphton tel que le hotu).