



**HAL**  
open science

# Impact des polluants sur la gamétogenèse de *Gammarus fossarum*

Khédidja Tair-Abbaci

► **To cite this version:**

Khédidja Tair-Abbaci. Impact des polluants sur la gamétogenèse de *Gammarus fossarum*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-01472145

**HAL Id: hal-01472145**

**<https://ephe.hal.science/hal-01472145>**

Submitted on 20 Feb 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES**

**Sciences de la Vie et de la Terre**

**MEMOIRE**

Présenté par

**TAÏR-ABBACI Khédidja**

Pour l'obtention du Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

**Impact des polluants sur la gamétogenèse de**  
***Gammarus fossarum***

**Soutenu le 09 Novembre 2016**

**Devant le jury suivant :**

M. MIAUD Claude (Directeur d'Etudes EPHE)	Président
M. GEFFARD Olivier (Chargé de recherches)	Tuteur Scientifique
M. EXBRAYAT Jean Marie (Directeur d'Etudes EPHE)	Tuteur pédagogique
M. BONNARD Marc (Maitre de conférences)	Rapporteur
Mme. BERTHIER Christine (Maitre de conférences)	Examineur

**Mémoire préparé sous la direction de :**

M. GEFFARD Olivier

Laboratoire de (Ecotoxicologie UR "Milieux aquatiques, écologie et pollutions" IRSTEA-Centre de Lyon-Villeurbanne) Directeur du centre : BOISTARD Pascale

M. EXBRAYAT Jean Marie

Laboratoire de (Laboratoire de Reproduction et Développement Comparé, Université Catholique de Lyon) Directeur : EXBRAYAT Jean Marie  
EPHE (Sciences de la Vie et de le Terre)

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**

**ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES**

**Sciences de la Vie et de la Terre**

**MEMOIRE**

Présenté par

**TAÏR-ABBACI Khédidja**

Pour l'obtention du Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

**Impact des polluants sur la gamétogenèse de**  
*Gammarus fossarum*

**Soutenu le 09 Novembre 2016**

**Devant le jury suivant :**

M. MIAUD Claude (Directeur d'Etudes EPHE)	Président
M. GEFFARD Olivier (Chargé de recherches)	Tuteur Scientifique
M. EXBRAYAT Jean Marie (Chargé d'Etudes EPHE)	Tuteur pédagogique
M. BONNARD Marc (Maitre de conférences)	Rapporteur
Mme. BERTHIER Christine (Maitre de conférences)	Examineur

**Mémoire préparé sous la direction de :**

M. GEFFARD Olivier  
Laboratoire de (Ecotoxicologie UR "Milieux aquatiques, écologie et pollutions" IRSTEA-  
Centre de Lyon-Villeurbanne) Directeur du centre : BOISTARD Pascale

M. EXBRAYAT Jean Marie  
Laboratoire de (Laboratoire de Reproduction et Développement Comparé, Université  
Catholique de Lyon) Directeur : EXBRAYAT Jean Marie  
EPHE (Sciences de la Vie et de le Terre)

# Impact des polluants sur la gamétogenèse de *Gammarus fossarum*

TAÏR-ABBACI Khédidja

Soutenu le : 09 novembre 2016

## Résumé

Les écosystèmes aquatiques sont soumis de façon continue à des sources de contamination d'origines anthropiques et naturelles contribuant à leur appauvrissement. L'absence d'une espèce dans une communauté peut être le résultat de l'impact direct d'un stress physique et/ou chimique sur cette espèce. Face à la multiplicité des substances polluantes et à la complexité de leurs effets sur l'écosystème aquatique, le développement de nouveaux marqueurs pour le monitoring et l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques paraissait nécessaire et très pertinent. Dans ce contexte, le but de ce travail était : 1) la caractérisation des gonades au cours de la gamétogenèse ainsi que l'impact de polluants modèles sur la structure tissulaire, chez les femelles et les mâles *Gammarus fossarum*, ayant pour objectif d'une part l'acquisition de connaissances de la structure tissulaire des gonades chez cette espèce et d'autre part de diagnostiquer une pathologie ; 2) de développer et valider l'utilisation du test des comètes dans notre laboratoire via l'utilisation des spermatozoïdes sur une sélection du site de référence, ainsi que l'étude des niveaux de bases pour le site choisi, et enfin l'exposition des gammares mâles aux effluents hospitalier et urbain de la station d'épuration Bellecombe (Haute Savoie), ceci dans le but de mieux comprendre l'effet des polluants sur la reproduction chez cette espèce ; 3) de proposer un protocole de conservation des spermatozoïdes par la congélation dans le but de proposer le test des comètes dans la surveillance à large échelle des milieux aquatiques. Les résultats de nos travaux ont permis une description histologique de l'anatomie de la gonadogenèse mâle et femelle, ce qui nous a permis de caractériser la pathologie émanant des contaminations par des polluants chimiques tels que le Cadmium, le Pyriproxifène, et le méthoxyfénozide. Nos observations ont également permis de noter les différentes lésions ovariennes et caecales dues à l'exposition aux effluents de la station d'épuration. La mise en place de bio-test telle que la numération nous a permis de quantifier et d'évaluer la spermatogenèse et d'observer la maturation des spermatides en spermatozoïdes. La mise en place du test des comètes dans notre laboratoire ainsi que les niveaux de bases nous ont permis la détection et la quantification du stress génotoxique des spermatozoïdes de gammares liées aux effluents hospitalier et urbain de la station d'épuration.

## MOTS-CLES

Bio-test; Cryo-congélation; Cycle de reproduction; *Gammarus fossarum*; Génotoxicité; Histologie; Milieu Dulçaquicoles; Numération; Spermatozoïdes.



# Remerciements

---

*Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries.*  
Marcel Proust

Je ne peux achever ce travail sans remercier les personnes qui ont cru en moi, qui m'ont soutenu, encouragé et qui ont contribué à l'aboutissement de ce diplôme.

Je remercie Pascale BOISTARD, directeur du centre Lyon-Villeurbanne pour m'avoir permis de réaliser ce diplôme dans d'excellentes conditions.

Je tiens à remercier le Pr Jean-Marie EXBRAYAT, mon encadrant pédagogique qui a suivi mon évolution, et ce depuis les années de la formation « Histotech 2002 ». Merci pour vos enseignements, vos conseils et votre humanisme.

Je remercie avec le même enthousiasme le Dr Olivier GEFFARD, mon encadrant scientifique et responsable du laboratoire d'écotoxicologie, qui est à l'origine de ce sujet. Merci pour votre confiance, vos encouragements et votre encadrement.

Je remercie grandement le Dr Claude MIAUD de CEFÉ-Montpellier pour avoir accepté la présidence du jury de ce diplôme, le Dr Marc BONNARD de UMR-1 02 SEBIO INERIS-URCA-ULH-Reims et le Dr Christine BERTHIER de l'Université Claude Bernard-Lyon1 d'en être rapporteur.

Je tiens également à adresser mes ardents remerciements à Sylvie BONY et Alain DEVAUX pour m'avoir accordé du temps pour m'initier au test des comètes, et me faire profiter de leurs connaissances et expériences dans le domaine de la Génotoxicologie. Merci pour votre sympathie et votre bonne humeur.

Je remercie Jeanne GARRIC, responsable du laboratoire d'Ecotoxicologie jusqu' à 2012, qui depuis le début de ma carrière au sein de ce laboratoire, m'a encouragé pour la réalisation de ce projet.

Je souhaite également remercier Arnaud CHAUMOT pour son aide précieuse en traitement statistique. Merci infiniment Arnaud pour ta disponibilité.

Je remercie également Adriana WIGH pour le temps passé ensemble et nos longues discussions sur le chemin de la station d'épuration.

Je remercie Adeline FRANÇOIS pour son investissement dans la préparation des campagnes d'implantations des expositions dans la station d'épuration. Je tiens à remercier également Patrice NOURI pour son aide et sa disponibilité.

Par ces quelques mots, je souhaiterais remercier l'ensemble des personnes que je côtoie tous les jours et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, les membres de mon laboratoire, les appuis à la recherche, sans oublier ma famille qui m'a toujours soutenu et cru en moi, sans son amour je n'en serais pas là aujourd'hui, ma mère, mon mari, mes enfants, beaux-enfants et ma petite fille chérie. Je ne saurai terminer sans remercier Géraldine GOUYSSE pour son soutien et son amitié.

*Je dédie ce diplôme  
à la mémoire de  
Mama et Dada*

Résumé	3
Remerciements	5
Liste des abréviations	10
Liste des figures	11
Liste des tableaux	14
Liste des publications	15
Liste des posters	17
Introduction	18
<b>Chapitre I : Synthèses bibliographiques</b>	<b>23</b>
1. Espèce cible, <i>Gammarus fossarum</i>	23
1.1. Ecologie et Biologie du gammare	23
1.2. Reproduction du gammare	25
1.2.1. Le cycle de mue	26
1.2.2. Anatomie du système reproducteur	26
2. Biomarqueurs de toxicité chez <i>G. fossarum</i>	28
2.1. Marqueurs d'impacts génotoxiques	28
2.2. Principe et intérêt du test des comètes	29
2.3. Utilisation du test des comètes en écotoxicologie	32
3. Problématique de ce travail de recherche	33
<b>Chapitre II : Matériels et méthodes</b>	<b>35</b>
1. Pêches et stabulation des gammares	35
2. Expérimentations sur les gammares	37
2.1. Expérimentations en laboratoire	37
2.1.1. Caractérisation tissulaire des gonades au cours de la gamétogenèse	37
2.1.2. Présentation des contaminants modèles	37
2.1.2.1. Le Cadmium	37
2.1.2.2. Le pyriproxifène & le méthoxyfénoside	38
2.1.3. Exposition des gammares aux contaminants modèles	38
2.1.3.1. Impact du Cd sur la structure tissulaire des gonades	38
2.1.3.2. Impact du PYR et MET sur la spermatogenèse	38
2.1.3.3. Technique histologique	38
2.1.3.4. Traitement statistique des résultats	39
2.2. Expérimentation sur le terrain - in situ	40
2.2.1. Présentation de la station d'épuration de Bellecombe – SIPIBEL	40
2.2.2. Tri et encagement des gammares	41
2.2.3. Exposition des gammares aux effluents de la station d'épuration	42

3. Mesure des réponses biologiques chez le gammare <i>G. fossarum</i>	45
3.1. Etude histologique des tissus gonadiques	45
3.1.1. Standardisation de la recoupe des femelles	45
3.1.2. Caractérisation histologique et morphologique des cellules Germinales mâles	46
3.2. Etude de la qualité des cellules germinales mâles	47
3.2.1. Optimisation de la méthode d'extraction et de comptages des spermatozoïdes chez <i>G. fossarum</i>	47
3.2.1.1. Utilisation de broyages manuel et mécanique	47
3.2.1.2. Validation de la méthode de comptage	48
3.2.2. Evaluation de la viabilité des spermatozoïdes sur cellules de Malassez	50
3.2.3. Evaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes par le test des comètes	52
3.2.3.1. Dissection et prélèvement des gonades	53
3.2.3.2. Dépôt des cellules sur lames	53
3.2.3.3. Lyses cellulaire	54
3.2.3.4. Dénaturation de l'ADN	54
3.2.3.5. Electrophorèse des fragments d'ADN	54
3.2.3.6. Neutralisation	54
3.2.3.7. Fixation et conservation des lames	54
3.2.3.8. Coloration des lames	55
3.2.3.9. Lecture des lames et traitement statistique des résultats	55
<b>Chapitre III : Résultats et Discussion</b>	<b>57</b>
1. Présentation de l'ovogenèse et de la spermatogenèse	57
2. Caractérisation de l'appareil génital femelle	58
3. Caractérisation du cycle de reproduction	61
3.1. Structure des ovaires aux différents stades de l'ovogenèse	61
3.1.1. Ovogonies indifférenciées	61
3.1.2. Vitellogenèse primaire	62
3.1.3. Vitellogenèse secondaire	66
4. Caractérisation du parasitisme chez la femelle	68
5. Caractérisation de l'appareil génitale mâle	70
5.1. Caractérisation des cellules germinales – spermatides / spermatozoïdes	72
5.2. Caractérisation de la spermatogenèse	74
5.2.1. La spermatogénèse à Jour 0	74
5.2.2. La spermatogénèse à Jour 2	75
5.2.3. La spermatogénèse à Jour 4	76
5.2.4. La spermatogénèse à Jour 7	77
6. Expérimentation au laboratoire aux contaminants modèles	78
6.1. Evaluation histologique de l'impact du cadmium	78
6.1.1. Chez la femelle	78
6.1.2. Chez le mâle	80

6.1.2.1. Exposition pendant un cycle de spermatogenèse	80
6.1.2.2. Exposition pendant deux cycles de spermatogenèses	80
6.2. Evaluation de la maturation des cellules germinales mâle au cours de la Spermatogenèse	82
6.3. Impact du cadmium, du pyriproxifene et du méthoxyfénozide	83
7. Expérimentation sur la station d'épuration de Bellecombe	86
7.1. Évaluation des lésions histopathologiques	86
7.1.1. Chez la femelle	86
7.1.2. Chez le mâle	88
7.2. Evaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes par le test des comètes	89
7.2.1. Évaluation du site de prélèvement	89
7.2.2. Établissement d'un niveau de base	90
7.2.3. Évaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes des gammares exposés à la station d'épuration de Bellecombe	91
8. méthode de conservation des spermatozoïdes	93
<b>Chapitre IV : Conclusion &amp; perspectives</b>	<b>96</b>
1. Conclusion	96
2. Les perspectives	97
<b>Références bibliographiques</b>	<b>99</b>

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AChE: Acétylcholinestérase

AFNOR : Association Française de Normalisation

BET: Bromure d'ethidium

BSA: Bovine Sérum Albumins

Cd : Cadmium

DCE: Directive cadre sur l'eau

GST: Glutathion S-transfèrease

HEPES : 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IP: Iodure de propidium

MET: Méthoxyfénozide

O<sub>3</sub>: Ozone

OCDE : Organisation de coopération et de développement économique

PBS: Phosphate buffer solution

PYR: Pyriproxifène

SOD : Superoxyde dismutase

STEP: Station d'épuration

UDS: Unscheduled DNA synthesis- synthèse non programmée d'AND

UV : Rayonnements ultra-violets

- Fig. 1 :** Vue latérale d'un gammaridea d'après (Chevreux et Fage., 1970 ; Roux., 1970)
- Fig. 2 :** Caractérisation du cycle de la mue chez *G. fossarum* (Geffard *et al*, 2010)
- Fig. 3:** Schéma des principaux organes du système reproducteur et endocrinien d'un Gammaridea femelle
- Fig. 4:** Schéma des principaux organes du système reproducteur et endocrinien d'un *Gammaridea* mâle
- Fig. 5 :** Principales lésions à l'ADN induites par l'exposition à des agents génotoxiques (Léonard, 1990)
- Fig. 6 :** Principe du test des comètes
- Fig. 7 :** Protocole de l'essai comète selon (Maniatis *et al.*, 1982 ; Schwartz et Cantor, 1984)
- Fig. 8:** Localisation géographique du site de prélèvement de La Tour du Pin
- Fig. 9:** Prélèvement et tamisage des organismes (*G. fossarum*) sur le site de La Tour du Pin
- Fig. 10:** Stabulation des gammares au laboratoire
- Fig. 11 :** La station d'épuration Bellecombe
- Fig. 12 :** Tri des gammares sur table lumineuse au stade pré-copulatoire
- Fig.13:** Tri et encagement du gammare dans la station d'épuration Bellecombe
- Fig. 14:** Schéma du pilote SIPIBEL pour l'encagement des gammares
- Fig. 15 :** Les différentes étapes de la technique histologique
- Fig. 16:** Comptage des cellules sur lame de Malassez
- Fig. 17:** Validation du marqueur de la viabilité cellulaire par « *Dead life sperm viability*® »
- Fig. 18 :** Méthode de comptage sur cellule de Malassez
- Fig. 19 :** Principe du test des comètes
- Fig. 20 :** Morphologie & dissection de *G. fossarum*
- Fig. 21:** logiciel Comet Assay IVTM® pour lecture des dommages à l'ADN
- Fig. 22:** Estimation des dommages à l'ADN (% tail intensity) par le logiciel Comet Assay IVTM®

**Fig. 23 :** Section longitudinale de l'appareil génital mâle et femelle du gammare (d'après Charniaux-Cotton, 1965 ; Meusy, 1972 ; Reger et al, 1979)

**Fig. 24:** Identification des différents organes de *G. fossarum* femelle au stade D1

**Fig. 25 :** Section longitudinale d'une femelle gammare en stade D1

**Fig. 26:** Caractérisation du stade A chez la femelle *G. fossarum* ; section transversale

**Fig. 27 :** Section longitudinale du stade B chez la femelle *G. fossarum*

**Fig. 28 :** Caractérisation du stade B chez la femelle *G.fossarum* ; section transversale

**Fig. 29:** Caractérisation du stade CI chez la femelle *G.fossarum* ; section transversale

**Fig.30 :** Caractérisation du stade C2 chez la femelle *G.fossarum* ; section transversale

**Fig. 31 :** Caractérisation du stade D1 chez la femelle *G.fossarum* ; section transversale

**Fig. 32 :** Caractérisation du stade D2 chez la femelle *G.fossarum* ; section transversale

**Fig.33:** Synchronisation du stade embryonnaire, du stade de la mue et du stade de reproduction chez la femelle *Gammarus fossarum*

**Fig. 34 :** Caractérisation du parasitisme chez les femelles *G. fossarum*

**Fig. 35:** Identification des différents organes de *G. fossarum* mâle en fin de spermatogénèse

**Fig. 36 :** Section longitudinale des différents organes de *G. fossarum* mâle en fin de spermatogénèse

**Fig. 37:** Identification des papilles génitales de *G. fossarum* en fin de spermatogénèse

**Fig. 38:** Identification des cellules d'intérêt chez *G. fossarum*

**Fig. 39 :** Identification du polymorphisme filamenteux du spermatozoïde de *G. fossarum*

**Fig. 40:** Caractérisation de la spermatogénèse à J0 d'un gammare sain

**Fig. 41:** Caractérisation de la spermatogénèse à J2 d'un gammare sain

**Fig. 42:** Caractérisation de la spermatogénèse à J4 d'un gammare sain

**Fig. 43:** Caractérisation de la spermatogénèse à J7 d'un gammare sain

**Fig. 44:** Caractérisation des lésions ovocytaires chez la femelle *G. fossarum* contaminée par le cadmium

**Fig. 45:** Caractérisation des lésions de l'organe reproducteur chez le mâle *G. fossarum* contaminé par le cadmium pendant un cycle de spermatogénèse

**Fig. 46 :** Caractérisation des lésions de l'organe reproducteur chez le mâle *G. fossarum* contaminé par le cadmium pendant deux cycles de spermatogénèse successifs

**Fig. 47:** Evaluation du nombre moyen de spermatozoïdes et de spermatides chez *G. fossarum* avant et après le stade précopulatoire

**Fig. 48 :** Evaluation de l'impact du cadmium sur la gonade mâle de *G. fossarum* au cours d'un cycle ou deux de spermatogénèse

**Fig. 49:** Evaluation de l'impact du pyriproxifène sur la gonade mâle de *G. fossarum* au cours d'un cycle ou deux de spermatogénèse

**Fig. 50 :** Evaluation de l'impact du méthoxyfénoside sur la gonade mâle de *G. fossarum* au cours d'un cycle ou deux de spermatogénèse

**Fig. 51 :** Evaluation de l'impact des effluents de la station d'épuration sur l'organe reproducteur chez la femelle *G. fossarum* au stade D1- D2

**Fig. 52 :** Evaluation de l'impact des effluents de la station d'épuration sur l'organe reproducteur chez le mâle *G. fossarum* en fin de spermatogénèse

**Fig. 53:** Evaluation de la toxicité des sites de références

**Fig. 54 :** Evaluation du seuil de tolérance des dommages à l'ADN

**Fig. 55 :** Evaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes de gammarès exposés aux effluents de la station d'épuration au mois de mars 2015

**Fig. 56:** Evaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes de gammarès exposés aux effluents de la station d'épuration au mois de juin 2015

**Tableau I :** Classification de l'espèce *G. fossarum*.

**Tableau II :** Récapitulatif des expositions des gammares aux molécules modèles

**Tableau III:** Synthèse de l'eau de la step Bellecombe pour exposition des individus control 2

**Tableau IV :** Méthodes de dissociations pour dénombrement des spermatozoïdes

**Tableau V :** Les conditions étudiées pour le dénombrement des spermatozoïdes

**Tableau VI:** Evaluation de la spermatogenèse avant et après la fécondation

**Tableau VII:** Préparation de la solution de dilution pour la gonade mâle *G. fossarum*

**Tableau VIII:** Protocole de préparation du tampon HEPES (solution de dilution du composant A).

**Tableau IX:** Protocole du test de viabilité par le kit *Live Dead sperm viability*®

**Tableau X :** Protocoles de congélations des spermatozoïdes de *G. fossarum*.

1. BOISSEAUX. P, DELIGNETTE-MULLER. M-L, **ABBACI. K**, THOMAS. H, GARRIC. J. (2016). Analysis of hemocytes in *Lymnaea stagnalis*: Characterization and effects of repeated hemolymph collections. *Journal of Fish & Shellfish Immunology* 57-116-126.
2. **TAÏR-ABBACI. K**, JOACHIM. S, BOISSEAUX. P, EXBRAYAT. JM, GARRIC. J, PORCHER. J., GEFFARD. O., In press (2016). Anatomical and histological characterization of the gametogenesis of *Radix Balthica* (Linnaeus, 1758) In comparison with *lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758). *Folia Histochemica et Cytobiologica: journal of histochemistry and cell & tissue biology*.
3. ABIDI. S, **TAIR ABBACI. K**, GEFFARD. O, BOUMAIZA. M, DUMET. A, GARRIC. J, MONDY. N., (2016). Impact of cadmium on the ecdysteroids production in *Gammarus fossarum*. *Journal of Ecotoxicology*,25(5), 880-887.
4. TRAPP. J, ARMENGAUD. J, PIBLE. O, GAILLARD. J-C, **ABBACI. K**, HABTOUL. Y, CHAUMOT. A, AND GEFFARD. O., (2014) :Proteomic Investigation of Male *Gammarus fossarum*, a Freshwater Crustacean, in Response to Endocrine Disruptors. *Journal of proteomie research*.
5. FOUQUERAY. M, NOURY. P, DHERRET. L, CHAURAND. P, **ABBACI. K**, LABILLE. J, ROSE. J, GARRIC. J., (2013) : Exposure of juvenile *Danio rerio* to aged TiO<sub>2</sub> nanomaterial from sunscreen. *Enviro Sci Pollut Res Int*, 20(5), 3340-3350.
6. MOUTHON. J & **TAÏR-ABBACI. K.**, (2012). The taxonomic confusion surrounding *Pisidium* (Bivalvia: 4phaeriidae): the possible birth of a new taxon. *Basteria* 76 (4-6), 126-130.
7. **ABBACI. K & GARRIC. J**, (2012). Histological Study of Gonadogenesis in *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata Piscinalis*. *Journal of Cytology and Histology*, 3 (2), 140-147.
8. ROSE. J, AUFFAN. M, LABILLE. J, BOTTA. C, CHAURAND. P, BORSCHNECK. D, MASION. A, GARRIC. J, FOUQUERAY. M, VOLLAT. B, NOURY. P., **ABBACI. K**, PIELICHOWSKIAZE. K, LESZCZYNSKA. A, , JAMESNJUGUNA. S, SACHSE. S, BOTTERO. J-Y., (2011). Ageing and Toxicity of real NM in aquatic environment. Experiments were supported by the French national programs NANOALTER (INSU/EC2CO/CYTRIX), AGINGNANO & TROPH (ANR-08-CESA-001) and the FP7 NEPHH project (CP-FP 228536-2).
9. GUST. M, BURONFOSSE. T, GEFFARD. O, COQUERY. M, MONS. R, **ABBACI. K**, GIAMBERINI. L , GARRIC. J., (2011). Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Aquatic Toxicology*, 101(1), 100-108.
10. GEFFARD. O, XUEREB. B, CHAUMOT. A, GEFFARD. A, BIAGIANTI. S, NOËL. C, **ABBACI. K**, GARRIC. J, CHARMANTIER. G, CHARMANTIER-DAURES. M., (2010). Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for Reproductive Toxicity Assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (10), 2249-2259

11. GUST M., GARRIC J., GIAMBERINI L., MONS R., **ABBACI K.**, GARNIER F., BURONFOSSE T., (2010). Sensitivity of New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) to a specific aromatase inhibitor. *Chemosphere*, 79(1), 47-53.
12. **TAÏR-ABBACI K.**, QUEAU H., GARRIC J., (2009). Étude histologique de la gonadogénèse chez *Potamopyrgus antipodarum* et *Valvata piscinalis*. *Revue Française d'Histotechnologie*, 22 (1), 63-74.
13. GAGNAIRE B., GAGNE F., ANDRE C., BLAISE C., **ABBACI K.**, BUDZINSKI H., DEVIER M.H., GARRIC J., (2009). Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. *Aquatic Toxicology*, 92 (3), 155-167.
14. BOTTA C., LABILLE J., FENG J., ROSE J., CHAURAND P., AUFFAN M., GARRIC J., VOLLAT B., **ABBACI K.**, NOURY P., MASION A., BOTTERO J Y., (2009). Physical-chemical characterization and ecotoxicity of residues from alteration of engineered nanomaterials. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, 73 (13), p. A144. ISSN 0016-7037.
15. RACCURT M., SMAMLLWOOD S., MERTANI H., DEVOST D., **ABBACI K.**, BOUTIN J M., MOREL G., (2005). Cloning, Expression and Regulation of Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factors (COUP-TFII and EAR-2) in the Rat Anterior Pituitary Gland *Neuroendocrinology*,82(5-6), 233-244.

1. **TAÏR-ABBACI. K.**, HABTOUL. Y, TRAPP. J, GEFFARD. O. (2016)., Caractérisation de la Spermatogenese chez *G. fossarum* et Developpement d'un bio-essai pour étudier l'impact du contaminant sur la production des spermatozoïdes. ECOBIM (12<sup>ème</sup> colloque du réseau ÉcoBIM Le Havre, UMR-I 02 SEBIO -30/05/2016).
2. TRAPP J., ARMENGAUD Y., HABTOUL Y., **ABBACI K.**, CHAUMOT A., GEFFARD O., (2014). Développement d'outils pour le suivi de la perturbation endocrine chez le gammare mâle. CEFA (Colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, Besançon, FRA, 01/07/2014).
3. ABIDI S., **TAIR-ABBACI K.**, MONDY N., M. EXBRAYAT J M., GARRIC J., BOUMAIZA M., GEFFARD O., (2013). Organe-Y chez *Gammarus fossarum*: localisation, structure et rôle dans la synthese des ecdysteroides. CEPA université clude bernard lyon 1.
4. **ABBACI K.**, GEFFARD O., GUST M., GARRIC J., (2012). Rôle de l'histologie en écotoxicologie. Congrès Association Française d'Histotechnologie - Lyon-Faculté de médecine-Laennec.
5. GEFFARD O., XUEREB B., BEZIN L., **ABBACI K.**, GARRIC J., (2008). Development of tool for evaluating reproductive effects in *Gammarus pulex*. 18th Annual Meeting of SETAC-Europe, Warsaw, Poland.
6. GAGNAIRE B., GUST M., XUEREB B., BEZIN L, BURONFOSSE T., **ABBACI K.**, GARRIC J., (2007). using freshwater gastropods *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*, as models for assessing endocrine disruption – development of biomarkers. Porto, Portugal.
7. GUST M., BURONFOSSE T., GIAMBIRINI L., RAMIL M., **ABBACI K.**, MONS R., GARRIC J., (2007). effects of floxetine the reproduction of two prosobranch molluscs, *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis* . International conference on pharmaceuticals in the environment- York, UK.
8. GEFFARD O., XUEREB B., BEZIN L., **ABBACI K.**, GARRIC J., (2007). Développement de marqueurs d'une perturbation de la reproduction chez *Gammarus pulex* 50<sup>ème</sup> congrès de l'Association Française de Limnologie. Toulouse, France.

Les écosystèmes aquatiques sont soumis de façon continue à des sources de contamination d'origines anthropiques (agriculture, industries, domestiques) et naturelles (sources géochimiques, éruptions volcaniques, feux de forêts, etc.), contribuant à leur appauvrissement. La plupart des composés rejetés dans les milieux sont persistants, s'accumulent dans les êtres vivants (bioconcentration) et certains se concentrent d'un maillon de la chaîne alimentaire à un autre (bioamplification), conduisant à des effets biologiques à court ou long terme (Burton 1992). Les milieux aquatiques constituent le réceptacle ultime pour un grand nombre de ces contaminants et par conséquent représentent une voie d'exposition, de contamination et de danger pour les organismes qui y vivent, ou qui, comme l'homme, les exploitent pour se procurer de la nourriture ou pour ses activités récréatives (McCauley *et al.*, 2000).

En 2000, l'Union Européenne s'est dotée d'une nouvelle réglementation, la Directive cadre sur l'eau (DCE200/60/CE), dont l'objectif principal est la protection et la gestion des milieux aquatiques sur l'ensemble du territoire européen. Cette directive dresse notamment une liste de substances polluantes prioritaires dont les rejets en milieux aquatiques doivent être réduits voire supprimés. Un tiers des substances chimiques rejetées dans l'environnement sont avérées ou suspectées génotoxiques pour les organismes (Claxton *et al.*, 1998, Ohe *et al.*, 2004). La mise en œuvre de la DCE impose de caractériser les milieux sur la base de mesures chimiques, ceci dans le but d'évaluer l'exposition des organismes aux substances prioritaires, via la mesure de leurs concentrations dans l'eau ou les organismes et leur confrontation aux normes de qualité environnementales. Bien que ces normes environnementales aient été établies à l'aide de données d'écotoxicité, au regard du faible nombre de composés pour lesquels il en existe une, leur utilisation pour diagnostiquer la toxicité des milieux reste très limitée. Dans ce contexte, diverses métriques biologiques basées sur les communautés et utilisant les invertébrés, les poissons et les algues ont été développées et sont aujourd'hui recommandées par la DCE afin d'évaluer « l'état de santé » de nos cours d'eau. La surveillance de populations et communautés autochtones d'organismes aquatiques constitue la principale démarche de l'évaluation des écosystèmes (Chapman *et al.*, 1991, Charvet *et al.*, 1998, Dolédec *et al.*, 1999, Felten, 2003). Ces mesures ont prouvé leur utilité pour décrire l'état d'un écosystème et mettre en évidence leur perturbation, mais se montrent moins pertinentes pour identifier les causes de cette perturbation, ce qui est un point incontournable pour tout processus d'aménagement et de restauration des milieux aquatiques. En effet, la structure d'une communauté est influencée par de nombreux facteurs et processus qui opèrent à différentes échelles de temps et d'espace. Par exemple, l'absence d'une espèce dans une communauté peut être le résultat de l'impact direct d'un stress (physique et/ou

chimique) sur cette espèce, mais peut également résulter d'un changement chez d'autres espèces (Hildrew *et al.*, 1984) qui soit se nourrissent, sont la proie et/ou sont en compétition avec cette espèce. La nécessité de devoir identifier l'origine d'une perturbation et de discriminer un stress d'origine physique (habitat) ou chimique (polluant) impose d'établir et de quantifier les liens existants entre cause et effet, et par conséquent de revenir à des « systèmes biologiques » simplifiés (niveau biologique moins élevé) que sont, la molécule, la cellule ou l'organisme.

Au cours de ces dernières décennies, diverses approches ont été développées, au laboratoire et sur le terrain, afin d'évaluer la toxicité des substances chimiques. Ces travaux ont concerné aussi bien le développement de biomarqueurs moléculaires, traduisant la mise en place de mécanismes de défense comme la GST, le SOD, la Catalase ou encore les metallothionines (Dedourge-Geffard *et al.*, 2009; Felten *et al.*, 2008, Gagné *et al.*, 2005, Geffard *et al.*, 2007; MacNeil *et al.*, 2002) ou des effets comme l'activité Ache ou encore les dommages à l'ADN (Xuereb *et al.*, 2009, Lacaze *et al.*, 2010). De la même façon, de nombreux bioessais ont été développés, dont certains sont normalisés (AFNOR-NF, OCDE), comme les bioessais létaux : le test daphnie magna (NF T90 301, OCDE 202, 48 h), ou les bioessais sublétaux : test daphnia magna 21 jours (NF T90 301, OCDE 211, 21 j), ou alors les tests chironomes (*Chironomus* sp.), (OCDE 218-219, 28 j) ainsi que le test *Ceriodaphnia dubia* 7 jours (Biesinger et Christensen 1972, Garric *et al.*, 1992, Calow, 1993).

Ces biotests permettent d'évaluer le degré de sensibilité ou de résistance chez diverses espèces animales à un toxique donné via les différentes formes d'intoxication (contact, inhalation ou ingestion) et avec une évaluation quantitative des principaux effets létaux ou sublétaux. Parmi les divers effets toxiques rencontrés avec les substances chimiques, les dommages à l'ADN ou encore les effets génotoxiques sont d'un intérêt particulier.

La génotoxicité se définit par la capacité de certains agents physiques, chimiques ou biologiques à induire des dommages à l'ADN pouvant compromettre l'intégrité physique ou fonctionnelle du génome, conduisant ainsi à des mutations génétiques ou chromosomiques. Ces agents sont qualifiés de mutagènes, il en existe deux classes : les génotoxiques directs qui sont capables de modifier directement la structure de l'ADN, et les progénotoxiques qui nécessitent une activation métabolique préalable afin de pouvoir instruire leurs effets génotoxiques, il s'agit d'un processus de bioactivation. Le contact d'un xénobiotique avec une molécule d'ADN peut entraîner une mutation pouvant ainsi déclencher une cascade d'évènements induisant une formation directe ou indirecte d'adduits à l'ADN.

Les modifications apparaissant ensuite peuvent être causées par un stress oxydant et correspondent ainsi aux dommages à l'ADN observés sous la forme de différentes lésions comme les cassures

simple et double brins, les sites alcali-labiles, les pontages intra et inter-brins. Le mode d'action de ces composés rend indispensable le développement et la mise en place d'outils permettant d'évaluer leur présence et leurs impacts sur les organismes. La détection et la quantification de ces dommages permettent leurs utilisations comme biomarqueurs d'effets à ces substances génotoxiques. L'oxydation de l'ADN, produit de la réaction entre l'oxygène et la guanine telle la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine (8-oxodGuo) est la modification la plus mesurée par HPLC chez les organismes aquatiques (Martinez *et al.*, 2003, Hwang et Kim 2007). Par ailleurs le test des comètes (SCG ou SCGE : *single cell gel electrophoresis*) est une technique quantitative simple et rapide pour mesurer les cassures simple et double brin d'ADN chez les cellules eucaryotes (Devaux *et al.*, 1997, Burlinson *et al.*, 2007). La technique est basée sur la migration électrophorétique de l'ADN endommagé à partir du noyau sur un gel d'agarose, formant ainsi une image de comète, dont la tête correspond au noyau cellulaire composé d'ADN intact et la queue aux brins d'ADN endommagés.

Couramment, la mesure des dommages à l'ADN, notamment à l'aide du test des comètes, s'est fortement focalisée sur les cellules mobiles du sang chez les vertébrés (Al-Salmani *et al.*, 2011, Cheng-Hung Chuang & Miao-Lin Hu *et al.*, 2004, Azqueta *et al* 2011) et de l'hémolymphe chez les invertébrés (Siu *et al.*, 2004, Mamaca *et al.*, 2005, Woźnicki *et al.*, 2004). Ce choix a souvent été fait car la méthode nécessite l'observation de cellules isolées et permet de limiter au maximum l'apparition d'artéfact non souhaités lors de la préparation de l'échantillon. Ainsi l'utilisation de cellules sanguines mobiles évite le recours à des méthodes de désolidarisation cellulaire nécessaires pour les autres tissus comme les branchies ou le foie, couramment utilisés en écotoxicologie pour la mesure des biomarqueurs. Plus récemment, et pour étudier le transfert transgénérationnel des dommages à l'ADN, plusieurs auteurs se sont focalisés sur l'utilisation des gamètes, ceci aussi bien chez les invertébrés (Lewis *et al.*, 2012 et Lacaze *et al.*, 2011a, 2011b, 2011c ) que chez le poisson (Devaux *et al.*, 2011, Arantes *et al.*, 2011) Ces travaux ont montré que les cellules germinales étaient des cibles d'intérêt pour la surveillance des dommages à l'ADN, notamment les spermatozoïdes, qui du fait de l'absence de mécanismes de réparation, intègrent l'apparition des dommages au cours de l'exposition. Ces travaux ont également permis de montrer le transfert entre génération des dommages à l'ADN et le risque pour la descendance avec l'apparition d'anomalies embryonnaires.

Au niveau individuel, chez les invertébrés, de nombreux bio-tests utilisent la reproduction pour évaluer l'impact toxique de composés chimiques, ces bioessais sont destinés à comprendre les différents mécanismes responsables de cette toxicité (bioaccumulation des polluants, mécanismes d'action du ou des polluants, facteurs influençant cette toxicité : température, teneur en oxygène, etc.), différentes études ont déjà montré un effet toxique causé par le mélange de composé, même quand ils

sont individuellement de faible concentration (Silva *et al.*, 2002). La reproduction est une réponse physiologique clef dans le maintien des populations. Toutefois, la mesure de ce trait de vie se contraint très souvent à évaluer la production d'embryons ou juvéniles au cours de l'exposition. Hammers-Wirtz (2000) a étudié le test de reproduction chez la daphnie contaminée au dispersant et a observé une croissance dans la reproduction, couplée par une diminution de la qualité des traits de vie des embryons. Les effets spécifiques des composés chimiques, notamment de perturbateurs endocriniens, sur les organes sexuels sont très peu documentés, notamment liés au fait que la structure tissulaire des gonades d'invertébrés a été très peu étudiée. Les crustacés ont un système endocrinien très différent de celui connu chez les vertébrés. Parmi les hormones impliquées dans la reproduction chez le crustacé, et que l'on ne retrouve pas chez les vertébrés, il y a les ecdystéroïdes et les juvénoïdes (Rodriguez *et al.*, 2007, LeBlanc, 2007). Le rôle de ces hormones a pu être mis en évidence dans de nombreuses études où la mue et la reproduction des crustacés exposés ont été perturbés. Cependant, et malgré les travaux de Ghekiere *et al.*, (2005), peu voire pas de marqueurs moléculaires spécifiques de la perturbation de la reproduction sont disponibles chez les crustacés et notamment les espèces de petite taille qui ont un intérêt fort en écotoxicologie. Dans ce contexte, plusieurs auteurs se sont intéressés au cycle de reproduction des amphipodes, dans l'objectif d'évaluer l'impact des polluants. Geffard *et al.* (2010) ont décrit de façon fine le cycle de mue et de reproduction chez *Gammarus fossarum* également nommé *G. fossarum* ou Gammare. Chez les amphipodes, le cycle de mue et de reproduction sont parfaitement synchronisés. Après avoir décrit les différents stades de mue chez cette espèce, ces auteurs ont montré que pour chaque stade de mue, correspondaient une surface ovocytaire et un stade embryonnaire spécifique. A partir de ces observations, ils ont proposé un protocole de biotest permettant d'évaluer d'une part l'impact de substances sur la mue, la croissance ovocytaire, la fertilité et la fécondité et d'autre part de proposer des indicateurs d'un impact potentiel de perturbateurs endocriniens sur la base des désynchronisations pouvant être observées entre la mue et la croissance ovocytaire. De la même façon, les travaux de Schirling *et al.* (2006) proposent des approches d'histo-pathologie afin d'évaluer l'impact d'une contamination sur la structure des ovocytes. Toutefois, ces travaux ont été réalisés sur des organismes prélevés sur le terrain, dont le statut reproducteur ni l'exposition à la contamination n'ont pu être validés.

**Notre travail aborde** ces problématiques en se focalisant sur **l'étude de l'amphipode (*Gammarus fossarum*)** reposant sur une double approche histologique-génotoxique. Il a pour objectif d'une part de poursuivre l'acquisition de connaissances de la structure tissulaire des gonades chez cette espèce et d'autre part de développer le test des Comètes dans notre laboratoire, ceci dans le but de mieux comprendre l'effet des polluants sur la reproduction chez cette espèce.

**Le premier volet de ce travail** concerne la mise en place d'une approche histologique dans le but d'acquérir des connaissances sur la structuration tissulaire des gonades mâle et femelle, mais également de décrire de façon précise les modifications de ces tissus au cours de la gamétogénèse. La description de ces deux processus liés à la reproduction chez le gammare servira de base pour ensuite évaluer l'impact des polluants sur la gamétogénèse, en termes d'anomalies cellulaires chez les femelles et de production de spermatozoïdes chez les mâles.

**Le deuxième grand volet de ce travail** sera entièrement consacré au développement du test des comètes sur les spermatozoïdes dans notre laboratoire, et à la validation de son utilisation.

**La troisième partie** sera consacrée à la proposition d'un protocole de conservation des spermatozoïdes par la congélation dans le but de proposer le test des Comètes dans la surveillance à large échelle des milieux aquatiques.

Le premier chapitre de ce travail propose une synthèse bibliographique se basant sur les récentes études développées chez l'amphipode *Gammarus fossarum* relative à l'utilisation de biomarqueurs reprotoxiques pour l'évaluation de la toxicité des milieux aquatiques.

La première partie est consacrée à la présentation et à la description de la morphologie de l'espèce cible en mettant l'accent plus particulièrement sur l'organe reproducteur.

La seconde partie concerne les biomarqueurs et les bio-tests développés chez cette espèce et plus particulièrement les techniques histologiques et génotoxiques (essai des Comètes) sélectionnées pour l'évaluation de la toxicité chez *Gammarus fossarum*.

Enfin, dans la dernière partie, nous présentons la problématique de la recherche traitée dans ce travail.

## 1. L'espèce cible, *Gammarus fossarum*

### 1.1. Ecologie et biologie du gammare

*Gammarus fossarum* est un crustacé, faisant partie de l'embranchement des arthropodes, de la famille des Gammaridae (Tableau I), il constitue le groupe le plus abondant et le plus diversifié avec plus d'un million d'espèces recensées (Tobe & Bendena 1999). *G. fossarum* occupe les ruisseaux et les rivières des plaines et de moyennes montagnes, caractérisés par un fort courant et de fortes teneurs en oxygène (Tachet *et al.*, 2000). L'aire de répartition géographique de *G. fossarum* s'étend des Pyrénées au milieu des Balkans, en incluant l'Europe centrale (Karaman *et al.*, 1977 ; Barnard et Barnard. 1983). Il se nourrit de débris végétaux ou animaux et des larves d'invertébrés capturés sur le fond, dans la mousse, les algues filamenteuses ou sur les plantes aquatiques. *Gammarus fossarum* est un bon indicateur de la santé des milieux aquatiques d'eau douce, du fait de sa sensibilité aux contaminants. Ils sont fréquemment utilisés dans les études de l'évaluation des risques et de la qualité des écosystèmes aquatiques (Rinderhagen et Zauke 2000).

L'amphipode est un crustacé à respiration branchiale, de petite taille et à corps comprimé latéralement, il comporte de nombreux appendices tels que représentés sur la figure 1 :

**a)** Le céphalon appelé aussi prosoma englobe la tête et constitue le premier somite thoracique, il comprend les maxillipèdes (fusionnés à leur base pour former une lèvre inférieure). Les autres pièces buccales sont du type masticateur, cette partie se termine par 2 paires d'antennes.

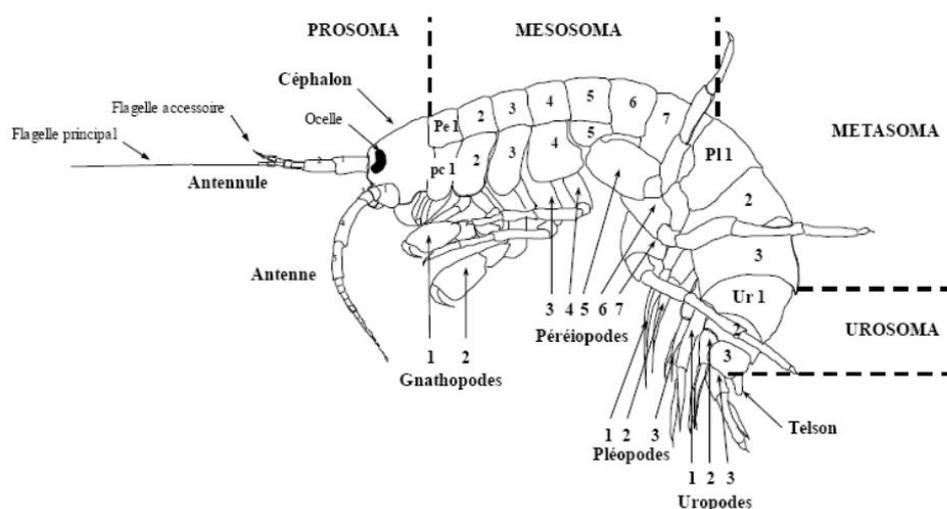
**b)** Le thorax ou mésosoma comprend 7 segments, bien individualisés, portant chacun une paire de pattes ambulatoires appelées péréiopodes. Elles sont semblables et correspondent aux seuls

endopodites (Le roux 1968). Les 4 premières paires de pattes sont dirigées vers l'avant. Elles sont préhensiles, servant à la capture des aliments. Les 3 paires suivantes, dirigées vers l'arrière, jouent un rôle locomoteur.

**c)** L'abdomen ou metasoma, comporte 6 appendices biramés qui constituent la continuité du thorax et prolongent la courbure du corps ; ils sont impliqués dans la respiration, grâce à des lamelles branchiales.

**d)** L'urosoma comprend 3 segments dont le dernier se termine par un court telson.

**e)** Chez le mâle : le flagelle des secondes antennes est remarquablement épaissi et en forme de brosse en raison de ses longues soies.



**Fig. 1 :** Vue latérale d'un gammaridea d'après (Chevreux et Fage 1970, Roux 1970).

**Tableau I** : Classification de l'espèce *G. fossarum*.

systématique de l'espèce modèle <i>G. fossarum</i>	
Règne	Animale
Embranchement	Arthropode
Sous embranchement	Crustacés
Classe	Malacostracés
Sous-classe	Pécararides
Ordre	Gammaridea
Famille	<i>Gammarus</i>
Genre	<i>Fossarum</i> (Koch, 1836)

## 1.2. Reproduction du gammare

*Gammarus fossarum* est un organisme à reproduction sexuée et itéropare, pouvant avoir jusqu'à six portées par an et une durée de vie de 2 ans durant laquelle il peut muer une vingtaine de fois (Corolla la Gombe 2010). Les travaux de Berg (1948), de Hynes (1955), de Macan & Mackereth (1957) et de Steele & Steele (1972) montrent que l'activité sexuelle des gammares est sous la dépendance de la photopériode. Roux (1970) et Sutcliffe (1992) ont montré que le cycle de reproduction de cette espèce présente une période de repos sexuel dont l'importance va de pair avec la latitude, et que l'arrêt de la reproduction serait déterminé dans un premier lieu, par l'abaissement de la température, et que la reprise de cette dernière serait conditionnée par le changement de la photopériode. La température optimale de fécondité pour *Gammarus fossarum* est de 12°C et le nombre d'œufs est étroitement lié à la taille de la femelle (Pöckl et Humpesch 1990). Quand les ovocytes arrivent à maturation, la femelle est prête à accueillir le mâle sur son dos, ce dernier l'agrippe au moyen de ses gnathopodes et la maintient en place sous son corps. Ce stade est appelé stade precopulatoire. Cette promenade dite « nuptiale » peut durer pendant environ huit jours. Cette posture permet au mâle de continuer à nager, se nourrir tout en maintenant la femelle prête à pondre (Sutcliffe 1993, Bollache et Cézilly 2004). Lors de la mue, une poche (marsupium) apparaît entre les pattes antérieures de la femelle où se déroule l'incubation et le développement des embryons. L'ovulation de la femelle peut donc avoir lieu, le mâle prend la position ventrale, de façon à installer ses papilles génitales face au marsupium de la femelle, Aussitôt l'exuvie de la femelle éjectée, et après plusieurs fécondations de la poche ventrale, le mâle et la femelle se séparent (Sutcliffe 1993).

### 1.2.1. Le cycle de mue

Des résultats antérieurs, menés au laboratoire, ont permis de déterminer que le cycle de mue chez la femelle *G. fossarum* à une température de 12°C est de 30 jours (Geffard, 2010). Six stades ont été identifiés :

- deux stades de post-mue (A et B) dont la durée est respectivement de 1 et 3 jours, ils se caractérisent par une fine cuticule au stade A qui s'épaissit au stade B,
- deux stades d'inter-mue (C1 et C2) caractérisés par le décollement de la matrice de l'ongle faisant apparaître les fentes cubiculaires au stade C2 dont la durée est de 9 jours chacun,
- et deux stades de pré-mue (D1 et D2), ces stades sont caractérisés par la synthèse d'une nouvelle cuticule servant de matrice aux nouvelles soies des péreiopodes, cette période dure respectivement 3 et 5 jours (Fig.2).

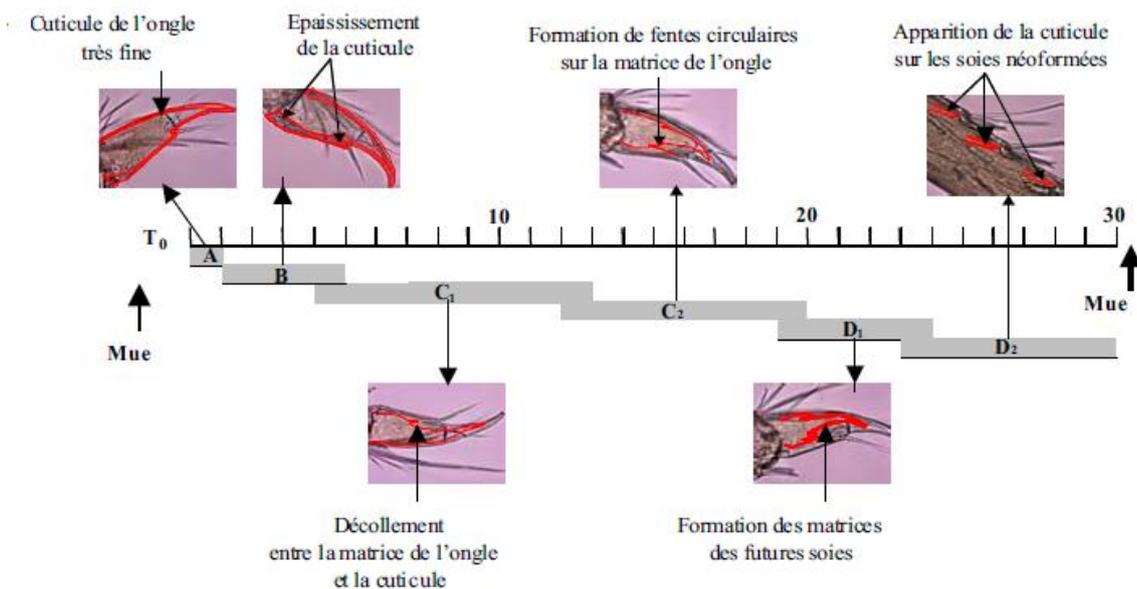
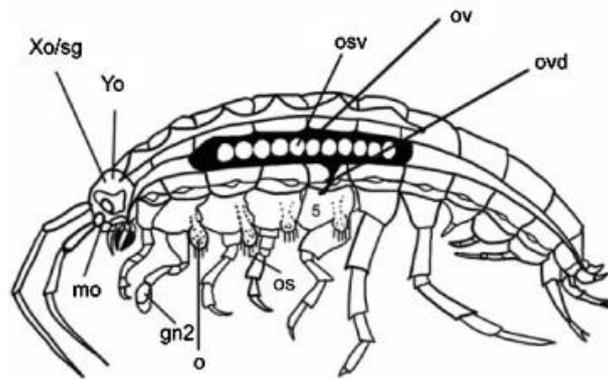


Fig. 2 : Caractérisation du cycle de la mue chez *G. fossarum* (Geffard *et al.*, 2010).

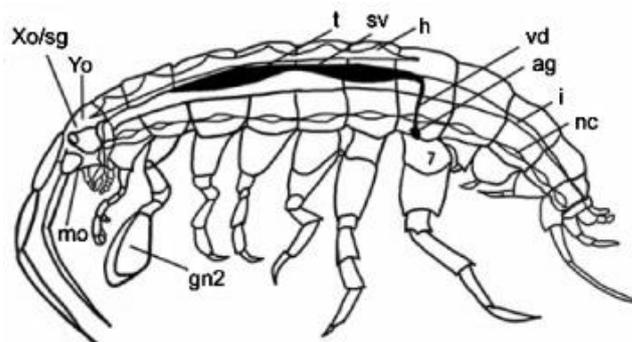
### 1.2.2. Anatomie du système reproducteur

L'appareil reproducteur femelle est constitué de deux ovaires placés latéralement au-dessus de l'intestin. L'oviducte est situé au niveau du péreiomère 5, il débouche de chaque ovaire, rejoint la face ventrale de l'animal pour aboutir à la base des oostégites (Fig.3). Lors de la ponte, les ovocytes sont déposés dans le marsupium formé par les oostégites, où le développement embryonnaire s'effectue jusqu'à l'éclosion (Schmitz 1992, Hyne 2011).



**Fig.3:** Schéma des principaux organes du système reproducteur et endocrinien d'un Gammaridea femelle (Hyne 2011).Xo/sg : organe X/ glande du sinus ; Yo : organe Y ; mo : organe mandibulaire ; osv : oocytes en vitellogenese secondaire ; Ov : ovaire ; Ovd : oviducte ; os : soies ; O : oostegite ; Gn2 : gnathopode secondaire ; 5 : segment thoracique.

Chez le mâle, l'appareil reproducteur est composé d'une paire de tubes fusiformes situés dorsalement par rapport au tube digestif, comprenant la vésicule séminale, le testicule et le canal déférent (Schmitz 1992, Hyne 2011). Chacun des canaux déférents aboutit au niveau ventral du péreiomère 7 et forme une ouverture au niveau des papilles génitales organes servant à l'évacuation des spermatozoïdes. Les figures 3 et 4 représentent respectivement la position de la gonade mâle et femelle chez *G. fossarum* et les organes servant à leurs bons fonctionnements.



**Fig. 4:** Schéma des principaux organes du système reproducteur et endocrinien d'un Gammaridea mâle (Hyne 2011).Xo/sg : organe X/ glande du sinus ; Yo :organe Y ; mo : organe mandibulaire ; gn2 : gnathopode secondaire ; t : testicule; sv : vésicule séminale ; h : cœur ; vd : canal déférent ; ag : glande androgene ; i : intestin ; nc : cordon nerveux ; 7 : segment thoracique.

## 2. Biomarqueurs de toxicité chez *G. fossarum*

Chez le gammare, de nombreux biomarqueurs ont été développés et utilisés pour évaluer la contamination des milieux aquatiques (Kunz *et al.*, 2010). Parmi ces marqueurs, il y a des réponses individuelles / physiologiques, traduisant une perturbation globale de l'organisme, comme le comportement avec la locomotion (Lawrence et Poulter 1998, Xuereb *et al.*, 2009b), l'alimentation (Maltby *et al.*, 2002, Coulaud *et al.*, 2011, Charron *et al.*, 2013) ou encore la ventilation avec les pléopodes (Felten *et al.*, 2008a, 2008b). Parallèlement, de nombreux travaux se sont attachés à développer des biomarqueurs moléculaires, ciblant plus précisément des fonctions physiologiques, comme le métabolisme énergétique (Charron *et al.*, 2014), l'osmorégulation (Felten *et al.*, 2008a, Felten *et al.*, 2008b) ou des impacts moléculaires, comme la peroxydation des lipides (Sroda and Cossu-Leguille 2011a, 2011b), la neurotoxicité (Xuereb *et al.*, 2007, 2009) et enfin les dommages à l'ADN. Dans ce dernier cas, en dehors des travaux menés par Lacaze et ses collaborateurs (Lacaze *et al.*, 2010, 2011), peu d'études ont porté sur les dommages à l'ADN chez les invertébrés d'eau douce et encore moins chez les amphipodes. Dans ces travaux, les dommages à l'ADN ont été étudiés à l'aide du test des comètes (ou *Single Cell Gel Electrophoresis*) dont le principe est basé sur une technique d'électrophorèse par microgel d'agarose. Il permet de mesurer les cassures induites par un agent génotoxique.

### 2.1. Marqueurs d'impacts génotoxiques

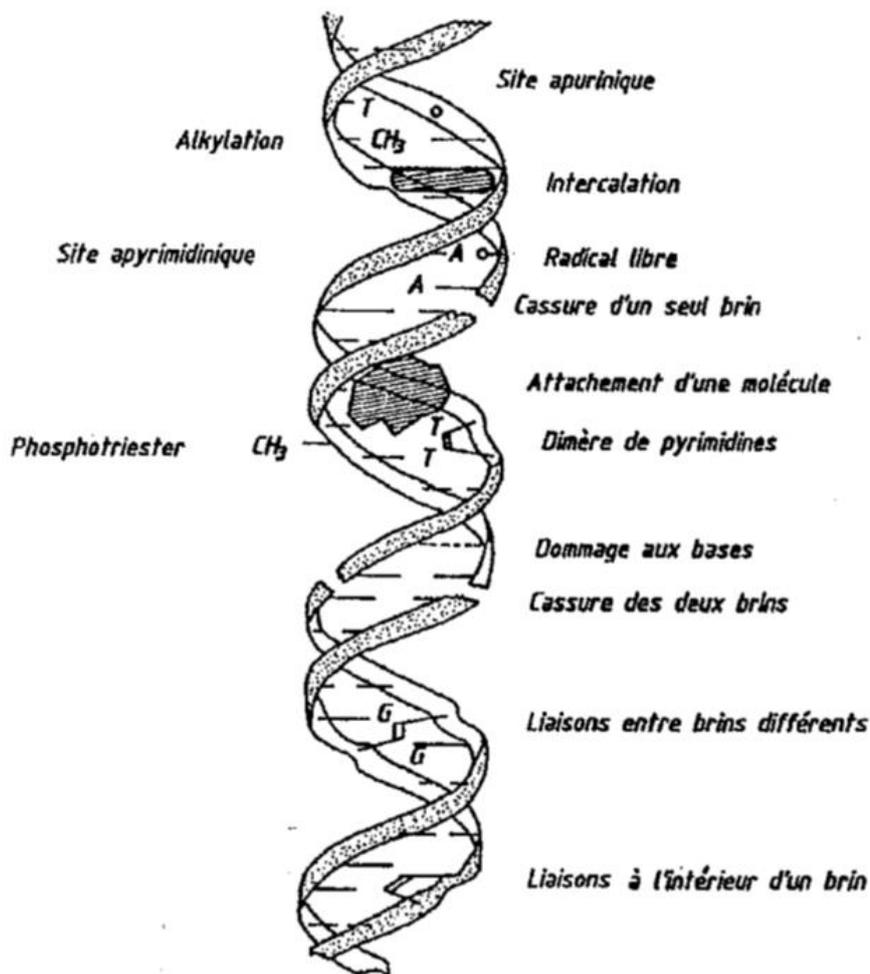
Les composés génotoxiques agissent sur l'ADN et peuvent induire divers types d'altérations primaires de l'ADN entraînant parfois des mutations : les **mutations géniques** issues d'une modification de la séquence nucléotidique, les **mutations chromosomiques** qui sont caractérisées par l'altération du nombre ou de la structure morphologique des chromosomes (cassures, inversions, translocations) et les **cassures simple et double brin** résultant d'une modification chimique des bases azotées induite par les composés génotoxiques. Les dommages à l'ADN peuvent être évalués via plusieurs méthodes. Le **test d'altérations primaires de l'ADN** consiste à étudier l'incorporation d'une base marquée ( $^3\text{H}$  thymidine) dans des cellules maintenues en conditions de culture optimales. Toute augmentation du marquage traduit une augmentation du mécanisme de réparation et par conséquent une réponse à un effet génotoxique, pouvant être reliée aux conditions d'exposition qu'ont subi les cellules. Le test **du micronoyau** permet la détection des micronoyaux dans le cytoplasme de cellules en interphase pouvant provenir de fragments de chromosomes acentriques, ou de chromosomes entiers qui ne peuvent migrer vers les pôles pendant l'étape d'anaphase de la division cellulaire. L'essai détecte l'activité de substances clastogènes et aneugènes dans les cellules qui ont subi une division cellulaire au cours ou après l'exposition à une substance.

## 2.2. Principe et intérêt du test des Comètes

L'essai Comète est une méthode basée sur la mesure de la migration différentielle des brins d'ADN selon leur taille dans un champ électrique. Elle repose sur la micro-électrophorèse des noyaux de cellules isolées en condition alcaline sur gel d'agarose (Singh *et al.*, 1988). L'intensité de fluorescence dans la queue de la comète ou «*tail intensity*» en anglais et exprimée en pourcentage est un paramètre directement lié au niveau des dommages à l'ADN (Collins 2004). L'analyse de 50 noyaux au minimum par échantillon et de deux lames par essai est recommandée (Tice *et al.*, 2000). Les comètes doivent être choisies de manière aléatoire sur l'ensemble du gel (en évitant cependant les bords) en excluant les noyaux très endommagés, présentant un aspect pycnotique (tête d'épingle et pulvérisation complète de l'ADN dans la queue). Les paramètres mesurés sont actuellement la quantité et le pourcentage de distribution des dommages d'ADN dans la queue de la comète.

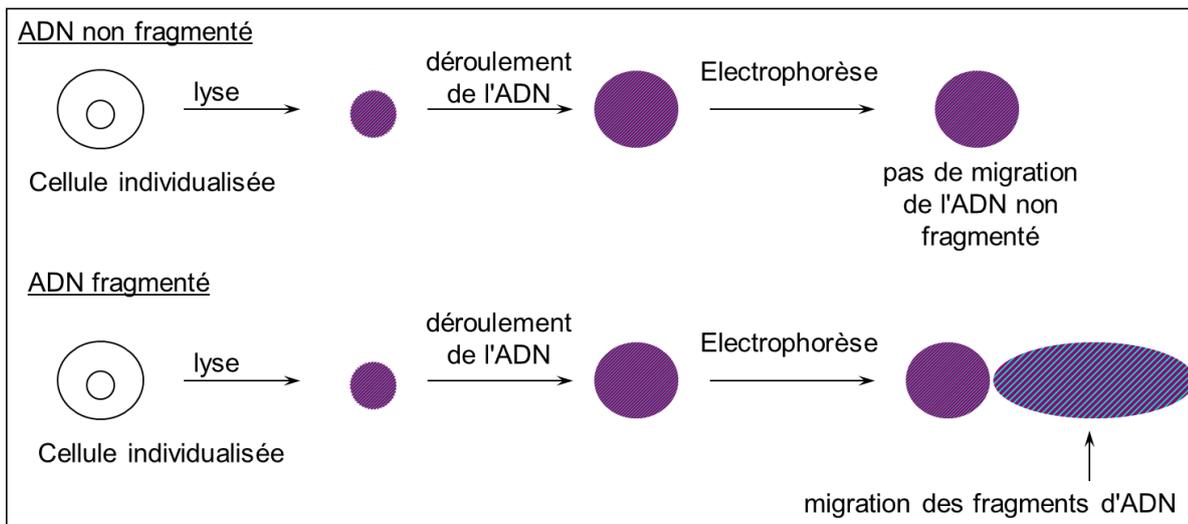
Les dommages à l'ADN se situent en amont des mutations géniques ou chromosomiques et restent susceptibles d'être pris en charge par les mécanismes de réparation (Léonard 1990 ; Friedberg 1995b, Moustacchi 2000). Rydberg et Johanson en 1978 furent les premiers à quantifier les dommages à l'ADN dans des cellules isolées de mammifères incluses dans de l'agarose sur lames de microscope marquées à l'acridine orange. Il a fallu attendre l'introduction de l'électrophorèse en condition alcaline par Singh (1988) pour pouvoir détecter les cassures simple-brin ainsi que les sites alcali-labiles à l'aide du test des comètes, un moyen efficace de détection de cassures simple et double brin, y compris les sites alcali-labiles. Les dommages à l'ADN sont généralement classés selon leur nature chimique ou leur localisation sur la molécule d'ADN. Plusieurs types de lésions à l'ADN sont d'origine endogène ou exogène et peuvent se produire au niveau de la molécule d'ADN, comme les sites abasiques (AP) ou apyrimidiques (Fig.5). L'instabilité de la liaison glycosylique (base désoxyribose), aux conditions physiologiques constitue la cause principale de création des sites AP (Evans et Cooke 2004). Ainsi les modifications des bases se révèlent souvent pro-mutagènes (Leonard 1990).

Les coupures simple et double brin induisent des cassures franches à l'ADN, les plus connues sont les radiations ionisantes (Sonntag *et al.*, 1987, Léonard 1990). En conditions alcalines, certaines lésions à l'ADN se traduisent par des coupures de brins qualifiés d'alcali-labiles, comprenant notamment les sites AP (site abasiques) (Ahnström 1988 , Olive *et al.*, 1990). L'essai des Comètes permet également de détecter des liaisons croisées (ou pontages) ADN-ADN et ADN-protéines (Moss *et al.*, 1997). Dans ce cas, ces liaisons auront tendance à stabiliser l'ADN et à inhiber la migration. Par conséquent, une réduction de la migration de l'ADN peut indiquer l'induction de liaisons croisées (Pfuhrer et Wolf 1996, Merk et Speit 1999). Le test des Comètes est une procédure rapide, sensible et efficace pour détecter de faibles cassures (100 cellules/génome).



**Fig. 5 :** Principales lésions à l'ADN induites par l'exposition à des agents génotoxiques (Léonard 1990)

En condition alcaline, le test des Comètes permet d'observer un déroulement des brins d'ADN dû à la rupture des liaisons hydrogènes (Ahnstron et Edwardsson 1974, Birnboim et Jevcak, 1981). La vitesse de déroulement est dépendante de la longueur des brins appariés et les niveaux des dommages à l'ADN sont exprimés par des valeurs F (facteurs de scission des brins en fonction de la cinétique de déroulement). La technique est basée sur la migration de fragments de molécules d'ADN selon leur taille après extraction, lyse, déroulement et pose sur gel d'agarose (Maniatis *et al.*, 1982 ; Schwartz et Cantor 1984) (Fig. 6).



**Fig. 6 :** Principe du test des comètes

Le test des comètes est une technique très sensible, il permet la quantification de 1000 cassures par noyau soit l'équivalent d'un taux de dommage induit par une dose de 50mGrays de rayons X (Singh et al, 1991 a), 200 cassures par noyau d'après Rojas (1997) et une cassure par  $10^9$  daltons d'après Collins *et al.*, (1997). Le test des comètes est simple et ne nécessitant pas la connaissance du caryotype de la cellule, ni de son cycle cellulaire et il peut être utilisé sur un grand nombre de type cellulaire nucléé, *in vivo* et *in vitro* (Collins *et al.*, 1997, Dixon *et al.*, 2002) sans avoir recours à l'utilisation de radioéléments. Enfin, il est rapide et peu coûteux (Belpaema et al.,1998). Durant cette dernière décennie, l'essai comète a pu détrôner plusieurs tests traditionnels comme le test réglementaire UDS sur cellules hépatiques (Tice et al., 2000, Hartmann *et al.*, 2003). Le test nécessite peu de cellules,  $2.10^4$  à  $5.10^4$  cellules pour un test en condition neutre à  $10^6$  pour la condition alcaline (Mitchelmore et Chipman 1998a) et présente peu d'artefacts (Collins *et al.*, 1997).

### 2.3. Utilisation du test des comètes en écotoxicologie

Parmi les nombreux essais de génotoxicité *in vivo* et *in vitro* utilisés en écotoxicologie aquatique, le test des comètes occupe une place de choix, tout du moins dans la version alcaline standard telle que décrite par Singh *et al.*, (1988) (Braunbeck et Neumüller 1996; Frenzilli *et al.*, 2009 ; Devaux et Bony 2013) (Fig.7). Cependant, plusieurs variantes développées en toxicologie humaine, comme par exemple l'utilisation d'enzymes de restriction spécifiques, permettant de caractériser la nature des lésions mises en évidence (Collins *et al.*, 1997, Collins 2004) ou le niveau de méthylation de l'ADN (Wasson *et al.*, 2006, Wentzel 2010), ou encore la mesure des activités de réparation des dommages à l'ADN (Langie *et al.*, 2006) n'ont pour l'heure, peu ou pas été utilisées dans le domaine de l'écotoxicologie. Aujourd'hui, l'essai comète reste l'outil d'évaluation des dommages primaires à l'ADN. Il est utilisé pour évaluer la génotoxicité des polluants au laboratoire et sur le terrain, dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique (Devaux *et al.*, 1997; Devaux *et al.*, 1998; Mitchelmore et Chipman 1998, Ohe *et al.*, 2004, Jha 2008, Devaux et Bony 2013).

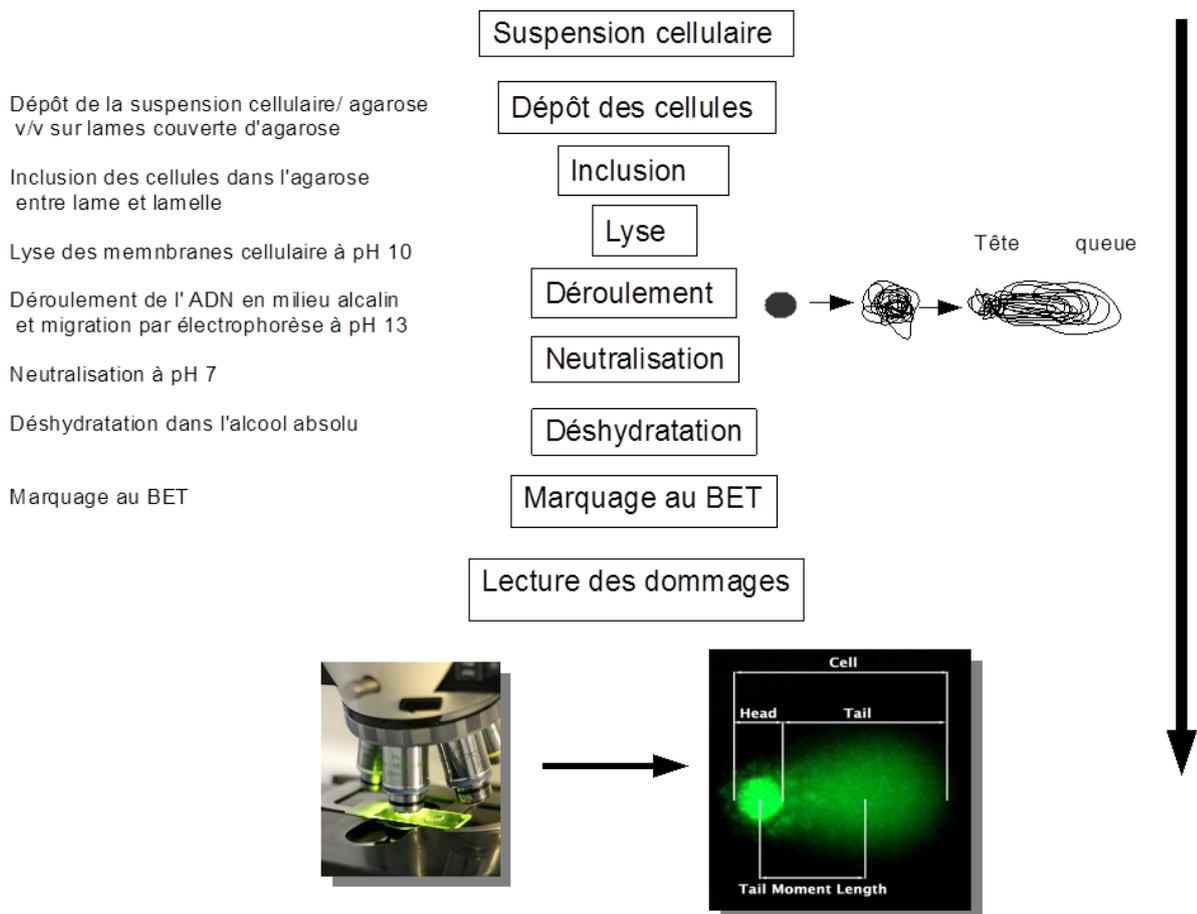


Fig. 7 : Protocole de l'essai comète selon (Maniatis *et al.*, 1982, Schwartz et Cantor 1984)

### 3. Problématique de ce travail de recherche

Les activités scientifiques de notre laboratoire concernent la compréhension des mécanismes liés à la toxicité des polluants sur les organismes aquatiques d'eau douce et la mise en place d'outils de diagnostic pour l'évaluation de la qualité chimique des cours d'eau. Des résultats antérieurs, menés au laboratoire ont permis de développer l'utilisation du **test des comètes** chez un de nos organismes modèles, l'**amphipode** *Gammarus fossarum*. Ces travaux ont permis: **i)** d'identifier le **spermatozoïde** comme étant le tissu le plus intégrateur des effets génotoxiques, en comparaison aux hémocytes et aux ovocytes, et pour lequel le niveau de base était le plus faible, permettant ainsi d'obtenir une mesure sensible et très reproductible ; **ii)** de montrer que les niveaux des dommages à l'ADN mesurés par le test des comètes étaient peu influencés par les facteurs environnementaux, ni dans le temps ni dans l'espace, permettant ainsi de définir aisément une valeur de référence chez cette espèce ; **iii)** de conclure que ce test était extrêmement sensible et permettait aisément de discriminer les milieux impactés ; **iv)** de valider que les dommages à l'ADN observés chez les spermatozoïdes pouvaient être reliés aux anomalies observées sur la descendance.

Bien que très largement développée chez les vertébrés aquatiques et plus récemment chez les invertébrés (Lacaze *et al.*, 2010 ; 2011), l'utilisation du test des comètes pour la surveillance des milieux aquatiques reste très limitée pour plusieurs raisons. La première est principalement liée au fait que le développement de ce test a été réalisé sur des espèces peu ou pas utilisables sur le terrain. La seconde est que la majorité des travaux menés sur le développement de ce test ne va pas jusqu'à la validation de son utilisation en milieu naturel, c'est à dire, la compréhension de l'impact des facteurs de confusion, biotiques (sexe, taille, statut reproducteur et tissu utilisé) et abiotiques (température, dureté et pH), étape indispensable pour comprendre la variabilité naturelle des réponses mesurées, de disposer de valeurs de référence et enfin de pouvoir interpréter de façon fiable les données obtenues en terme de présence et d'impact de contaminants génotoxiques.

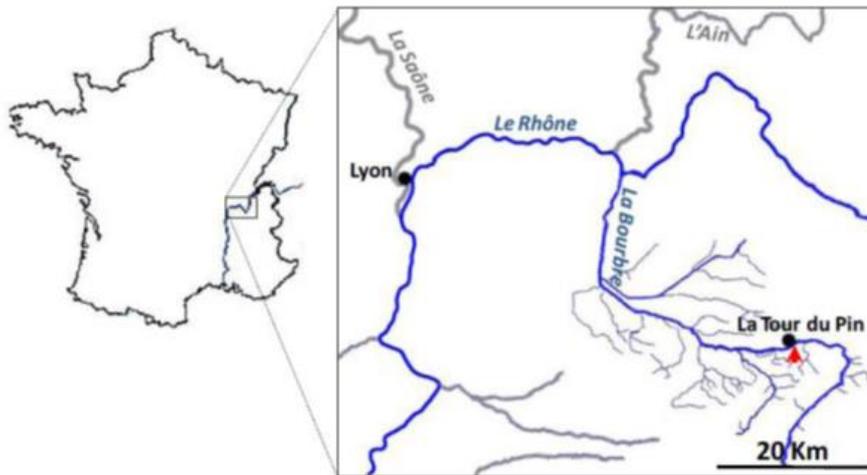
Malgré la pertinence et la sensibilité de cette approche, notamment chez le gammare, **l'utilisation de ce test en surveillance est inexistante, voire pas envisageable actuellement.** Une des limites fortes concerne **la conservation des tissus**. Aujourd'hui, l'utilisation du test des Comètes chez le gammare impose d'être réalisé à l'aide de cellules obtenues sur organisme vivant, constituant une contrainte forte pour la surveillance. Aussi, le manque de standardisation du protocole rend parfois difficile la comparaison entre deux laboratoires et cela pour une même espèce (Belpaema *et al.*, 1998). Il existe plusieurs méthodes de conservations des tissus développées chez le poisson, cependant, **aucune n'est encore disponible chez les invertébrés.**

Depuis plusieurs années, nous avons développé une approche expérimentale de terrain par transplantation d'organismes contrôlés provenant d'une seule population de référence, ceci afin de limiter l'impact des facteurs biotiques dans nos études de diagnostic. Dans ce contexte, le travail de recherche effectué au cours de mon parcours a pour but le développement et la validation d'outils permettant la surveillance à large échelle des milieux aquatiques. La mise en place de ces outils nécessite :

- a) La caractérisation des gonades au cours de la gamétogenèse ainsi que l'impact de polluants modèles sur la structure tissulaire, chez les femelles et les mâles chez *G. fossarum*. Cette étape a consisté à sélectionner les gammares femelles selon le cycle de mue (B, C1, C2, D1, D2) à l'exception du stade A étant le premier et le plus court (quelques heures), tandis que les mâles ont été choisis selon leur cycle de reproduction sachant que ce dernier ne dure que 7 jours, des prélèvements ont été faits aux jours : J0, J2, J4, J7. Le diagnostic de la pathologie a été observé sur les femelles en stade D2 et les mâles en J7.
- b) De développer et valider l'utilisation du test des comètes dans notre laboratoire, via l'utilisation des spermatozoïdes : i) Une sélection du site de référence (réalisé sur le site de Bourgoin, la Bourbe et La Tour du Pin), ii) Etudes des niveaux de bases pour le site choisi, iii) Exposition des gammares mâle à la station d'épuration Bellecombe (Haute Savoie).
- c) De répondre à une limite dans l'utilisation du test des comètes dans la surveillance du milieu aquatique permettant la conservation des tissus, dans le but de construire une méthodologie et rendre accessible l'utilisation de l'essai comète sur les gamètes mâles de *G.fossarum* dans notre laboratoire.

### 1. Pêches et stabulation des gammares

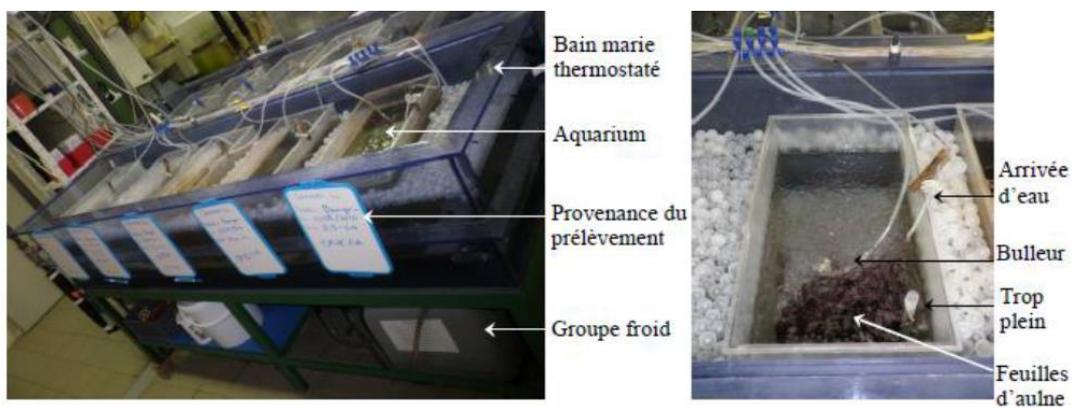
Des gammares de taille homogène entre 10-12 mm ont été prélevés dans la rivière de la Mouge en amont du bassin, sur la commune de La Tour du Pin (Isère, France) (Fig. 8), site de référence connu pour avoir un niveau de pollution très faible. Les prélèvements ont été réalisés selon la méthode dite «kick sampling ». Cette méthode consiste à remuer le substrat avec le pied afin de provoquer la fuite des organismes, qui emportés par le courant se trouvent piégés dans le filet du troubleau placé en aval (Fig. 9), ensuite les gammares adultes de taille homogène sont sélectionnés entre les tamis de maille 2 et 2,5 mm. Les organismes sont par la suite stockés dans des récipients en polyéthylène contenant l'eau de la rivière puis sont transportés au laboratoire dans des glacières pour limiter les changements de températures. De retour du terrain, les gammares sont répartis dans des aquariums de 30l alimentés en continu avec de l'eau de forage à un pH compris entre 7,4 et 7,8 et une conductivité de 600 $\mu$ S/cm, oxygénés à l'aide d'un système de bullage permettant de maintenir un taux d'oxygène dissous à saturation. Ces aquariums sont placés dans un bain-marie thermo-régulé à  $12 \pm 0,5$  °C (Fig. 10). La photopériode est fixée à 16h de jour et 8h de nuit sous une intensité lumineuse de 750 lux. Les organismes sont nourris avec des feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*), récoltées dans une zone faiblement anthropisée, dans la localité des Ardillats (Rhône). Avant leur utilisation, les feuilles sont placées pendant  $6 \pm 1$  jour, à température ambiante, dans de l'eau de forage renouvelée quotidiennement. Ce conditionnement des feuilles permet de les réhydrater et de favoriser le développement d'un biofilm à leur surface, ceci afin d'augmenter leur appétence. Enfin 500 mg de vers lyophilisés (*Tubifex sp.*) sont distribués deux fois par semaine par aquarium.



**Fig. 8:** Localisation géographique du site de prélèvement de La Tour du Pin



**Fig. 9:** Prélèvement et tamisage des organismes (*G. fossarum*) sur le site de La Tour du Pin ; 1 : tamis ; 2 : troubleau ; 3 : seau de stockage



**Fig. 10:** Stabulation des gammares au laboratoire (photo laboratoire d'écotoxicologie : IRSTEA-Lyon)

## 2. Expérimentations sur les gammares

### 2.1. Expérimentations en laboratoire

#### 2.1.1. Caractérisation tissulaire des gonades au cours de la gamétogenèse

Pour comprendre l'évolution tissulaire des gonades mâles et femelles, les expérimentations et prélèvements suivants d'organismes ont été réalisés. Pour les femelles, à l'aide des organismes en stabulations, nous avons sélectionné 5 individus pour chaque stade de mue caractérisée précédemment par Geffard (2010), c'est-à-dire stade B, C1, C2, D1 et D2. Les individus ont été fixés par le liquide de Bouin, puis rincés et conservés dans l'éthanol 70% jusqu'à leur utilisation en histologie. De la même façon, des mâles ont été prélevés et fixés par le liquide de Bouin afin d'avoir des représentants à chaque stade de la spermatogénèse. Chez le gammare, après l'accouplement, la spermatogénèse se remet tout de suite en place pour produire de nouveaux spermatozoïdes. Huit jours après l'accouplement, le testicule est de nouveau plein. Par conséquent, des couples ont été isolés et vérifiés chaque jour afin de récupérer des mâles juste après fécondation, qui ont ensuite été placés en béciers datés et maintenus pour une période allant de 1 à 8 jours avant d'être fixés par le liquide de Bouin, puis stockés dans l'éthanol 70 % jusqu'à leur utilisation en histologie.

#### 2.1.2. Présentation des contaminants modèles

Dans le but de déterminer l'effet reprotoxique de contaminants sur la production des gamètes femelles et mâles chez *G. fossarum*, 3 molécules modèles ont été choisies: le **Cadmium (Cd)**, le **Pyriproxyfène (PYR)** et le **Méthoxyfénozide (MET)**. Dans cette étude, nous porterons notre attention sur l'effet du Cd sur les gonades mâles et femelles tandis que l'effet du PYR et le MET sera étudié uniquement sur la production de gamètes mâles.

##### 2.1.2.1. Le cadmium

Le Cd est un métal lourd toxique, difficilement biodégradable et soluble dans l'eau. Il possède des effets variés sur les fonctions vitales principales chez les invertébrés aquatiques. Les effets du Cd, notamment sur le taux d'alimentation, la vitellogenèse, les développements ovocytaire et embryonnaire ainsi que sur la génotoxicité du spermatozoïde ont été étudiés par Geffard (2010) & Lacaze (2010).

### **2.1.2.2. Le pyriproxyfene & le méthoxyfénozide**

Ce sont des insecticides larvicides utilisés en agriculture, ils sont analogues de l'hormone juvénile chez les arthropodes et du méthyl farnesoate chez les crustacés. Ils agissent sur la voie hormonale des insectes cibles et perturbent leurs développements, le PYR et le MET SIGMA-AIDRICH® sont peu solubles dans l'eau et très persistants dans les milieux aquatiques.

### **2.1.3. Exposition des gammares aux contaminants modèles**

#### **2.1.3.1. Impact du Cd sur la structure tissulaire des gonades**

Pour étudier l'impact du Cd sur le développement de la gamétogénèse chez le gammare, des organismes mâles et femelles sont exposés à des concentrations allant de [0,3 à 3 µg/L]. Pour les femelles, nous avons utilisé le protocole décrit et proposé par Geffard (2010) qui consiste à sélectionner des couples en fin de cycle de reproduction, c'est-à-dire avec des femelles en stade de mue D2 avec un marsupium vide étant donnée l'éclosion des embryons. Les femelles sont ensuite exposés aux contaminants pendant 21 jours à 12°C, afin qu'elles puissent après la mue, atteindre le stade C2 du cycle suivant. Suite à cette exposition, les femelles sont directement fixées par le liquide de Bouin puis stockées dans l'éthanol.

Pour les mâles, l'objectif était d'exposer des individus au cours de deux spermatogénèses. Pour ceci, des individus venant juste de s'accoupler ont été sélectionnés et exposés à différentes concentrations en Cd pour 7 jours auxquels des femelles ont ensuite été placées dans les béciers afin de permettre une fécondation. Après la fécondation, les femelles ont été retirées et les individus mâles maintenus dans les conditions d'exposition pour une nouvelle période de 8 jours permettant d'assurer la spermatogénèse. Suite aux 14 jours d'exposition, les individus mâles sont directement disséqués afin d'énumérer le nombre total de spermatozoïdes produits.

#### **2.1.3.2. Impact du PYR et MET sur la spermatogénèse**

Le même protocole que celui décrit précédemment a été mis en place pour évaluer l'impact de ces composés sur la production de spermatozoïdes (tableau II).

#### **2.1.3.3. Technique histologique**

Les gammares utilisés pour la caractérisation histologique sont fixés directement par le liquide de Bouin, tandis que pour le comptage de la viabilité, ces derniers sont immédiatement disséqués et la gonade prélevée pour le dénombrement cellulaire sur cellules de Malassez.

#### 2.1.3.4. Traitement statistique des résultats

Le nombre total estimé des spermatozoïdes est calculé en multipliant le nombre de spermatozoïdes par le volume de la suspension cellulaire. Les analyses statistiques sont réalisées par le logiciel de traitement statistique R (R Development Core Team 2008). L'existence de différences significatives entre les différents groupes expérimentaux est testée par une Anova (test Paramétrique) ou un test de Kruskal-Wallis (test non paramétrique).

Tableau II : Récapitulatif des expositions des gammares aux molécules modèles

Organisme	Cycle de repro	Molécules testées [ $\mu\text{g/L}$ ]	T°	Temps	Marqueur
<b>Femelle</b> N= 7-8/[]	D1-D2	Cd : 0, 0.11, 0.33, 1, 3	12°C	21jours	Analyses histologiques
<b>Mâle</b> N= 7-8/[]	J0	Cd : 0, 0.3, 1, 3 PYR : 0, 0.001, 0.1, 10 MET : 0, 0.5, 5, 50	12°C	1 <sup>e</sup> cycle1 =7 jours 2 <sup>e</sup> cycle2 =14jours	Dénombrement des spermatozoïdes

## 2.2. Expérimentation sur le terrain - *in situ*

### 2.2.1. Présentation de la station d'épuration de Bellecombe - SIPIBEL

Le site de Bellecombe - SIPIBEL est situé dans le département de la Haute-Savoie, à proximité de la frontière suisse. Il a été mis en place en 2011 avec pour objectifs de réaliser l'étude de la caractérisation des impacts des effluents hospitaliers en station d'épuration urbaine. La station d'épuration de Bellecombe possède deux files de traitements distinctes permettant d'isoler les effluents hospitaliers, en tant que milieu récepteur de ces effluents. La rivière Arve alimente une partie des ressources en eau destinée à la consommation humaine du Genevois (Fig. 11).

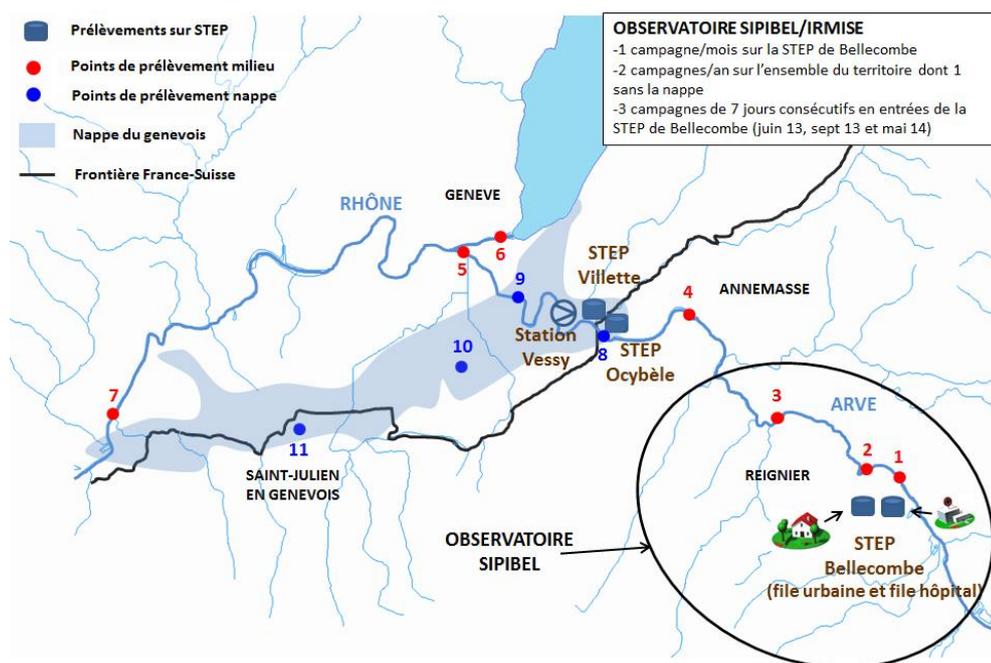


Fig. 11 : La station d'épuration Bellecombe

### 2.2.2. Tri et encagement des gammares

Après observation des gammares sur table lumineuse, dans un premier temps, seuls les individus sains, actifs, non parasités par des larves d'acanthocéphales sont utilisés à des fins expérimentales (Cold *et al.*, 2004), puis dans un second temps, ces gammares doivent répondre aux exigences de chaque manipulation, ils seront donc sélectionnés selon des critères bien définis (taille et cycle de mue). Pour le test de génotoxicité, les couples d'individus sont choisis au stade de précopulat (Fig. 12) (stade de mue D2 pour la femelle). Cette sélection nous permet d'avoir des mâles en fin de spermatogenèse avec une gonade mature.

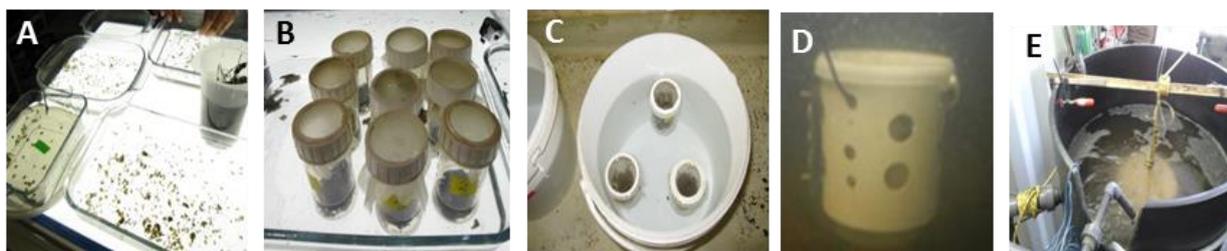


**Fig. 12 :** Tri des gammares sur table lumineuse au stade pré-copulatoire.

### 2.2.3. Exposition des gammares aux effluents de la station d'épuration

Afin d'étudier l'impact de contaminants sur les organismes en milieu naturel, le laboratoire a développé depuis plusieurs années des outils basés sur l'utilisation de gammares encagés (Xuereb *et al.*, 2009). La méthodologie d'encagement est une adaptation de celle proposée par Maltby (1990) qui a été déployée avec succès sur de nombreux organismes (Mulliss *et al.*, 1996). La technique repose sur l'encagement de gammares calibrés dans des pots cylindriques en polypropylène de 5 cm de diamètre et 12 cm de hauteur. Ces systèmes sont clos par un couvercle percé au préalable, vissé sur un carré de toile à bluter avec une maille de 500 $\mu$ m (Fig. 13 B). Le fond de la chambre d'encagement est un carré de toile à bluter soudé sur les bords du tube de polypropylène. Les systèmes sont transportés dans des bidons en polypropylène (Fig. 13 C) contenant le même milieu de stabulation, ces bidons sont placés dans des glacières pour maintenir la température. Sur le site, les systèmes sont transférés dans des bidons troués (Fig. 13 D) permettant ainsi le passage de l'eau.

Ces derniers sont plongés dans la cuve à exposition (Fig. 13 E) contenant les eaux de sortie du pilote SPIBEL de la station d'épuration Bellecombe (Fig. 14).



**Fig.13:** Tri et encagement du gammare dans la station d'épuration Bellecombe. **A :** tri de gammares sur table lumineuse ; **B :** remplissage des systèmes ; **C :** seau de transport des systèmes ; **D :** seau percé d'exposition ; **E :** cuve d'exposition remplie d'eau de sortie de la station d'épuration.

Dans le cadre d'un projet d'évaluation des traitements à l'ozone, piloté par Degrémont (constructeur de STEP) et Alain Devaux (ENTPE), nous avons entrepris des expérimentations sur le gammare afin d'étudier l'effet de l'ozonation sur les effluents hospitaliers. Pour ce faire, deux temps d'exposition des gammares, détaillés ci-après (a et b), ont été réalisés dans le pilote (SIPIBEL) aux eaux de sortie de la station d'épuration après traitement avec la boue activée suivie par l'ozonation (Fig. 14). La conductivité de la station d'épuration étant de 1800 $\mu$ S/cm, pour éviter un choc dû à la salinité, les gammares ayant été stabulés dans l'eau de forage, ont été placés pendant 2h dans des bains dilués à 50% par l'eau de la station d'épuration dans laquelle ces derniers vont séjourner pendant 15 jours.

Ainsi les gammars sont exposés à des effluents traités au fil du temps par différentes concentrations en O<sub>3</sub>. Parallèlement, les gammars devant servir de témoins, sont maintenus dans l'eau de forage. Afin de palier à un effet artéfactuel dû à la salinité, les gammars sont exposés à une eau synthétisée par ajout de sels nécessaires à l'obtention de la même salinité que la station d'épuration (tableau III). Ce « nouveau » témoin a pour objectif d'appréhender l'impact de ces fortes teneurs en sels et de pouvoir faire la distinction entre un effet lié à la contamination et un effet potentiellement lié à ces fortes teneurs en ions.

a) Conditions d'expositions des gammars aux effluents de la station d'épuration en mars 2015:

- **Ligne BA:** Effluent pré-ozoné [3,2 mg O<sub>3</sub>/L] + boues activées ozonées recirculée [3,3 mg O<sub>3</sub>/L],
- **Ligne BA2:** Effluent pré-ozoné [3,2 mg O<sub>3</sub>/L] + boues activées
- **Control :** H<sub>2</sub>O forage du laboratoire

b) Conditions d'expositions des gammars aux effluents de la station d'épuration en Juin 2015:

- **T :** (Control 1) H<sub>2</sub>O forage
- **TS :** (Control 2) H<sub>2</sub>O step synthétisée
- **BA :** Effluents +traitement biologique (boue activée)
- **BA2 :** Effluents + traitement biologique (boue activée) + ozonées recirculé [9,4 mg O<sub>3</sub>/l]

**Tableau III:** Synthèse de l'eau de la step Bellecombe pour exposition des individus control 2

produit	ajout de produit (en mg par litre d'eau de forage)	Conductivité $\mu\text{s}/\text{cm}$	pH
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	60	1.8	7.4
Na Cl	900	–	–
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	40	–	–
MgCl <sub>2</sub>	30	–	–
K Cl	40	–	–

La Figure 14 représente le pilote SIPIBEL d'exposition des gammares avec ses deux lignes de traitement. Les gammares sont exposés aux eaux de sortie, dans le dernier bac de la ligne de traitement.

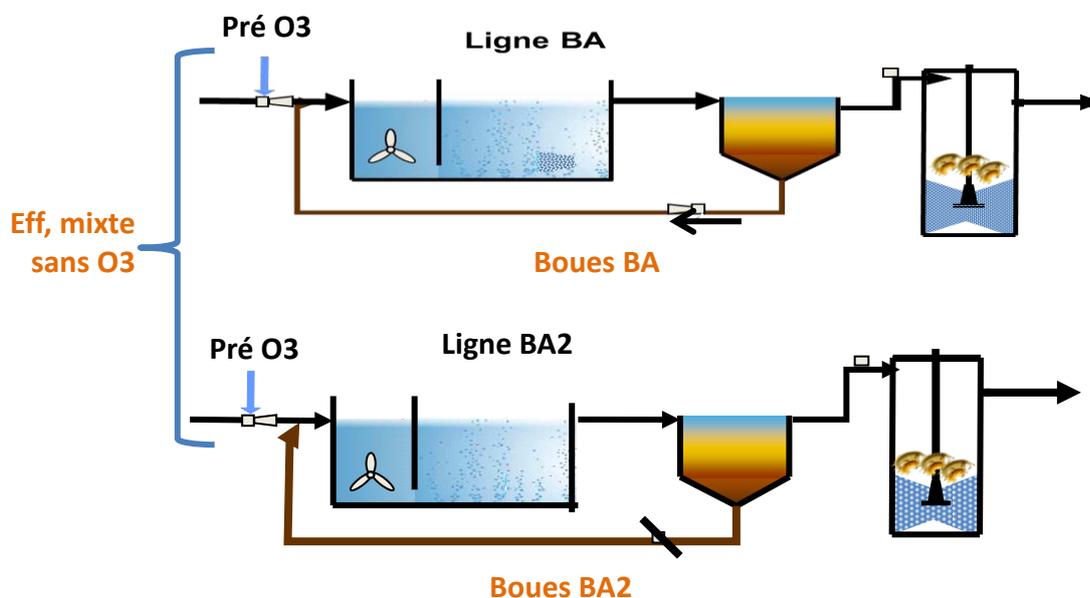


Fig. 14: Schéma du pilote SIPIBEL pour l'encagement des gammares.

### Protocole utilisé

4 réplicats de 7 couples en précopulat ayant une taille entre 10-12mm ont été sélectionnés puis répartis dans des systèmes d'encagements (Fig. 13 A, B). Les gammares mis dans ces systèmes sont nourris par des feuilles d'aulnes. Ils ont été exposés pendant en moyenne 14 jours (temps estimé pour un cycle de mue à  $T^{\circ}$  12-14°C). Ainsi le temps d'exposition des gammares est calculé selon la température du site d'exposition de telle manière à récupérer les femelles en stade C2 (Chaumot *et al* 2013), stade où le mâle est accroché à la femelle. Ce stade est appelé stade de précopulat, stade où la gonade du mâle se trouve à l'état mature. Les gammares sont exposés aux effluents hospitaliers et urbains de la station d'épuration Bellecombe, une deuxième exposition est réalisée au laboratoire avec l'eau de forage (contrôle 1) et une eau reconstitué aux conditions de la station d'épuration (contrôle 2).

### **3. Mesure des réponses biologiques chez le gammare *G. fossarum***

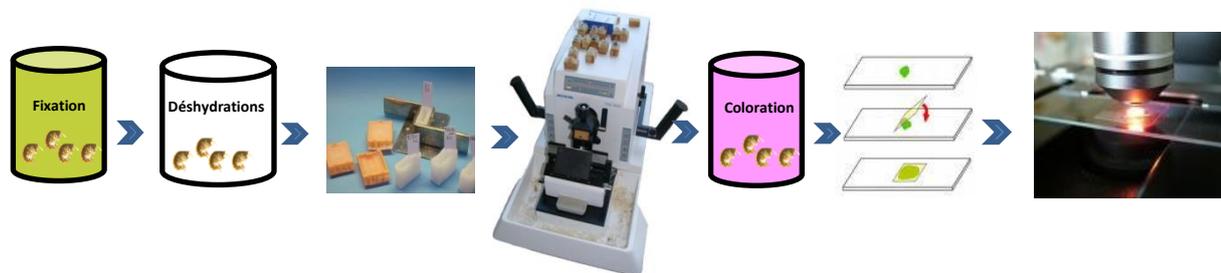
#### **3.1. Etude histologique des tissus gonadiques**

Les femelles *G.fossarum* au stade B, C1, C2, D1 et D2 et les mâles aux stades J2, J4 et J7 sont fixés par le liquide de Bouin (75% de solution aqueuse saturée d'acide picrique, 20% de formaldéhyde et 5% d'acide acétique) (R. et M. Martoja, 1967) pendant 48 heures, sont ensuite rincés durant plusieurs jours avec de l'alcool 75° régulièrement renouvelé pour éliminer au maximum le fixateur, puis déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de degré croissant (3 X 90 min à 90° et 3 X 45 min à 100°). L'étape d'éclaircissement est réalisée en utilisant le butanol pendant 24h permettant la transition entre l'alcool et la paraffine, enfin les échantillons sont placés dans un bain d'Histochoice® Clearing Agent (Sigma) pendant 3h. Les échantillons sont ensuite inclus dans des bains successifs de paraffine Paraplast X-tra® (Mc Cormick<sup>MT</sup>) (à 55°C, point de fusion de cette paraffine) pendant 3 X 2 h et 1 X 24 h, garantissant ainsi la pureté du milieu d'inclusion. Les gammare sont mis en bloc à l'aide de barres de Leuckart, pour être sectionnés au microtome RM 2245 leica® en coupes sériées de 4 µm d'épaisseur, puis étalées sur lames préalablement traitées avec 3-aminopropyl tryethoxysilane (2% dans de l'acétone) pour une meilleure adhésion tissulaire, puis séchées à l'étuve pendant 24h à 37°C. Après un déparaffinage des tissus et une réhydratation permettant une coloration (2 bains de 5min d'Histochoice®, 1 bain de 5min de butanol, 1 bain de 5min chacun d'alcool absolu, 95°, 75° puis 1 bain d'eau de robinet préparant ainsi les tissus à une meilleure accroche de l'hématoxyline). En effet, pour une identification structurale, les lames ont été colorées à l'hématoxyline de Groat et l'éosine pour leurs affinités tinctoriales respectives pour les structures nucléaires et cytoplasmiques. Aussitôt après le dernier bain de solvant, une goutte de liquide de montage Histochoice® mounting medium (Microm® France) est déposée sur la lame et une lamelle est appliquée de façon à ce que la résine recouvre l'ensemble de la coupe. Les observations des lames et les photographies ont été réalisées à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse 80i® muni d'une caméra numérique associée à un logiciel d'acquisition NIS-Elements D. version 4.12 (Nikon®). La Figure 15 illustre le protocole de la technique histologique réalisée pour cette étude.

##### **3.1.1. Standardisation de la recoupe des femelles**

Les femelles ont été coupées de façon à pouvoir observer les deux ovaires en coupes transversales sur une majorité de leur longueur. Les ovaires étant situés entre le 2ème et le 7ème segment thoracique, nous avons commencé la recoupe 1 mm après les yeux pour réaliser 20 bandes de 10 coupes de 4µm d'épaisseur réparties sur 5 lames. Un espace de 60 µm est laissé entre deux bandes.

Cette longueur a été choisie en fonction de la taille des ovocytes en début de vitellogenèse pour minimiser le risque de passer à côté d'un ovocyte tout en conservant un nombre de lames raisonnable d'un point de vue technique. Les mâles ont été coupés latéralement pour une meilleure différenciation cellulaire.



**Fig. 15 :** Les différentes étapes de la technique histologique. Fixation : Par le liquide Bouin; Déshydratation : Par passage dans des bains d'alcools de degré croissant ; Blocs de paraffine : Enrobage et mise en blocs de paraffine ; Microtome : Coupe fine= 4-5  $\mu\text{m}$  ; Coloration : HE ; Lames : Fixation des échantillons entre lames et lamelle; Microscope : Observation de la préparation.

### 3.1.2. Caractérisation histologique et morphologique des cellules germinales mâle

Afin d'identifier la structure des cellules germinales mâles de *G. fossarum* et de caractériser les différentes étapes de maturation des gamètes, étape importante pour le dénombrement et nécessaire dans l'essai des comètes. Nous avons réalisé un frottis sur lame : après dissection, prélèvement et mise en suspension de la gonade dans 20 $\mu\text{l}$  de PBS, le prélèvement est déposé sous forme de frottis sur une lame de verre traitée par (3-aminopropyl) tryethoxysilane (2% dans de l'acétone), puis laissé à l'air libre sous la hotte. Une fois sèches, les lames sont colorées par 1ml de solution May-Grünwald Giemsa pendant 3min, qui est ensuite diluée par ajout de 1 ml de tampon à pH 7 pendant 1 min. Les lames sont ensuite rincées rapidement par le tampon, puis recouvertes par 1 ml d'une solution de Giemsa dilué au 1/30e dans le tampon pH 7. Cette coloration, selon Pappenheim, permet la libération des produits actifs en milieu neutre provoquant ainsi leurs précipitations, ainsi le May-Grünwald colore les éléments acidophiles et le Giemsa colore les cytoplasmes et la chromatine des noyaux. Les lames sont ensuite rincées par le tampon puis déshydratées et montées entre lames et lamelles pour être observées au microscope Nikon®.

## 3.2. Etude de la qualité des cellules germinales males

### 3.2.1. Optimisation de la méthode d'extraction et de comptages des spermatozoïdes

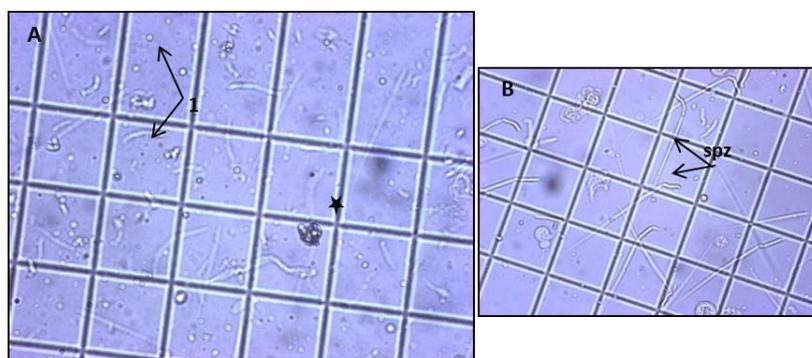
#### 3.2.1.1. Utilisation de broyages manuel et mécanique

Pour une meilleure estimation de la quantité de spermatozoïdes, dans un premier temps, nous avons procédé à deux techniques de dissociation de la gonade : l'une manuelle, consiste à broyer avec un cône d'une micropipette (Fig. 16 B) et l'autre, à l'aide de microbilles en verres de 2mm de diamètre (Fig.16 A).

Pour les deux techniques, nous avons réalisé deux dilutions avec et sans ajout de 10 µl de BSA, le tableau IV récapitule les conditions expérimentales.

**Tableau IV :** Méthodes de dissociations pour dénombrement des spermatozoïdes

Tubes	dissociation	VPBS (µl)	VBSA (µl)
2 tubes	manuelle	20/40	+/- 10
2 tubes	2 billes 10 mm pendant 5s	20/40	+/- 10
2 tubes	2 billes 10 mm pendant 10s	20/40	+/- 10



**Fig.16 :** Comptage des cellules sur lame de Malassez. **A :** Dissociation cellulaire par broyage aux microbilles ; 1 : Flagelles fragmentés, étoile : Fragment cellulaire ; **B :** Dissociation manuelle ; spz : Spermatozoïdes.

Au vu des résultats précédemment obtenus (Fig. 16), la technique a été finement ajustée, en utilisant uniquement le broyage manuel, mais pour un résultat plus fiable, nous avons testé deux dilutions, en ajoutant ou omettant la BSA (tableau V).

**Tableau V** : Les conditions étudiées pour le dénombrement des spermatozoïdes

Tube	V PBS ( $\mu\text{L}$ )	BSA (10 $\mu\text{l}$ )	Total de 10 rectangles	N de bâtonnet /ml $\ast(10^3)$	N de bâtonnet/ paire de gonade /mâle $\ast(10^3)$
1	20	+	50	500	15
2	20	-	26	260	5.2
3	40	+	24	240	12
4	40	-	25	250	10

### 3.2.1.2. Validation de la méthode de comptage

Afin de valider la sensibilité de la méthode de comptage des spermatozoïdes, la mesure a été réalisée sur 6 mâles en précopulat et 6 mâles juste après la fécondation, les conditions expérimentales sont récapitulées dans le tableau VI ci-après

**Tableau VI**: Evaluation de la spermatogenèse avant et après la fécondation

Tubes	Dissection	Conditions	V PBS ( $\mu\text{l}$ )	V BSA ( $\mu\text{l}$ )	comptage
6 tubes	manuelle	j7	20	10	10 rectangles, 200cellules min
1 paire gonade/ tube		j7	20	1	nombre de cellules/10carré $\ast$ facteur
6 tubes	manuelle	j 0	20	10	/1000
1paire de gonade/tube		j0	20	10	

Pour développer le biomarqueur de génotoxicité des spermatozoïdes, il était nécessaire de vérifier dans un premier temps, la viabilité des cellules d'intérêt par *Le Live Dead sperm viability Kit*®, développé par invitrogen® pour le sperme bovin, que nous avons adapté pour le sperme de gammare. Ce test permet de colorer les cellules vivantes en vert et les cellules mortes en rouge observées en épifluorescence. Le tableau ci-après synthétise la préparation des solutions utilisées pour la dilution et la mise en suspension des spermatozoïdes (Tableau VII).

**Tableau VII:** Préparation de la solution de dilution pour la gonade mâle *G. fossarum*

composant	Rôle	concentration
HEPES	Tampon de dilution	150mM
BSA	stabilisant/ précipitant	10%
Composant A	SYBER 14® (émission en vert)	5µl (dilué au 1/50 dans HEPES)
Composant A	IP (iodure de propidium)	5 µl

### Protocole utilisé :

Après dissection, la paire de gonade est mise en suspension dans un tube Eppendorf de 0,5 ml contenant 20 µL du tampon HEPES puis conservée dans la glace. Le tableau VIII renseigne sur la préparation du tampon HEPES. Le tableau IX synthétise le protocole mis au point, utilisé pour le comptage de la viabilité cellulaire du sperme de gammare.

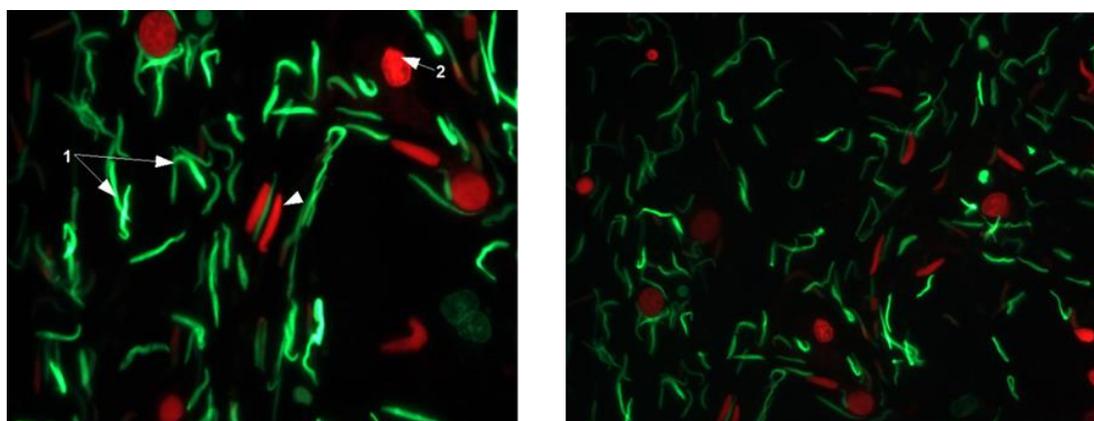
**Tableau VIII:** Protocole de préparation du tampon HEPES (solution de dilution du composant A).

composant	concentration	pH
HEPES	10mM	7,4
Na Cl	150mM	-
BSA	10%	-

**Tableau IX:** Protocole du test de la viabilité par le kit *Live Dead sperm viability*®

type cellulaire	volume	réactifs	incubation	microscopie	montage	observation
spermatozoïdes	20µl	5 µl SYBER 14 dilué 1/50 dans HEPES 5 µl IP	10 mn à 37 °C  10mn à 37°C	épifluorescence x40	entre lame et lamelle	200 cellules minimum cellules mortes: rouge cellules viables: vert

L'essai a permis une observation cellulaire microscopique très différenciée, et évalué une viabilité (Fig. 17). Le Kit emploie deux fluorochromes spécifiques des acides nucléiques, un agent fluorescent vert : le SYBR 14, intercalant des membranes cellulaires vivantes, qu'il colore en vert, et l'IP (Iodure de propidium) qui pénètre les cellules mortes et les colore en rouge. Ce Kit étant uniquement conçu pour évaluer la viabilité cellulaire du sperme bovin développé par invitrogen®, nous le validons également pour la viabilité cellulaire du sperme de gammare représenté ci-après (Fig. 17).



**Fig. 17:** Validation du marqueur de la viabilité cellulaire par « *Dead life sperm viability*® ». 1: spermatozoïdes vivant ; 2 : spermatogonie morte ; flèche : spermatozoïdes mort.

### 3.2.2. Evaluation de la viabilité des spermatozoïdes sur cellules de malassez

L'étude de la viabilité est indispensable pour la validité du protocole du test des comètes, qui doit se faire sur 99% de cellules vivantes. Ainsi le dénombrement cellulaire est réalisé dans le but d'optimiser une méthodologie de comptage des spermatozoïdes. Deux protocoles de numération des spermatozoïdes chez *G. fossarum* sont mis au point. L'un évalue la viabilité par comptage cellulaire

sur cellule de Malassez, tandis que l'autre l'évalue par le kit commercial « dead life sperm viability kit® » développé par invitrogen® pour le mammifère. Ce kit est adapté au laboratoire pour le sperme de gammare, il permet de quantifier les cellules vivantes et les cellules mortes grâce à un fluorochrome SYBR 14, un intercalant des membranes cellulaires vivantes, qui les colore en vert. A l'inverse, le IP (Iodure de propidium) est un fluorochrome qui pénètre dans les cellules mortes et les colore en rouge. Plusieurs essais et concentrations que nous détaillerons plus loin, sont réalisés avant d'aboutir à la concentration optimum utilisée.

### Protocole de comptage /viabilité de spermatozoïdes chez *G. fossarum*

Après la dissection, la gonade est dilacérée dans 20µl de PBS 1% + 10µl de BSA. La suspension est ensuite déposée sur la lame de Malassez afin de réaliser le comptage des spermatozoïdes (Fig. 18).

Le nombre de spermatozoïdes dans 10 rectangles (quadrillés) de la lame de Malassez est déterminé par observation sous microscope DM 2500 LEICA® (grossissement\* 40).

Le volume d'un rectangle quadrillé étant de 0,01µl, en comptant 10 rectangles, il suffit alors de multiplier le résultat par  $10^4$  pour obtenir le nombre de cellules/ml. Le nombre total de spermatozoïdes contenus dans 20 µl de solution de dilution a été calculé en multipliant le nombre total des 10 rectangles par  $10^4$  \* facteur de dilution/1000.

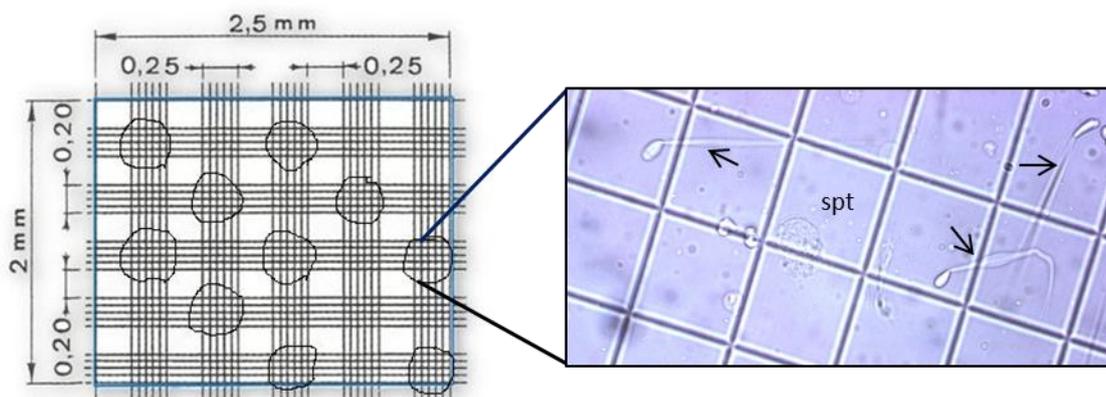
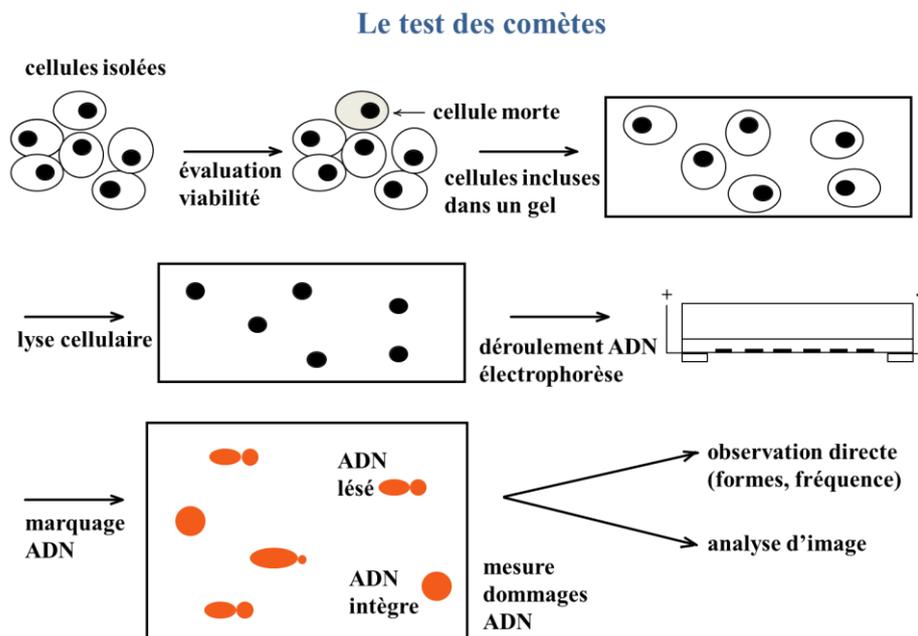


Fig. 18 : Méthode de comptage sur cellule de Malassez.

### 3.2.3. Evaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes par le test des comètes

Seule les mâles en couples formant des précopulats sont sélectionnés, cela nous assure une quantité suffisante et nécessaire de gamètes pour la réalisation du test des comètes.

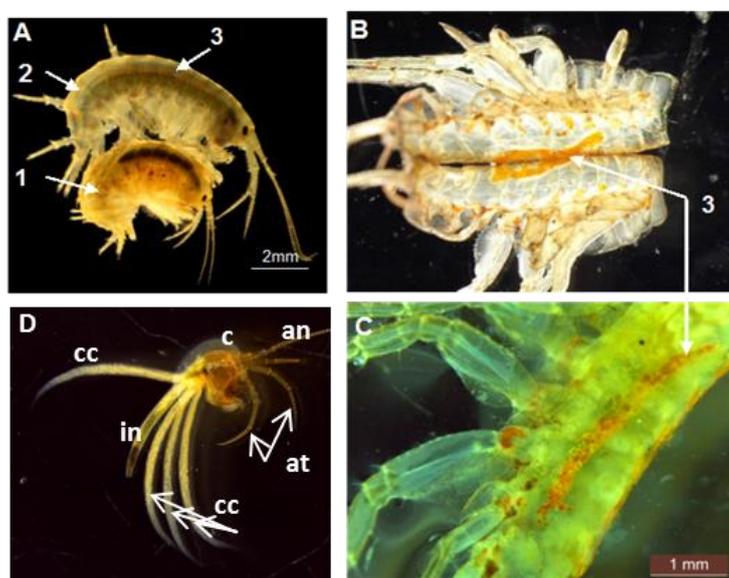
Après dissection et l'évaluation de la viabilité, les cellules sont soumises à une électrophorèse sur microgel d'agarose (Fig. 19). Les dommages à l'ADN sont quantifiés sous microscope à epifluorescence équipé d'une caméra et d'un logiciel Comet assay<sup>TM</sup>.



**Fig. 19** : principe du test des comètes

### 3.2.3.1. Dissection et prélèvement des gonades

Afin de réaliser le test de génotoxicité, les gammars mâles en précopulat, avec des femelles portant des jeunes (Fig. 20A) sont disséqués sous une loupe binoculaire Leica® au grossissement x40. Le céphalon, le tube digestif ainsi que les quatre caecums (Fig. 20 D) sont supprimés. Ensuite, la cuticule dorsale et ventrale est excisée afin de retirer délicatement les gonades mâles (Fig. 20 B et C).



**Fig. 20** : Morphologie & dissection de *G. fossarum*. **A** : Couple de gammare en précopulat, 1 : Femelle ; 2 : Male ; 3 : Gonade mâle. **B et C** : Dissection et ouverture en portefeuille du corps du gammare, 3 : Gonade ; **D** : Dissection du prosoma, c : céphalon; an: Antennule; at : Antennes; cc: Caecum; in: Intestin.

### 3.2.3.2. Dépôt des cellules sur lames

La gonade est dilacérée dans 20µl de PBS 0.01M à 4°C, et les spermatozoïdes recueillis sont additionnés à une suspension d'agarose à bas point de fusion (Ultra Pure™ LMP Agarose – Invitrogen) à 1% à 37°, puis sont étalés sur une lame préalablement couverte de gel d'agarose à 0.8% ayant un haut point de fusion. Préparées dans du PBS sans Mg<sup>2</sup> ni Ca<sup>2</sup> les lames sont recouvertes d'une lamelle et déposées au réfrigérateur à 4°C pour polymérisation.

### **3.2.3.3. Lyses cellulaire**

La spermiogénèse est le processus de production des spermatozoïdes, qui permet une condensation extrême du génome afin de protéger son intégrité. Lors de la thèse d'E. Lacaze (2010), plusieurs temps de lyse ont été testés pour permettre la décompaction et la migration de la molécule d'ADN, la durée optimale de 18h a été déterminée.

La lamelle est donc retirée et la lame est plongée dans la cuve contenant la solution de lyse ( NaCl 2.5 M, Tris 10mM, Na<sub>2</sub>EDTA100mM, DMSO 10%, Triton X-100 1%) pendant 18 à 20h dans une cuvette refroidie à 4°C à l'abri de la lumière.

### **3.2.3.4. Dénaturation de l'ADN**

Cette étape de relâchement de la structure superenroulée et de séparation des deux brins d'ADN a lieu sous condition alcaline forte, le pH du tampon est supérieur à 13. Les lames sont installées dans la cuve à électrophorèse horizontale, immergées dans un tampon fraîchement préparé (NaOH 0.3M, Na<sub>2</sub>EDTA 1Mm, pH >13.0) pendant 20 mn à 4°C toujours à l'obscurité.

### **3.2.3.5. Electrophorèse des fragments d'ADN**

La solution tampon utilisée est identique à celle de la phase de déroulement, le pH du tampon est toujours supérieur à 13. L'électrophorèse est réalisée sous un champ électrique de 0.6v/cm (22v), avec une intensité de 300 mA pendant 24 mn à 4°C et toujours à l'obscurité pour permettre une bonne reproductibilité. Cette opération permet la migration des brins d'ADN selon leurs poids moléculaires.

### **3.2.3.6. Neutralisation**

L'électrophorèse s'étant déroulée en milieu alcalin, les gels sont neutralisés pour permettre un ré-appariement des brins d'ADN. Les lames sont alors retirées délicatement de la cuve, égouttées et rincées pendant 3 fois 5 mn avec une solution de Tris 0.4 M, pH 7.5 à température ambiante.

### **3.2.3.7. Fixation et conservation des lames**

Les lames sont ensuite déshydratées pendant 20mn dans un bain d'alcool absolu puis séchées à l'air libre. Cette étape permet la conservation des lames.

### 3.2.3.8. Coloration des lames

La coloration des lames se fait à l'aide du BET (bromure d'éthidium), fluorochrome de type phénontridinique dont la structure plane autorise son intercalation entre les bases de l'ADN.

Les noyaux sont colorés par 20µl de BET à 10% (0.05Mm). Les lames sont colorées au moment de l'observation.

### 3.2.3.9. Lecture des lames et traitement statistique des résultats

Les observations sont réalisées au grossissement x 40 à l'aide d'un microscope à épifluorescence (leica® DM 200), équipé d'une caméra monochrome Perseptive instrument®, reliée à l'analyseur d'image «Comet Assay 4» ( fig. 21) qui permet de traiter individuellement les cellules (Fig. 21). Cinquante cellules par gel, 2 gels par lame sont traitées et 12 lames par condition sont analysées.

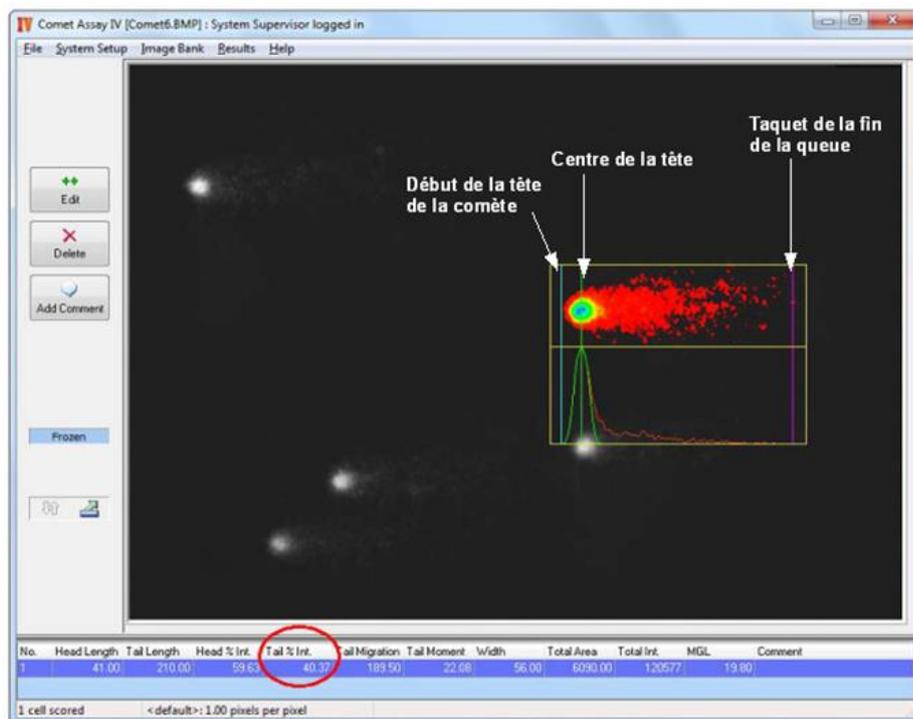
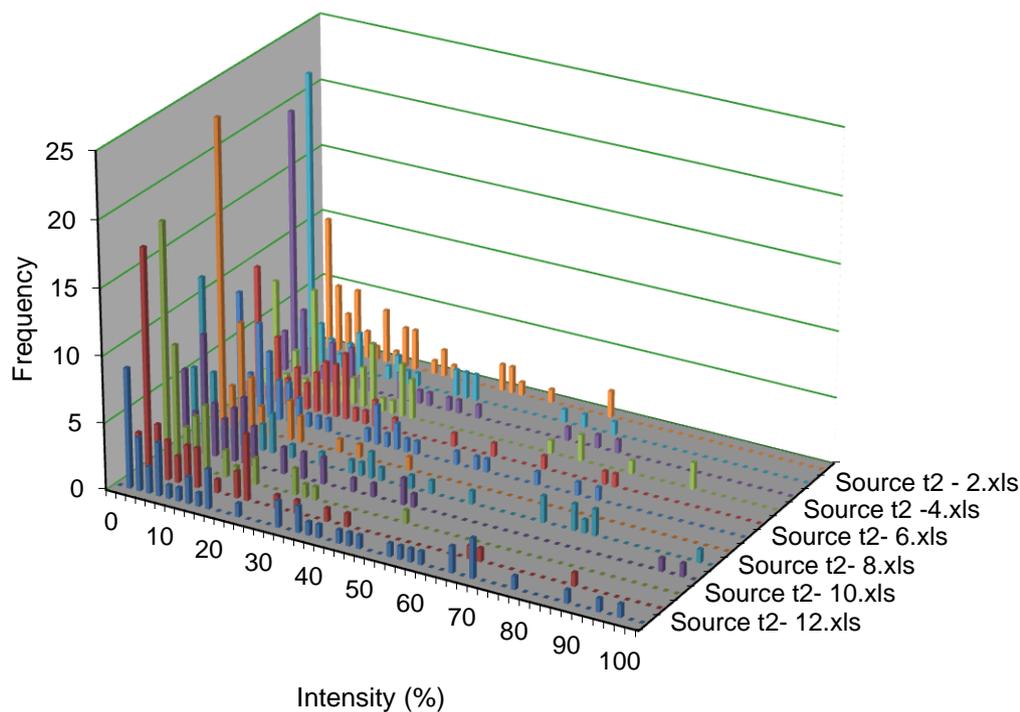


Fig. 21: Logiciel Comet Assay IVTM® pour lecture des dommages à l'ADN.



**Fig. 22:** Estimation des dommages à l'ADN (% tail intensity) par le logiciel Comet Assay IVTM®.

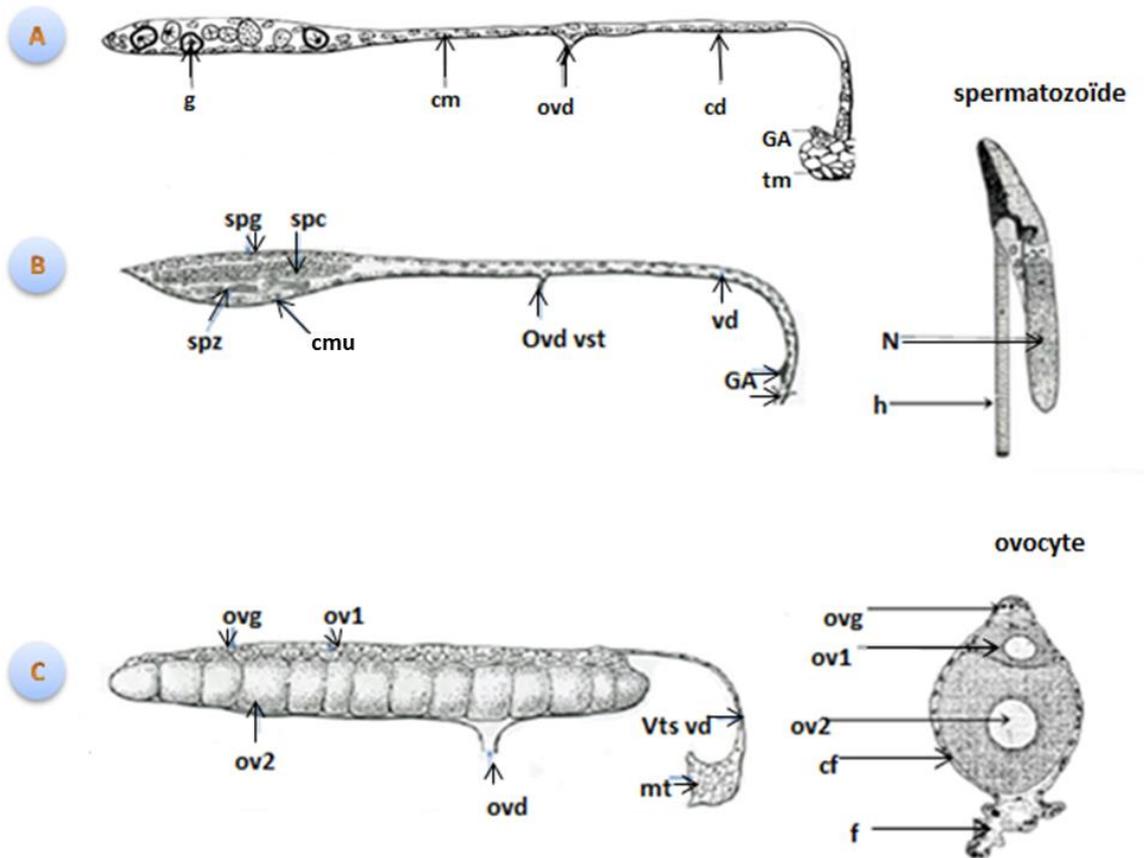
Les paramètres mesurés sont « % Tail intensity » moyen et médian, représentant la proportion d'ADN dans la queue de la comète et le paramètre «tail moment » représentatif du produit du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète par sa longueur. Après avoir vérifié tous les paramètres, les résultats sont tous exprimés par le pourcentage médian d'ADN dans la queue (median % tail intensity), paramètre qui semble être le plus pertinent pour mettre en évidence les effets.

Les résultats sont traités par le logiciel Statistica (version 9) et R, des tests paramétriques et non paramétriques sont appliqués. Le test Anova et le test Kruskal-Wallis pour comparer les moyennes sans condition de normalité des distributions ainsi que le test Willcoxon-Man-Whitney pour tester l'hypothèse d'une différence significatives entre les moyennes respectives de deux conditions expérimentale indépendante.

## 1. Présentation de l'ovogenèse et de la spermatogenèse

Pour faciliter la compréhension de nos résultats, nous faisons un rappel bibliographique sur la gamétogenèse. A l'éclosion l'appareil génital du gammare est identique chez les deux sexes (Fig. 23 A), ce stade est appelé « stade indifférencié ». La gonade est constituée alors par deux cordons mésodermiques enfermant des gonies séparées les unes des autres par des cellules mésodermiques (Charniaux-Cotton 1973) accolées au septum péricardique de part et d'autre du tube digestif, les ébauches des voies déférentes des deux sexes sont présentes. A partir de la prophase de la première division méiotique et dès la deuxième inter-mue, certaines gonies forment des ovocytes parsemés tout le long du cordon ovarien (Fig. 25). Les cellules germinales se multiplient pour former des cellules goniales secondaires qui se transforment en spermatocytes primaires chez le mâle (Fig. 23 B) et en ovocytes primaires chez la femelle (Fig. 23 C). Toutefois chez le gammare, Charniaux-Cotton (1973) a bien souligné l'apparition de l'ovogenèse avant la spermatogenèse.

Les spermatocytes et les ovocytes primaires subissent une première division méiotique formant les spermatocytes secondaires, puis une seconde division pour produire les spermatides haploïdes, et une maturation permettant d'obtenir les spermatozoïdes (Charniaux-Cotton 1959, Bacci 1965). La croissance previtellogénétique est due à une accumulation de ribosomes et de glycoprotéines dans des vésicules ergastoplasmiques (Zerbib 1973). Ainsi, les ovocytes matures sont le résultat d'un renouvellement cellulaire formé par un tissu mésodermique continu et permanent (Charniaux-Cotton ., 1974) (Fig. 24, 25).



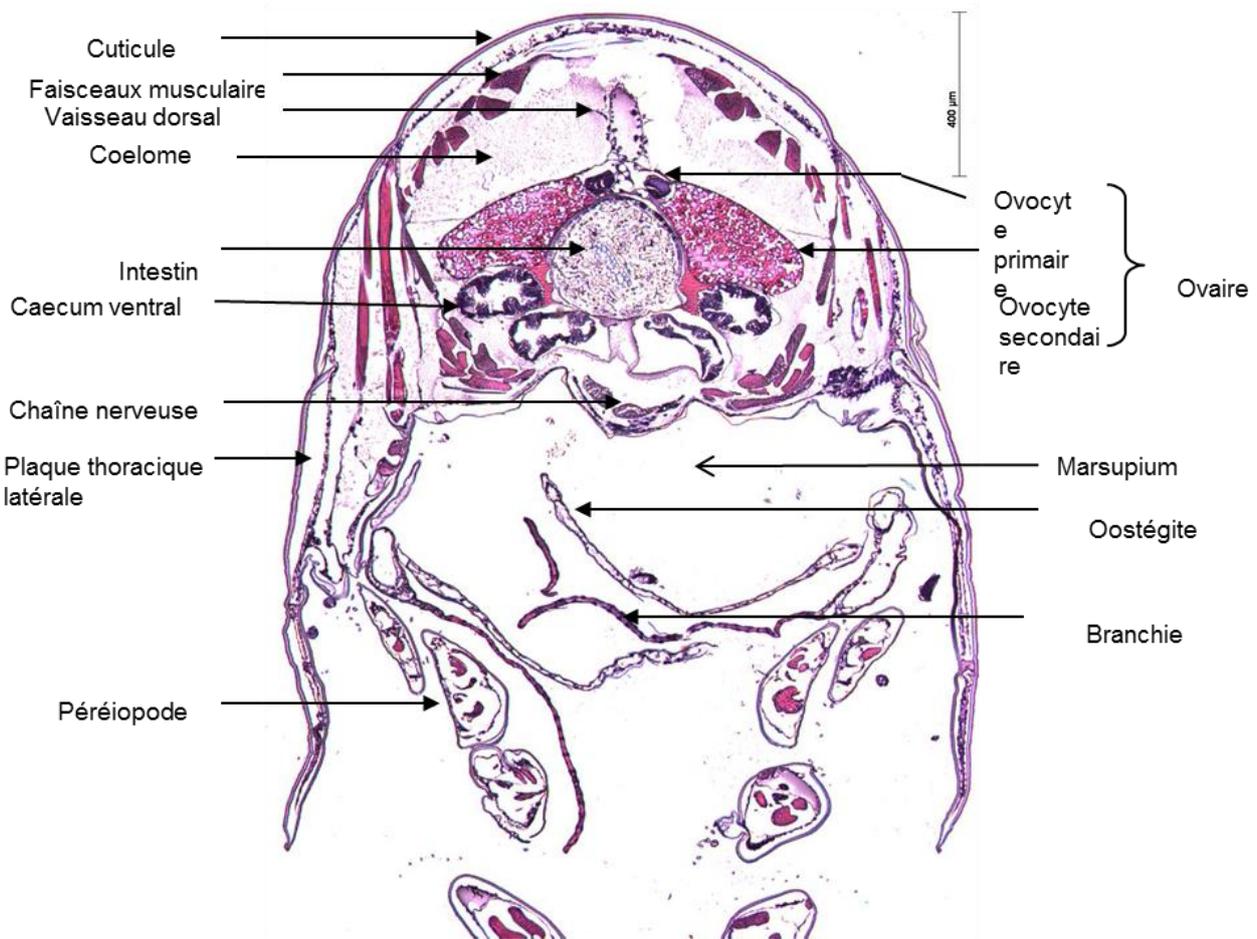
**Fig. 23 :** Section longitudinale de l'appareil génital mâle et femelle du gammare (d'après Charniaux-Cotton 1965, Meusy, 1972, Reger *et al.*, 1979); **A :** Stade indifférencié ( 1<sup>e</sup> intermue ); **B :** Jeune mâle, peu après la mue ; **C :** Femelle en vitellogenèse. spg : Spermatogonie. G : g : Gonie ; cm : Cellules mésodermiques ; ovd : Oviducte ; cd : Canal déférent ; GA : glande albumen ; tm : tissu mesenchymateux ; spc : spermatocyte ; spz : spermatozoïde ; cmu : cellules à mucus ; ovd vst : Oviducte vestigial ; vd : Vas déférent ; GA: Glande androgène ; N : Noyau ; h : Hampe ; C : Appareil génital femelle ; ovg : Ovogonie ; ov1 : Ovocyte primaire ; ov2 : Ovocyte secondaire ; ovd : Oviducte.

## 2. Caractérisation de l'appareil génital femelle.

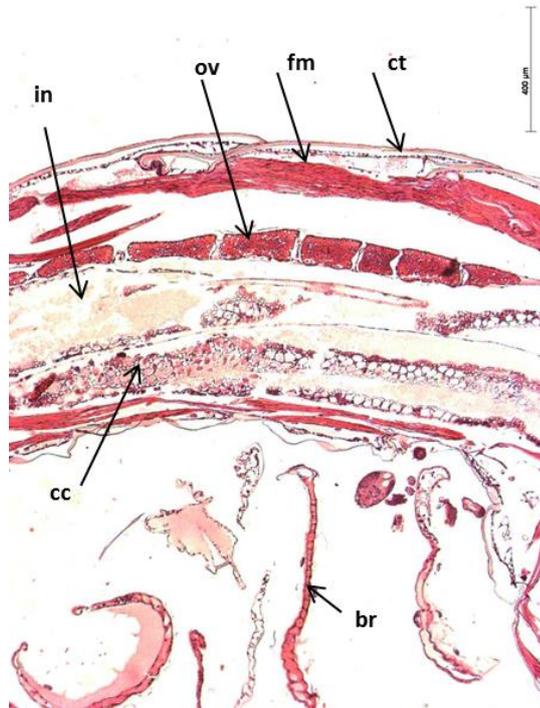
La caractérisation histologique et anatomique de la femelle *G. fossarum* sain a permis d'instruire les différents organes internes, pour mieux comprendre dans un premier temps, le processus de l'ovulation, puis dans un deuxième temps de diagnostiquer les effets du polluant.

Les Fig. 24 et 25 représentent respectivement une section transversale et longitudinale sur lesquelles apparaissent les ovocytes au stade D1.

Le corps du gammare est délimité par une cuticule fine, segmentée et un épithélium simple (Fig. 24, 25). Il possède des appendices articulés et des muscles striés. Son coelome contient un tube digestif central, entouré par deux caecums ventraux et deux dorsaux. L'hémolymphe circule dans le vaisseau dorsal suite aux battements de la vésicule cardiaque, elle irrigue l'ensemble du corps et notamment les branchies ventrales (Fig. 25), protégées par les plaques latérales thoraciques. Chez la femelle, les ovaires forment deux tubes, contenant crânialement, dans la zone germinative, les cellules germinales. Les ovocytes s'y développent et sont pondus par les oviductes. Ceux-ci s'abouchent ventralement au niveau du cinquième segment thoracique. Les œufs pondus sont déposés dans un marsupium, ou chambre incubatrice, formée par des oostégites, appendices aplatis spécialisés présents chez la femelle adulte, où le développement embryonnaire s'effectue jusqu'à l'éclosion (Fig. 24).



**Fig. 24:** Identification des différents organes de *G. fossarum* femelle au stade D1 ; section transversale ; X4 ; coloration HE.



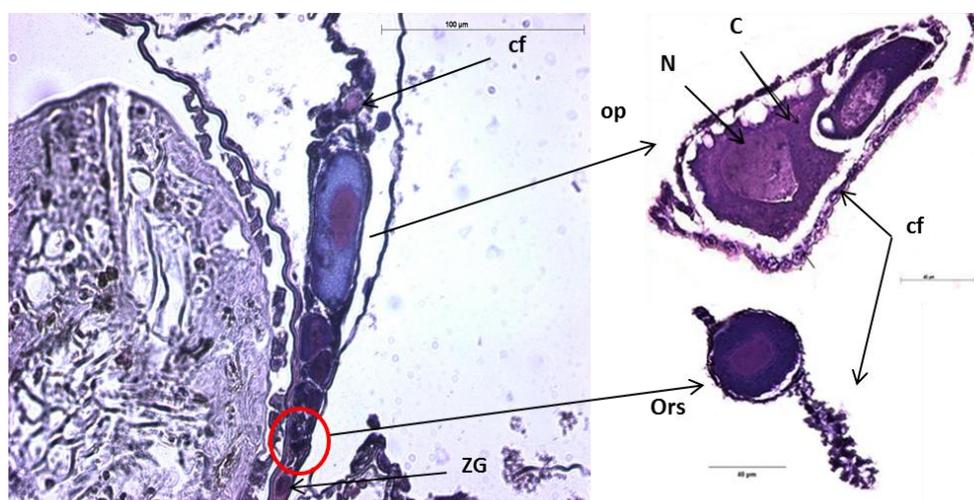
**Fig. 25** : Section longitudinale des différent organes chez la femelle *G. fossarum* en stade D1 ; X10 ; in : Intestin ; ov : Ovocyte ; fm : Faisceau musculaire ; ct : Cuticule ; br : Branchie.

### 3. Caractérisation du cycle de reproduction

Comme rapporté chez d'autres espèces d'amphipodes, le cycle de mue et le cycle de reproduction des femelles *G. fossarum* se déroulent de manière synchrone et présentent une durée de 30 jours à la température de 12 °C. Chaque stade de mue est caractérisé par un stade de développement embryonnaire (Geffard *et al.*, 2010).

#### 3.1. Structure des ovaires aux différents stades de l'ovogenèse

##### 3.1.1. Ovogonies indifférenciées



**Fig. 26 :** Caractérisation du **stade A** chez la femelle *G. fossarum* ; section transversale; X10, X100 ; op : Ovocyte primaire ; N : Noyau ; c : Cytoplasme ; cf : Cellules folliculaires ; ors : Ovocyte primaire en repos sexuel. ZR : Zone germinative.

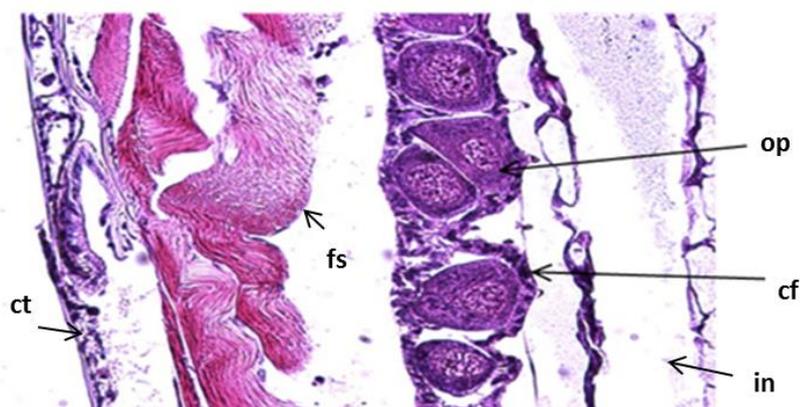
La vitellogenèse est définie comme l'accumulation par l'ovocyte de vésicules lipidiques et protéiques appelées à être utilisées comme réserves énergétiques par l'embryon, elle provoque un accroissement important des ovocytes. En accord avec Charniaux-Cotton (1973), l'ovogenèse démarre plus tôt que la spermatogenèse, les ovogonies primaires sont enfermées dans un tissu de cellules mésodermiques, formant une étroite bande accolée à la lame basale appelée zone germinative (Fig. 26). Cette zone persiste pendant toute la vie de la femelle, les ovogonies emprisonnées dans cette zone n'entrent pas en gamétogenèse, elles y effectuent des mitoses en toutes saisons.

La figure 26 représente le stade d'ovogonie primaire où les ovocytes se trouvent en zone médiale crâniale, où ils sont recrutés par vague à chaque cycle de reproduction. Lors de la vitellogenèse primaire, leur cytoplasme s'étend par accumulation de glycoprotéines dans le réticulum

endoplasmique et apparaît basophile à la coloration par l'hématoxyline, et finement granuleux. Ils sont alors appelés ovocytes primaires. Les cellules folliculaires sont présentes latéralement et forment un fin cordon.

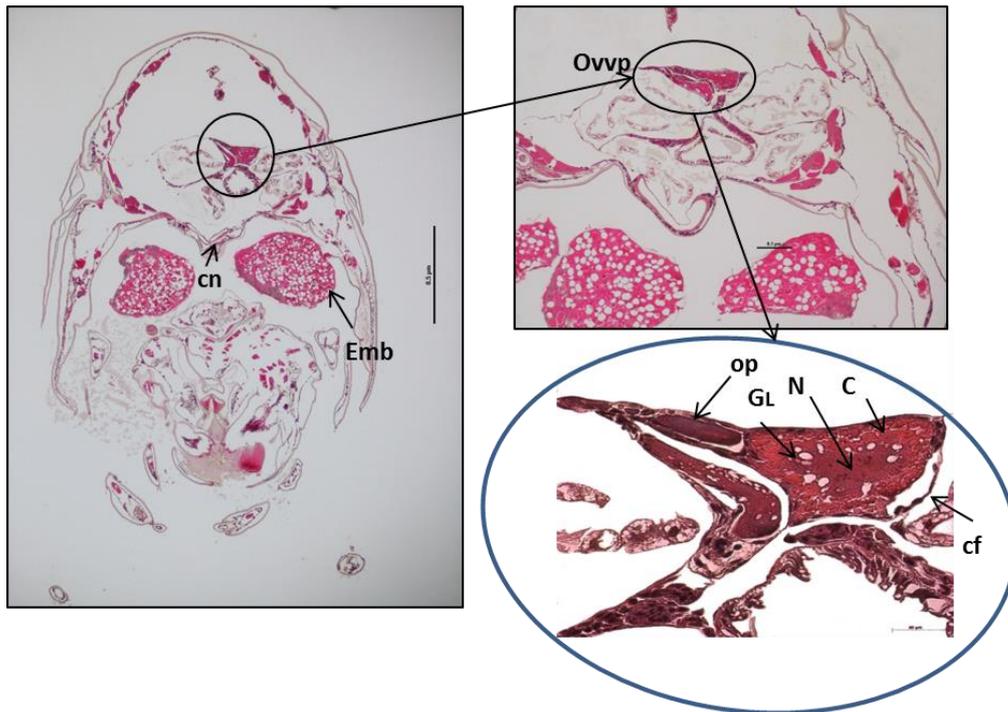
### 3.1.2. Vitellogénèse primaire

Après l'exuviation, au début du stade A, les ovocytes arrivés au terme de la vitellogénèse secondaire sont pondus. Commence alors un nouveau cycle de mue et de reproduction. Chaque ovaire est alors constitué d'une zone germinative médiale contenant les ovogonies bordées latéralement par des ovocytes en vitellogénèse primaire et des cellules folliculaires libres (Fig. 27), dont une partie est recrutée par vague à chaque cycle de reproduction. En raison de leur courte durée, les étapes de post-mue (stades A et B) ont été regroupées dans un seul stade AB (Geffard *et al.*, 2010). Chez les femelles au stade AB, les ovocytes apparaissent montrant des nucléoles basophiles avec très peu de globules lipidiques (Fig. 27).



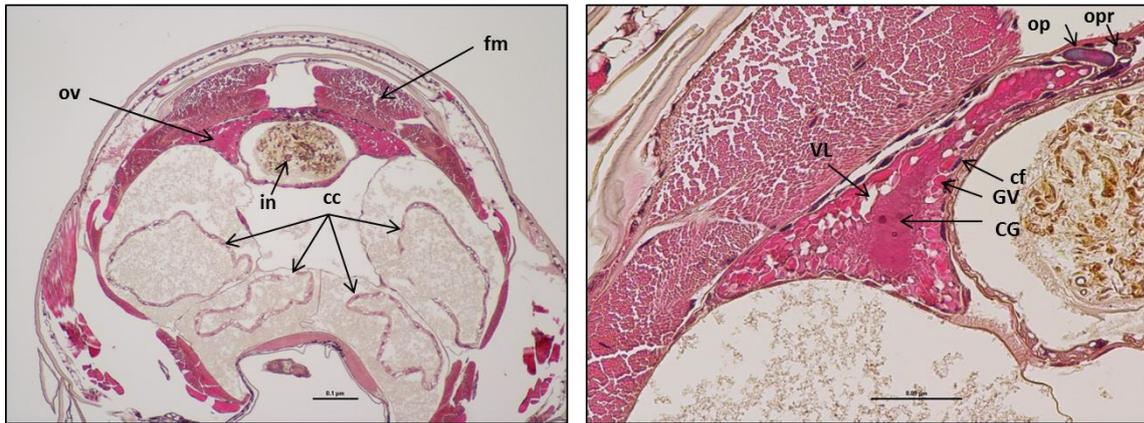
**Fig. 27** : Section longitudinale du **stade B** chez la femelle *G. fossarum* ; X 20 ; ct : Cuticule ; fs : Faisceau musculaire ; op : Ovocyte primaire ; cf : Cellules folliculaires ; in : Intestin.

Pour mieux caractériser la structure des ovocytes, nous avons choisi de sectionner le gammare dans le sens transversal, cela nous a permis une meilleure observation des différents stades de maturation. Ainsi, la Figure 28 représente le stade B où sont observés les ovocytes primaires et les ovocytes en vitellogenèse primaire côte à côte et bien différenciés.



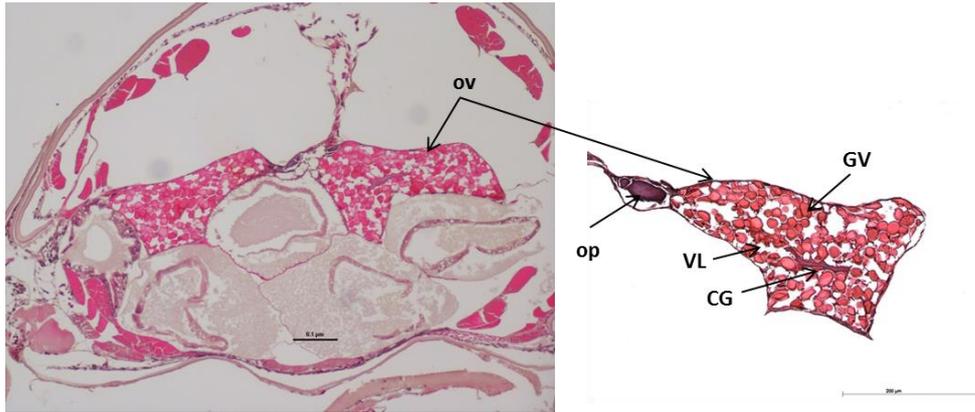
**Fig. 28 :** Caractérisation du **stade B** chez la femelle *G. fossarum* ; section transversale X4 ; X20: cn : Chaîne nerveuse ; emb : Embryon dans le marsupium ; ovvp : Ovocyte en vitellogenèse primaire ; op : Ovocyte primaire ; N : Noyau ; C : Cytoplasme ; cf : Cellules folliculaires.

Les ovocytes des femelles en stade C1 se caractérisent par la présence de quelques globules lipidiques et des vésicules éosinophiles en périphérie, provoquant le début de la vitellogénèse secondaire. Le principal changement au cours de la maturation des ovocytes a été observé entre le stade C1 et le stade C2 lorsque la vitellogénèse secondaire a lieu (Fig. 29, 30). La vitellogénèse se développe assez rapidement et les vésicules vitellines augmentent en nombre et en taille. A ce stade, les ovocytes sont garnis de vitellus colorés en rouge par l'éosine, colorant histologique connu pour ses affinités tinctoriales avec les structures acidophiles.



**Figure 29:** Caractérisation du **stade C1** chez la femelle *G. fossarum* ; Section transversale ; X4, X20 ; in : Intestin ; ov : Ovocyte ; fm : Faisceau musculaire ; cc : Caecum ; VL: Vésicule lipidique ; op : Ovocyte primaire ; opr : Ovocyte en repos sexuel ; cf : Cellules folliculaires ; GV : Globule vitelline ; CG : Centre germinatif.

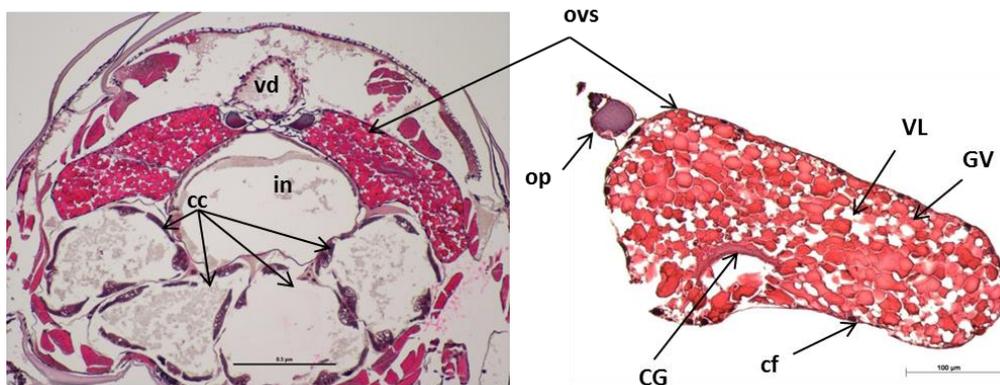
Le stade 2 de la mue est caractérisé par le décollement entre la matrice de l'ongle et la cuticule (Geffard et al. 2010). Ce stade, correspond au début de la vitellogénèse, aux stades C1 et C2 marqués par les globules vitellines éosinophiles, caractéristiques de réserve énergétique pour le développement embryonnaire. Au fur et à mesure de la maturation, nous observons une parfaite synchronisation entre le développement des stades de la mue et la maturation des ovocytes (Fig. 30).



**Fig. 30** : Caractérisation du **stade C2** chez la femelle *G. fossarum* ; Section transversale; X4, X20 ; ov : Ovocyte en début de vitellogénèse secondaire ; op : Ovocyte primaire ; GV : Globule vitelline ; CG : Centre germinatif ; VL : Vésicule lipidique.

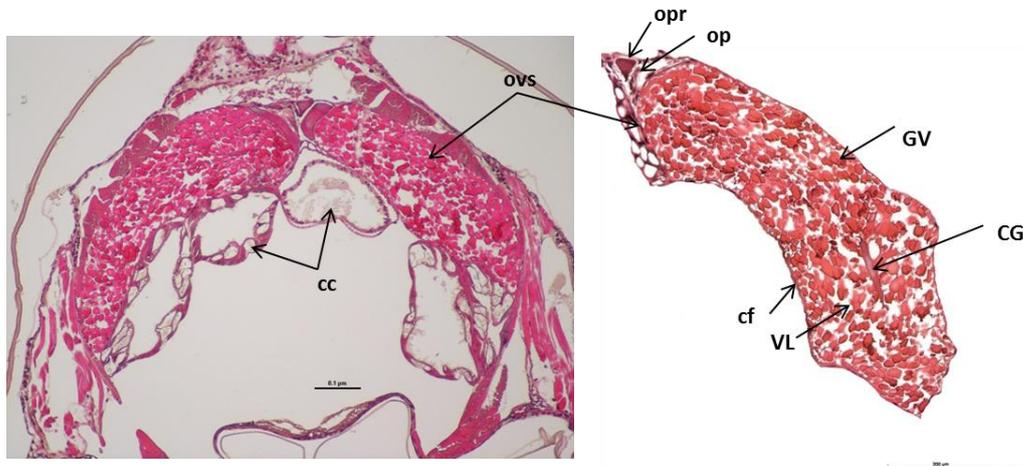
### 3.1.3. Vitellogenèse secondaire

A la fin du stade de la vitellogenèse primaire, les ovocytes rentrent dans le cycle suivant au stade de vitellogenèse secondaire (Fig. 31). La vitellogenèse secondaire est caractérisée par des gouttelettes lipidiques et des globules de vitellus éosinophiles, homogènes, de diamètre croissant, s'accumulant dans le cytoplasme des ovocytes, organisé en rosace autour du centre germinatif (Fig. 31). Ces dernières sont entourées par les cellules folliculaires, avec lesquelles se forment des ponts cytoplasmiques. Le centre germinatif est basophile, central, en forme de croissant en section transversale.



**Fig. 31** : Caractérisation du **stade D1** chez la femelle *G.fossarum*; Section transversale ; X4, x20 ; cc : Cecum ; in : Intestin ; vd : Vaisseau dorsal ; op : Ovocyte primaire ; ovs : Ovocyte secondaire ; VL : Vésicule lipidique ; GL : Globule vitelline ; cf : Cellules folliculaires ; CG : Centre germinatif.

Le stade D2 est caractérisé par des ovocytes volumineux. Leurs cytoplasmes éosinophiles entourés d'une fine couche de cellules folliculaires, visible par leurs noyaux basophiles entourant la cellule. Ils sont garnis de globules de vitellus très compactés entre eux, ne laissant que peu d'espace pour les vésicules lipidiques. Le centre germinatif devient alors central et condensé linéaire (Fig. 32).



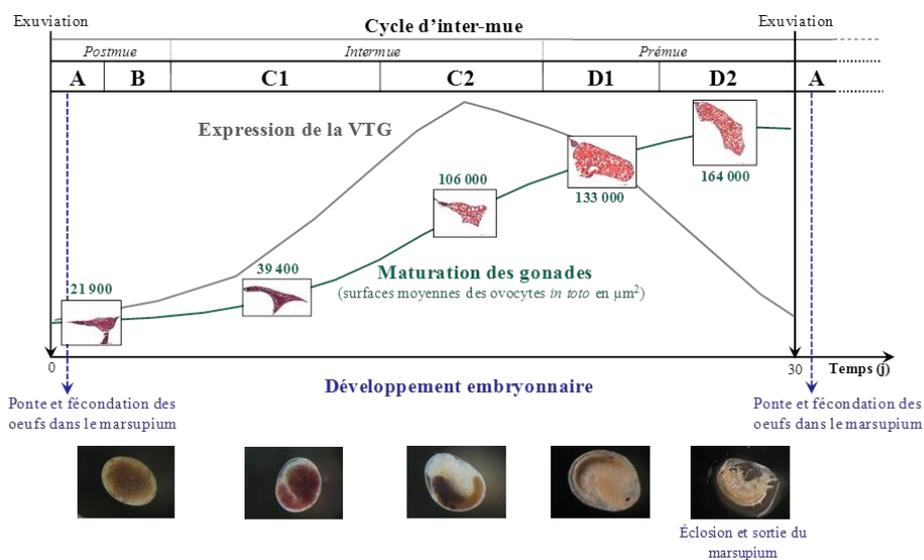
**Fig. 32 :** Caractérisation du **stade D2** chez la femelle *G. fossarum*. Section transversale X4, X20 ; cc : Caecum ; ovs : Ovocyte secondaire ; op : Ovocyte primaire ; GV : Globule vitelline ; CG : Centre germinatif ; VL : Vésicule lipidique ; cf : Cellules folliculaires.

Au cours de la maturation de la gonade, une augmentation des surfaces ovocytaires, a été observée, avec une croissance très marquée au stade C2. Les ovocytes des femelles au stade D1 et D2 montrent la même organisation histologique, déjà observée chez les femelles en stade C2. Seule la position du centre germinatif et la condensation des globules vitellines font la différence et marquent la maturation des ovocytes. Les figures 26, 27, 28, 29, 30, 31 et 32 décrivent l'évolution de la surface moyenne des ovocytes au cours du cycle de reproduction.

Dans notre laboratoire la fonction de reproduction chez le gammare a été abordée par différentes approches, dans le but de comprendre le mode d'action des polluants sur les différents processus physiologiques, en lien avec le succès reproducteur :

- des approches physiologiques telles que le cycle de la mue, les surfaces ovocytaires et le développement embryonnaire (Geffard *et al.*, 2010),
- des approches moléculaires telles que l'activité de la vitélogénèse (Vtg) dans l'objectif de développer ce biomarqueur et valider son rôle fonctionnel dans la reproduction (vitellogénèse, embryogénèse et différences inter-sexe), et de caractériser le potentiel perturbateur endocrinien de composés chimiques et des systèmes aquatiques (Jubeaux *et al.*, 2012, Xuereb *et al.*, 2011).

La figure 33 synthétise les données et informations disponibles sur le cycle de reproduction et obtenues à l'aide des diverses approches développées au sein de notre laboratoire. Pour chaque stade de mue, un stade embryonnaire, une surface ovocytaire moyenne (observation *in toto*) et un niveau d'expression du gène codant pour la vitellogénine spécifique sont observés. Ces travaux montrent notamment que la croissance ovocytaire la plus élevée est observée lors du stade C2, stade au cours duquel on observe également la plus forte expression du gène codant pour la vitellogénine, qui ensuite diminue pour les stades D1 et D2. Les résultats histologiques obtenus lors de cette étude viennent compléter les observations précédemment présentées (Geffard et al., 2010) et confirmer, via une description fine de la structure des ovocytes, que la vitellogenèse secondaire, caractérisée par l'apparition de façon importante de globules lipidiques et de vitellins, se fait au cours du stade C2 de la mue.

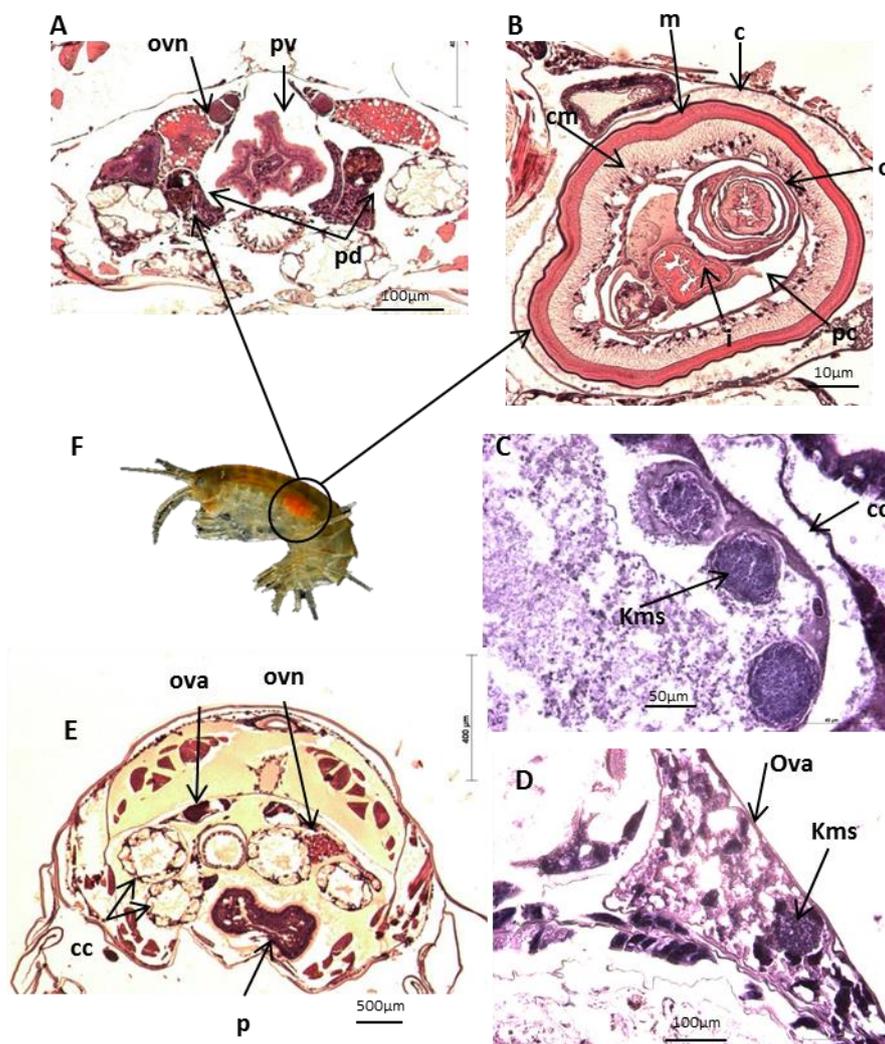


**Fig. 33:** Synchronisation du stade embryonnaire, du stade de la mue et du stade de reproduction chez la femelle *Gammarus fossarum*.

#### 4. Caractérisation du parasitisme chez la femelle

Dans la nature, de nombreux gammars sont des hôtes intermédiaires d'acanthocéphales (tâche orange visible à travers la cuticule) (Fig. 34 F), et sont parasités par leur larve, notamment par *Polymorphus minutus*. Le cycle de développement de ce trématode *Microphallus papillorobustus* comprend trois hôtes successifs : le mollusque, le crustacé et l'oiseau chez qui elle deviendra adulte et se reproduira. Cette infestation, provoque chez le gammare de nombreuses perturbations comportementales, le rendant ainsi plus susceptible à la prédation par les hôtes définitifs (Helluy. S. 1983).

Lors de la caractérisation de la pathologie émanant de la contamination par le cadmium, il a été observé chez une femelle une larve d'acanthocephale (Fig. 34 A). La section d'une larve de ce parasite métazoaire mesure environ 400 µm de diamètre, elle possède une cuticule, un hypoderme épais et une couche musculaire entourant un pseudocoelome contenant un tube digestif, un oviducte et des cellules myoépithéliales bordant la paroi interne de la lame basale (Fig. 34 B). On note l'absence d'ovocytes en vitellogenèse chez la femelle parasitée du fait de la castration induite par le parasite (Ladewig et *a.*, 2006), (Fig. 34 A et E).

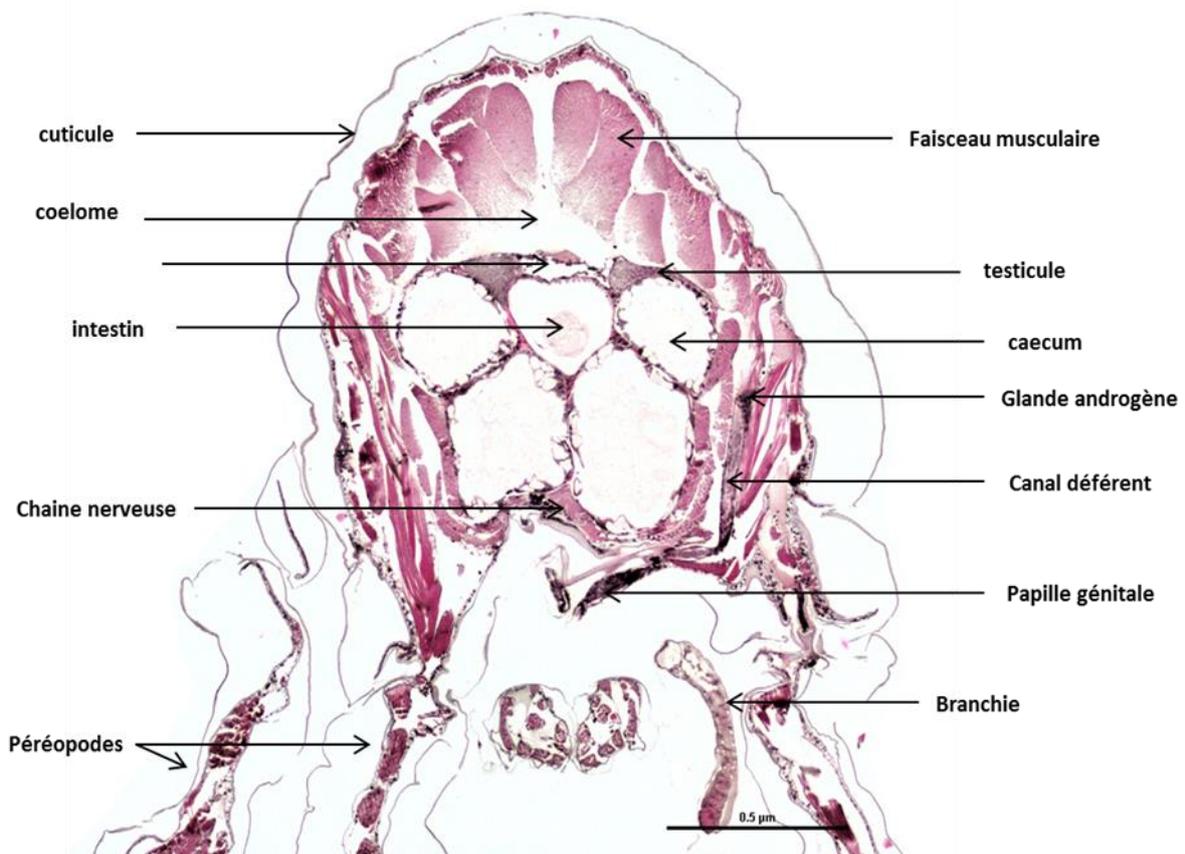


**Fig. 34 :** Caractérisation du parasitisme chez les femelles *G. fossarum* contaminées à [3µg/L] de cadmium. **A :** Section transversale d'une femelle présentant des foyers inflammatoires au niveau des ovocytes et un parasite dégénéré : ovn : Ovocyte nécrotique, pv : Parasite viable, pd : Parasite dégénéré ; **B :** Section transversale d'un parasite nematode viable dans le gammare : cm : Cellules myoépithéliales, m : Muscle, c : cuticule, o : Oviducte, pc : Pseudocoelom, i : Intestin ; **C :** Section transversale de kystes microsporidies dans les cellules de la paroi caecale : cc : Caecum, kms : kystes de microsporidies ; **D :** Section d'un ovocyte atrétique infesté de kystes de microsporidies : ova : Ovocyte atrétique, kms : Kyste microsporidies ; **E :** Section transversale d'un gammare femelle en stade D2 , enkysté ayant des ovocyte nécrotique/atrétique ; **F :** Gammare enkysté.

## 5. Caractérisation de l'appareil génital mâle

L'histologie de la gonade mâle de *G.fossarum* a été réalisée dans le but de caractériser son cycle de reproduction et de définir les paramètres physiologiques permettant de déterminer son statut reproducteur, ce qui est crucial pour le développement de marqueurs spécifiques de perturbation endocrinienne.

Le gammare mâle, possède presque les mêmes apparences physiologiques extérieure et intérieure que la femelle précédemment caractérisée, à savoir une cuticule fine, segmentée et un épithélium simple, des appendices articulés et des muscles striés, un tube digestif central entouré par quatre caecums, deux ventraux et deux dorsaux (Fig. 35). Un vaisseau dorsal où circule l'hémolymphe qui irrigue l'ensemble du corps et des branchies ventrales et protégées par les plaques latérales thoraciques la différence réside donc dans les gonades.



**Fig. 35:** Identification des différents organes de *G. fossarum* mâle en fin de spermatogenèse. Section transversale X4 ; Coloration HE.

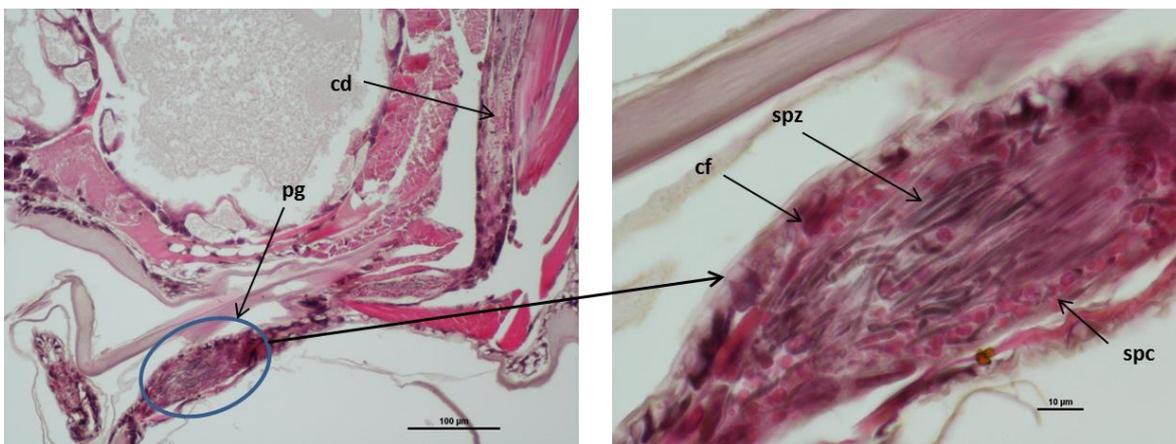
La gonade mâle forme une paire de tubes fusiformes situés dorsalement par rapport au tube digestif, contenant les cellules germinales (Fig. 35, 36).

L'activité spermato-génétique se développe dans le testicule et les spermatozoïdes arrivés à maturation à la fin du cycle, sont véhiculés à travers le canal déférent et libérés par les papilles génitales (Fig. 35, 37) pour féconder les ovocytes.



**Fig. 36 :** Section longitudinale des différents organes de *G. fossarum* mâle en fin de spermatogenèse ; X10; X4  
 ct : Cuticule ; fm : Faisceaux musculaire ; ts : Testicule ; in : Intestin ; cf : Cellules folliculaires ; cc : Caecum spz : Spermatozoïdes.

Les figures 35, 37 et 36 représentent respectivement des sections transversales et longitudinales d'un gammare mâle normal où sont observés les différents organes constitutifs de l'organisme. Contrairement à la femelle, pour le mâle *G. fossarum*, nous avons choisi de le sectionner dans le sens longitudinal, car les organites testiculaires paraissent plus différenciés facilitant ainsi leur lecture. En effet, sur la figure 37 sont observés le canal déférent et les papilles génitales.



**Fig. 37 :** Identification des papilles génitales de *G. fossarum* en fin de spermatogenèse. Section transversale X10, X100. Pg : Papilles génitales ; cd : Canal déférent ; cf : Cellules folliculaires ; spz : Spermatozoïdes ; spc : Spermicites.

## 5.1. Caractérisation des cellules germinales – spermatides / spermatozoïdes

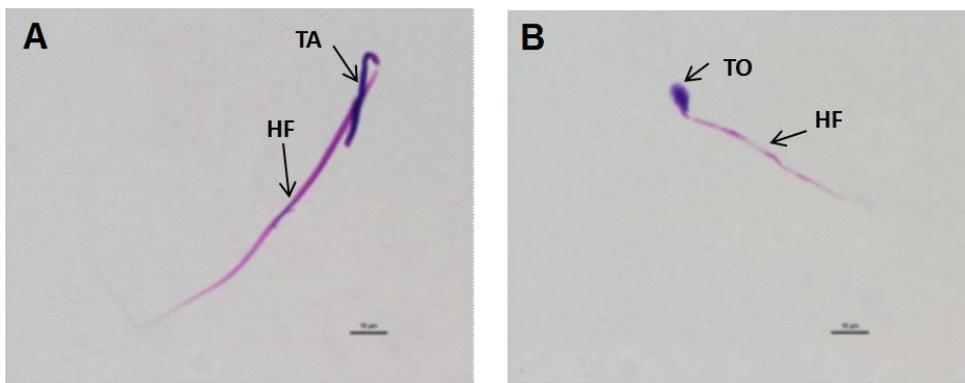
Dans la littérature, les spermatozoïdes d'une grande partie des invertébrés aquatiques ont été décrits comme des spermatozoïdes primitifs, non motiles, dont le noyau est de forme et de longueur très variable (Chevaillier 1969 ; Koch et Lambert 1990). Chez le mâle *Gammarus fossarum* et les crustacés en général, peu d'études caractérisent leur cycle de reproduction, notamment la production de spermatozoïdes. Notre étude s'intéresse à caractériser la spermatogenèse chez cette espèce.

Une spermatogonie secondaire entre en méiose, et donne un spermatocyte primaire diploïde qui produit deux spermatocytes secondaires, évoluant en spermatides puis en spermatozoïdes. La réalisation de frottis, nous a permis d'identifier les différents stades de maturation de la gonade. En accord avec les observations de Reger (1966), deux types cellulaires ont été observés : i) les spermatides : ce sont des cellules immatures, possédant une tête ovoïdes et un appendice appelé hampe par Charniaux-Cotton (1965) fine; ii) les spermatozoïdes : ce sont les spermatides qui sont arrivés à maturation. Ils possèdent une tête oblongue longeant la cellule souvent recourbée formant une hampe (Fig. 38A), la chromatine est peu dense, la hampe est filamenteuse et de structure aplatie non mobile (Fig. 38 et 39).

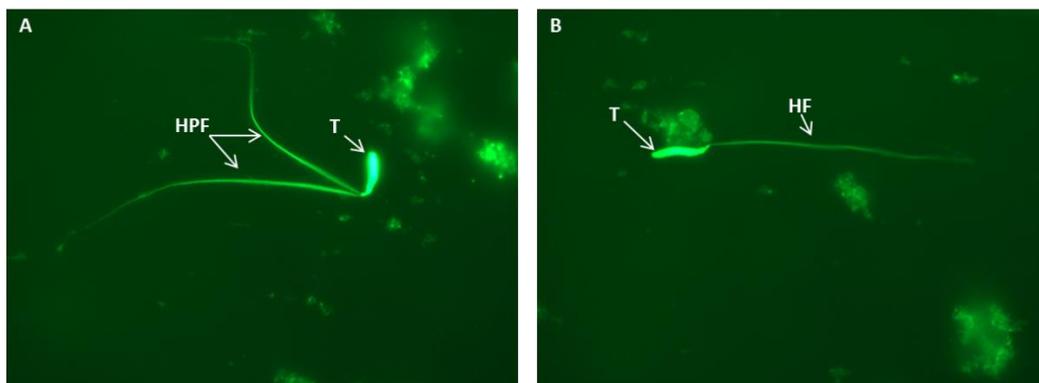
Les noyaux sont colorés en bleu et les cytoplasmes en rose grâce aux affinités tinctoriales respective des composants du May-Grünwald Giemsa qui sont le bleu de méthylène avec les structures basophiles et l'éosine avec les structures acidophiles (Fig. 38). En effet et en accord avec les observations de Chevaillier (1969), pendant le stade la maturation du spermatozoïde, la vésicule acrosomique s'allonge jusqu'à former un noyau en forme de bâton d'environ 20  $\mu\text{m}$  de long et 0.5  $\mu\text{m}$  de large. Chez *G. fossarum*, nos observations ont également permis d'identifier un polymorphisme filamenteux au niveau de la hampe (Fig. 39).

L'observation de suspensions cellulaires gonadiques, prélevées sur des mâles pendant le stade pré-copulatoire et le stade post-fécondation ont montré successivement plus de spermatozoïdes dans le premier cas que dans le deuxième. Le mâle investit une grande quantité de cette réserve à chaque accouplement (Lemaitre et al, 2009). La durée de reconstitution du stock de spermatozoïdes d'un mâle après la reproduction est d'environ 7 jours.

Les figures 38 et 39 présentent l'anatomie des spermatides et des spermatozoïdes de l'amphipode mâle *G. fossarum*, ainsi que le polymorphisme de la hampe observé sur la figure 39 A.



**Fig. 38:** Identification des cellules d'intérêt chez *G. fossarum*. Coloration ( MGG) ; X100. **A** : Spermatozoïde mature caractérisé par un noyau oblongue ; **B** : Spermatide caractérisé par un noyau ovoïde. HF : Hampe filamenteuse ; TA :Tête aplatie ; TO : Tête oblongue.



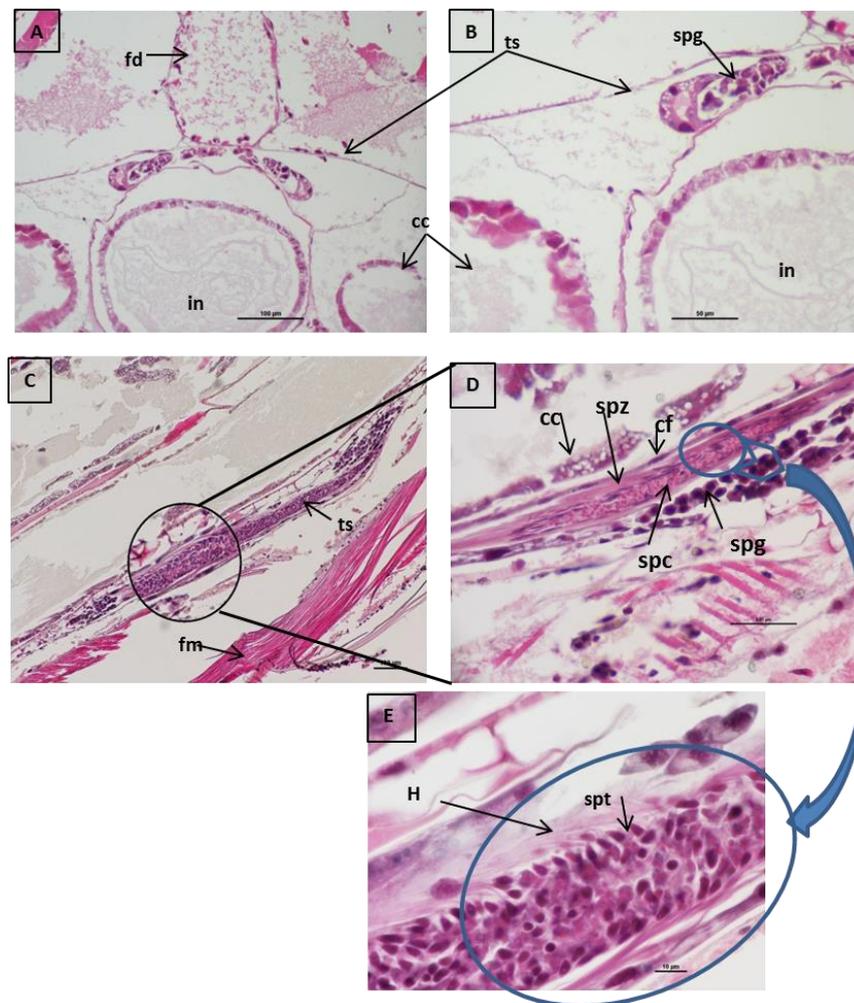
**Fig. 39:** Identification du polymorphisme filamenteux du spermatozoïde de *G. fossarum*. Coloration par le Kit de viabilité cellulaire « *Dead life sperm viability*® », X40 **A** : Spermatide à polymorphisme filamenteux ; **B** : Spermatozoïde ; HPF : Hampe à polymorphisme filamenteuse ; HF : Hampe filamenteuse ; TA : Tête aplatie ; TO : Tête oblongue.

## 5.2. Caractérisation de la spermatogénèse

### 5.2.1. La spermatogénèse à Jour 0

Juste après la fécondation, sur une section transversale de la gonade de *Gammarus fossarum*, il a été noté des cellules rondes, basophiles, contenues dans les testicules, délimitées par une membrane, pouvant ressembler à des ovogonies. Le testicule entoure le tube digestif par son pôle apical et borde le caecum par son pôle basal (Fig. 40 A, B).

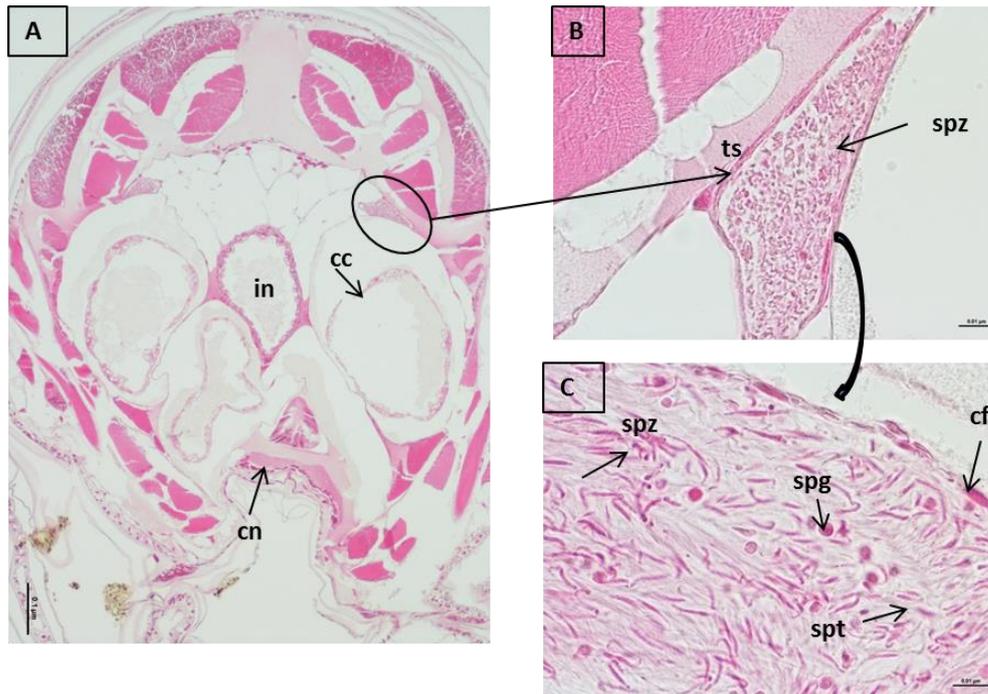
Les figures 40 C et 40 D montrent un testicule garni de filaments éosinophiles, alternés par quelques filaments basophiles, bordés par les cellules épithéliales du testicule au pôle apical et par de grosses cellules rondes au pôle basal, correspondant à des spermatogonies. La figure 40 E est un grandissement de la figure 40 D, elle représente un testicule rempli de cellules ayant une tête ovoïde, basophile et une hampe filamenteuse caractérisant ainsi les spermatides. Cette observation nous met en accord avec nos observations des suspensions cellulaires prélevées sur des individus venant de se reproduire.



**Fig. 40:** Caractérisation de la spermatogénèse à J0 d'un gammare sain. (A, B) : Section transversale, (C, D, E) : Section longitudinale; fd :Faisceau dorsal; ts : Testicule; cc : Caecum; spt : Spermatide; cf : Cellule folliculaire; spg : Spermatogonie.

### 5.2.2. La spermatogénèse à Jour 2

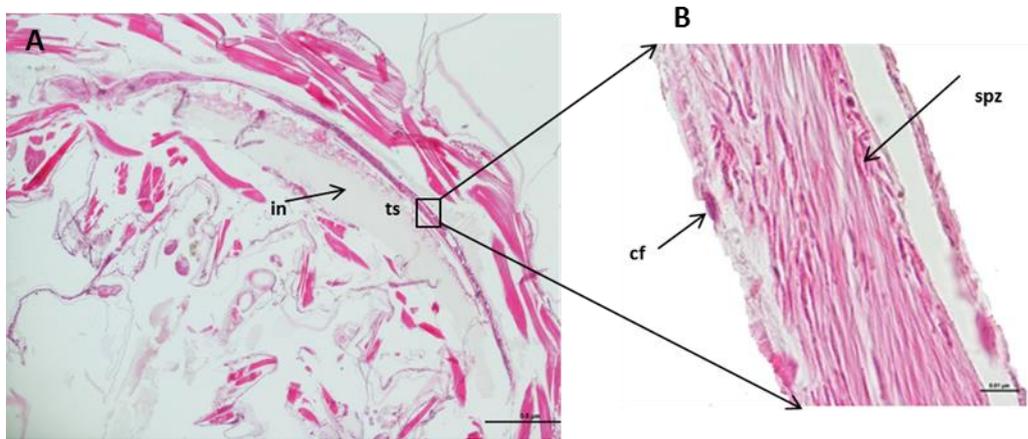
La figure 41 A nous renseigne sur la position latérale dorsale des deux testicules et sur une approximation de l'estimation de la quantité de cellules sexuelles. La figure 41 B montre une gonade étoffée de cellules sexuelles. Sectionnées dans le sens transversal, la figure 41 C nous permet l'appréciation des trois différents stades. Ainsi au deuxième jour, après la fécondation, il a été noté une gonade remplie de cellules différenciées, assez homogènes.



**Fig. 41** : Caractérisation de la spermatogénèse à **J2** d'un gammaré sain ; (A, B) : Section transversale; cn : Chaîne nerveuse ; in : Intestin ; cc : Caecum ; ts : Testicule ; spz : Spermatozoïdes ; spg : Spermatogonie ; spt : Spermatide ; cf : Cellule folliculaire.

### 5.2.3. La spermatogénèse à Jour 4

Au quatrième jour après la fécondation, la section longitudinale montre une gonade longeant le tube digestif (Fig. 42 A), elle est garnie de filaments fins enchevêtrés caractérisant les spermatides et les spermatozoïdes, bordés par les cellules folliculaires (Fig. 42 B).



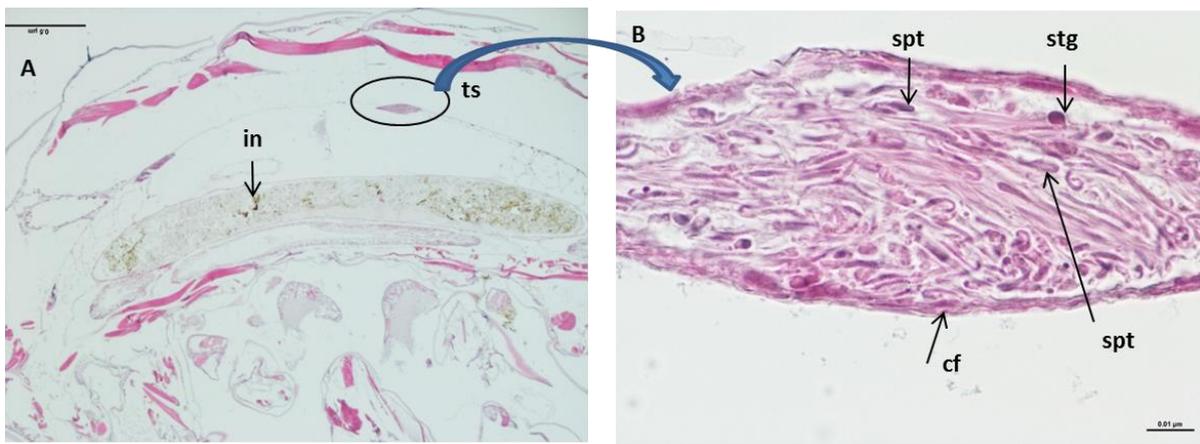
**Fig. 42:** Caractérisation de la spermatogénèse à **J4** d'un gammare sain ; (A, B) Section longitudinale ; ts : Testicule ; cf : Cellule folliculaire ; spt : Spermatides.

#### 5.2.4. La spermatogénèse à Jour 7

Au septième jour, il a été noté une augmentation significative des spermatozoïdes de par la condensation de la chromatine, colorée en bleu par l'hématoxyline, reconnue pour ses affinités avec les structures basophiles. La figure 43 montre bien une gonade remplie de cellules bien différenciées.

La figure 43 B montre des spermatozoïdes tendant vers la lumière du tube, ayant une tête allongée, recourbée en forme de anse, à chromatine dense basophile et une hampe eosinophile. Il a été noté également la présence de spermatides reconnus par leur tête ovoïde, et des spermatogonies situées en périphérie du tube (Fig. 43 B).

En effet, les figures 40, 41, 42 et 43 décrivent l'évolution de la spermatogénèse chez *G. fossarum*.



**Fig. 43:** Caractérisation de la spermatogénèse à J7 d'un gammare sain; in :Intestin ; ts : Testicule ; spz : Spermatozoïde ; stg : Spermatogonie ; sf : Cellule folliculaire ; spt : Spermatozoïde.

## 6. Expérimentation au laboratoire aux contaminants modèles

### 6.1. Evaluation histologique de l'impact du cadmium

#### 6.1.1. Chez la femelle

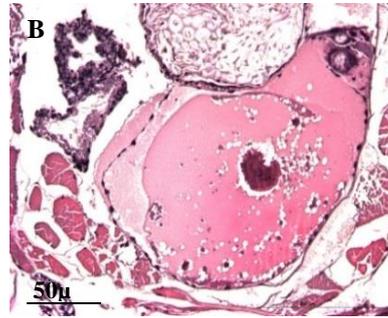
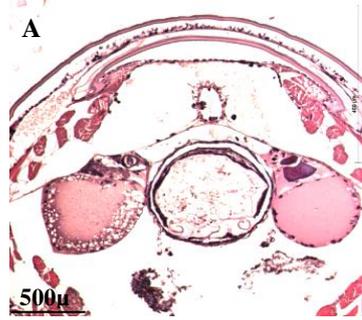
Différentes lésions ont pu être observées chez les femelles exposées au cadmium. Il a été noté **des œdèmes** de l'ovaire avec accumulation de liquide dans sa lumière, ayant pour conséquence la déstructuration des ovocytes secondaires et la dissolution d'une majorité des globules de vitellus remplacés par des plages de matériel éosinophile, amorphe, contenant quelques gouttelettes lipidiques (Fig. 44 A, B).

Nous avons observé **une dysplasie** de l'ovocyte secondaire de taille réduite, au noyau finement vacuolisé, son cytoplasme contient de fines gouttelettes de matériel basophile, amorphe (Fig. 44 H). Sa structure le place entre l'ovocyte primaire et l'ovocyte secondaire, d'où l'hypothèse qu'il s'agisse d'un ovocyte ayant subi une vitellogenèse anormale.

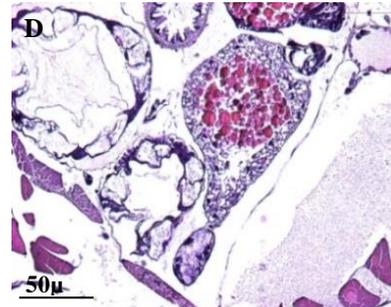
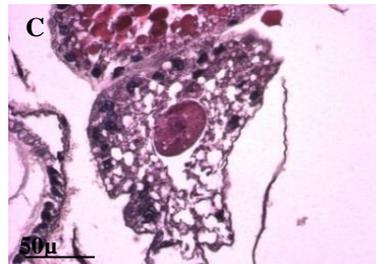
**Une atrésie** des ovocytes secondaires a été notée. La morphologie de ces ovocytes varie selon le stade d'avancement de la résorption du vitellus. La structure normale des ovocytes secondaires, composés de globules de vitellus et de gouttelettes lipidiques, est progressivement modifiée, en direction centripète. Les globules de vitellus sont alors remplacés par un matériel légèrement basophile, finement granuleux, relativement peu abondant, les traces (fantômes) des gouttelettes lipidiques restent présentes (Fig. 44 C, D, E).

La figure 44 F représente **une nécrose**, caractérisée par une rupture du matériel cytoplasmique dans l'espace interstitiel, provoquant une inflammation distinguée par une structure granuleuse basophile et des plages éosinophiles amorphes, observées dans l'espace interstitiel séparant la gonade du tube digestif.

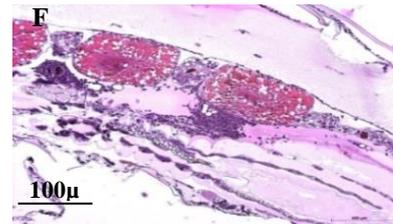
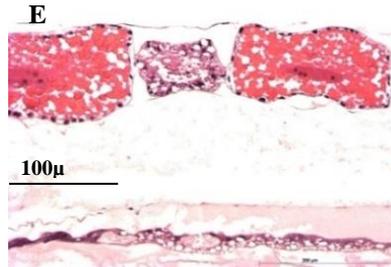
A, B : Œdème  
Ovocytaire  
associé à une  
nécrose des  
caecums.



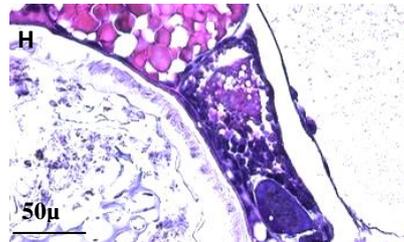
C, D, E : Atrésie  
ovarienne



F : Nécrose  
ovocytaire



G : Folliculaire ou  
Alpha atrésie



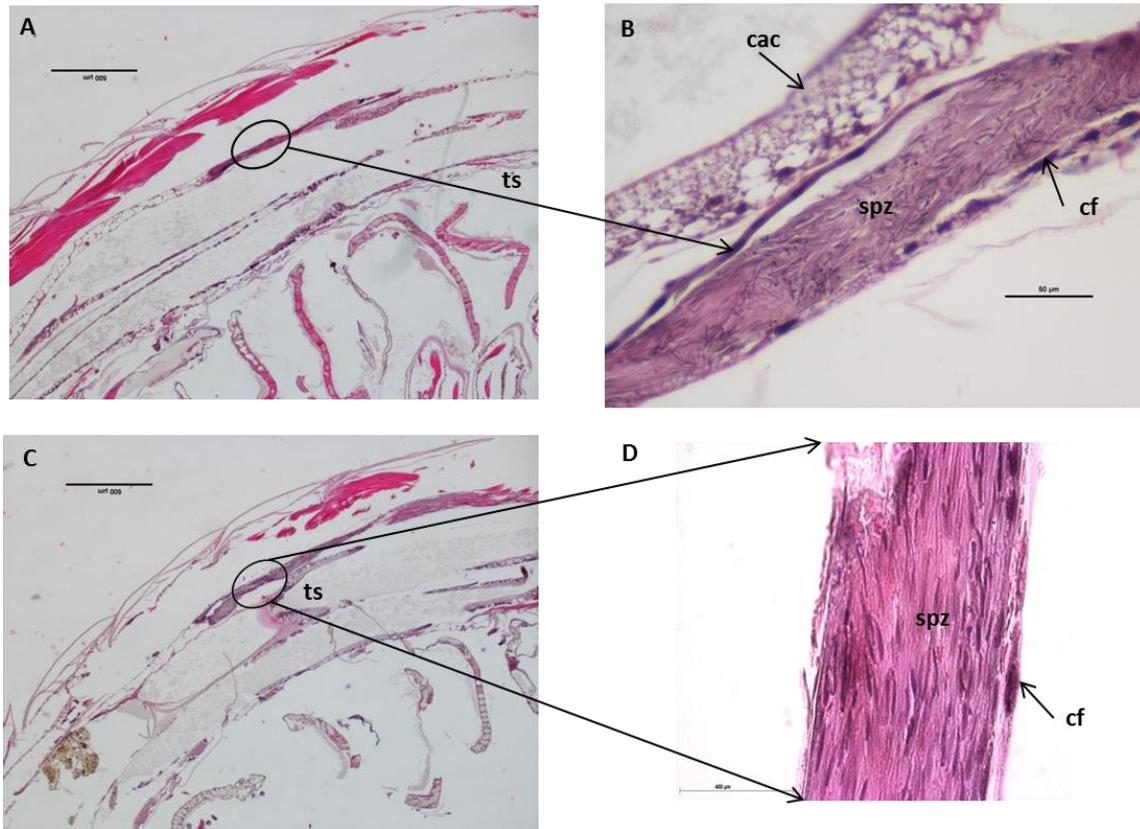
H : Dysplasie  
Ovarienne

**Fig. 44:** Caractérisation des lésions ovocytaires chez la femelle *G. fossarum* contaminée au cadmium.

## 6.1.2. Chez le mâle

### 6.1.2.1. Exposition pendant un cycle de spermatogénèse

Les mâles *G. fossarum* exposés pendant 7 jours au Cadmium, n'ont montré aucune pathologie. Ainsi les figures 45 A et 45 B illustrent la structure tissulaire de la gonade chez les organismes exposés à la concentration de [3 µg/L] au cours de la spermatogénèse. Cette structure est identique à la structure observée chez les individus témoins (Fig. 45 C et D).

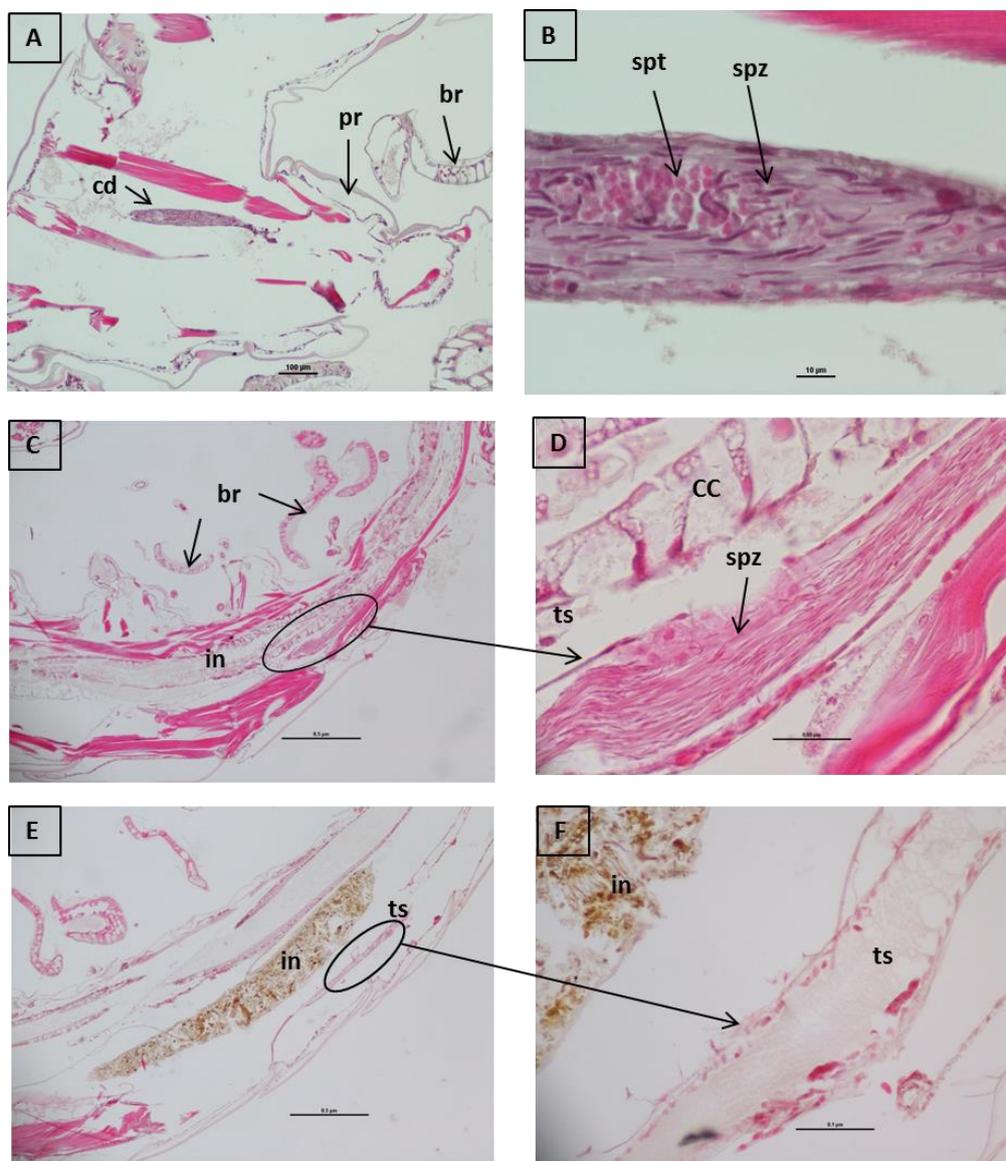


**Fig. 45 :** Caractérisation des lésions de l'organe reproducteur chez le mâle *G. fossarum* contaminé par le cadmium pendant un cycle de spermatogénèse; **A, B :** Individus traités au Cd à [3µg/L]; **C, D :** Individus témoins

### 6.1.2.2. Exposition pendant deux cycles de spermatogénèse

Suite à une exposition au cadmium, au cours de deux cycles de spermatogénèses successifs, l'histologie a montré une chute dans la production de cellules sexuelles. Cependant, aucun effet n'a été observé concernant l'exposition à la plus faible concentration [0.3µg/L] (Fig. 46 C et D) en comparaison avec les témoins de l'expérimentation (Fig.46 A et B). En revanche, nous avons noté une gonade quasiment vide pour les gammares ayant été exposés à la plus

forte concentration [ $3\mu\text{g/l}$ ] (Fig. 46 E et F). En effet, l'exposition au Cd, montre bien une inhibition de la production de gamètes chez le gammare au bout du deuxième cycle de spermatogénèse. Plusieurs auteurs ont montré la sensibilité de cette espèce vis à vis du Cd. Lacaze (2011) a montré que le Cd a un effet génotoxique sur les spermatozoïdes, Geffard (2010) a montré un effet significatif sur le développement ovocytaire et embryonnaire chez la femelle gammare exposée à [ $3\mu\text{g/L}$ ] de Cd, ainsi que Felten (2008) qui a trouvé que les réponses comportementales ont été affectées suite à une exposition au Cd. De manière générale, le Cd exerce une action toxique systémique sur le gammare. En effet, notre étude vient s'ajouter, pour démontrer que le Cd peut altérer la reproduction à long et moyen terme chez le gammare en provoquant une chute importante de la quantité de spermatozoïdes produite.



**Fig. 46:** Caractérisation des lésions de l'organe reproducteur chez le mâle *G. fossarum* contaminé par le cadmium pendant deux cycles de spermatogénèse successifs; **AB** : Témoins de la manipulation, **CD** : [ $0.3\mu\text{g/l}$ ]; **EF** : [ $3\mu\text{g/L}$ ].

## 6.2. Evaluation de la maturation des cellules germinales mâle au cours de la spermatogenèse

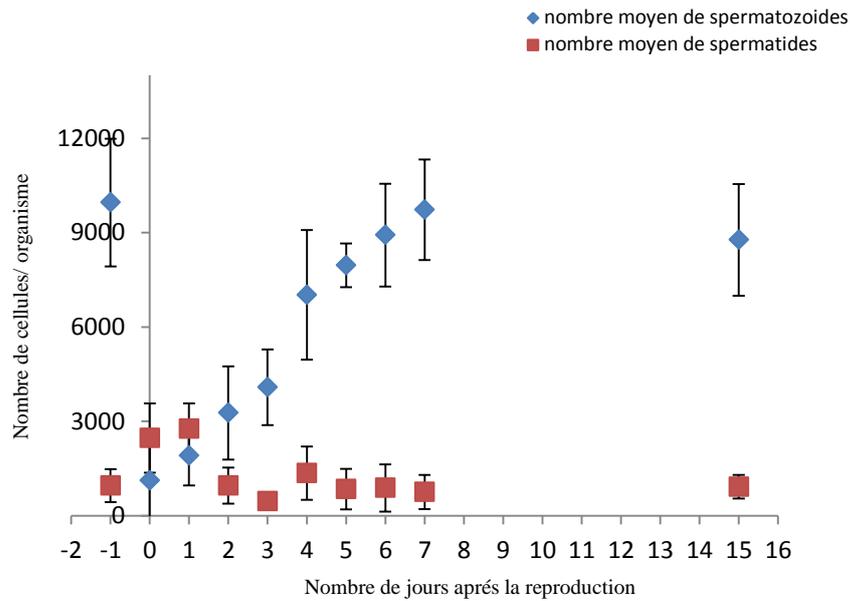
La Cryo-congélation de cellules en suspension et la décongélation entraînent souvent une diminution de la viabilité cellulaire et engendre des dommages à l'ADN. Par conséquent et pour le travail présenté ci-dessous, nous avons choisi de réaliser les travaux avec des tissus frais.

L'essai a permis de mettre au point un protocole de comptage. L'ajout de la BSA (sérum Albumine Bovine) à la solution de dilution de sperme de gammare, aide à la sédimentation cellulaire, cela facilite le comptage. Ainsi, il a été observé que la méthode de dissection manuelle donnait de meilleurs résultats.

Dans le but de présenter l'évolution de la maturation du sperme au cours d'un cycle de spermatogenèse, nous avons compté le nombre de spermatozoïdes et de spermatides des mâles, en précopulat et des mâles venant de se reproduire. Il a été noté que les mâles en précopulat (fin de spermatogenèse) présentent un nombre moyen de spermatozoïdes de  $10^4$  cellules par paire de gonade et un nombre moyen de spermatides de  $10^3$  par paire de gonades. Après la fécondation le nombre de spermatozoïdes a chuté de près de 90 % alors que celui des spermatides a augmenté de près de 40%.

Le premier jour après la fécondation (J0), nous avons observé une augmentation du nombre de spermatozoïdes. En accord avec nos observations histologiques, le nombre de spermatozoïdes augmente rapidement à partir du quatrième jour et atteint son maximum au septième jour (fin de la spermatogenèse), alors que le nombre de spermatides reste constant.

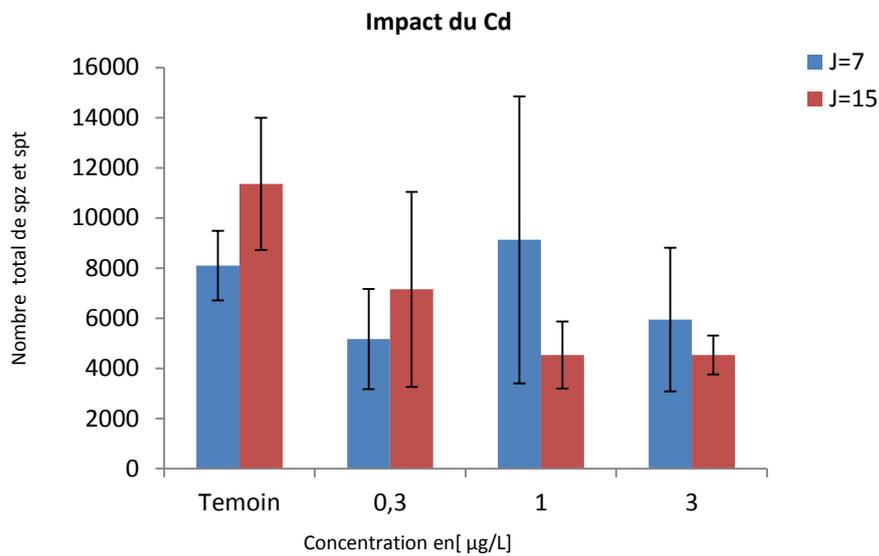
La figure 47 représente le suivi journalier de la spermatogenèse chez *G. fossarum*.



**Fig. 47:** Evaluation du nombre moyen de spermatozoïdes et de spermatides chez *G. fossarum* avant et après le stade précopulatoire.

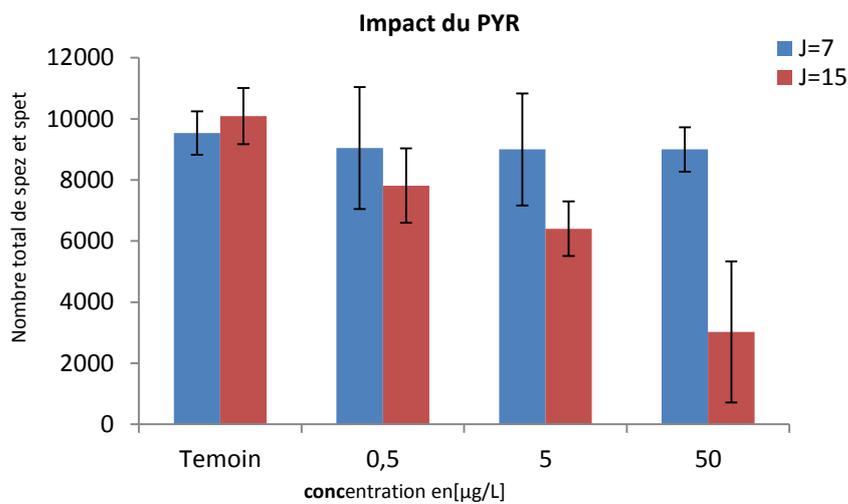
### 6.3. Impact du cadmium, du pyriproxyfène et du méthoxyfénozide

La numération des cellules sexuelles après exposition aux différentes concentrations en cadmium, en pyriproxyfène et en méthoxyfénozide a permis d'observer que la variabilité interindividuelle au cours du premier cycle ne permet pas de montrer un effet. En revanche sur la seconde spermatogénèse, une inhibition de la production de spermatozoïdes selon une relation dose-réponse a été observée (Fig. 48, 49, 50), nous mettant en accord avec nos observations histologiques (Fig. 45 et 46).



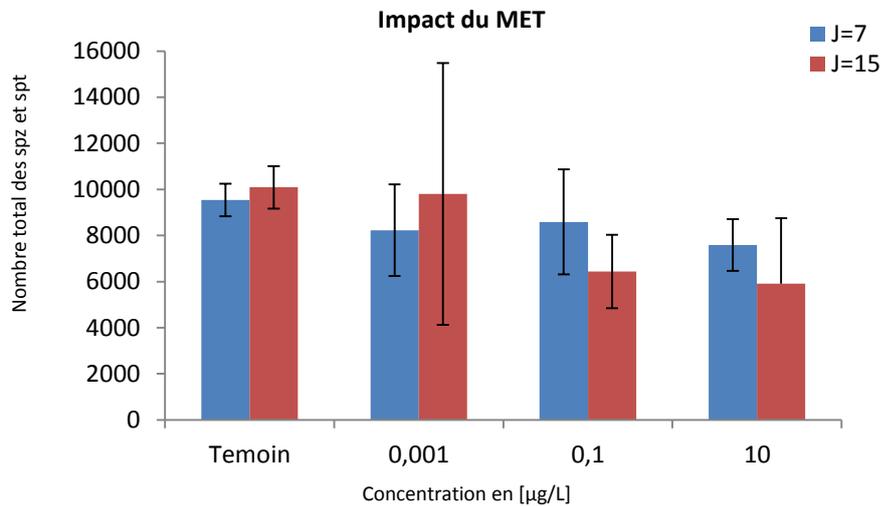
**Fig. 48 :** Evaluation de l'impact du cadmium sur la gonade mâle de *G. fossarum* au cours d'un cycle ou deux de spermatogenèse.

L'exposition des individus à [3µg/L] de cadmium, montrent une différence significative de la production de spermatozoïdes au cours du second cycle de spermatogenèse, avec une réduction moyenne de 75% de la quantité de spermatozoïdes (Kruskal-Wallis;  $p = 2,01 \times 10^{-3}$ ).



**Fig.49:** Evaluation de l'impact du pyriproxyfene sur la gonade mâle de *G. fossarum* au cours d'un cycle ou deux de spermatogenèse.

Au second cycle de spermatogenèse, un effet dose-réponse a été observé avec une différence significative pour les deux concentrations en pyriproxifene les plus fortes [5 et 50 µg/L] avec une réduction du nombre de spermatozoïde de 40% et de 73% respectivement (Kruskal-Wallis ;  $p = 1.2 \times 10^{-5}$ ) et une différence significative entre elles (Kruskal-Wallis ;  $p = 1,59 \times 10^{-8}$ ).



**Fig. 50 :** Evaluation de l'impact du méthoxyfénozoïde sur la gonade mâle de *G. fossarum* à au cours d'un cycle ou deux de spermatogenèses.

Les organismes exposés à [0.1µg/L] et [10µg/L] au méthoxyfénozoïde au cours de deux cycles successifs de spermatogenèse présentent une baisse de la production de spermatozoïdes suivant un effet dose-réponse avec des réductions de 38% et de 42% respectivement face au témoin, il a été noté une différence significative (Kurskal-Wallis;  $p= 4,36 \times 10^{-3}$ ).

## 7. Expérimentation sur la station d'épuration de Bellecombe

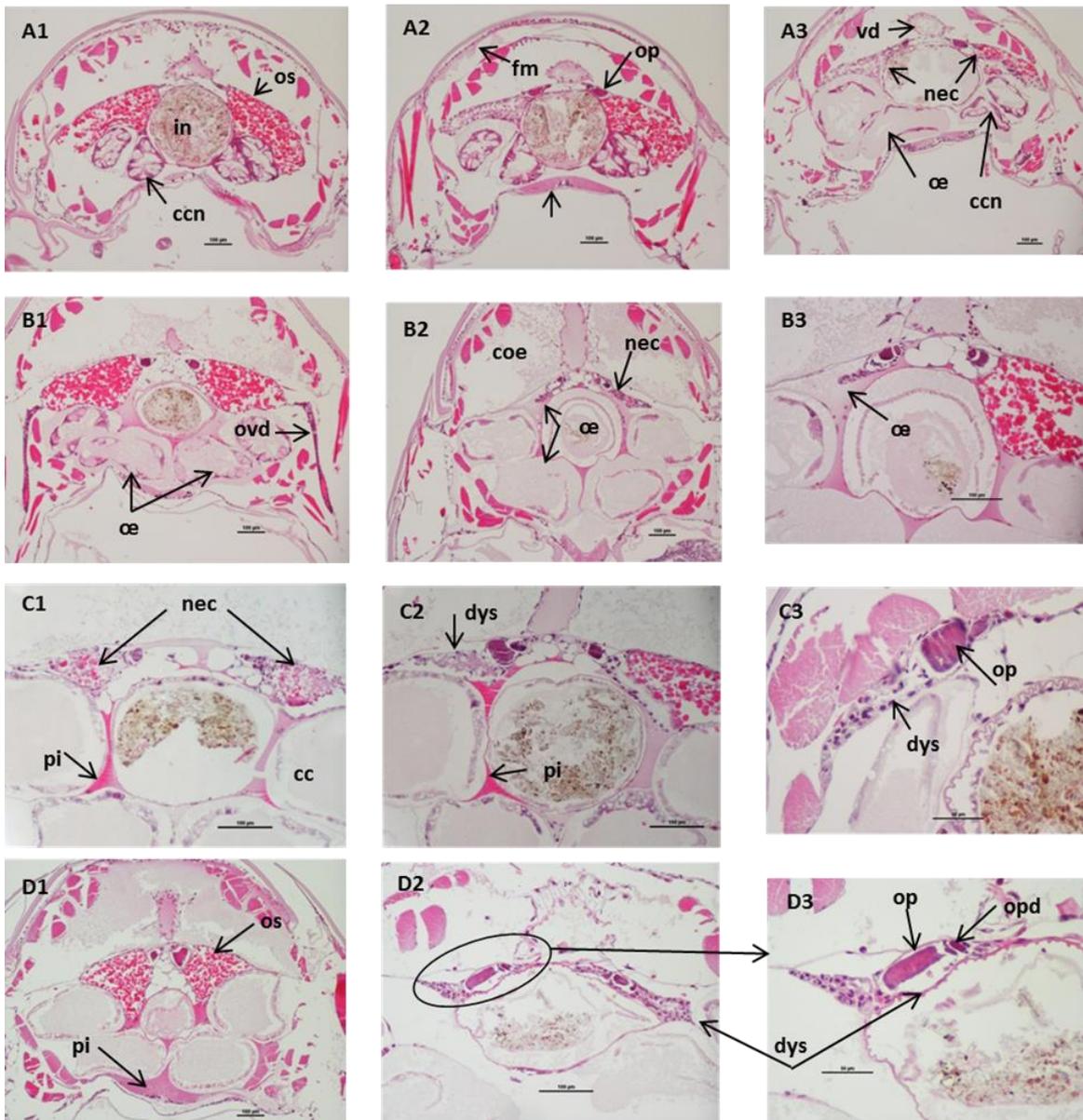
### 7.1. Évaluation des lésions histopathologiques

#### 7.1.1. Chez la femelle

Les femelles ont été exposées pendant 15 jours aux effluents de la station d'épuration. Les figures 51 A1, A2 et A3 représentent notre témoin de laboratoire ( $T^{\circ} = 14^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{Cond} = 500\mu\text{S}$ ,  $\text{Ph} 7.4$ ). Sur 5 femelles exposées, nous avons noté un seul état de nécrose (Fig. 51 A2, A3). Les figures 51 A1 et B1 représentent une structure normale et des ovocytes en stades D1 ou D2 avec de nombreux globules de vitellus.

Bien que faisant partie des témoins de l'expérimentation, les figures 51 A2, A3, B2 et B3 présentent une pathologie de l'ovaire. Les ovocytes ont des structures granuleuses, basophiles. Il est à noter que l'ovocyte nécrotique (Fig. 51 A3) semble avoir déversé son matériel cytoplasmique dans l'espace interstitiel, déclenchant ainsi une inflammation, distinguée par des plages éosinophiles amorphes, observées autour des caecums. Sur la figure 51 A3, sont observés des caecums nécrotiques à gauche, caractérisés par des œdèmes et des plages amorphes (œdème inflammatoire) et à droite des caecums normaux. La figure 51 B3 présente un œdème ovarien caractérisé par une large plage éosinophile.

Les femelles exposées aux conditions de la station d'épuration, montrent une pathologie de l'ovaire. Il a été noté des œdèmes inflammatoires au niveau des caecums (Fig. 51 B, C et D), des nécroses ovariennes (Fig. 51 B2, B3, C1) et des dysplasies ovariennes, caractérisées par une mal formation de l'ovocyte, ainsi l'ovocyte primaire évolue en taille et non en maturation, on observe donc un énorme ovocyte primaire parsemé de quelques granules basophiles et quelques rares globules de vitellus entourées de cellules folliculaires (Fig. 51 C2, C3, D3).

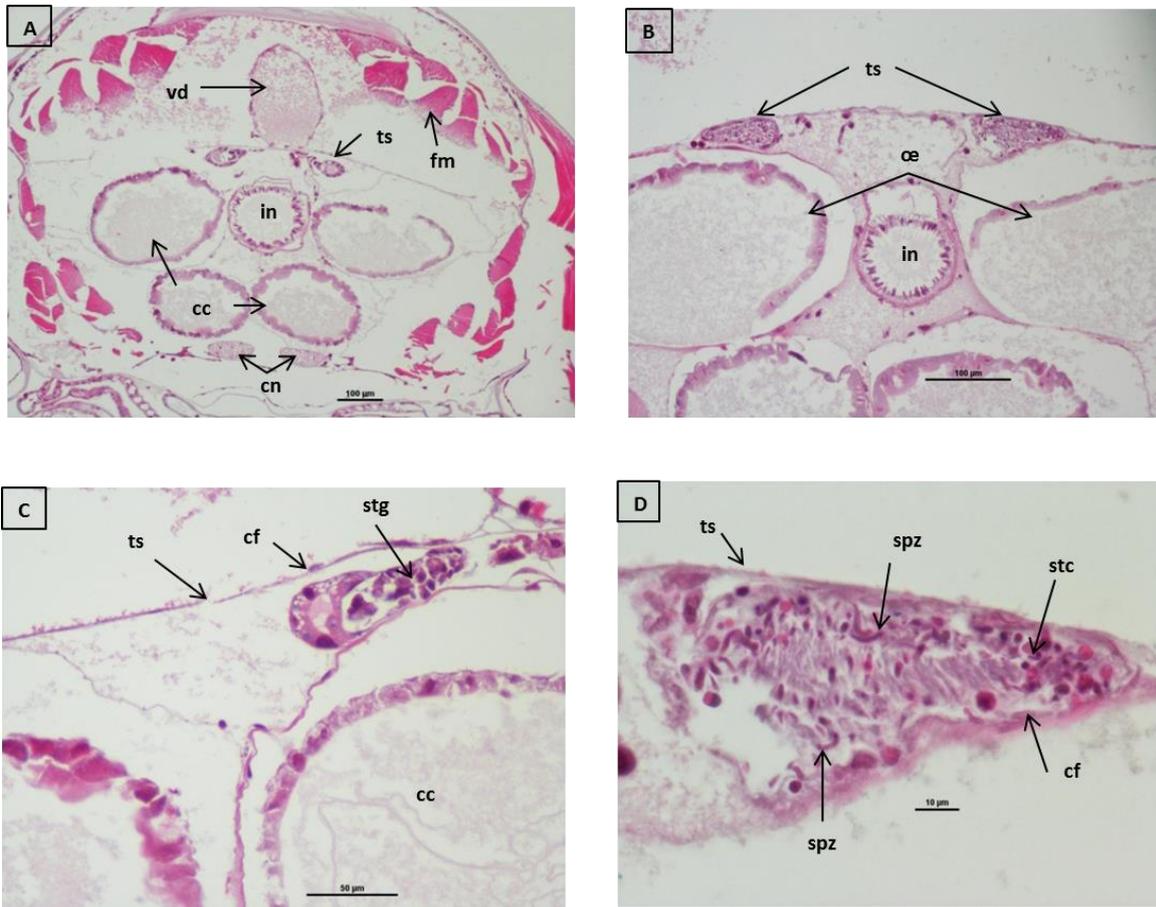


**Fig. 51** : Evaluation de l'impact des effluents de la station d'épuration sur l'organe reproducteur chez la femelle *G. fossarum* au stade D1- D2. A1, A2, A3 : Témoin du laboratoire ; B1 B2 B3 : Témoin du milieu reconstitué ; C1 C2 C3 : Ligne BA ; D1 D2 D3 : ligne BA2.

### 7.1.2. Chez le mâle

Un mâle *G. fossarum* exposé aux effluents de la station d'épuration, a été traité en histologie par erreur, nous le présentons ici, pour montrer une structure normale de la gonade en fin de spermatogénèse (Fig. 52 C, D), néanmoins présentant des œdèmes aux caecums latéraux bordant les testicules (Fig. 52 A, B).

Lors de nos observations, chez les femelles exposées aux effluents ainsi que le mâle, nous avons identifié des pathologies ovariennes, qui ne sont pas très différentes de celles observés chez les femelles témoins du laboratoire (exposées à l'eau de forage). Tous les individus exposés aux effluents, montrent principalement la pathologie du caecum, contrairement à ceux exposés à l'eau de forage du laboratoire. En effet, la forte salinité du milieu pourrait nous laisser penser que cela pourrait provoquer des œdèmes infiltrant et fragilisant les parois du caecum.



**Fig. 52:** Evaluation de l'impact des effluents de la station d'épuration sur l'organe reproducteur chez le mâle *G. fossarum* en fin de spermatogénèse.

## 7.2. Evaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes par le test des comètes

### 7.2.1. Évaluation du site de prélèvement

Afin de tester la sensibilité du test des comètes in-situ sur des gammares exposés aux effluents de la station d'épuration, la sélection du site de prélèvement fut notre première préoccupation. Nous avons donc procédé à une évaluation de la génotoxicité de trois sites par le test des comètes sur les spermatozoïdes de 12 individus mâles *G. fossarum* par site : la rivière de Bourgoin Jallieu, La Tour du Pin et la Mouge. Le taux le plus élevé en dommages à l'ADN a été enregistré sur le site de Bourgoin Jallieu, ce dernier était significativement différent (test Anova  $P = 0.0994$ ) que le site de La Tour du Pin et celui de la Mouge, alors que ces deux derniers sont similaires entre eux (Fig. 53).

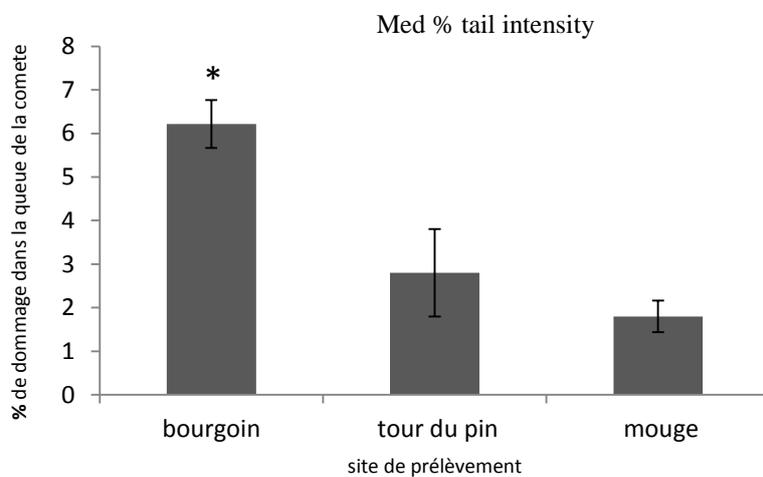
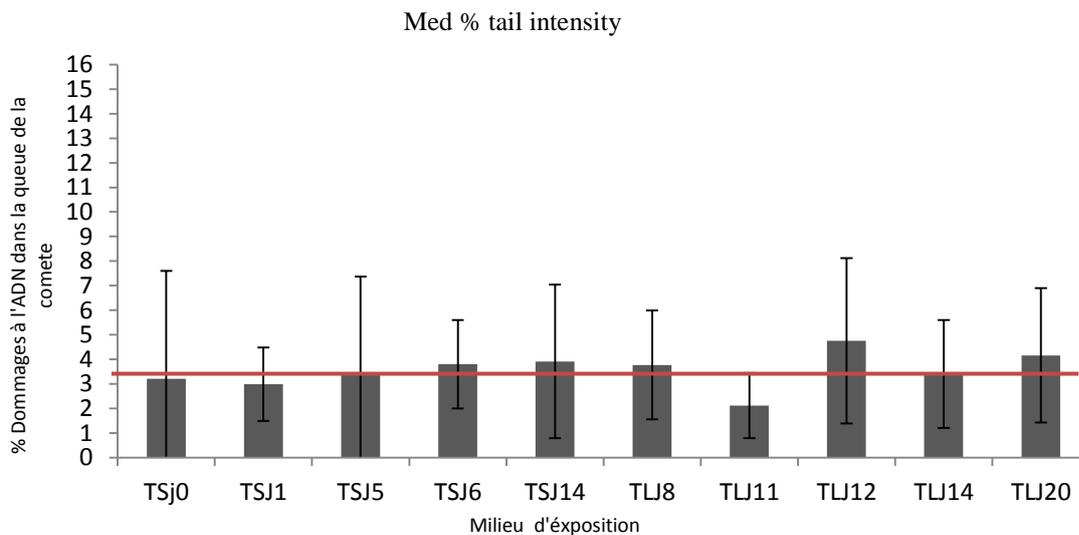


Fig. 53: Evaluation de la toxicité des sites de références

## 7.2.2 Établissement d'un niveau de base

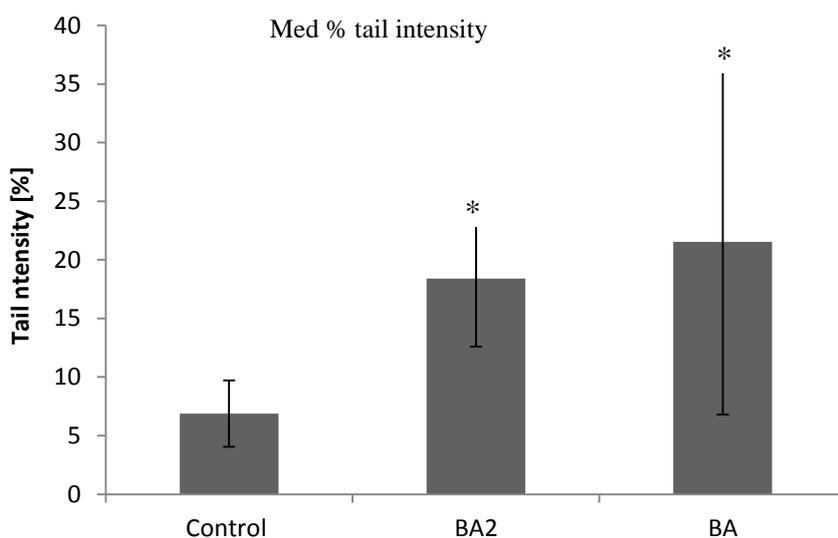
Afin de déterminer la variabilité des niveaux des dommages à l'ADN des spermatozoïdes, deux groupes de la même population ont été suivis parallèlement. L'un a été maintenu dans l'eau du site de prélèvement (Tour du Pin) et l'autre dans l'eau de forage du laboratoire. L'intégrité des dommages à l'ADN des spermatozoïdes de *G. fossarum* des deux groupes a été étudiée, permettant ainsi d'établir une valeur seuil de référence. Cette valeur seuil correspond à l'intervalle de confiance à 95 %, au-delà de laquelle, le niveau des dommages à l'ADN révèle une exposition à un stress génotoxique attribué aux stress en réponse à une contamination chimique lors de l'exposition aux effluents de la station d'épuration. Des études antérieures au laboratoire ont déterminés un niveau de référence pour les témoins du laboratoire de 3% des dommages à l'ADN pour ce biomarqueur de génotoxicité. Notre étude a déterminé une valeur seuil de 3.35%, valeur exprimée en pourcentage des dommages à l'ADN dans la queue de la comète (tail intensity) (Fig. 54).



**Fig. 54 :** Evaluation du seuil de tolérance des dommages à l'ADN pour le site (Tour du Pin). TS : Control 2 maintenu avec H<sub>2</sub>O du site ; TL : Control 1 maintenu au laboratoire (H<sub>2</sub>O de forage). J0 à J20 : jours d'expositions des gammarès aux deux conditions ; La ligne rouge représente l'intervalle de confiance à 95%.

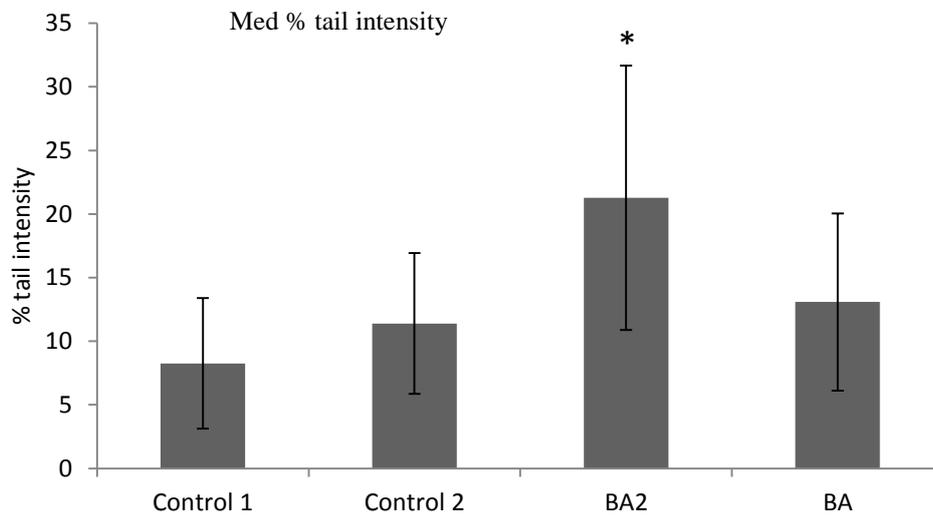
### 7.2.3. Evaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes de gammares exposés à la station d'épuration de Bellecombe

La sensibilité de l'essai comète in-situ a été évaluée sur deux temps : en mars et en juin 2015, ceci afin de limiter la variabilité dû à l'effet saisonnier. Les gammares exposés en mars présentent des valeurs supérieures au seuil toléré (Fig. 55), et restent significativement différents entre eux (test Kruskal Wallis :  $P < 10^{-5}$ ). En effet, une différence significative a été enregistrée pour les valeurs des dommages à l'ADN entre les individus ayant été exposés à la ligne BA et les contrôles (test Wilcoxon :  $P < 10^{-4}$ ) ainsi que les individus exposés à la ligne BA2 (test Wilcoxon :  $P < 10^{-7}$ ) (Fig. 55).



**Fig. 55 :** Evaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes des gammares exposés aux effluents de la station d'épuration au mois de mars 2015.

La figure 56 présente les valeurs des dommages à l'ADN des gammares exposés en juin. Une condition de contrôle avec une conductivité adaptée à la station d'épuration a été ajoutée, ceci afin de limiter le facteur artéfact. Les gammares exposés en mars et en juin présentent tous des valeurs supérieures au seuil toléré (3.5%), mais restent différents entre eux, et significativement différents entre les individus contrôles 1 et ceux exposés à la ligne de l'effluent BA2 (test Mann-Whitney :  $P = 0.0191$ ).



**Fig. 56 :** Evaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes des gammares exposés aux effluents de la station d'épuration au mois de juin 2015.

## 8. Méthode de conservation des spermatozoïdes

Avant de réaliser une approche pratique dans le laboratoire, nous avons effectué une recherche bibliographique approfondie dont nous présentons ici le résultat.

La cryoconservation, ou conservation par le froid d'échantillons biologiques, est un procédé de conservation à basse température utilisant l'azote liquide. A ces températures, toute activité biologique est suspendue. Presque toutes les études ont abordé la congélation du sperme du poisson zèbre, modèle vertébré couramment utilisé dans la recherche de développement génétique et biomédicale (Westerfield *et al.*, 2000). Des dommages liés à la congélation-décongélation ont été observés (Wales & White 1959, Quinn & White 1967). Les auteurs ont démontré une perte de fonctionnalités des spermatozoïdes chez certaines espèces en relation avec un phénomène biophysique appelé transition de phase liquide (Labbé 2013).

Lors du refroidissement en dessous des températures physiologiques, les spermatozoïdes subissent le « cold shock » ou « choc froid » se traduisant par des fuites de matériel intracellulaires et des pertes de fonctionnalité. La diminution de température induit un changement de phase des membranes phospholipides (John et al, 1992) responsable de remaniements membranaires délétères. Ces remaniements miment les réorganisations membranaires liées au phénomène de capacitation chez les mammifères et peuvent donc provoquer une mort cellulaire prématurée (Cormier *et al.*, 1997).

Les cryoprotecteurs sont des agents essentiels pour la cryoconservation, cependant ces additifs ne garantissent pas une survie totale après décongélation, bien que nécessaire à la congélation, ils peuvent ainsi être toxiques pour les échantillons biologiques et les dommages à l'ADN peuvent être lus comme dommages de confusion (Gregory & Fahy 1986). Fiser *et al.*, 1986 ont démontré que l'effet de la cryo-congélation rapide reste, chez les mammifères, la méthode la plus fiable pour garantir un taux de viabilité maximal des spermatozoïdes après la décongélation. Néanmoins d'autres auteurs ont observé une perte de la fonctionnalité des spermatozoïdes lors de la baisse de la température, alors même que l'on se situait toujours au-dessus de 0°C (Wales *et al.*, 1959 ; Quinn *et al.*, 1967 ; Labbé 2013).

La vitesse de refroidissement est un facteur important dans la cryoconservation du sperme, elle affecte l'équilibre osmotique des solutions intra et extracellulaire au cours de la congélation (Yang *et al.*, 2007). L'augmentation de la concentration en ions dans l'eau extracellulaire non cristallisée crée un gradient osmotique au niveau de la membrane

plasmique contribuant à une fuite d'eau de la cellule vers le milieu extracellulaire. Ce phénomène est appelé « freeze-deshydratation » (Mazur 1984).

Le milieu de congélation joue un rôle important dans la protection des fonctions cellulaires des spermatozoïdes. Un milieu de dilution pour les gamètes mâles doit répondre à plusieurs critères dont le pH et la pression osmotique, devant être proches de ceux du plasma séminal. Le milieu de dilution doit contenir des éléments nutritifs, et des éléments cryo-protectants pour limiter les dommages cellulaires lors de la congélation. Il en existe deux types : les perméants et les non perméants (Pillet 2009). Les cryoprotecteurs perméants ou cryoprotecteurs internes ont le pouvoir de traverser la membrane plasmique, ainsi, ils peuvent assurer une protection au niveau intra et extra cellulaire. Le glycérol est le cryo-protecteur perméants le plus utilisé en congélation de semence équine et le méthanol ou le DMSO sont ceux majoritairement utilisés pour la congélation de la semence de poisson. Les cryoprotecteurs non perméants, les sucres (lactose, saccharose) ou les additifs protéiques et lipidiques (lait écrémé, liposomes, jaune d'œuf) sont ceux qui ont un pouvoir protecteur de surface et ne peuvent pas entrer dans la cellule. Chez le poisson zèbre par exemple, l'utilisation de méthanol dans les milieux de congélation permet une protection des spermatozoïdes satisfaisante. Harvey *et al.*, 1982 obtiennent  $43 \pm 12.3\%$  (méthanol 10%) de spermatozoïdes mobiles après décongélation et Yang *et al.*, 2007 en obtiennent  $35 \pm 15\%$  (méthanol 8%). L'ajout de saccharose dans le milieu de congélation apporte souvent une protection supplémentaire. Cela permet de stabiliser la membrane plasmique des spermatozoïdes lors de la diminution de température (Sun et al., 1996). Idéalement, une situation équilibrée permet de maintenir un taux de survie considérable, cet équilibre peut être déterminée empiriquement, et varie en fonction du cryo-protecteur utilisé et de la physiologie des spermatozoïdes (Yang et al. 2007).

Dans un but de développer la technique au laboratoire, nous avons envisagé un protocole que nous n'avons pas encore validé. Celui-ci sera définitivement validé lorsque les conditions matérielles seront réunies.

## Protocole de congélation pour les spermatozoïdes de gammare

Nous avons réfléchi à l'exploration de deux méthodes de congélations :

- i) essai de congélation d'une suspension de spermatozoïdes,
- ii) essai de congélation de la gonade entière.

Dans les deux cas, la gonade sera mise dans un milieu de dilution dont le pH et la pression osmotique devront être proches de ceux du plasma séminal. Le tableau 9 ci-après, synthétise les essais pour la mise au point d'un protocole d'utilisation, pour la congélation des spermatozoïdes de gammare.

**Tableau X** : Protocoles de congélations des spermatozoïdes de *G. fossarum*.

Gonade	BSA	cryoprotecteurs perméants	Cryoprotecteurs non perméants	
Congélations				
20µl suspension				
de spz	10%	glycérol 5 et 10%	lactose 10 et 20%	rapide
-	-	DMSO 3 et 8 %	méthanol 5, 8 et 10 %	rapide
Gonade				
entière	10%	glycérol 10 et 15%	lactose 10 et 20%	rapide
-	-	DMSO 3 et 8 %	méthanol 5, 8 et 10 %	rapide

A l'issu des essais précédemment cités, le protocole le plus adapté, celui qui nous donnera le meilleur taux de viabilité, sera sélectionné pour nos futures études. L'évaluation de la technique sera poursuivie pendant la mise à l'épreuve de celle-ci (après la mise en place de la technique) pendant une période à apprécier, ce qui nous permettra de valider ce protocole et contribuera à mettre le test des comètes en routine pour la surveillance de la santé des milieux aquatiques.

## 1. Conclusion

Face à la multiplicité des substances polluantes et à la complexité de leurs effets sur l'écosystème aquatique, il apparaît nécessaire de développer de nouveaux marqueurs pour le monitoring et l'évaluation de la qualité de l'écosystème d'eau douce. En effet, dans ce travail, nous avons étudié différents stress pour évaluer les effets de la contamination des milieux aquatiques.

La première partie de ce travail a été consacrée à la caractérisation anatomique et histologique de la gamétogenèse mâle et femelle chez *Gammarus fossarum*, permettant ainsi de renseigner les différents stades de maturation de l'ovogenèse et de la spermatogenèse. Nos observations histologiques ont précisé une augmentation des surfaces ovocytaires, avec une croissance très marquée au cours du stade C2, traduisant la mise en place de la vitellogenèse secondaire. La position du centre germinatif et la condensation des globules vitellines marquent la maturation des ovocytes en stade D1 et D2. Dans le même contexte, nous avons pu caractériser les différents stades de la spermatogenèse chez le mâle *Gammarus fossarum*, ce qui a permis d'observer la différenciation des spermatides en spermatozoïdes ainsi que le polymorphisme filamenteux. Nos observations ont également permis de noter les différentes lésions ovariennes et caecales dues à l'exposition aux effluents de la station d'épuration. Il a été noté l'existence de nombreuses lésions spontanées dégénératives, inflammatoires dues au traitement par le cadmium. En effet, de nombreux auteurs ont montré que le cadmium interférait directement avec l'endocytose du vitellus (Bodar *et al.*, 1998) et pouvait avoir une action au niveau des hormones telles que la GSH (Gonad Stimulating Hormone) et la 5HT (5-Hydroxytryptamine), conduisant à une diminution de la production de la VTG et la production d'ovocytes atrétiques (Martin-Diaz *et al.*, 2006). De même, chez certaines femelles, nous avons observé des microsporidies (*Nosema granulosis*) et des kystes d'acanthocéphales au niveau des cellules caecales et des ovocytes atrétiques. Haine (2007) a démontré que le système reproducteur des gammarus est facilement exploité par ces parasites et que les effets des infections sur la condition physique de l'hôte peuvent dépendre des espèces. Cette présence pourrait éventuellement prolonger le stade d'inter-mue chez l'amphipode (Thomas *et al.*, 1996).

Les dysfonctionnements cellulaires dus aux stress, entraînent une augmentation des dommages à l'ADN. La détection et la quantification de ces dommages, permettent leurs utilisations

comme biomarqueurs des substances génotoxiques. Chez le crustacé, parmi les hormones impliquées dans la reproduction, on peut citer les ecdystéroïdes et les juvénoïdes, hormones responsables de la régulation du développement de la croissance et de la reproduction (Rodriguez *et al.*, 2007, Leblanc 2007). Leblanc 2007 a noté une perturbation de la régulation de ces hormones due à la biodisponibilité de contaminants chez des crustacés. Lacaze (2010) a démontré que les spermatozoïdes sont les cellules les plus sensibles et les plus discriminantes d'un stress génotoxique. Ainsi la seconde partie de mon travail visait à évaluer le stress génotoxique des spermatozoïdes de gammare lié aux effluents de la station d'épuration Bellecombe et à la variation saisonnière. Dans ce contexte, et malgré les difficultés de mise au point détaillées plus haut, le test des comètes selon Singh *et al.*, (1988) a été utilisé avec succès sur les spermatozoïdes de *Gammarus fossarum* exposé en mars et en juin 2015.

L'exposition des gammares mâles in-situ aux effluents hospitaliers et urbains a été précédée par une étude permettant le choix du site de prélèvement réalisé en comparant les sites de La Tour du Pin, Bourgoin et la Mouge et l'établissement d'un seuil de référence de dommage à l'ADN défini à 3,35% Tail DNA (Fig. 32). Dans les deux cas, nos résultats ont montré une similitude de dommages à l'ADN chez nos contrôles du laboratoire, nous assurant ainsi une mesure sensible et très reproductible. Les niveaux des dommages à l'ADN mesurés par le test des comètes étaient peu influencés par les facteurs environnementaux, ni dans le temps ni dans l'espace, permettant ainsi de définir aisément une valeur de référence chez cette espèce. Ce test est extrêmement sensible, il peut être utilisé aisément dans notre laboratoire pour la surveillance des milieux aquatiques de référence.

## **2. Les perspectives**

- 1- Une étude de la pathologie spontanée chez les gammares sur plusieurs sites de prélèvements et l'établissement d'une carte de contrôle au cours de l'année, permettrait une meilleure connaissance de cet organisme ainsi qu'un meilleur choix des individus tests.
- 2- Concernant le parasitisme observé dans cette étude, provoquant des nécroses ovocytaires, et pouvant être la cause de l'infertilité chez la femelle, la question de pouvoir produire des individus d'élevage pourrait se poser, néanmoins cela pourrait rencontrer la difficulté du rendement, donc de l'approvisionnement ou du maintien de cet élevage.

- 3- La congélation des spermatozoïdes pourrait être une question prioritaire à laquelle il faudra répondre, afin de pouvoir utiliser le test des comètes en routine en tant que biomarqueur pour la surveillance de la santé de l'écosystème.

Ces trois points semblent nécessaires et pertinents pour l'obtention de résultats les plus homogènes et répétables possibles.

## Références bibliographiques

---

1. AHNSTRÔM G. ET EDWARDSSON K.A., (1974). Letter: Radiation-induced single-strand breaks in DNA determined by rate of alkaline strand separation and hydroxylapatite chromatography: an alternative to velocity sedimentation. *International Journal Of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 2 6(5), 493-497.
2. AHNSTRÔM G., (1988). Techniques to measure DNA single-strand breaks in : A review, *International Journal of Radiation Biology*, 54 (5), 695-707.
3. AL-SALMANI K., ABBAS HUSSEIN HK., SCHULPEN S., KARBASCHI M., ABDALLA I., BOWMAN K J., SO KK., . EVANS MARK D., JONES G D D., GODSCHALK RW., COOKE MS., (2011). Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. *Free Radical Biology and Medicine*, 51, (3), 719–725.
4. ARANTES FÁBIO P., SANTOS HÉLIO B., RIZZO ELIZETE., SATO YOSHIMI., BAZZOLI NILO., (2011). Influence of water temperature on induced reproduction by hypophysation, sex steroids concentrations and final oocyte maturation of the “curimatã-pacu” *Prochilodus argenteus* (Pisces: Prochilodontidae). *Journal of General and Comparative Endocrinology*, 172, 400-408.
5. AZQUETA A., GUTZKOW KB., BRUNBORG G., COLLINS AR., (2011). Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research*, 724, 41– 45.
6. BACCI G., (1965). Sex determination and genic balance of *ophryotrocha puerilis*, a hermaphrodite polychaete worm. *Nature, London*. 297, 1208-1209.
7. BARNARD J L & BARNARD C M., (1983). Freshwater Amphipoda of the World. Part I, Evolutionary Patterns: i–xvii, 1–358. Part II, Handbook and Bibliography. Hayfield Associates, Mt. Vernon, Virginia: xxix, 359–830.
8. BELPAEMA K., COOREMAN K., KIRSCH-VOLDERS M., (1998). Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 415 (3), 167 – 184.
9. BERG K., (1948). Biological studies on the river Susaa. *Folia Limnol. Scand.*, 4, 318p.
10. BIESINGER KE., CHRISTENSEN G.M., (1972). Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 29, 1691-1700.
11. BIRNBOIM H C., JEVCAK JJ., (1981). Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low dose of radiation *Cancer Research*, 41(5), 1889-1892.
12. BODAR CWM, VOOGT PA, ZANDEE DI. (1990). Ecdysteroids in *Daphnia magna*: Their role in moulting and reproduction and their levels upon exposure to cadmium. *Aquatic Toxicology*. 17(4), 339-350.
13. BOLLACHE L., ET CÉZILLY F., (2004). Sexual selection on male body size and assortative pairing in *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda): field surveys and laboratory experiments. *Journal of Zoology* 264(2), 135-141.
14. BRAUNBECK T., NEUMÜLLER D., (1996). The comet assay in permanent and primary fish cell cultures – a novel system to detect genotoxicity. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 32, 61-62.

15. BURLINSON A., TICE RR., SPEIT G., AGURELL E., BRENDLER-SCHWAAB SY., COLLINS AR., ESCOBAR P., HONNA M., KUMARAVEL TS., NAKAJIMA M., SASAKI YF., THYBAUD V., UNO Y., VASQUEZ M., HARTMANN A.,(2007).fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. *Mut Res.*627, 31-35.
16. BURTON G.A., (1992). Sediment toxicity assessment: *Lewis Publishers*, 211 pp.
17. BURCHAM PC., (1999). Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. *Mut Res*, 433, 11-36.
18. CALOW P., ( 1993). Handbook of Ecotoxicology, Vol. 1. Blackwell Science Ltd, London, UK, 478 p.
19. CHAUMOT A., COULAUD R., LOPES C., QUEAU H, FRANCOIS A., GEFFARD O., (2013). Modélisation pour l'interprétation des réponses individuelles mesurées lors de tests de toxicité in situ. Rapport d'activé. ONEMA partenariat 2012, action 45, sous action : élaboration d'une batterie d'indicateurs "invertébrés transplantés" – phase 3 Modélisation.
20. CHAPMAN RF., LEE JC., (1991)..Environmental-effects on numbers of peripheral chemoreceptors on the antennae of a grasshopper. *Chemical Senses*. 16 (6), 607-616.
21. CHARNIAUX-COTTON H., (1954). Discovery in, an amphipod crustacean (*Orchestia gam-marella*) of an endocrine gland responsible for the differentiation of primary and secondary male sex characteristics. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* 239, 780–782.
22. CHARNIAUX-COTTON H., (1965). Hormonal control of sex differentiation in invertebrates. *Organogenesis*. R. L.Dehaan and H. Ursprung. New York, Holt, Rinehart, and Winston, 701-740.
23. CHARNIAUX-COTTON H., (1973). "Description et controle de l'ovogenese chez les crustaces superieurs." *Ann.Biol. anim. Bioch. Biophys.* 13(Hors-serie): 21-37.
24. CHARNIAUX-COTTON,H.,(1974). Données nouvelles concernant la vitellogenèse des Crustacés Malacostracés obtenues chez l'Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas) : folliculogenèse à partir d'un tissu permanent ; action du busulfan ; action inhibitrice de l'hormone juvénile . *C . R . Acad. Sci.*, 279 sér. D, p.563-566.
25. CHARRON L., GEFFARD O., CHAUMOT A., COULAUD R., QUÉAU H., GEFFARD A., DEDOURGE-GEFFARD O., (2013). "Effect of water quality and confounding factors on digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum*." *Environ Sci Pollut Res Int* 20(12), 9044-9056.
26. CHARRON L., GEFFARD O., CHAUMOT A., COULAUD R., JAFFA L A., GAILLET V., DEBOURGE-GEFFARD O., GEFFARD A., (2014). "Influence of molting and starvation on digestive enzyme activities and energy storage in *Gammarus fossarum*." *PloS One* 9, e96393.
27. CHARVET S., KOSMALA A., STATZNER. B., (1998).Biomonitoring through biological traits of benthic macroinvertebrates : perspectives for a general tool in stream management. *Archive für Hydrobiology*. 142(4), 415-432.
28. CHENG-HUNG CHUANG., MIAO-LIN HU., (2004). Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Mutation Research*, 564, 75–82.
29. CHEVAILLIER P., (1969). Evolution des constituants nuclearaires et cytoplasmiques au cours de la spermatogenese chez les Crustaces Decapodes. *CR Acad. Sci. Paris*, 269, 2251-2253.
30. CHEVREUX É., FAGE L., (1970). Amphipodes Paris. Chinnery, F. E. et Williams, J. A. (2003) Photoperiod and temperature regulation of diapause egg production in *Acartia bifilosa* from Southampton Water. *Marine Ecology Progress Series*, 263, 149-157.

31. CLAXTON LD., HOUK VS., HUGHES TJ., (1998). Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 410(3), 237-243.
32. COLD A., FORBES VE., (2004). Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquatic Toxicology*, 67(3), 287-299.
33. COLLINS A R., (2004). The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26, 249-261.
34. COLLINS AR., DOBSON VL., DUSISNSKA M., KENNEDY G., STETINA R., (1997). The comet assay: what can it really tell us?, *Mutation Research*, 375,183-193.
35. CORMIER N., SIRARD M A., BAILEY J L., (1997). Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.* 18,461-468.
36. COROLLA JP LA GOMBE., (2010) DORIS FFESSM *Comission Environnement et Biologie Subaquatique* : n° 1645.
37. COULAUD R., GEFFARD O., XUEREB B., LACAZE E., QUÉAAU H., GARRIC J., CHARLES S. CHAUMOT A., (2011). *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research* 45(19), 6417-6429.
38. DEDOURGE-GEFFARD O., PALAIS F., BIAGIANTI-RISBOURG S., GEFFARD O., GEFFARD A., (2009). Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An in situ experiment. *Chemosphere* 77(11), 1569-1576.
39. DEVAUX A., PESONEN M., MONOD G., (1997). Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol in vitro*, 11: 71-79.
40. DEVAUX A., PESONEN M., MONOD G., (1997). Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. In Vitro*, 11 (1997), pp. 71–79.
41. DEVAUX A., FLAMMARION P., BERNARDON V., GARRIC J., MONOD G., (1998). Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501a induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Mar Environ Res*, 46( 1-5), 257–262.
42. DEVAUX A., FIAT L., GILLET C., BONY S., (2011). Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Journal of aquatic ecotoxicology* 101(2), 405-411.
43. DEVAUX A., BONY S., (2013). Genotoxicity of contaminants: Comet assay. In “Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology”, Springer Science + Business Media Dordrecht, pp 559-568.
44. DIXON DR., PRUSKI A., DIXON M., JHA AN., (2002). Marine invertebrate ecogenotoxicology : A methodological overview. *Mutagenesis*,17 (6), 495-507.
45. DOLEDEC S., STATZNER B., BOURNARD M., ( 1999). Species traits for future biomonitoring across ecoregions: patterns along a human-impacted river. *Freshwater Biology*. 42, 737-758.
46. EVANS M D., COOKE M S., (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays*, 26(5), 533 -5 42.
47. FELTEN V., (2003). Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophysiologie de *Gammarus fossarum* Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda) : approche intégrée à différents niveaux d'organisation.,These de Doctorat Université de Metz, 339p.
48. FELTEN V., G CHARMANTIER., MONS R., GEFFARD A., ROUSSELLE P., COQUERY M., GARRIC J., GEFFARD O., (2008a). "Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*, 86(3), 413-425.

49. FELTEN V., TIXIER G., GUÉROLD F., DE CRESPIN D B., DANGLES O., (2008b). Quantification of diet variability in a stream amphipod: implications for ecosystem functioning. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie* 170(4): 303-313.
50. FISER P S., FAIRFULL., (1986). The effects of rapid cooling ( cold shock) of Ram Semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*, 23, 518-524.
51. FRENZILLI. G, NIGRO. M, LYONS. B.P. (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research* 681, 80–92.
52. FRIEDBERG E C., (1995b). Out of the shadows and into the light : the emergence of DNA repair. *Trends Biochem Sci*, 20, (10), 3 81.
53. GAGNE F C., ANDRÉ., BLAISE C., (2008).The dual nature of metallothioneins in the metabolism of heavy metals and reactive oxygen species in aquatic organisms: implications of use as a biomarker of heavy-metal effects in field investigations. *Biochemistry Insights*,1, 23–33.
54. GARRIC J., FERARD JF., VINDIMIAN E., (1992). Essais biologiques pour l'estimation de la toxicité chronique des effluents. Numéro spécial. rapport final. Ministère de l'Environnement/Agences de l'Eau,Neuilly-sur-Seine, France.
55. GEFFARD A., GEFFARD O., AMIARD J.C., HIS E., AMIARD-TRIQUET C., (2007). Bioaccumulation of Metals in Sediment Elutriates and Their Effects on Growth, Condition Index, and Metallothionein Contents in Oyster Larvae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 57–65.
56. GEFFARD O., XUEREB B., CHAUMOT A., GEFFARD A., BIAGIANTI S., NOËL C., ABBACI K., GARRIC J., CHARMANTIER G., CHARMANTIER-DAURES M., (2010). Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for Reproductive Toxicity Assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (10): 2249-2259.
57. GHEKIERE A., FENSKE M., VERSLYCKE., TYLER C., JANSSEN C., (2005). Development of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for vitellin in the mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). *Comparative Biochemistry and Physiology*, part A 142, 43-49.
58. GREGORY M., FAHY., (1986). The Relevance of Cryoprotectant “Toxicity” to Cryobiology. *RYOBIOLOGY*, 23, I-13.
59. HAINE ER., MOTREUIL S., RIGAUD T., (2007). Infection by a vertically-transmitted microsporidian parasite is associated with a female-biased sex ratio and survival advantage in the amphipod *Gammarus roeseli*. *Parasitology*, 134, 1363–1367.
60. HAMMERS-WIRTZ M., RATTE. H T., (2000). Offspring fitness in *Daphnia*: is the *Daphnia* reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level?. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 (7) (2000), pp. 1856–1866.
61. HARTMANN A., AGURELL E., BEEVERS. C., BRENDLER-SCHWAA SB., BURLINSON.B., CLAY P., COLLINS. A., SMITH A., SPEIT. G., THYBAUD V., TICE RR., (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4<sup>th</sup> international Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 18(1), 45-51 .
62. HARVEY B., KELLEY R N., ASHWOOD-SMITH M J., (1982), Cryopreservation of zebrafish spermatozoa using methanol. *Canadian Journal of Zoology*, 60, 1867-1870.
63. HELLUY S., (1983). Un mode de favorisation de la transmission parasitaire: la manipulation du comportement de l'hôte intermédiaire. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 38, pp211-223.

64. HILDREW A., TOWNSEND C., FRANCIS J., (1984). Community structure in some southern english streams: the influence of species interactions. *Fresh Water Biology*, Vol: 14.297-31
65. HWANG ES., KIM GH., (2007). Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. *Toxicology*, 229: 1-10.
66. HYNES, H. (1955) The reproductive cycle of some British freshwater Gammaridae. *The Journal of Animal Ecology*: 352-387.
67. HYNE RV., (2011). Review of the reproductive biology of amphipods and their endocrine regulation: identification of mechanistic pathways for reproductive toxicants. *Environ Toxicol Chem*, 30(12), 2647-2657.
68. JHA AN., (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23 (3), 207-221.
69. JOHN E., PARKS., DANIEL V., LYNCH., (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes, *Cryobiology*, 29, 255-266.
70. JUBEAUX G., SIMON R., SALVADOR A., QUÉAU H., CHAUMOTA A., GEFFARD O., (2012). Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch,1835): Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. *Aquatic Toxicology*, 112-113 (0): 72– 82.
71. KARAMAN G S., PINKSTE R S., (1977). Freshwater *Gammarus* species from Europe, north Africa and adjacent regions of Asia (*Crustacea-Amphipoda*), part I. *Gammarus pulex*-group and related species. *Bijdr Dierk* 47: 1-97.
72. KOCH R A., LAMBERT C C., (1990). Ultrastructure of sperm, spermiogenesis, and sperm-egg interactions in selected invertebrates and lower-vertebrates which use external fertilization. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 16, pp. 115–154.
73. KUNZ P Y., KIENLE C., GERHARDT A., (2010). *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests. *Rev of Environ Contam Toxicol*. 205, 1-76.
74. LABBÉ C., (2013). Spécificités de la cryoconservation des ressources génétiques chez les espèces aquacoles. *STAL*, 39- 2<sup>e</sup> trimestre.
75. LACAZE E., GEFFARD O., BONY S., DEVAUX A., ( 2010). Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutation Research – Gen Toxicol Environ Mutag*, 700 (1-2): 32-38.
76. LACAZE E., (2011). Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gammarus fossarum*: développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel. Thèse de Doctorat Université de Metz, 368p.
77. LACAZE E., DEVAUX A., JUBEAUX G., MONS R., QUEAU H., GARDETTE M., BONY S., GARRIC J., GEFFARD O., (2011a). "DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure: intrinsic variability and reference level." *Sci Total Environ* 409(17): 3230-3236.
78. LACAZE E., DEVAUX A., MONS R., BONY S., GARRIC J., GEFFARD A., GEFFARD O., (2011b)., DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollut*, 159(6): 1682-1691.
79. LACAZE E., GEFFARD O., GOYET D, BONY S., DEVAUX A., (2011c). "Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay." *Environ Res*, 111(5): 626-634.

80. LADEWIG V., JUNGSMANN D., KÖHLER HR., SCHIRLING M., TRIEBSKORN R., NAGEL R., (2006). Population structure and dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) upstream and downstream from effluents of sewage treatment plants. *Arch Environ Contam Toxicol*, 50(3):370-383.
81. LANGIE SA., KNAAPEN AM., BRAUERS KJ., VAN BERLO D., VAN SCHOOTEN FJ., GODSCHALK RW., (2006). Development and validation of a modified comet assay to phenotypically assess nucleotide excision repair. *Mutagenesis*, 21, 153–158.
82. LAWRENCE A., J AND C., POULTER., (1998). "Development of a sub-lethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*." *Water Research*, 32(3), 569-578.
83. LEBLANC G.A., (2007) Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology*, 16, 61-81.
84. LEMAITRE J., RIGAUD F., CORNET S., BOLLACHE L., (2009). sperm depletion, male mating behaviour and reproductive "time-out" in *gammarus pulex* ( Crustacea, Amphipoda). *Animal behaviour*, 77 (1), 49-54.
85. LEONARD A., (1990). Les Mutagènes de l 'environnement et leurs effets biologiques, MASSON, Paris, 3 06p.
86. LE ROUX A. 1968. Description d'organes mandibulaires nouveaux chez les crustacés décapodes. *C R Acad Sci Paris Ser D* 266:1414–1417.
87. LEWIS C., FORD AT., (2012). Infertility in male aquatic invertebrates: A review. *Journal of aquatic toxicology* 120-121 79-89.
88. MACAN TT., MACKERETH TC., (1957). Notes on *Gammarus pulex* in the English Lake District. *Hydrobiol*, 9, 1-12.
89. MACNEIL C., DICK JTA., BIGSBY E., ELWOOD RW., MONTGOMERY WI., GIBBINS CN., KELLY DW., (2002). The validity of the *Gammarus* : *Asellus* ratio as an index of organic pollution: abiotic and biotic influences. *WATER RESEARCH*. 36 ( 1), 75-84.
90. MALTBY L., ET NAYLOR C., (1990). Preliminary observations on the ecological relevance of the *Gammarus* scope for growth'assay: effect of zinc on reproduction. *Functional Ecology*, 393-397.
91. MALTBY L., CLAYTON S A., WOOD R M., MALOUGHLIN N., (2002). "Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as abiomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance." *Environ Toxicol Chem*, 21(2), 361-368.
92. MAMACA E., BECHMANN R K., TORGRIMSEN S., AAS E., BJØRNSTAD A., BAUSSANT T., LE FLOCH S., (2005). The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. *Aquatic Toxicology*, 75(3) 10, 191–201.
93. MANIATIS T., FRITSCH E F., SAMBROOK J., (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New-York. *ACTA Biothechnol*,5 (1985) 1, 104.
94. MARTINEZ GR., LOUREIRO AMP., MARQUES SA., MIYAMOTO S., YAMAGUCHI LF., ONUKI J., ALMEIDA JEA., GARCIA CCM., BARBOSA LF., MEDEIROS MHG., DI MASCIO P., (2003). Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mut Res*. 544: 115-127.
95. MARTIN-DIAZ ML., TUBERTY SR., MCKENNEY JR CL., BLASCO J., SARASQUETE C., DELVALLS TA., (2006). The use of bioaccumulation, biomarkers and histopathology diseases in shape *Procambarus clarkii* to establish bioavailability of Cd and Zn after a mining spill. *Environmental Monitoring and Assessment*, 116(1-3):169-184.
96. MARTOJA R., MARTOJA-PIERSON M., (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. MASSON,Paris, 345p.

97. MCCAULEY D J., DEGRAEVE GM., LINTON T K., ( 2000). Sediment quality guidelines and assessment: overview and research needs. *Environmental Science and Policy*, 3, 133-144.
98. MAZUR P., (1984), Freezing of living cells: Mechanisms and implications, *American Journal of Physiology*. 247, 125-142.
99. MERK O., SPEIT G., (1999). Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33 (2), 167-172.
100. MEUSYJ J N., (1972). La gamétogenèse et la fraction protéique de l'hémolymphe spécifique du sexe femelle chez quelques Crustacés supérieurs : étude descriptive et rôle des glandes androgènes. Thèse d'état Paris VI, n° CNRS. AO6583.
101. MITCHELMORE CL., CHIPMAN JK., (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399 (2): 135-147.
102. MOUSTACCHI E., (2000). DNA damage and repair: consequences and dose-responses. *Mutat Res*, 464(1), 35-40.
103. MOSS T., DIMITROV S L., HOUDE D., (1997). UV-Laser Crosslinking of Proteins to DNA. *Methods*, 11(2), 225-234.
104. MULLISS RM., REVITT DM., SHUTES RBE., (1996). A statistical approach for the assessment of the toxic influences on *Gammarus pulex* (Amphipoda) and *Asellus aquaticus* (Isopoda) exposed to urban aquatic discharges. *Water research*, 30, 1237-1243.
105. OHE T., WATANABE T., WAKABAYASHI K., (2004). Mutagens in surface waters. *Mutat Res*, 567 (2-3): 109-149.
106. OLIVE P L., BANÁTH J P., DURAND R E., (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet assay". *Radiat Res*, 122(1), 86-94.
107. PFUHLER S., AND WOLF HU., (1996). Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 27 (3): 196-201.
108. PILLET E., BATELIER F., DUCHAMP G., FURTOSS V., LE VERN Y., KERBOEUF D., VIDAMENT M., MAGISTRINI M., (2008). Freezing stallion semen in INRA96-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82, *Dairy Sci Technol*, 88, p 257-265.
109. PÖCKL M., HUMPESCH U., (1990) Intra- and inter-specific variations in egg survival and brood development time for Austrian populations of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda). *Freshwater Biology*, 23(3): 441-455.
110. QUINN P J., WHITE I G., (1967). Phospholipid and cholesterol content of epididymal and ejaculated ram spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. *J.Biol.Sci*, 20, 1205-1215.
111. REGER J F., (1966). A comparative study on the fine structure of developing spermatozoa in the isopod, *Oniscus asellus*, and the amphipod, *Orchestoidea* sp. *Cell and Tissue Research*, 75 (3), 579 – 590.
112. REGER JF., ITAYA P W., FITZGERALD M A., (1979). A thin section and freeze-fracture study on membrane specialization in spermatozoa of the isopod, *armadillidium vulgare*. *Journal of ultrastructure research*, 67(2), 180-193.
113. RINDERHAGEN M., RITTERHOFF J., ZAUKE G.-P., (2000). Crustaceans as bioindicators. *Biomonitoring of polluted water*, 9: 161-194.
114. RODRIGUEZ MR., MEDESANI DA., FINGERMAN M., (2007). Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants : A review. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146, 661-671.

115. ROJAS S A., GOFF HD., SENARATNE V., DALGLIESH D G., FLORES A., (1997). Gelation of commercial fractions of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 7,79-85.
116. ROUX AL., (1970). Le cycle de reproduction de deux espèces étroitement parentes de Crustacés Amphipodes: *Gammarus pulex* et *G. fossarum*. *Annls Hm-nol*, 6 (1): 2746.
117. RYDBERG B., JOHANSON K J., (1978). Estimation of single strand breaks in single mammalian cells, in Hanawalt P.C. , Friedberg E.F. et Fox C.F. (Eds), *DNA Repair Mecanisms*, Academic press, New York, 465-468.
118. SCHIRLING M., JUNGMANN D., LADEWIG V., LUDWICHOWSKI KU., NAGEL R., KÖHLER HR., (2006). Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicology*, 15(2):143-156.
119. SCHMITZ EH., (1992)Amphipoda. In: Harrison FW, Humes AG, editors. *Microscopic Anatomy of Invertebrates: john wiley and son.* p. 443-528.
120. SCHWARTZ.D C., CANTOR C R., (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNA by pulsed field gradient gel electrophoresis *Cell*,37, 67- 75.
121. SILVA E., RAJAPAKSE N., KORTENKAMP A., (2002). Something from "nothing"--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol*, 36(8),1751-6.
122. SINGH N P., MACOY M T., TICE R R., SCHNEIDER E L., (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Res*, 175(1), 184-191.
123. SINGH N P., DANNER D B., TICE R R., PEARSON J D., BRANT L J, MORRELL C H., SCHNEIDER E L., (1991a). Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age, *Mutat Res*, 256(1),1-6.
124. SIU WHL., CAO J., JACK RW., WU RSS., RICHARDSON BJ., XU L., LAM PKS., (2004). Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquatic Toxicology* 66 (4), 381–392.
125. SRODA S., COSSU-LEGUILLE C., (2011a). "Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor?" *Ecotoxicology* 20(1), 264-273.
126. SRODA, S., COSSU-LEGUILLE C., (2011B). "Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy Reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*." *Chemosphere* 83(4), 538-544.
127. SUBRAMONIAM T., ( 2000). Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comparative biochemistry and physiology. Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol*, 125(2), 135–156.
128. SUN G., BIRKEY M., HULETT FM., (1996). Three two component signal transduction systems interact for pho regulation in *Bacillus subtilis* . *Mol Microbiol*;19(5), 941–848.
129. SUTCLIFFE D W., (1992). Reproduction in *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda): basic reproductive processes. *Freshwater forum*; 2,102-128.
130. SUTCLIFFE D W., (1993) Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): female strategies. *Freshwater Forum* 3(1), 26-64.
131. STEELE DH., STEELE VJ., (1972) Biology of *Gammarus angulosus* (Crustacea, Amphipoda) in the northwestern Atlantic. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 29(9),1337-1340.
132. TACHET H., BOURNAUD M., RICHOUX P., USSEGLIO-POLATERRA., (2000). *Invertebrés d'eau douce : Systematiques, bilgie, écologie*, CNRS édition, Paris,588p.

133. THOMAS F., VERNEAU O., SANTALLA F., CEZILLY F., RENAUD F., (1996). The influence of intensity of infection by a trematode parasite on the reproductive biology of *Gammarus insensibilis* (Amphipoda). *International journal for parasitology*, 26 (11) 1205–1209.
134. TICE R., AGURELL R E., ANDERSON D., BURLINSON B., HARTMANN A., KOBAYASHI H., MIYANAE Y., S.ROJAS E., RYU JC., SASAKI YF., (2000). Single cell gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and invivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
135. TOBE SS., BENDENA WG., (1999). The regulation of juvenile hormone production in arthropods - Functional and evolutionary perspectives. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 897, 300-310.
136. VON SONNTAG C., (1987). New aspects in the free-radical chemistry of pyrimidine nucleobases. *Free Radic.Res. Commun*, 2, 217–224.
137. WALES R.G., WHITE I.G., (1959). The susceptibility of spermatozoa to temperature shock. *J. Endocrin*, 19, 211-220.
138. WASSON G R., MCGLYNN A P., MCNULTY H., O'REILLY S L., MCKELVEY-MARTIN V J., MCKERR G., STRAIN J J., SCOTT, J, DOWNES, C. S., (2006). Global DNA and p53 region-specific hypomethylation in human colonic cells is induced by folate depletion and reversed by folate supplementation. *J Nutr*, 136 (11), 2748-2753.
139. WENTZEL. J F, GOUWS. C, HUYSAMEN. C, VAN DYK. E, KOEKEMOER. G, PRETORIUS. PJ. (2010). Assessing the DNA methylation status of single cells with the comet assay. *Analytical Biochemistry* 400 (2), 190–194.
140. WESTERFIELD M., (2000). *The Zebrafish Book, A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 4th Edition. University of Oregon Press; Eugene, OR. p. 1.1-11.93.
141. WOŹNICKI P., LEWANDOWSKA R., BRZUZAN P., ZIOMEK E., BARDEGA RY., (2004). The level of DNA damage and the frequency of micronuclei in haemolymph of freshwater mussels *Anodonta woodiana* exposed to Benzo[A]Pyrene. *Acta Toxicologica*, 12(1),41 – 45.
142. XUEREB B., NOURY P., FELTEN V., GARRIC J., GEFFARD O., (2007). Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos. *Toxicolgy*, 236(3), 178-189.
143. XUEREB B., CHAUMOT A., MONS R., GARRIC J., GEFFARD O., (2009a). "Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys." *Aquat Toxicol*, 93(4), 225-233.
144. XUEREB B., LEFEVRE E., GARRIC J., GEFFAR O., (2009b). "Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration." *Aquat Toxicol* 94(2), 114-122.
145. XUEREB B., BEZIN L., CHAUMOT A., BUDZINSKI H., AUGAGNEUR S., TUTUNDJIAN R., GARRIC J., GEFFARD O., (2011). Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization in females and potential for use as an endocrine disruption biomarker in males. *Ecotoxicology* 20 (6), 1286–1299.
146. YANG H., CARMICHAEL C., ZOLTAN M V., TIERSCH T.R., (2007), Development of simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*, *Theriogenology*, 68, p 128-136.
147. ZERBIB C., (1973). Contribution à l'étude ultrastructurale de l'ovocyte chez le Crustacé Amphipode *Orchestia gammarella* Pallas. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 277 D, 1209-1212.