



HAL
open science

Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gammarus fossarum* : développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel

Emilie Lacaze

► **To cite this version:**

Emilie Lacaze. Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gammarus fossarum* : développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel. *Ecotoxicologie*. Université Paul Verlaine - Metz, 2011. Français. NNT : 2011METZ007S . tel-01748853

HAL Id: tel-01748853

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748853v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

UNIVERSITE de METZ

UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

Présentée par

Emilie LACAZE

En vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de la Vie

Spécialité : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

**Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gammarus fossarum* :
développement, signification fonctionnelle
et application au milieu naturel**

Soutenue le 14 janvier 2011, devant la commission d'Examen formée de:

M Awadhesh JHA, Professeur, Université de Plymouth	Rapporteur
M Laurent LAGADIC, Directeur de Recherche, INRA	Rapporteur
Mme Almut GERHARDT, Directrice de LimCo International	Examineur
Mme Paule VASSEUR, Professeur, Université de Metz	Président
M Alain DEVAUX, Ingénieur de Recherche, HdR, INRA/ENTPE	Directeur de thèse
M Olivier GEFFARD, Chargé de Recherche, Cemagref	Co-directeur de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de deux laboratoires lyonnais, le Laboratoire des Sciences de l'Environnement (LSE), à l'ENTPE, membre de l'Université de Lyon et le laboratoire d'écotoxicologie (UR MALY) du Cemagref de Lyon. Il a été financé par une bourse du Cluster Environnement de la Région Rhône-Alpes.

Je remercie sincèrement les directeurs respectifs des deux laboratoires, Monsieur Yves Perrodin, directeur du LSE et Madame Jeanne Garric directrice du laboratoire d'écotoxicologie de m'avoir accueilli et permis de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions de travail. Je vous remercie également d'avoir pris en charge une prolongation d'un mois dans chacun des laboratoires pour finir ce travail. Les années passées au sein de ces laboratoires m'ont beaucoup appris et apporté tant sur le plan scientifique, professionnel qu'humain.

A l'origine de ce projet, je tiens particulièrement à remercier Alain Devaux et Olivier Geffard, les deux encadrants de cette thèse. Au cours de ces trois ans, j'ai eu la chance et le privilège de bénéficier d'un encadrement d'une grande qualité scientifique et particulièrement enrichissant. Alain, je te remercie pour toutes les connaissances en écotoxicologie et en génotoxicité que tu m'as transmises avec passion et pour l'enthousiasme inébranlable dont tu as fait preuve tout au long de ces 3 ans. Olivier, merci de m'avoir appris tant de chose sur ce petit crustacé qu'est le gammare et surtout de m'avoir permis de goûter aux joies du terrain et de réaliser toutes ces campagnes qui resteront pour moi des moments inoubliables. Vos nombreux conseils et votre soutien quotidien m'ont évité bien des écueils et, je pense, m'ont apporté une certaine maturité.

Je suis très honorée que Madame Paule Vasseur, Professeur à l'Université de Metz ait accepté la présidence du jury de cette thèse. J'exprime ma profonde reconnaissance à Messieurs Laurent Lagadic, Directeur de recherche à l'INRA et Awadhesh Jha, Professeur à l'Université de Plymouth qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail et à Madame Almut Gerhardt qui a pris de son temps pour participer à ce jury. La discussion avec les membres du jury a été pour moi particulièrement intéressante et riche d'enseignements.

Au cours de cette thèse, un comité de pilotage a été réuni. Je tiens tout d'abord à remercier Sylvie Bony pour ses conseils, son aide précieuse lors de la rédaction des publications, sa gentillesse et son chocolat. Merci à Mireille Charmantier pour m'avoir fait profiter de ses connaissances et de sa riche bibliographie concernant la gamétogenèse et la reproduction des crustacés. Enfin, je tiens à remercier Jeanne Garric, Arnaud Chaumot, Natalie Mondy et Françoise Vincent qui ont également enrichi ce comité.

Grâce à Bernard Clément, Jean-Philippe Bedell et Laurence Volatier, j'ai pu me confronter à la difficile tâche de l'enseignement. Je vous remercie chaleureusement de m'avoir fait confiance pour mener à bien cette tâche. Merci également à Vanessa Cusimano, du Cluster Environnement de m'avoir fait participer à la fête de la science. Je tiens également à remercier Sandrine Charles, Maître de conférence à l'Université Lyon 1 de m'avoir permis de présenter mon travail au SEMOVI (merci aussi pour les encouragements).

J'ai eu la chance d'avoir accès aux canaux artificiels de l'INRA à Thonon-les-Bains pour réaliser des encagements de gammares grâce à Agnès Bouchez. Ces expériences ont fourni des résultats très prometteurs. Je remercie aussi Christian Gillet pour son aide lors de ces expériences.

Je souhaite également remercier Magalie Baudrimont et Agnès Feurtet-Mazel, Maitres de conférence à l'Université de Bordeaux de m'avoir donné l'occasion de faire de très belles expériences sur le Lot dans le cadre de l'ANR Resyst. Je salue également toutes les personnes rencontrées à cette occasion, et plus particulièrement Véronique Duflo et Adeline Arini du laboratoire EPOC de l'Université de Bordeaux avec qui j'ai partagé de très bons repas dans l'Aveyron.

De nombreuses personnes ont également contribué à la réalisation de ce travail. Sans Isabelle Gaillard, je serai peut être encore un peu sauvage ! Merci pour les fous rires, les coups de main, les coups de pied (salvateurs) et les coups à boire ! Monsieur Mons, merci de m'avoir toujours et en toutes situations supporté, aidé, fait rigoler, encouragé et géré tant de fois sur le terrain. Je ne verrai plus Decazeville de la même façon, mais à travers l'œil du gardon frais ! Un grand merci également à Khedidja Abbaci de m'avoir initié avec patience à l'histologie, et à mes deux stagiaires Maude et Delphine pour le travail que vous avez réalisé avec application et efficacité.

L'entourage de tous les membres des deux laboratoires a été un réel plaisir. J'adresse toute ma sympathie et toutes mes amitiés à Marion, une vraie mère pour moi et un modèle d'efficacité face à la tentaculaire administration, à Benoit, qui a ouvert la voie « gammare », aux « collègues » de bureaux (LSE et Cemagref) Cyrielle, Muriel, Hélène, Aude et Raphaël, à Xavier et à Guillaume parce qu'ils écoutent du « bon son » pendant les manipulations et à Romain et Hervé pour la livraison de gammares mensuels. Enfin, je n'oublierai pas les compères qui ont affronté la petite Sibérie, Docteur Adam (et sa mie), Jean-Phi (et sa mie aussi), Claire et Renaud. Et merci aussi à toutes les personnes des deux laboratoires qui ont partagé avec bonne humeur et sympathie un café, un gâteau ou un barbecue pendant les pauses, avec une mention spéciale pour Laurence, Zaza et Lydie qui ont souvent partagé plus qu'un café !

Enfin, mille mercis à toute ma famille pour son soutien et son amour. Merci à Mamé, d'avoir fourni les montagnes de confitures pendant toutes ces années, à mon père, qui m'a appris l'art de se coucher tard (« un café, et au lit »), à ma mère qui sait me faire déculpabiliser quand je prends du bon temps, à Yan pour la baraque et tous les coups de fils que tu m'as passés pendant ces 3 ans (ah, on me fait signe que non !), à Stef de m'avoir cultivée et habillée, sans oublier Nicolas et Camille. Et merci aussi aux « Schmitt », pour les bonnes tables, les bons vins et la bonne humeur ! Les copains de Tarbes, de Limoges, de Lyon et les autres qui se sont éparpillés en France et dans le monde, je vous remercie quand même aussi, et j'aime beaucoup passer du temps avec vous et voudrais en passer plus encore. Merci à toi Thomas, je n'écris pas pour quoi, je vais encore pleurer !

Table des matières

Remerciements.....	4
Liste des abréviations.....	10
Liste des figures et des tableaux.....	12
Liste des publications et communications.....	24
Introduction.....	30
1. Synthèse bibliographique et état de l'art.....	36
1.1. Les biomarqueurs pour l'évaluation de la qualité biologique des hydrosystèmes.....	38
1.1.1. Le rôle des biomarqueurs dans l'évaluation environnementale.....	38
1.1.1.1. L'évaluation de la qualité biologique du milieu aquatique.....	38
1.1.1.2. Définition des biomarqueurs.....	39
1.1.1.3. Utilisation des biomarqueurs dans l'évaluation du risque environnemental.....	40
1.1.2. Développement d'un biomarqueur.....	44
1.1.2.1. Définition de l'espèce sentinelle.....	44
1.1.2.2. Critères de sélection de l'espèce sentinelle.....	45
1.1.2.3. Exemple de l'approche multispécifique.....	47
1.1.2.4. Critères définissant un protocole de référence.....	47
1.1.3. Validation d'un biomarqueur.....	53
1.1.3.1. Influence des facteurs environnementaux et variabilité naturelle.....	53
1.1.3.2. Etablissement d'une référence.....	54
1.1.4. Signification d'un biomarqueur.....	56
1.1.4.1. Corrélation entre plusieurs niveaux d'organisation biologique.....	57
1.1.4.2. Pertinence écologique du biomarqueur.....	59
1.2. La génotoxicité : sources, conséquences et évaluation.....	62
1.2.1. Dommages et sources de génotoxiques.....	62
1.2.2. Les outils d'évaluation de la génotoxicité dans le milieu aquatique.....	67
1.2.3. Le test Comet	78
1.2.3.1. Historique.....	78
1.2.3.2. Avantages et inconvénients	79
1.2.3.3. Protocole.....	80
1.2.3.4. Nature des dommages.....	82

1.2.3.5.Applications du test Comet.....	84
1.2.4.Interprétation des réponses à un stress génotoxique en terme d'effet biologique.....	95
1.3.Modèle biologique : Gammarus fossarum.....	101
1.3.1.Ecologie.....	101
1.3.2.Morphologie et identification de l'espèce	103
1.3.3.Anatomie et biologie	107
1.3.3.1.Circulation hémolympatique.....	108
1.3.3.2.Reproduction.....	109
1.3.3.3.Appareils reproducteurs, ovogenèse et spermatogenèse.....	112
1.3.4.Utilisation des gammares en écotoxicologie et pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques.....	116
1.4.Objectifs.....	124
2. Matériels et méthodes.....	128
2.1.Sites de prélèvement et d'encagement.....	130
2.1.1.Sites de prélèvement dans le milieu naturel.....	130
2.1.1.1.Site de prélèvement pour la stabulation des organismes au laboratoire.....	130
2.1.1.2.Sites de prélèvement pour le suivi du niveau de base des dommages à l'ADN : les Ardillats et La Tour du Pin.....	131
2.1.2.Sites d'encagement.....	132
2.1.2.1.Rejets de stations d'épuration.....	132
2.1.2.2.Le Lot à Decazeville.....	134
2.2.Matériel biologique.....	135
2.2.1.Technique de prélèvement des gammares.....	135
2.2.2.Stabulation au laboratoire.....	136
2.2.3.Dissection des organismes.....	137
2.2.4.Caractérisation des stades de reproduction.....	140
2.2.4.1.Ovogenèse.....	140
2.2.4.2.Spermatogenèse.....	140
2.3.Caractéristiques des expositions au laboratoire.....	142
2.3.1.Exposition en continu.....	143
2.3.2.Exposition en conditions semi-statiques.....	144
2.3.2.1.Dispositif expérimental.....	144

2.3.2.2. Contaminants utilisés au laboratoire.....	145
2.4. Caractéristiques des expositions in situ.....	147
2.4.1. Méthodes d'encagement.....	148
2.4.2. Mesures physico-chimiques.....	150
2.4.3. Exposition en canaux expérimentaux.....	151
2.5. Expérimentations mises en œuvre pour répondre aux objectifs de la thèse.....	152
2.5.1. Développement du biomarqueur.....	152
2.5.1.1. Viabilité cellulaire.....	153
2.5.1.2. Protocole du test Comet.....	155
2.5.2. Signification et interprétation du biomarqueur en terme d'effet.....	165
2.5.3. Validation du biomarqueur : variabilité naturelle et niveau de base.....	169
2.5.4. Application du biomarqueur au milieu naturel.....	171
3. Développement et signification du biomarqueur.....	175
3.1. Développement d'un biomarqueur de génotoxicité chez le gammare <i>G. fossarum</i>	177
3.1.1. Publication 1 : Genotoxicity assessment in the amphipod <i>Gammarus fossarum</i> by the use of the alkaline Comet assay.....	177
3.1.2. Note 1 : Optimisation du protocole du test Comet pour la lecture des dommages à l'ADN sur spermatozoïdes de <i>G. fossarum</i>	186
3.2. Signification fonctionnelle du biomarqueur de génotoxicité : lien avec la reproduction.....	194
3.2.1. Publication 2 : Linking genotoxic responses in <i>Gammarus fossarum</i> germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay.....	194
4. Validation et application du biomarqueur.....	223
4.1. Validation du biomarqueur : variabilité naturelle et niveau de base.....	225
4.1.1. Note 2 : Description de la spermatogenèse chez <i>G. fossarum</i>	225
4.1.2. Publication 3 : How to avoid the misinterpretation of DNA damage in <i>Gammarus fossarum</i> sperm as a biomarker of genotoxic pressure: intrinsic variability and reference level.....	235
4.2. Application du biomarqueur au milieu naturel.....	259
4.2.1. Note 3 : Evaluation du risque génotoxique de pesticides viticoles sur l'amphipode d'eau douce <i>G. fossarum</i> : étude en mésocosme.....	259

4.2.2.Publication 4 : DNA damage in caged amphipods <i>Gammarus fossarum</i> : a tool for freshwater quality assessment	269
5. Synthèse et discussion générale.....	297
5.1.Développement d'un biomarqueur de génotoxicité : le test Comet appliqué à trois types cellulaires de gammare.....	300
5.1.1.Choix du modèle biologique.....	300
5.1.2.Choix des types cellulaires étudiés.....	300
5.1.3.Choix du test d'évaluation de la génotoxicité : le test Comet.....	301
5.1.4.Choix du type cellulaire le plus sensible.....	302
5.1.5.Conclusion.....	305
5.2.Validation d'un protocole standard : variabilité naturelle et niveau de base du biomarqueur.....	305
5.2.1.Choix de l'état de maturation du gammare et d'un protocole standard : influence des facteurs biotiques et méthodologiques.....	306
5.2.2.Variabilité naturelle de la réponse du biomarqueur et établissement d'un niveau de référence.....	309
5.2.2.1.Influence de facteurs abiotiques sur la variabilité de la réponse	310
5.2.2.2.Établissement d'un niveau de base.....	311
5.2.3.Conclusion.....	312
5.3.Signification de la réponse du biomarqueur : lien entre dommages à l'ADN des spermatozoïdes et effet sur la reproduction.....	313
5.3.1.Interprétation de la réponse du biomarqueur en terme d'effet sur la reproduction : expérimentations au laboratoire.....	313
5.3.2.Interprétation de la réponse du biomarqueur en terme d'effet sur la reproduction : expérimentations en mésocosme et sur le terrain.....	316
5.3.3.Conclusion.....	318
5.4.Application du biomarqueur de génotoxicité au milieu naturel : vers un biomarqueur à vocation écologique.....	319
Conclusion générale.....	325
Références.....	331
ANNEXE I.....	369
ANNEXE II.....	373

Liste des abréviations

4-NQO : 4-nitroquinoline 1-oxyde

AChE : Acétylcholinestérase

ADN : Acide desoxyribo Nucléique

Agence de l'eau RMC : Agence de l'eau Rhône-Méditerranée et Corse

AMPA : Acide aminométhylphosphonique

BaP : Benzo[a]pyrène

BER: Base Excision Repair

BET : Bromure d'Ethidium

Cd : Cadmium

DCE : Directive Cadre Européenne sur l'eau

DMSO : Dimethylsulfoxyde

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique

IBGN : Indice Biologique Global Normalisé

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

K₂Cr₂O₇ : Dichromate de potassium

MMS : Methyl methane sulfonate

NER: Nucleotide Excision Repair

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCB : Polychloro-Biphényles

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SDAGE : Schéma directeur d'aménagement et de gestion des eaux

STEP : Station d'épuration des eaux usées

TCS: Total Comet Score

TM: Tail Moment

UV : Rayons Ultra-Violet

WWTP : Waste water treatment plant

Zn : Zinc

Liste des figures et des tableaux

CHAPITRE I

FIGURE

Figure I-1 : Applications possibles des biomarqueurs au laboratoire (Jemec et al., 2010). **p.41**

Figure I-2 : Applications possibles des biomarqueurs dans le milieu naturel (Jemec et al., 2010) **p.42**

Figure I-3 : Place des biomarqueurs dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental : acquisition, interprétation et devenir des données (adapté de Galloway et al., 2004 et Picado et al., 2007). **p.43**

Figure I-4 : Développement d'un biomarqueur : établissement d'un protocole de référence tenant compte des principaux facteurs de variabilité (d'après Jemec et al., 2010). **p.48**

Figure I-5 : Relations entre les différents niveaux d'organisation biologique : pertinence écologique, échelle spatio-temporelle et spécificité intrinsèque (d'après Lagadic et al., 1997 ; Clements, 2000). **p.57**

Figure I-6 : Etapes du développement d'un biomarqueur dans l'évaluation de l'état écologique du milieu aquatique (d'après Lagadic et al., 1997 ; Caquet et al., 2000 ; Amiard et Amiard-Triquet, 2008). **p.61**

Figure I-7 : Principaux types de dommages à l'ADN causés par des agents exogènes ou endogènes, ainsi que les potentiels processus de réparation (d'après Houtgraaf et al., 2006). **p.65**

Figure I-8 : Tests utilisés pour évaluer la mutagénicité et la génotoxicité de l'eau de surface. Pourcentage calculé sur 128 publications scientifiques parues depuis 1990 (Ohe et al., 2004). **p.68**

Figure I-9 : Exemple d'observations de noyaux de cellules non endommagés (A) et endommagés (B). Exposition in vitro d'hémolymphe de *G. fossarum* au PBS (A) et à 10 mM de MMS (B). **p.79**

Figure I-10 : Illustration des étapes du protocole du test Comet en conditions alcalines. **p.81**

Figure I-11 : Le logiciel Comet Assay IVTM de Perceptive Instruments calcule des paramètres de mesure des dommages à l'ADN basés sur l'intensité de fluorescence des brins et leur dispersion. **p.82**

Figure I-12 : Utilisation de l'essai comète pour différents modèles, de la bactérie à l'homme (d'après Dhawan et al., 2009). **p.84**

Figure I-13 : Représentation schématique des conséquences de l'exposition à un xénobiotique (d'après Frelon, 2001). **p.96**

Figure I-14 : Principaux processus reliant les effets des contaminants depuis le niveau moléculaire jusqu'au niveau populationnel au travers du succès de la reproduction (Amiard-Triquet et Amiard, 2008). **p.98**

Figure I-15 : Aire de répartition géographique de *Gammarus fossarum* (Barnard et Barnard, 1983). **p.102**

Figure I-16 : Vue latérale d'un Gammaridae (adaptée d'après Roux, 1970 ; Chevreux et Fage, 1970). pc 1-7 : plaques coxales 1-7 ; Pe 1-7 : périomères 1-7 ; Pl 1-3 : pléomères 1-3 ; Ur 1-3 : uromères 1-3. **p.104**

Figure I-17 : Détermination de *G. fossarum* (d'après Felten, 2003). **p.106**

Figure I-18 : Uropode 3 de *Gammarus fossarum* (A) et de *Gammarus pulex* (B) (photos : Hervé Quéau/Cemagref Lyon). **p.107**

Figure I-19 : Coupe longitudinale de gammare illustrant les principaux organes (Schmitz, 1992). **p.108**

Figure I-20 : *Gammarus fossarum* mâle et femelle en précopula (photo : Hervé Quéau). **p.110**

Figure I-21 : Caractérisation du cycle de mue chez la femelle *G.fossarum* (Geffard et al., 2010). **p.111**

Figure I-22 : Stades embryonnaires corrélés aux stades de mues de la femelle *G.fossarum* (Xuereb, 2009). **p.111**

Figure I-23 : Femelle *G. fossarum* après exuviation et ponte des ovocytes secondaires dans le marsupium (photo : Hervé Quéau). **p.111**

Figure I-24 : *Gammarus fossarum* mâle et femelle, appareils génitaux des amphipodes en coupe longitudinale, spermatozoïde et coupe transversale d'ovaire (d'après Charniaux-Cotton, 1965 et Reger et al., 1979). **p.115**

TABLEAU

Tableau I-1 : Classification du pouvoir mutagène de quelques effluents industriels (magnitude de 10 entre les réponses génotoxiques) (Houk, 1992). **p.66**

Tableau I-2 : Principaux invertébrés aquatiques sur lesquels a été appliquée la méthode de post-marquage au ³²P pour l'étude des adduits à l'ADN. **p.67**

Tableau I-3 : Principaux invertébrés aquatiques sur lesquels ont été appliquées des méthodes d'études cytogénétiques et des micronoyaux. **p.71**

Tableau I-4 : Principaux invertébrés aquatiques sur lesquels ont été appliquées différentes techniques de mesure des cassures simple et double brin de l'ADN. **p.74**

Tableau I-5 : Principaux invertébrés aquatiques sur lesquels a été appliquée la mesure de bases oxydées de l'ADN par l'évaluation du taux de 8-oxodGuo (d'après Vasseur et al., 2008 et Lemièrre, 2004). **p.76**

Tableau I-6 : Application du test Comet chez les invertébrés marins : types cellulaires, paramètres d'observation et niveaux de base (la définition de chacun des paramètres de mesure est définie à la fin des tableaux I-7 et I-8). **p.88**

Tableau I-7 : Application du test Comet chez les invertébrés dulçaquicoles : types cellulaires, paramètres d'observation et niveaux de base. **p.92**

Tableau I-8 : Systématique de *G.fossarum* (Martin et Davis, 2001). **p.101**

Tableau I-9 : Utilisation de *G. pulex* et *G. fossarum* en écotoxicologie aquatique (complétée par quelques tests sur *Gammarus* spp). **p.118**

CHAPITRE II

FIGURE

Figure II-1: Localisation géographique du site de La Tour du Pin. **p.130**

Figure II-2 : Débit mensuel moyen en m³/s de la Bourbre à Bourgoin Jallieu de Novembre 2007 à Août 2010 (Données Banque Hydro). **p.131**

Figure II-3 : Localisation des sites d'encagement dans un contexte amont-aval de rejet de stations d'épuration et occupation du sol. **p.133**

Figure II-4 : Localisation des sites d'encagement le long d'un gradient de contamination métallique dans le bassin versant du Riou Mort (Aveyron, France). **p.134**

Figure II-5 : Prélèvement d'organismes au troubleau et tri des gammares sur colonne de tamis. **p.135**

Figure II-6 : Système de stabulation des gammares au laboratoire. **p.136**

Figure II-7 : Etapes de dissection pour la récupération des spermatozoïdes de gammares. (A) découpe du céphalon, extraction des caecums et du tube digestif, (B) découpe de la cuticule ventrale et dorsale, (C) récupération des gonades. **p.138**

Figure II-8 : Gouttelette d'hémolymphe de *G.fossarum* collectée entre le prosoma et le mesosoma. **p.138**

Figure II-9 : Récupération des ovocytes en vitellogénèse secondaire pour la préparation de la suspension cellulaire utilisée pour l'essai Comet. **p.139**

Figure II-10 : Dispositif expérimental semi-statique. **p.145**

Figure II-11 : Chambre d'encagement en polypropylène. **p.148**

Figure II-12 : Caisses d'encagement. **p.151**

Figure II-13 : Systèmes d'encagement dans une rivière installés depuis la berge. **p.151**

Figure II-14 : Systèmes d'encagement dans une rivière installés depuis un barrage. **p.151**

Figure II-15 : Description des canaux expérimentaux lotiques (photo et schéma). **p.154**

Figure II-16 : Pourcentage de viabilité des spermatozoïdes exposés à une gamme croissante d'éthanol mesuré par le test Baclight. * significativement différent du témoin. **p.156**

Figure II-17 : Photographie d'embryons de *G.fossarum* après 21 jours de développement à 12°C (stade 3). **p.163**

Figure II-18 : Photographie sous loupe binoculaire d'embryons de *G.fossarum* présentant divers types d'anomalies après 21 jours de développement à 12°C (stade 3). **p.164**

TABLEAU

Tableau II-1 : Principales caractéristiques hydrauliques et physico-chimiques des deux stations de référence étudiées. **p.132**

Tableau II-2 : Informations générales pour les stations d'épuration de Beaujeu, Bourgoin et Fontaine. **p.133**

Tableau II-3 : Description des cinq sites d'encagement sur le bassin versant du Riou Mort. **p.134**

Tableau II-4 : Tableau synthétique de la procédure de dissection. **p.139**

Tableau II-5 : Conditions expérimentales pour le suivi de la spermatogenèse. **p.141**

Tableau II-6 : Tableau synthétique du protocole des test de viabilité cellulaire. **p.154**

Tableau II-7 : Composition de la solution de lyse pour le test Comet. **p.156**

Tableau II-8 : Développement du biomarqueur : expérimentations en laboratoire. **p.159**

Tableau II-9 : Signification du biomarqueur : expérimentations au laboratoire et au terrain. **p.163**

Tableau II-10 : Validation du biomarqueur : expérimentations au laboratoire et au terrain. **p.165**

Tableau II-11 : Application du biomarqueur : expérimentations en mésocosme et sur le terrain. **p.167**

CHAPITRE III

PUBLICATION 1

Table 1: DNA damage induction factor in haemocytes, oocytes and spermatozoa after MMS exposure. **p.177**

Table 2: Percentage of gammarid survival after 5 days exposure to a range concentration of paraquat, AMPA, $K_2Cr_2O_7$, cadmium chloride, BaP. Concentrations chosen to further assess genotoxicity appeared in grey. These concentrations correspond to the highest ones allowing a minimum survival of 93 %. **p.177**

Figure 1: DNA damage as detected by the comet assay in *Gammarus fossarum* spermatozoa, oocytes and haemocytes exposed in vitro for 1 hour to MMS. **p.177**

Figure 2: Comparing the response of haemocytes, oocytes and spermatozoa to *in vitro* MMS exposure for 1 hour at 4°C. Each block is the mean % tail DNA from three replicates \pm standard error (error bars). (*) Significantly different from control. **p.177**

Figure 3: Levels of DNA damage in haemocytes, oocytes and spermatozoa from gammarids exposed for 5 days to MMS. Each block is the mean % tail DNA from three replicates \pm standard error (error bars). (*) Significantly different from control. **p.177**

Figure 4: Levels of DNA damage in spermatozoa from exposed gammarids (5 days of exposure to cadmium, paraquat, AMPA, $K_2Cr_2O_7$ and BaP) measured by the comet assay. Each block is the mean of tail DNA % from three replicates \pm standard error. (*) Significantly different from control. **p.178**

NOTE 1

Figure 1 : Influence du temps de lyse sur les niveaux de dommages à l'ADN dans les spermatozoïdes de *G. fossarum* exposés in vitro pendant 1 heure à 10 mM de MMS. * différence significative entre les temps de lyse (test de Mann Whitney, $p < 0,05$). **p.186**

Figure 2 : Relation entre les paramètres % tail DNA et tail moment du test Comet, obtenus par le logiciel d'analyse d'images Comet IV. **p.187**

PUBLICATION 2

Figure 1: Localization of the investigated areas of caging in the Bourbre River and the Bion River, affluents of the Rhone River in the south east part of France. **p.211**

Figure 2: 21 days-old embryos developed in non contaminated water at 12°C. **p.212**

Figure 3: Chart illustrating the experimental design adopted in this study to evaluate the genotoxic effects on *Gammarus fossarum* germ cells of MMS, $K_2Cr_2O_7$ and in situ genotoxic pressure of a WWTP effluent and the consequences of this parental exposure on the offspring. **p.213**

Figure 4: Comparing the response of oocytes and spermatozoa to *in vivo* MMS exposure (A) and $K_2Cr_2O_7$ exposure (B) for 5 days at 12°C. Each block is the mean % tail DNA from five replicates \pm standard error (error bars). (*) Significantly different from control. **p.213**

Figure 5: Levels of DNA damage in *Gammarus fossarum* oocytes and spermatozoa after 15 days of caging in the Upstream Bourbre River (a), the Bion River (b), the Confluence (c) and Downstream Bourbre River (d), N=5, (*) Significant difference in DNA damage compared with organisms caged et the upstream Bourbre River station. **p.214**

Figure 6: Four days recovery experiment after exposure to a range concentration of MMS during 5 days A) in spermatozoa and B) in oocytes. (*) Significant difference in % tail DNA compared with the day 0. **p.214**

Figure 7: Four days recovery experiment after exposure to a range concentration of $K_2Cr_2O_7$ during 5 days A) in spermatozoa and B) in oocytes. **p.214**

Figure 8: Effects of adult exposure on embryonic development measured after 21 days in non contaminated water (12°C). Data as percentage of abnormalities per female \pm SEM. N=10. A) MMS exposure. B) $K_2Cr_2O_7$ exposure and C) *in situ* experiment. (*) significantly different from control condition ($p<0.05$). (**) and (***) highly and very highly significantly different ($p<0.005$ and $p<0.0005$ respectively). **p.215**

Figure 9: Linking DNA damage in spermatozoa of *Gammarus fossarum* with the resulting percentage of abnormal development observed in 21 days-old embryos after MMS (A) and $K_2Cr_2O_7$ (B) exposure. The grey triangle corresponds to the recalculated percentage of abnormalities based on the number of control embryos. **p.215**

Table 1: Mean number of embryos per female \pm SEM (N=10) after MMS exposure, $K_2Cr_2O_7$ exposure and *in situ* experiment. (*) significantly different from control condition ($p<0.05$). **p.211**

CHAPITRE IV

NOTE 2

Figure 1 : Micrographies de spermatide (A) et de spermatozoïde (B) en microscopie électronique à balayage utilisé en mode wet-STEM (x 2022). **p.224**

Figure 2 : Nombre de spermatozoïdes et de spermatides contenu dans la gonade en fonction du nombre de jour après reproduction (J-1 : mâles en précopula). N=10. **p.225**

Figure 3 : R = rapport entre le nombre de spermatozoïdes par gonade et le nombre de cellules pseudo-flagellées (spermatozoïdes + spermatides) en fonction du nombre de jours post reproduction. **p.226**

Figure 4 : Coupe histologique longitudinale de gammare mâle, juste après la reproduction : gonade entière (x 50). **p.227**

Figure 5 : Coupe histologique longitudinale de gammare mâle, 7 jours après la reproduction : vésicule séminale (x 200) et détail (x1000). **p.227**

Figure 6 : Coupe histologique transversale de gammare mâle, 7 jours après la reproduction : papilles génitales, canal déférent (x 50) et détail des papilles génitales (x 200). **p.228**

PUBLICATION 3

Figure 1: Percentage of tail DNA in spermatozoa from male gammarids exposed for 7 days to MMS before spermatogenesis (a) and at the end of spermatogenesis (b). Data are reported as mean \pm standard deviation ($n=6$). **p.250**

Figure 2: Kinetic study of % tail DNA in spermatozoa from mature male gammarids after MMS exposure. Data are reported as mean \pm standard deviation ($n=6$). **p.250**

Figure 3: Monthly variations of DNA damage (% tail DNA) measured in male *G. fossarum* in precopula collected from January 2009 to December 2010 in the upstream part of the Ardière River and the Bourbre River. Data reported are mean \pm standard deviation ($n=15$). Continuous line represents the annual mean of DNA damage values obtained for both rivers (3.1% tail DNA) excluding the value measured in July at the Bourbre river site and dotted lines, the 95% confidence intervals (2.6–3.5% tail DNA). * Significantly different from annual mean of DNA damage. **p.251**

Figure 4: Percentage of tail DNA measured in mature spermatozoa from male *G. fossarum* kept 1 and 15 days at four different temperatures: 6, 12, 18 and 24°C (conductivity = 600 $\mu\text{S cm}^{-1}$) (A), and at two different conductivities: 300 and 600 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (temperature=12°C) (B). Data are reported as mean \pm standard deviation ($n=6$). **p.251**

Table 1: Physicochemical water characteristics (temperature, pH, conductivity, Ca^{2+} and HCO_3^-) measured at each sampling time and the monthly flow rate of the studied sites. A: Ardière River and B: Bourbre River. (- : not measured). **p.252**

NOTE 3

Figure 1 : Dommages à l'ADN dans les hémocytes, les ovocytes et les spermatozoïdes de *G.fossarum* encagés 15 jours dans des canaux témoins et soumis à un mélange diuron-tébuconazole. * différence significative entre les conditions « Témoin » et « Diuron » (test de Mann Whitney, $p < 0,05$). **p.258**

Figure 2 : Effet de l'exposition des femelles pendant 15 jours au mélange diuron-tébuconazole sur le cycle de reproduction suivant (i.e. 21 jours en milieu non contaminé à 12°C). Evaluation de la fertilité (nombre moyen d'ovocytes par femelle \pm SEM, N=10) (A) et stade de mue des femelles (B). **p.259**

Figure 3 : Effets de l'exposition des adultes sur le développement embryonnaire observé après 21 jours de développement en milieu non contaminé à 12°C. Dénombrement des embryons par femelle (N=10) (A) et pourcentage moyen d'anomalies par condition \pm SEM (N=10) (B). **p.260**

PUBLICATION 4

Figure 1: Location of the Lot River and the five caging sites along a polymetallic contamination gradient. Metal discharge originates from a zinc ore treatment factory. The red star represents the smelting facility, the grey circles, the smelting waste storage areas, the white circle, the town of Decazeville and the black arrows the caging sites. **p.287**

Figure 2: DNA damage in haemocytes, oocytes and spermatozoa from gammarids caged upstream, in the vicinity and downstream a WWTP effluent output in the Ardière River (A), the Bourbre River (B) and the Saône River (C). Each block is the mean % tail DNA from five replicates \pm standard error (error bars). * Significantly different from upstream site value ($p < 0.05$). **p.287**

Figure 3: Metal bioaccumulation of Zn (A) and Cd (B) in gammarids at the five studied sites after 7 days of exposure and 2 weeks in June during 2009 and 2010. **p.288**

Figure 4: DNA damage in spermatozoa from gammarids caged at five sites surrounding the Lot River after 7 days of exposure and 2 weeks in June 2009 and 2010. Each mark is the mean % tail DNA from five replicates \pm standard error (error bars). * significantly different from upstream site value ($p < 0.05$). **p.289**

Figure 5: Variation of DNA damage level measured in male *G. fossarum* caged at upstream sites of the Ardière, Bourbre and Saône Rivers and of the Lot River. Data are reported as mean \pm standard deviation ($n=5$). The continuous line represents the mean DNA damage and dotted lines represent the 95% confidence interval (2.7–3.6%). **p.290**

Table 1: Ardière, Bourbre and Saône Rivers: mean physico-chemical parameters and watershed characteristics. **p.285**

Table 2: Survival rate in caged gammarids upstream and downstream from WWTP effluent output after 7 days and 15 days of exposure (mean value \pm standard error). **p.285**

Table 3: Survival rate in caged adult male gammarids in five sites surrounding the Lot River along a polymetallic contamination gradient after 7 days of exposure (mean value \pm standard error). – lost cage due to overflow. **p.285**

Table 4: Mean physico-chemical characteristics from February 2009 to June 2010 measured at five sites located on the Lot River and its tributaries along a polymetallic pollution gradient (- not measured). **p.286**

CHAPITRE V

FIGURE

Figure V-1 : Dommages à l'ADN, exprimés en % tail DNA, dans les hémocytes, les ovocytes et les spermatozoïdes de *G.fossarum* encagés sur (A) l'Ardière (B) la Bourbre et (C) la Saône. * significativement différent de l'amont. **p.298**

Figure V-2 : Dommages à l'ADN des spermatozoïdes de *G.fossarum* exposés au MMS, au cours de la spermatogenèse et en précopula (matures) (significativement différent du témoin pour $p<0,05$). **p.302**

Figure V-3 : Suivi mensuel des dommages à l'ADN sur spermatozoïdes de *G. fossarum* prélevés dans deux sites de référence (N=15). La ligne orange représente la moyenne annuelle calculée à partir des résultats des deux sites, hormis la valeur de juillet sur la Bourbre. * significativement différent de la valeur moyenne. **p.306**

Figure V-4 : Lien entre dommages à l'ADN des spermatozoïdes et le pourcentage d'anomalies sur les embryons issus de parents exposés au MMS (A) et au K₂Cr₂O₇ (B). **p.309**

Figure V-5 : Niveau de dommages à l'ADN après 5 jours d'exposition au MMS (Jour 0), suivis de 2 jours et 4 jours de récupération en milieu non contaminé (Jour 2 et Jour 4) dans les spermatozoïdes (A) et les ovocytes (B). (*) significativement différent du Jour 0. **p.310**

Figure V-6 : Niveau de dommages à l'ADN après 5 jours d'exposition au K₂Cr₂O₇ (Jour 0), suivis de 2 jours et 4 jours de récupération en milieu non contaminé (Jour 2 et Jour 4) dans les spermatozoïdes (A) et les ovocytes (B). * significativement différent du Jour 0. **p.310**

Figure V-7 : (A) Dommages à l'ADN des spermatozoïdes et des ovocytes après exposition à un mélange diuron-tébuconazole et (B) pourcentage d'anomalies des embryons issus de parents exposés à ces pesticides. * significativement différent du témoin. **p.312**

Figure V-8 : (A) Dommages à l'ADN des spermatozoïdes et des ovocytes après exposition in situ sur 4 sites de la Bourbre, dont le rejet de STEP (station c) et (B) pourcentage d'anomalies des embryons issus de parents exposés à ces sites. * significativement différent de la station amont a. **p. 312**

Figure V-9 : Dommages à l'ADN de spermatozoïdes de gammares après 5 jours d'exposition (exprimés en % tail intensity). * significativement différent du témoin. **p.315**

Figure V-10 : Dommages à l'ADN des spermatozoïdes de gammares engagés sur les sites amonts de la Saône, de l'Ardière, de la Bourbre, et du Lot. La droite orange représente la valeur de référence, les lignes pointillées, l'intervalle de confiance à 95%. **p.316**

TABLEAU

Tableau V-1 : Niveau d'endommagement de l'ADN dans les témoins au laboratoire ou obtenus après engagement sur les sites amont (% tail DNA). **p.298**

Tableau V-2 : Facteurs d'induction (% tail DNA obtenus pour la plus forte concentration en MMS et au niveau du rejet de STEP / % tail DNA dans les témoins ou sites amont). **p.299**

Tableau V-3 : Niveaux de base dans les conditions témoins et aux sites amont en fonction du temps d'exposition (% tail DNA). **p.303**

Tableau V-4 : Niveaux de base dans les conditions témoins et aux sites amont en fonction du temps d'exposition (% tail DNA). **p.307**

CONCLUSION

Figure i : Développement d'un biomarqueur de génotoxicité chez le gammare *Gammarus fossarum* : objectifs, résultats et perspectives. **p.321**

Liste des publications et communications

PUBLICATIONS

Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutation Research* 700 (2010) 32-38

Emilie Lacaze, Olivier Geffard, Sylvie Bony, Alain Devaux

Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay Soumise à *Environmental Research* (en révision)

Emilie Lacaze, Olivier Geffard, Delphine Goyet, Sylvie Bony, Alain Devaux

DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: a tool for freshwater quality assessment Soumise à *Environmental Pollution* (en révision)

Emilie Lacaze, Alain Devaux, Raphaël Mons, Sylvie Bony, Jeanne Garric, Alain Geffard, Olivier Geffard

How to avoid the misinterpretation of Comet assay in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic impact: intrinsic variability and reference level ? Soumise à *Science of the total Environment*

Emilie Lacaze, Alain Devaux, Guillaume Jubeaux, Raphaël Mons, Hervé Quéau, Maud gardette, Sylvie Bony, Jeanne Garric, Olivier Geffard

POSTERS

Colloques nationaux

- *Séminaire de l'école doctorale RP2E janvier 2009*, prix du meilleur poster

- *Colloque du Cluster Environnement de la région Rhône-Alpes* (13 mai 2008)

Développement et validation d'un biomarqueur de génotoxicité chez le gammare (*Gammarus fossarum*) - 1^{er} prix

- Colloque du Cluster environnement Rhône Alpes (11 mai 2009)

L'essai des comètes chez le gammare (*Gammarus fossarum*) : un outil de surveillance pertinent dans un contexte de contamination environnementale ?

- ADEBIOTECH eau et polluants émergents : apport des biotechnologies à l'analyse des polluants émergents, Romainville-France (20 au 22 octobre 2009)

Comet assay in caged *Gammarus fossarum* as a tool for genotoxic exposure and effect diagnosis.
Emilie Lacaze, Alain Devaux, Jeanne Garric, Raphaël Mons, Sylvie Bony and Olivier Geffard

- SEFA, Versailles-France (31 mars au 1er avril 2010)

Bio-surveillance in situ de la qualité des eaux douces : approche multi-échelle chez *Gammarus fossarum*

Geffard O, Chaumot A, Xuereb B, **Lacaze E**, Geffard A, Quéau H, Mons R, Noury P, Bony S, Devaux A, Garric J

Colloques internationaux

- MODELKEY, Leipzig-Allemagne (30 novembre au 2 décembre 2009)

In situ bio-monitoring of water quality : multiscale effect assessment in *Gammarus fossarum*.

Geffard O, Chaumot A, Adam O, Xuereb B, **Lacaze E**, Geffard A, Quéau H, Mons R, Noury P, Devaux A, Bezin L, Garric J

- 14th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOXICITY ASSESSMENT, Metz-France (30 août au 4 septembre 2009)

Attempt to link paternal genotoxic exposure to reproductive impairment in fish.

Luc Fiat, Christian Gillet, Sylvie Bony, **Emilie Lacaze**, Alain Devaux (prix du meilleur poster)

- SETAC Europe-Annual meeting, Goteborg-Suède (31 mai au 4 juin 2009)

New genotoxic biomarker in *Gammarus fossarum* to study the link between germ cell DNA integrity and reproductive success.

Emilie Lacaze, Olivier Geffard, Jeanne Garric, Isabelle Gaillard, Sylvie Bony, Alain Devaux

- *SETAC Europe-Annual meeting*, Goteborg-Suède (31 mai au 4 juin 2009)

Comet assay in caged *Gammarus fossarum* as a tool for genotoxic exposure and effect diagnosis.

Emilie Lacaze , Alain Devaux, Jeanne Garric, Raphaël Mons, Sylvie Bony, Olivier Geffard

- *SETAC Europe Annual meeting*, Séville-Espagne (23 au 27 mai 2010)

DNA damage in germ cells and their reproductive consequences in the freshwater crustacean *Gammarus fossarum*

Emilie Lacaze, Delphine goyet ,Jeanne Garric, Sylvie Bony, Alain Devaux and Olivier Geffard

- *SETAC Europe Annual meeting*, Séville-Espagne (23 au 27 mai 2010)

How to avoid the misinterpretation of Comet assay in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic impact : intrinsic variability and reference level.

Emilie Lacaze, Alain Devaux and Olivier Geffard

COMMUNICATION ORALE

Colloques nationaux

- *Journées Environnement Santé (P6) du Cluster Environnement*, Lyon-France (4 et 5 mars 2010)

Développement d'un biomarqueur de génotoxicité chez le gammare : un outil de surveillance et un élément de pronostique du succès reproducteur ?

Emilie Lacaze, Olivier Geffard et Alain Devaux

Colloques internationaux

- *8th International Comet assay Workshop*, Perugia-Italie (27 au 30 août 2009)

Functional significance of genotoxicity in aquatic species germ cells

Alain Devaux, **Emilie Lacaze**, Luc Fiat, Christian Gillet, Olivier Geffard, Sylvie Bony

- 14th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOXICITY ASSESSMENT, Metz-France (30 août au 4 septembre 2009)

Comet assay as a reliable tool for genotoxic exposure and reproductive effect assessment in *Gammarus fossarum*.

Emilie Lacaze, Olivier Geffard, Jeanne Garric, Sylvie Bony, Alain Devaux

Colloques internationaux sans actes

- Séminaire de Modélisation du Vivant, Lyon-France (7 septembre 2010)

Aquatic ecosystems: tools for contaminant exposure assessment and effect diagnosis in ecotoxicological survey -The example of a genotoxicity biomarker.

Emilie Lacaze (conférencier invité)

Introduction

L'expansion de l'industrialisation, de l'urbanisation et des pratiques agricoles intensives entraîne d'une part des besoins en eau croissants, et est d'autre part la cause de l'augmentation des rejets de xénobiotiques dans les milieux aquatiques. Plus de 100000 molécules chimiques produites ou utilisées par les activités humaines sont ainsi retrouvées dans l'environnement (Depledge et Galloway, 2005). Les milieux aquatiques sont le réceptacle ultime de la majorité, voire de l'intégralité de ces contaminants. Leurs voies d'entrée sont nombreuses, que ce soit par les rejets domestiques, industriels, hospitaliers, le lessivage des sols agricoles et des zones urbaines, les retombées atmosphériques, les accidents industriels et le transport de produits chimiques ou pétroliers. Tous ces phénomènes sont la cause de la présence dans le milieu aquatique de composés aussi divers que les hydrocarbures, les pesticides, les métaux lourds et les rejets pharmaceutiques (Holt, 2000). La présence de tels contaminants a ainsi été montrée dans la plupart des grands fleuves à travers le monde, comme le Gange, le Mississippi, le Nil, le Yang-Tseu-Kiang, le Saint Laurent, et l'Europe, par exemple dans le Danube, le Rhin, le Rhône, l'Elbe et le Tage.

Parmi tous ces contaminants, un tiers d'entre eux sont avérés ou suspectés génotoxiques pour les organismes (Claxton et al., 1998 ; Ohe et al., 2004). Les composés génotoxiques sont des substances pouvant altérer l'intégrité de l'ADN, support biochimique de l'hérédité. Les dommages primaires à l'ADN peuvent être observés sous la forme de différentes lésions comme les cassures simple et double brins, les sites alcali-labiles, les pontages intra et inter-brins, les adduits. Les conséquences de l'exposition aux substances génotoxiques sont de plus en plus étudiées et comprises et plusieurs auteurs ont rapporté l'existence d'un lien direct avec leur pouvoir tumorigène chez l'homme et l'occurrence de malignité chez les organismes aquatiques (Gardner et al., 1991 ; Van Beneden, 1994 ; Baumann, 1998). Les effets néfastes des composés génotoxiques représentent un risque indéniable pour la santé humaine, mais également pour les écosystèmes, en participant à l'érosion de la diversité génétique globale intra et inter espèces, entraînant un risque potentiel pour la survie à long terme des populations naturelles (Würgler et Kramers, 1992 ; Anderson et al., 1994). Malgré les efforts visant à améliorer l'évaluation du

risque génotoxique et une meilleure stratégie de classification des substances génotoxiques proposée par Dearfield et al. en 2002, il reste actuellement difficile d'évaluer la présence et la toxicité de ces composés dans l'environnement. De plus, cette évaluation est rendue plus complexe par des processus d'activation des substances chimiques sous l'influence de facteurs physicochimiques ou biologiques. Par exemple, la biotransformation de certains contaminants peut conduire à une modification de leur toxicité initiale. Ainsi, un contaminant peu toxique comme le benzo[a]pyrène peut, après métabolisation, former des dérivés fortement mutagènes et cancérigènes (Johnson, 1992).

Depuis l'acceptation de la Directive Cadre Européenne sur l'eau par les états membres en 2000, qui vise à atteindre le bon état chimique et écologique des masses d'eau d'ici 2015 et à promouvoir une utilisation durable des réserves en eau, de nouvelles perspectives pour l'évaluation de la qualité biologique de l'eau ont été développées. Actuellement, cette évaluation repose essentiellement sur l'utilisation d'indicateurs biologiques construits sur la présence et l'abondance d'organismes de la faune et la flore des milieux aquatiques, comme par exemple les communautés algales, les macro-invertébrés benthiques ou les espèces piscicoles (Rosenberg et Resh, 1993). Toutefois, si l'utilisation de ces bioindicateurs apporte une information intéressante dans le cadre d'une évaluation globale de la qualité du milieu, elle ne répond pas aux attentes de compréhension des processus toxiques mis en jeu, ni à l'identification des pressions, qui peuvent être d'ordre physique (par exemple une modification de l'habitat), biologique (prédation, compétition) ou chimique. Enfin, elle ne répond pas précocement à une contamination (Attrill et Depledge, 1997 ; Clements, 2000).

Les biomarqueurs sont des outils complémentaires dans le domaine de l'évaluation de la qualité des écosystèmes (McCarthy et Shugart, 1990 ; Peakall, 1994). Ils permettent d'améliorer la précocité de la réponse biologique vis-à-vis d'un stress, de rechercher les modes d'actions impliqués, et ainsi contribuer à l'amélioration du diagnostic du risque environnemental, dans le but d'orienter les actions de remédiation. Dans le présent travail, le terme biomarqueur se réfère à tous les paramètres biochimiques, moléculaires, cellulaires, histologiques ou physiologiques qui peuvent être observés ou mesurés dans les cellules, tissus, fluides corporels ou dans l'organisme entier pour mettre en évidence l'exposition ou les effets d'un ou plusieurs polluants chimiques (Depledge et Fossi, 1994 ; Lagadic et al., 1997). Leur utilisation généralisée dans l'évaluation du risque environnemental et les programmes de surveillance est encore freinée par

deux verrous scientifiques liés d'une part à l'interprétation de la réponse des biomarqueurs dans le milieu naturel et d'autre part, à la faible prédictivité de ces outils en terme d'effet au niveau populationnel (Forbes et al., 2006 ; Jemec et al., 2010). En effet, malgré de nombreux efforts réalisés pour comprendre l'influence des facteurs biotiques, abiotiques et méthodologiques sur la variabilité naturelle de la réponse des biomarqueurs, l'établissement de niveaux de référence reste encore sujet à caution (Hanson et al., 2010). En outre, la signification écologique des biomarqueurs a souvent été abordée par un faisceau d'évidences établi sur la corrélation de réponses à différents niveaux d'organisation biologique suite à un stress (Schlenk et al., 1996 ; Clements, 2000 ; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Toutefois, la corrélation ne peut pas être considérée comme un lien direct de cause à effet. Aujourd'hui, peu d'études sont disponibles concernant l'établissement d'un lien mécanistique et statistique entre la réponse d'un biomarqueur et des éléments de la fitness des organismes (croissance, métabolisme, défense et reproduction).

Le développement des marqueurs de génotoxicité permet l'évaluation de l'impact des contaminants sur l'intégrité structurelle de l'ADN. Les altérations de l'intégrité génétique peuvent en théorie affecter plusieurs niveaux d'organisation biologique, de la molécule à la population, en affectant des fonctions telles que le développement, la reproduction, et la survie des individus, et ainsi compromettre la dynamique des populations (Anderson et Wild, 1994). Historiquement, l'évaluation de la génotoxicité dans le milieu aquatique a essentiellement reposé sur l'utilisation de modèles vertébrés. Le constat actuel est la faiblesse des outils d'évaluation génotoxique pouvant être mis en œuvre chez les invertébrés d'eau douce, alors que ces derniers représentent plus de 90 % des espèces aquatiques et jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement et la santé des écosystèmes aquatiques (Lee et Steinert, 2003 ; Jha, 2004 ; Frenzilli et al., 2009 ; Dhawan et al., 2009).

Dans ce contexte, ce travail de thèse vise à développer un biomarqueur de génotoxicité chez un invertébré dulçaquicole d'intérêt écologique, l'amphipode *Gammarus fossarum*, en s'appuyant sur une double approche laboratoire-terrain. Afin de proposer ce biomarqueur comme un outil d'aide à l'évaluation environnementale de l'impact génotoxique et dans le cadre de programme de surveillance du milieu, il nous est apparu nécessaire de hiérarchiser notre démarche en **quatre objectifs**.

Le premier objectif consiste à développer le protocole du test Comet *in vivo*, sur trois types cellulaires du gammare, choisis pour leur rôle dans des fonctions biologiques majeures, à savoir les cellules hémolymphatiques et les cellules germinales mâles et femelles.

Le deuxième objectif est de valider un protocole standard pour lequel la variabilité de la réponse du biomarqueur est minimale, et de proposer un niveau de dommages à l'ADN de référence, prenant en compte la variabilité spatio-temporelle du milieu naturel.

L'objectif suivant vise à comprendre la signification de la réponse du biomarqueur en terme d'effet sur la reproduction, fonction clé à même de lier la réponse sub-individuelle à des niveaux d'intégration biologique supérieurs.

Le dernier objectif consiste à appliquer ce biomarqueur dans le milieu naturel, par des méthodes d'encagement d'organismes, dans des contextes de contamination variés, afin d'en apprécier la pertinence écologique.

Ce document se structure en cinq chapitres. Le chapitre I est une synthèse bibliographique relative à l'utilisation des biomarqueurs pour l'évaluation de la qualité biologique du milieu aquatique, l'accent étant mis plus particulièrement sur les biomarqueurs de génotoxicité. Ce chapitre présente également l'espèce sentinelle choisie pour ce travail, le gammare *Gammarus fossarum*. Le chapitre II détaille les méthodes expérimentales mises en œuvre pour répondre aux quatre objectifs que nous nous sommes fixés précédemment. Les chapitre III et IV, structurés sous forme de publications et de notes comme compléments d'information des publications, traitent des résultats obtenus pour répondre d'une part aux objectifs de développement et de signification du biomarqueur (Chapitre III) et d'autre part aux objectifs de validation et d'application du biomarqueur dans le milieu naturel (Chapitre IV). Enfin, le chapitre V est une discussion des principaux résultats obtenus au cours du présent travail suivie d'une conclusion ouvrant un certain nombre de perspectives à ce travail.

Chapitre I

1. Synthèse bibliographique et état de l'art

Le premier chapitre de ce travail est une synthèse bibliographique des connaissances actuelles relatives à l'utilisation des biomarqueurs pour l'évaluation de la qualité biologique du milieu aquatique, l'accent étant mis plus particulièrement sur les marqueurs de génotoxicité.

La première partie (I.1) a pour objectif de définir la notion de biomarqueur, de présenter l'utilité et l'utilisation de ces outils pour l'évaluation de la qualité biologique du milieu aquatique, ainsi que de définir les étapes clés permettant de développer ces outils et d'interpréter leurs réponses.

La deuxième partie (I.2) est un état de l'art concernant la génotoxicité, les sources de substances génotoxiques pour l'environnement, les conséquences pour les organismes exposés et les techniques d'évaluation de la génotoxicité, en particulier la technique choisie pour ce travail, le test Comet.

Dans une troisième partie (I.3), l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum* choisi dans le cadre de cette étude comme espèce sentinelle est présenté.

Enfin, la dernière partie (I.4) expose les objectifs de ce travail de thèse.

1.1. Les biomarqueurs pour l'évaluation de la qualité biologique des hydrosystèmes

1.1.1. Le rôle des biomarqueurs dans l'évaluation environnementale

1.1.1.1. L'évaluation de la qualité biologique du milieu aquatique

L'évaluation de la qualité du milieu aquatique, qu'il soit marin ou dulçaquicole repose depuis une quarantaine d'années sur une double approche chimique et biologique. Les analyses chimiques effectuées dans divers compartiments (colonne d'eau, sédiment) ne peuvent à elles seules décrire l'état de santé d'un écosystème. En effet, l'analyse chimique est spécifique à un contaminant et ne peut pas prendre en compte la complexité d'une mixture de contaminants. Elle ne permet pas non plus de déterminer si ces contaminants ont un effet toxique, ni les conséquences adverses du polluant pour l'écosystème aquatique. C'est pourquoi, l'évaluation et le suivi de la qualité du milieu aquatique se sont appuyés rapidement sur des analyses du biote. Ainsi, en complément des analyses chimiques, des indicateurs biologiques ont été développés et ce à divers niveaux d'organisation biologique.

Historiquement, l'évaluation de la toxicité d'un milieu et sa surveillance ont été réalisées par le suivi d'indicateurs biologiques basés sur la présence et l'abondance de différentes espèces végétales et animales. De très nombreuses revues font état de l'emploi des bioindicateurs pour évaluer la qualité des milieux naturels (Blandin, 1986 ; Rosenberg et Resh, 1993). En France, plusieurs de ces indices ont fait l'objet d'une normalisation ou d'une standardisation (Indice Biologique Global Normalisé, Indice Biologique Diatomées, Indice Poisson Rivière, Indice Biologique Macrophyte en Rivière, Indice Oligochète de Bioindication des Sédiments). Les invertébrés aquatiques restent les plus utilisés des indicateurs biologiques de part les avantages qu'ils présentent. Ils sont faciles à échantillonner, à transporter, couvrent une grande diversité phylogénétique, sont ubiquistes et souvent abondants.

Depuis l'adoption par la communauté européenne de la DCE (2000/60/CE) et de la publication de la directive fille (2008/105/CE), évaluer l'état écologique du milieu aquatique,

améliorer cet état ou maintenir un bon état sont des défis auxquels sont confrontés les écotoxicologues, les écologues et les gestionnaires. L'étude des populations d'invertébrés et des communautés a permis de fournir des données pertinentes sur l'état écologique du milieu aquatique. Toutefois, trois limites fortes à l'utilisation de ces indices de communautés peuvent être soulignées. La première limite est qu'il n'est pas possible de discriminer les effets écologiques tels que l'habitat, la prédation, l'alimentation, des effets toxiques dus à la présence de polluants, malgré de nombreux efforts réalisés en ce sens (Archaimbault, 2003 ; Ducrot, 2005). La deuxième limite est l'impossibilité d'appréhender la nature du stress toxique et notamment les mécanismes d'action sous-jacents ainsi que sa source. Enfin, la dernière limite est liée au fait que ces indices sont révélateurs d'une contamination passée. Or, toutes ces connaissances sont indispensables pour entreprendre des actions de restauration appropriées et répondre aux questions soulevées par la DCE à savoir comment évaluer et améliorer la qualité écologique du milieu.

1.1.1.2. Définition des biomarqueurs

Les biomarqueurs, décrits initialement comme la réponse d'une fonction biochimique ou physiologique à la présence d'un xénobiotique, sont **spécifiques** à un type de contaminant et sont plus à même de donner un **diagnostic précoce** sur la nature et le niveau de contamination. Ils présentent ainsi une capacité de prédiction que ne possèdent pas les autres indicateurs biologiques. Les biomarqueurs présentent également un caractère **intégrateur** du message toxique puisque l'organisme exposé n'intègre par définition que la fraction biodisponible des composés anthropiques. Le biomarqueur permet de cibler le type de polluant (par exemple neurotoxique, génotoxique, reprotoxique...) en discriminant l'effet du polluant ou l'effet d'autres variables propres au milieu. Il est donc à même d'être utilisé pour une **évaluation spatiale et temporelle de la contamination d'un milieu**.

Dans le présent travail, un biomarqueur se réfère à tous les paramètres biochimiques, moléculaires, cellulaires, histologiques ou physiologiques qui peuvent être observés ou mesurés dans les cellules, tissus, fluides corporels ou dans l'organisme entier pour mettre en évidence l'exposition ou les effets d'un ou plusieurs polluants chimiques (Depledge et Fossi, 1994).

Idéalement, le biomarqueur doit pouvoir répondre aux critères suivants.

- Il doit être fiable, facile à utiliser et relativement peu coûteux.
- Le biomarqueur est un outil précoce, c'est à dire qu'il doit répondre rapidement à l'exposition aux polluants (McCarthy et Shugart, 1990).
- Il doit être sensible à des expositions au laboratoire et dans le milieu naturel, dans des conditions de contamination réalistes, la réponse devant dépendre idéalement que de la dose et du temps et permettre une quantification de l'exposition ou de l'effet. La variabilité temporelle et la cinétique de la réponse après exposition à un polluant doivent être connues pour interpréter les résultats (McCarthy et Shugart, 1990 ; Timbrell, 1998).
- L'influence de facteurs confondants biotiques et abiotiques sur le niveau de base de la réponse doit être établie afin de distinguer stress toxique et variabilité naturelle. Cela permet d'établir des valeurs de référence en sites non contaminés et également de mieux comprendre la variabilité spatiale de la réponse (Mayer, 1992).
- Le mécanisme reliant la réponse biologique observée et l'exposition aux polluants doit être connu (Lagadic et al, 1997).
- Le lien entre réponse du biomarqueur et effet sur l'organisme afin d'éventuellement pouvoir prédire des effets à des niveaux biologiques supérieurs voire prédire des risques pour l'homme doit être clarifié (Amiard et Amiard-Triquet, 2008).

1.1.1.3. Utilisation des biomarqueurs dans l'évaluation du risque environnemental

Les biomarqueurs représentent de nouveaux outils qui peuvent avantageusement apporter des réponses aux enjeux de la directive cadre européenne. Afin d'utiliser ces outils dans l'évaluation du risque environnemental, il convient de définir leur rôle et leur utilisation dans cette procédure d'évaluation. Dans le cadre environnemental, diverses applications des biomarqueurs ont été proposées, à des fins pronostiques et diagnostiques.

Au laboratoire, les biomarqueurs ont été utilisés pour déterminer en conditions contrôlées le type de toxicité d'un contaminant, à savoir neurotoxique, génotoxique, reprotoxique, immunotoxique, tératogène... Dans ces conditions, ils ont alors rapidement trouvés une place comme un outil d'aide à l'évaluation du risque environnemental (Figure I-1). En effet, dans cette démarche, l'établissement de liens entre exposition et effet est une étape essentielle à la caractérisation des risques. Hors les biomarqueurs peuvent répondre avantageusement à

l'établissement de ce lien (Peakall, 1994). Comme indiqué dans la figure I-1, ils sont aujourd'hui développés pour répondre aux exigences actuelles en matière d'évaluation de risque et de sécurité sanitaire des produits chimiques dans le contexte REACH.

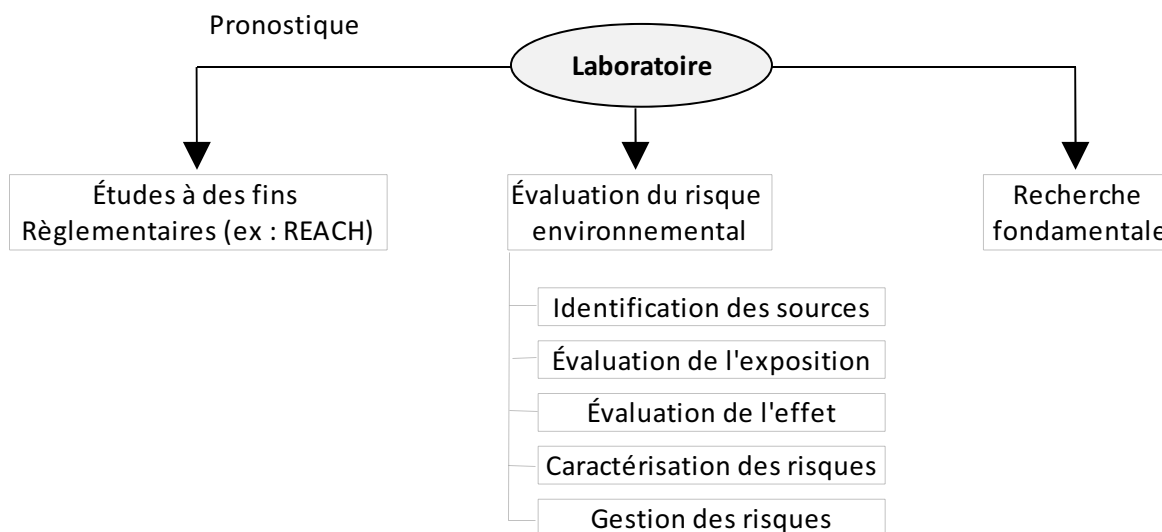


Figure I-1 : Applications possibles des biomarqueurs au laboratoire (Jemec et al., 2010).

Forbes et al (2006) préconisent une utilisation des biomarqueurs essentiellement destinée aux études en laboratoire, pour fournir des hypothèses et des explications mécanistiques des effets d'un contaminant chimique sur l'organisme, considérant que les biomarqueurs ne sont pas des indicateurs suffisants et exhaustifs pour l'évaluation de la qualité écologique d'un milieu.

Pourtant il convient de souligner qu'historiquement le rôle des biomarqueurs a été d'évaluer la qualité d'un milieu naturel et de réaliser son suivi (McCarthy et al., 1990). Abondant dans ce sens, Cairns et Pratt, (1993) revendiquent que la différence entre toxicologie et écotoxicologie est de tenir compte de la complexité environnementale. Les premières études écotoxicologiques utilisant les biomarqueurs dans le milieu naturel ont essentiellement consistées en des approches de type amont/aval, encadrant une source de pollution que ce soit par des prélèvements de population naturelle *in situ* ou par l'encagement d'organismes du laboratoire ou prélevés dans un site non contaminé (transplantation).

Aujourd'hui dans le cadre d'études *in situ*, les biomarqueurs ont vocation à proposer un diagnostic de la qualité du milieu (études de biomonitoring) et à évaluer le risque environnemental auquel le milieu est soumis (Figure I-2).

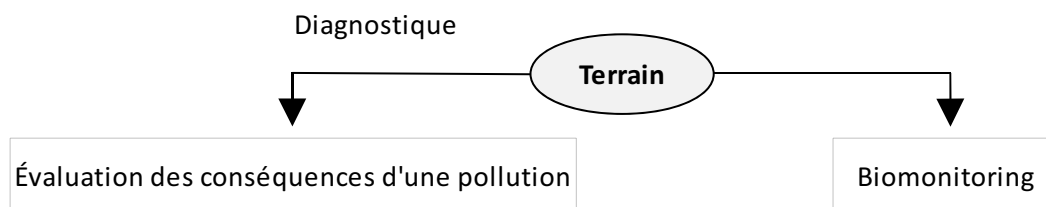


Figure I-2 : Applications possibles des biomarqueurs dans le milieu naturel (Jemec et al., 2010).

Dans le cadre d'études de biomonitoring, les biomarqueurs ont souvent été déployés en batteries. Toutefois les nombreuses contraintes de terrain rendent difficile l'acquisition de données, leur interprétation et leur hiérarchisation. Pour donner une note d'évaluation de la qualité du milieu, des méthodes d'intégration des réponses des biomarqueurs ont été proposées. Le calcul d'indice intégrant la variabilité globale de la batterie de biomarqueurs est la méthode d'interprétation des données la plus aboutie. Le calcul d'indice ou de la réponse intégrée des biomarqueurs (Integrated Biomarker Response) simplifiant l'interprétation des données a été utilisé chez différentes espèces sentinelles comme le flet d'Europe *Platichthys flesus* pour une étude à large échelle en mer Baltique et la moule *Mytilus edulis* dans l'estuaire de la Seine (Beliaeff et Burgeot, 2002). D'autres auteurs ont utilisé une approche multibiomarqueurs chez plusieurs espèces de poissons comme outil de diagnostic en normalisant leurs réponses par les niveaux de référence (Adams et al., 1999). Dans le programme européen BEEP, l'accent a été plus particulièrement mis sur les biomarqueurs de perturbations hormonales et gonadiques impliquant une altération de la fonction de reproduction. Ils ont été appliqués le long de la côte Atlantique, en mer Baltique et en Méditerranée pour proposer une validation et une intercalibration des méthodologies utilisées et finalement pouvoir être utilisés dans les programmes de surveillance nationaux et internationaux, rendant ainsi possible une plus large utilisation des biomarqueurs (Narbonne et al., 2005 ; Pampanin et al., 2006).

D'autre part, les biomarqueurs trouvent une place importante dans le cadre de programmes d'évaluation du risque environnemental (Galloway et al., 2004; Picado et al., 2007). De

nombreux auteurs recommandent leur utilisation dans ces programmes comme une approche complémentaire s'intégrant aux démarches déjà largement utilisées basées sur la surveillance chimique et l'évaluation de la réponse des bioindicateurs (McCarthy et al., 2002 ; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Ils sont donc de plus en plus souvent inclus dans une procédure globale d'évaluation comme celle schématisée dans la figure I-3. Ce type d'évaluation repose sur une démarche à différentes échelles chimiques et biologiques permettant la mise en évidence d'un faisceau de preuves justifiant l'existence d'un stress toxique. Les biomarqueurs apportent dans cette démarche la connaissance de la biodisponibilité et de la toxicité du contaminant.

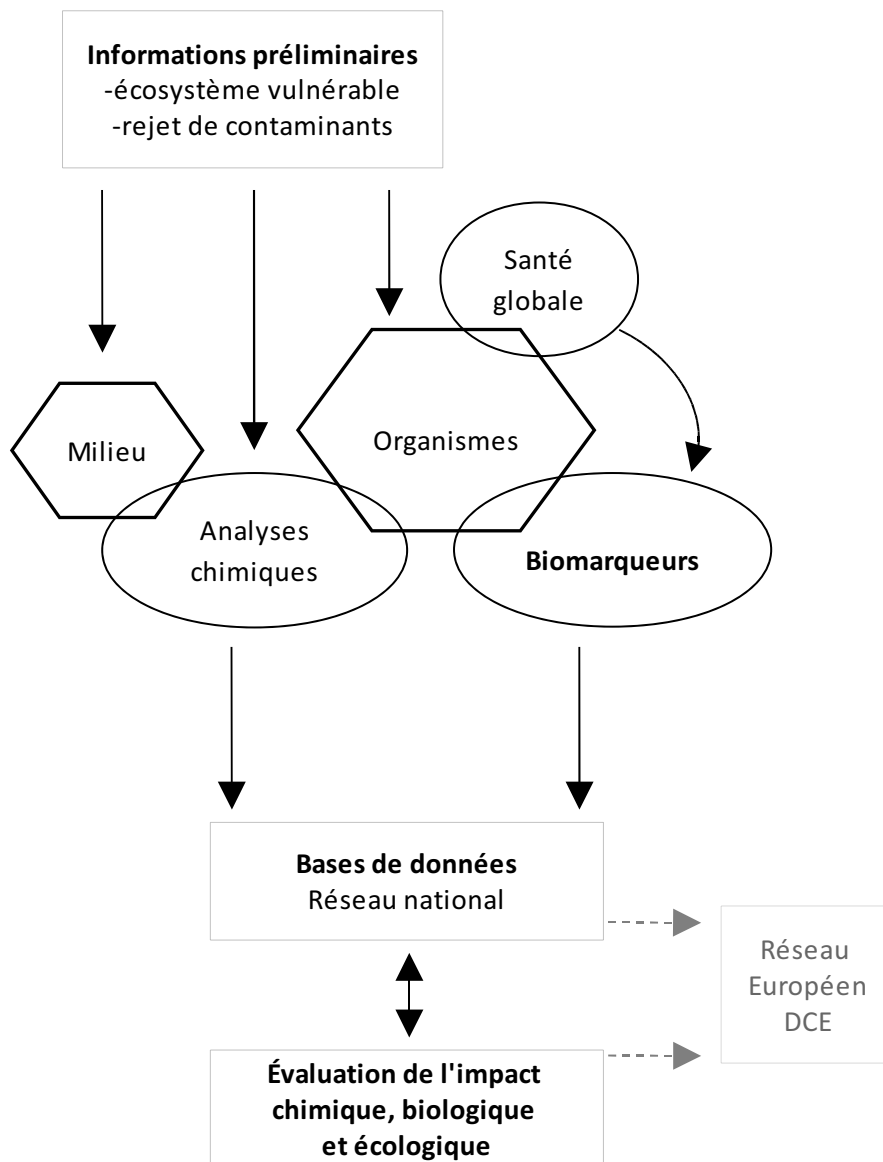


Figure I-3 : Place des biomarqueurs dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental : acquisition, interprétation et devenir des données (adapté de Galloway et al., 2004 et Picado et al., 2007).

Suivant cette procédure (Figure I.3), il s'agit d'identifier les sources de contaminations et de réunir les informations déjà existantes sur les sites d'intérêt. Dans une deuxième étape, les différentes analyses chimiques à réaliser dans le milieu et dans le biote sont choisies, notamment en fonction des connaissances acquises sur les contaminations suspectées. Le choix des organismes est justifié par leur biologie générale, et en particulier par leurs différents modes d'alimentation et leur habitat. Une observation des réponses biologiques de ces organismes au niveau de la santé globale permet de mieux interpréter les réponses des biomarqueurs. Cette approche globale et intégrée, appliquée notamment dans le projet ECOMAN (Galloway et al., 2004) permet d'identifier à large échelle et à long terme l'impact de la contamination chimique sur les organismes dans le milieu naturel.

Il est nécessaire de souligner ici que l'utilisation des biomarqueurs pour évaluer la qualité environnementale n'est pas encore généralisée. De nombreux paramètres peuvent entraîner une forte variabilité de la réponse du biomarqueur comme l'alimentation, le parasitisme, le statut physiologique, pouvant conduire à une mauvaise interprétation de cette réponse (Olsen et al, 2001 ; Van der Oost et al., 2003 ; Correia et al, 2003) Le manque de calibration et de prise en compte de cette variabilité limite encore trop souvent l'utilisation des biomarqueurs au seul domaine de la recherche. Avant de promouvoir une large utilisation des biomarqueurs, il conviendrait de définir une procédure rigoureuse permettant le développement, l'utilisation et l'interprétation des biomarqueurs.

1.1.2. Développement d'un biomarqueur

1.1.2.1. Définition de l'espèce sentinelle

Les premières études écotoxicologiques, et plus particulièrement les études pronostiques permettant d'évaluer la toxicité d'une substance, ont majoritairement été développées sur les espèces les plus sensibles. Le paradigme de protéger l'espèce la plus sensible pour protéger de fait toutes les autres espèces a largement freiné le développement de biomarqueurs sur un plus grand nombre d'espèces. Pourtant, la diversité des espèces et de fait la diversité de sensibilité de

ces espèces permet une meilleure compréhension du risque environnemental (Cairns et Pratt, 1993). Le choix d'une espèce sentinelle différente de l'espèce la plus sensible s'avère aujourd'hui plus adapté aux objectifs d'évaluation, de préservation ou de restauration de la qualité du milieu. Il convient de préciser que l'espèce sensible est une notion différente de celle de stade biologique sensible (juvéniles ou femelles en reproduction par exemple). Dans le présent travail, la notion d'espèce sentinelle est une espèce dont les modifications de paramètres biologiques sont utilisées pour évaluer les risques associés à la présence de xénobiotiques (Rivière, 1993). De nombreux organismes ont été proposés comme espèces sentinelles : des invertébrés terrestres et aquatiques car ils sont abondants et faciles à échantillonner, des amphibiens et parfois des reptiles, des poissons, souvent pour leur intérêt économique et comme espèces emblématiques des rivières, certains oiseaux comme les goélands ou les pigeons pour leur habitat ou leur lieu de nutrition (villes, décharges) et enfin de petits mammifères dont l'échelle spatiale de déplacement est limitée (Berthet, 2008). Dans tous les cas, il est extrêmement difficile voire illusoire de vouloir extrapoler la réponse d'une espèce sentinelle à l'homme.

1.1.2.2. Critères de sélection de l'espèce sentinelle

Tous les biomarqueurs n'étant pas applicables à toutes les espèces, il convient de choisir une espèce sentinelle qui soit représentative du milieu à surveiller. Historiquement l'espèce sentinelle a été choisie plus pour des raisons pratiques telles que la faisabilité d'un élevage au laboratoire et la facilité d'échantillonnage, que pour sa pertinence écologique. Au laboratoire, pour évaluer la toxicité d'un contaminant, étudier sa toxicocinétique, décrire son mode d'action, l'espèce sentinelle sera choisie en fonction de la connaissance de son cycle de vie, de l'assurance de disposer d'organismes génétiquement proches, permettant de multiplier le nombre de réplicats et d'obtenir des réponses répétables. Toutefois, le choix d'espèces peu exigeantes donc de maintien aisé au laboratoire peut entraîner une faible sensibilité de la réponse aux contaminants. Dans le cadre d'expérimentations avec des organismes engagés, les espèces peuvent provenir du laboratoire, à condition toutefois de veiller à ne pas introduire de nouvelles espèces dans des hydrosystèmes où elles sont normalement absentes et où elles pourraient être potentiellement invasives. Aujourd'hui une espèce sentinelle est choisie en fonction de son habitat, de sa

stratégie alimentaire, de sa place dans la chaîne trophique, voire de son importance dans le cadre de programmes de conservation d'un milieu. Ainsi, une espèce peut être sélectionnée comme « sentinelle » en répondant aux questions suivantes : Pour quelle utilisation (expérimentations au laboratoire, translocation *in situ*, prélèvement de populations autochtones) ? Quelle est sa pertinence écologique ? Quelles sont les contraintes techniques inhérentes à cette espèce ? Il s'agit donc de savoir si l'espèce sentinelle répond aux attentes de la liste non exhaustive ci après (Rivière, 1993 ; Lagadic et al., 1997).

Critère technique :

- Elle est facilement identifiable et échantillonnable, ce qui nécessite une bonne connaissance de l'écologie de l'espèce.
- Elle est aisément manipulable et transportable lors d'expérimentations au laboratoire ou sur le terrain.
- L'espèce est de taille suffisante, permettant de pratiquer des mesures de concentrations en polluants, ou d'examen biologiques et biochimiques.

Critère méthodologique :

- Elle doit être sensible aux polluants considérés (relations dose/effet et cause/effet).
- Des tests chroniques doivent être réalisables à différentes périodes de la vie de l'organisme
- Il est nécessaire de disposer d'organismes témoins, c'est à dire prélevés dans des zones non polluées ou maintenus au laboratoire dans des conditions semi naturelles.
- Des études similaires ou proches sur la même espèce ou sur des espèces proches doivent être disponibles afin de disposer de données bibliographiques permettant d'interpréter les réponses de l'espèce.

Critère écologique :

- Il est recommandé que l'espèce ait un rôle significatif dans le fonctionnement des écosystèmes, dans les cycles biogéochimiques (dégradation de la matière organique, oxygénation) ou qu'elle soit une espèce clé du réseau trophique (proie, activité de prédation).

- Il est préférable que l'espèce soit ubiquiste, largement distribuée dans les zones d'intérêt et résidant exclusivement ou très majoritairement dans cette zone, ou si possible disponible en élevage.
- Le fait qu'elle soit représentative de différents phylums et qu'elle présente un intérêt économique sont des atouts supplémentaires.

1.1.2.3. Exemple de l'approche multispécifique

A la difficulté de choisir une espèce sentinelle pertinente, s'ajoutent les difficultés de la prise en compte de la diversité des espèces. Afin de limiter les erreurs d'interprétation en se basant exclusivement sur une espèce, il convient de se poser la question s'il est possible d'utiliser plusieurs espèces dont les stratégies d'alimentation et l'habitat sont différents. Dans le projet ECOMAN, Galloway et al. (2004) préconisent une approche multispécifique où les espèces sont sélectionnées pour leur diversité trophique et leur fonction écosystémique. Le choix de plusieurs espèces peut également être motivé par la volonté de représenter une certaine diversité phylogénétique. Il serait intéressant d'évaluer si différentes espèces peuvent présenter des réponses comparables afin de limiter les études à quelques groupes taxonomiques, représentatifs de l'ensemble des communautés.

1.1.2.4. Critères définissant un protocole de référence

Une étape nécessaire pour le développement d'un biomarqueur consiste à définir un protocole de référence. L'établissement de ce protocole permet de limiter la variabilité de la réponse du biomarqueur et ainsi de proposer une interprétation pertinente de ces réponses. La figure I-4 récapitule les facteurs biologiques, environnementaux et techniques qui doivent être pris en compte lors de l'établissement du protocole de référence d'un biomarqueur, qu'il s'agisse d'expérimentations au laboratoire ou sur le terrain.

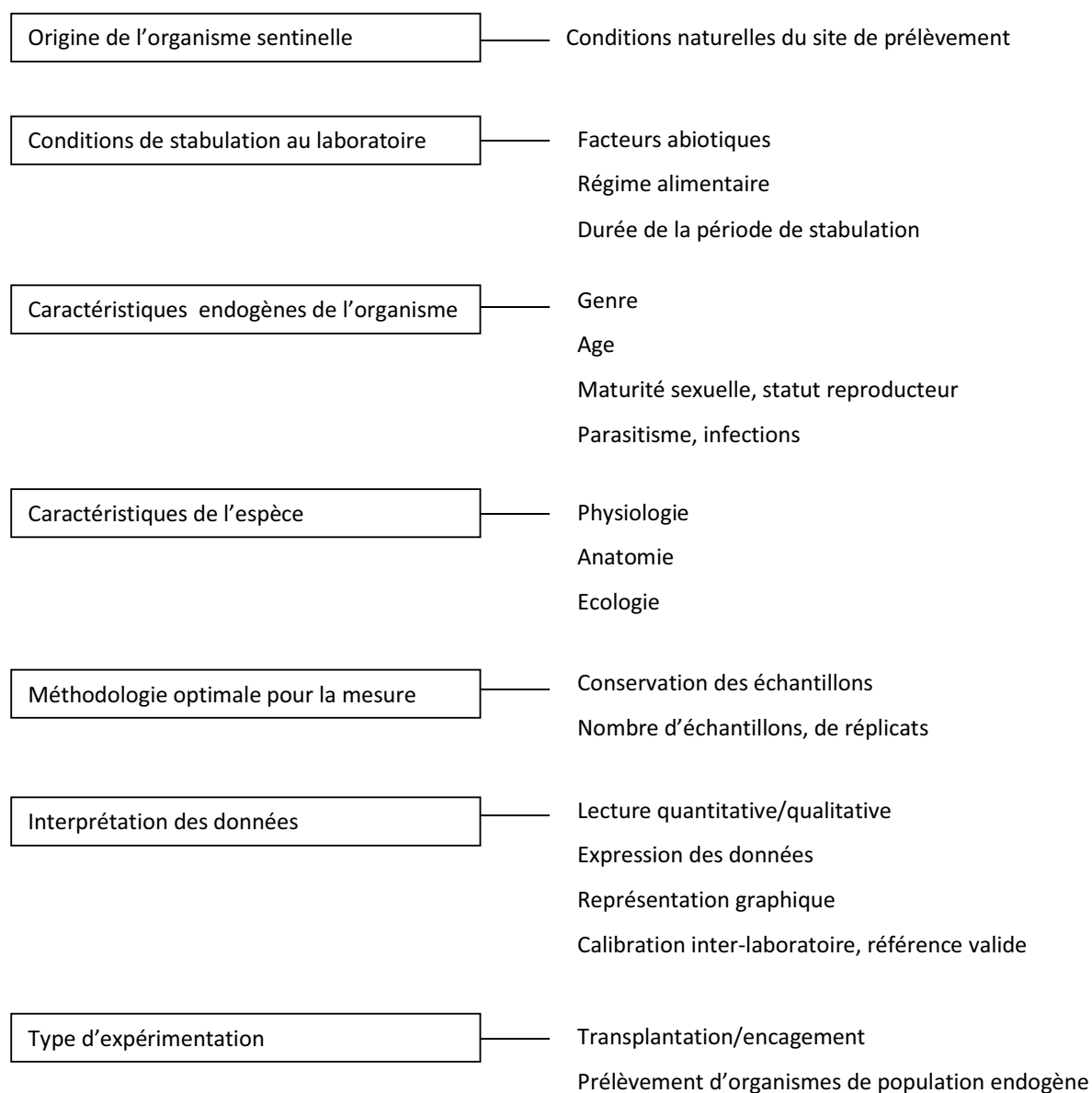


Figure I-4 : Développement d'un biomarqueur : établissement d'un protocole de référence tenant compte des principaux facteurs de variabilité (d'après Jemec et al., 2010).

Les critères listés dans la figure I-4 permettant d'établir un protocole aussi robuste que possible sont argumentés et illustrés ci après.

Origine de l'organisme sentinelle :

Les caractéristiques physico-chimiques de l'habitat où sont prélevés les organismes et la variabilité de ces caractéristiques doivent être connues pour pouvoir reproduire au laboratoire un milieu de stabulation aussi proche que celui du terrain. Une modification des caractéristiques de la zone de prélèvement peut entraîner une variabilité de la réponse du biomarqueur. Lewis et Galloway (2008) soulignent que la différence de réponse à un stress génotoxique de trois espèces de polychètes pourrait être due à un site de prélèvement différent. Les trois espèces n'étant pas présentes sur les mêmes sites, une vraie comparaison de leur sensibilité n'est pas possible.

Conditions de stabulation au laboratoire :

Les conditions d'élevage (cycle jour/nuit, régime alimentaire, oxygénation) ainsi que la durée de stabulation vont influencer l'état de santé global de l'organisme. Elles doivent être choisies de sorte à ce que l'organisme présente un état physiologique proche de celui du milieu naturel non contaminé.

Caractéristiques endogènes de l'organisme :

Certains facteurs biotiques peuvent également être une source de variabilité de la réponse du biomarqueur. Ces facteurs de variabilité sont liés à la physiologie de l'espèce, à son alimentation, à son statut reproducteur, à son âge, son poids. Correia et al. (2003) ont montré que la variation de l'activité des enzymes antioxydants chez *Gammarus locusta* était liée à l'âge des organismes et à leur sexe. La sensibilité de l'organisme doit donc être constante dans le temps ou connue pour chacun des différents stades de vie pour choisir le stade le plus sensible.

Caractéristiques de l'espèce :

Il a été très souvent démontré que des espèces, même proches peuvent répondre très différemment à une même exposition. Par exemple, suite au même stress génotoxique, *Nereis virens* est plus résistant que *Arenicola marina*, chez qui l'augmentation des dommages à l'ADN va être plus forte (Lewis et Galloway, 2008). C'est pourquoi il est important de connaître la voie d'exposition à un contaminant, déterminée par l'habitat et les préférences alimentaires de l'espèce, sa tolérance vis à vis de différents facteurs abiotiques ainsi que les réponses adaptatives aux variations spatiotemporelles (température, conductivité, débit).

Méthodologie optimale pour la mesure :

D'un point de vue technique, le mode de conservation des échantillons et la durée maximale pendant laquelle ils peuvent être conservés sans dégradation doivent être évalués. Il a été montré que la cryopréservation du sperme comme moyen de conservation entraînait une diminution de l'intégrité de l'ADN chez l'homme et une diminution de la survie embryonnaire chez la loche *Misgurnus fossilis* (Gandini et al., 2006 ; Kopeika et al., 2003). Un nombre nécessaire et suffisant d'échantillons doit permettre une évaluation statistique des données, d'obtenir une bonne **réplicabilité**, de tester la **répétabilité** et de garantir la **spécificité** de la réponse. S'il est aisé d'obtenir un grand nombre d'échantillons au laboratoire, il faut toujours tenir compte du réalisme expérimental. Pour les expérimentations de terrain, le choix des saisons, des sites de prélèvement ou d'encagement sont particulièrement importants car il est moins aisé pour ces expériences de disposer d'un grand nombre d'échantillons et il n'est pas possible de reproduire une expérience à l'identique.

Interprétation des données :

L'expression des données est un paramètre important à prendre en considération pour proposer une quantification correcte, être reproductible et permettre une comparaison voire une calibration inter-laboratoire. Pour de nombreux biomarqueurs, l'expression des données n'est pas standardisée, ce qui entraîne des difficultés pour la comparaison des résultats avec les données existantes de la littérature.

Par exemple, dans la littérature, la mesure d'activité de l'AChE est normalisée par rapport à la quantité de protéines présente dans le volume d'extrait étudié pour corriger les éventuelles différences de rendement d'extraction. Mais cette quantité de protéines totales peut elle-même être variable et indépendante de la quantité en protéines enzymatiques en fonction du statut reproducteur de l'organisme, et cette normalisation n'est pas toujours pertinente (Xuereb et al., 2007).

Une très grande diversité dans l'expression des données peut être observée lorsque les résultats sont obtenus par analyse d'image. Cette diversité est due d'une part au choix d'exprimer les résultats de manière qualitative ou quantitative par l'utilisation de logiciels de lecture, et d'autre part par le logiciel d'analyse d'images lui-même qui propose en général différents paramètres de lecture. Dans ces conditions, quel que soit le domaine d'application du biomarqueur, force est de constater qu'il est souvent difficile de comparer les données acquises à celle de la littérature. Le choix de l'expression des données peut être amélioré par une bonne connaissance de la signification technique et biologique du paramètre de mesure retenu.

Type d'expérimentation :

Pour diagnostiquer l'état de santé d'un milieu naturel, deux approches ont été développées. L'une d'elle consiste à prélever des organismes de populations endogènes, présentes sur le milieu à étudier pour évaluer la réponse biologique à un contaminant. Une autre approche consiste à encager ou à transplanter des organismes provenant du laboratoire ou de sites non contaminés.

Les études basées sur des populations endogènes présentent l'avantage de donner des réponses très intégratives et permettent le suivi des variations saisonnières et des variations physiologiques des organismes. Il est également possible de s'intéresser à l'étude des phénomènes d'adaptation des organismes à une contamination. Toutefois, il est parfois difficile de connaître les traits de vie de la population en place. La diversité génétique (flux génique, dérive, mutations, sélection) et la plasticité de l'espèce sont des sources de variabilité qu'il est difficile d'appréhender et d'intégrer dans la réponse d'un biomarqueur (Larno, 2004). Trouver une espèce présente à la fois sur des sites de référence et sur des sites contaminés peut s'avérer être une difficulté supplémentaire. Dans le cas des rivières, le site de référence se situe généralement à l'amont du site contaminé, voire à la source. Le profil hydrogéologique des sites étudiés va donc être différent. La plupart des espèces ayant des exigences écologiques qui leur

sont propres, on ne retrouvera pas les mêmes espèces dans des compartiments différents (variabilité locale des peuplements) (Huet, 1949). La forte sensibilité de l'espèce à un polluant, pouvant être une qualité au laboratoire sera un défaut si cette sensibilité entraîne l'absence de l'espèce sentinelle sur des sites contaminés. C'est le cas de certains crustacés, très sensible à une contamination métallique ou à d'autres facteurs abiotiques par exemple (MacNeil et al., 2000). La mobilité des organismes sentinelles peut entraver la réalisation de suivis ainsi que la possibilité de réaliser des mesures au niveau individuel telles que la survie, la croissance, l'alimentation. C'est pourquoi, le choix de l'espèce s'est plutôt orienté vers des organismes sessiles lorsqu'ils sont adultes comme de nombreux mollusques (bivalves), la majorité des brachiopodes et certains cnidaires (éponges, hydres, coraux).

Pour palier aux difficultés engendrées par l'étude d'espèces endogènes, les méthodes de transplantation des organismes ont été rapidement adoptées. En France, la technique de transplantation est utilisée depuis 1996 dans le Réseau intégrateurs biologiques sur le littoral méditerranéen (Rinbio, 2002). Le premier objectif des expériences d'encagement est de limiter les interactions avec certains facteurs physiques et biologiques tels que l'habitat, la prédation et la compétition. Elles permettent également d'investiguer tous types d'hydrosystèmes où l'espèce sentinelle est absente, d'intégrer les fluctuations des caractéristiques physico-chimiques du milieu ainsi que celles des apports en contaminants. La sélection d'organismes calibrés en taille, âge, état physiologique et statut reproducteur, provenant du laboratoire permet de limiter l'hétérogénéité des individus et ainsi de restreindre la variabilité inter-individuelle. Divers facteurs abiotiques (période d'exposition, durée de l'exposition, localisation des sites) peuvent être maîtrisés limitant la variabilité géographique et temporelle. La maîtrise partielle de l'exposition permet de mieux comprendre le lien temporel entre exposition et apparition des effets, mais il n'est pas possible de s'intéresser à des phénomènes d'adaptation de la population. La principale difficulté liée à l'utilisation d'organismes transplantés est de maintenir une fitness optimale pour les organismes (modification de l'habitat, du régime alimentaire, du comportement) ayant un impact direct sur les variables biologiques pouvant influencer la réponse du biomarqueur (Gerhardt et al., 1998). De plus, les systèmes d'encagement peuvent modifier les conditions d'exposition des espèces en modifiant certains paramètres physico-chimiques comme la teneur en oxygène, en particules, et le débit d'eau. D'autres paramètres peuvent intervenir comme une trop grande densité d'organismes dans les cages entraînant une

modification du comportement et une carence alimentaire (Geffard et al., 2010). L'utilisation d'organismes engagés doit donc d'abord passer par l'évaluation des effets artéfactuels de l'engagement sur les organismes en milieu non contaminé et par l'amélioration des connaissances des variables biologiques individuelles susceptibles de modifier la réponse du biomarqueur afin de discriminer le stress lié à l'engagement de celui généré par un contaminant.

1.1.3. Validation d'un biomarqueur

La validation d'un biomarqueur passe par deux étapes indispensables permettant une interprétation correcte de la réponse. A l'instar de la DCE (2000) qui stipule que l'évaluation écologique d'une masse d'eau ne repose pas exclusivement sur la notion de valeur seuil unique mais plutôt sur la notion d'écart à la référence, la validation d'un biomarqueur passe par la définition d'une référence et d'un seuil d'effet (l'équivalent d'un seuil de bon état écologique). Cela nécessite de connaître la **variabilité naturelle** de la réponse et de disposer d'un **référentiel de valeurs de référence** en site non contaminé.

1.1.3.1. Influence des facteurs environnementaux et variabilité naturelle

L'une des principales limites d'utilisation des biomarqueurs est la variabilité inhérente de toute réponse biologique à des facteurs non toxiques. L'examen de la variabilité naturelle est une partie essentielle du processus d'évaluation de la qualité. La variabilité spatiale et temporelle va être liée à des facteurs abiotiques tels que la température, la luminosité, la biomasse disponible mais aussi à des facteurs climatiques non saisonniers comme les crues. Une bonne connaissance des conditions environnementales des sites étudiés est indispensable pour déterminer les causes de la variabilité. Les facteurs environnementaux responsables de la variabilité de la réponse du biomarqueur sont nombreux. La température peut influencer la réponse de certains biomarqueurs de génotoxicité comme par exemple le niveau de dommages primaires à l'ADN chez *Dreissena polymorpha* mesuré par le test Comet (Buschini et al., 2003). Il a été montré que le pH modifiait la réponse de marqueurs physiologiques comme la respiration chez *Gammarus fossarum* (Felten et Guérold, 2001). La salinité peut moduler certaines activités enzymatiques comme

l'acétylcholinésterase (AChE), la lactate déshydrogénase (LDH) et la glutathion S-transferase (GST) mesurées chez le copépode *Eurytemora affinis* et chez la crevette *Crangon crangon* (Cailleaud et al., 2007, Menezes et al., 2006). La teneur en oxygène modifie la sensibilité aux contaminants d'un biomarqueur de développement embryonnaire chez un amphipode marin (Wiklund et Sundelin, 2004). Les variations saisonnières ou de régime alimentaire peuvent également être source de variabilité de la réponse des biomarqueurs chez la moule *Mytilus edulis* (Hagger et al., 2010).

Afin d'affiner la discrimination entre variations naturelles et variations causées par un impact anthropique, l'influence des divers paramètres biotiques et abiotiques sur la réponse du biomarqueur doit être appréhendée. Pour se dégager de cette variabilité et proposer une plus large utilisation du biomarqueur, il est important d'établir une référence (Flammarion et Garric, 1997).

1.1.3.2. Établissement d'une référence

Pour la quasi totalité des biomarqueurs, aucune référence n'est disponible et cette lacune constitue un obstacle majeur pour l'évaluation des impacts à court et long terme ou en situation accidentelle. L'établissement d'un niveau de base ou d'un état de référence permet une hiérarchisation des risques, ce qui est particulièrement adéquat dans une démarche de gestion de la qualité environnementale. Cela permet également une plus grande adaptabilité du biomarqueur qui peut alors être utilisé dans d'autres contextes que les approches amont-aval.

Plusieurs stratégies sont classiquement utilisées pour définir une valeur de référence. On considère généralement que trois stratégies sont possibles.

La référence absolue : elle est définie par les valeurs obtenues dans un site non contaminé. Elle permet des études à large échelle (suivi d'une contamination côtière par exemple), toutefois le choix de la station de référence doit être particulièrement rigoureux et les caractéristiques du site bien documentées pour intégrer l'influence des facteurs environnementaux (Olsen et al., 2001).

La référence relative : elle est déterminée par la réponse du biomarqueur dans le site étudié par rapport à la réponse dans un site amont moins impacté dont les caractéristiques physico-chimiques sont proches. Cette référence est utilisée pour caractériser le profil de contamination d'une rivière (comme par exemple dans le cadre d'évaluation amont/aval). Toutefois il n'est pas possible d'utiliser cette méthode dans le cadre d'études à grande échelle (Flammarion et Garric, 1997).

La référence temporelle : elle peut correspondre en fait aux deux références précédentes avec la prise en compte d'une dimension supplémentaire qu'est le temps. Elle est établie par le suivi d'un même site non contaminé au cours du temps. Cette stratégie permet à la fois de s'affranchir de la variabilité inter-site si le suivi est réalisé sur plusieurs sites aux caractéristiques physico-chimiques contrastées et de connaître la variabilité annuelle des valeurs du biomarqueur en conditions de référence. Cette méthode est souvent nécessaire car c'est la prise en compte d'une variation éventuelle du biomarqueur au cours du temps qui permet de déceler l'impact d'une pollution sur une espèce à un moment donné (Sanchez et Porcher, 2009). Il convient de signaler que la référence temporelle peut à long terme évoluer sous l'action de changements globaux. Dans ce cas, il peut ne pas être pertinent d'utiliser les données les plus anciennes. Hanson et al. (2010) ont démontré que pour de nombreux biomarqueurs appliqués sur la perche *Perca fluviatilis*, il était plus pertinent d'utiliser une référence multi sites qu'une référence temporelle basée sur de nombreuses données historiques.

En conclusion, la référence et la connaissance de sa variabilité permettent par définition d'éviter faux négatifs ou faux positifs et de révéler une exposition à un ou plusieurs contaminants dans des situations peu contrastées au sens de la contamination. Plusieurs auteurs (Ham et al., 1997 ; Sanchez et al., 2008) ont montré que le suivi temporel de la réponse du biomarqueur dans un milieu non contaminé était une des manières les plus pertinentes d'établir une référence, bien que les autres approches soient complémentaires.

1.1.4. Signification d'un biomarqueur

Un des objectifs majeurs de l'écotoxicologie est d'intégrer toutes les informations depuis la source de pollution jusqu'aux conséquences au niveau des populations afin d'atteindre une échelle pertinente en terme de fonctionnalité des écosystèmes (Newman et Clements, 2008). Au delà des effets avérés sur la cellule, le tissu ou l'individu, il s'agit de savoir si ces effets peuvent être traduits à un niveau d'organisation biologique supérieur, par exemple si une perturbation biochimique aura à long terme des conséquences néfastes sur la fitness de l'organisme voire des conséquences sur la population. Donner un sens écologique à la réponse du biomarqueur valide son utilité pour l'évaluation du risque environnemental. Pourtant, si la valeur prédictive du biomarqueur est l'aspect le plus important, c'est aussi le plus polémique. Le pouvoir prédictif du biomarqueur tient au fait que la réponse sub-individuelle, plus précoce et sensible que la réponse individuelle ou populationnelle, pourrait avoir des conséquences à des niveaux biologiques supérieurs. Toutefois, le caractère même de ce lien est ambigu. S'agit-il de lien empirique, mécanistique, ou de corrélations utilisant un faisceau d'évidence pour appuyer la signification du biomarqueur en terme d'effet ? Comprendre la signification de la réponse d'un biomarqueur couvre deux aspects. Comme indiqué dans la figure I-5, il est possible, pour comprendre la signification d'un biomarqueur, de comparer les effets d'un contaminant à plusieurs niveaux d'organisation biologique et de corrélérer ces réponses. La deuxième démarche, récente et encore relativement peu appliquée, consiste à établir des liens mécanistiques et statistiques entre les niveaux d'organisation.

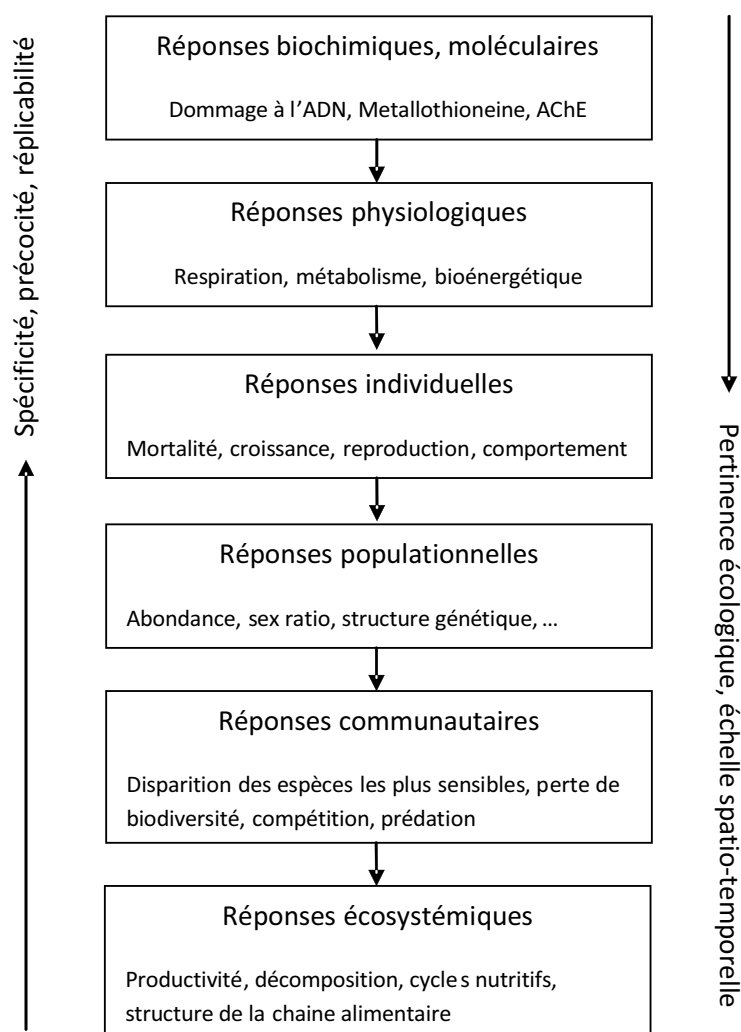


Figure I-5 : Relations entre les différents niveaux d'organisation biologique : pertinence écologique, échelle spatio-temporelle et spécificité intrinsèque (d'après Lagadic et al., 1997 ; Clements, 2000).

1.1.4.1. Corrélation entre plusieurs niveaux d'organisation biologique

Le premier point à vérifier pour donner un sens biologique à la réponse du biomarqueur est que le niveau de contamination du milieu est tel qu'il entraîne des effets toxiques pour l'organisme, c'est à dire que la réponse du biomarqueur ne révèle pas seulement une exposition à un contaminant mais qu'elle peut être interprétée en terme d'effet. Cette définition de la signification n'a pas vraiment d'aspect prédictif mais elle prouve que l'exposition à un contaminant a des conséquences néfastes pour l'organisme. Une fois la **relation entre**

exposition et effet établie, il est possible d'établir un seuil au delà duquel les effets sur la santé de l'organisme sont avérés.

Les approches par l'établissement de corrélations entre niveaux biologiques peuvent aider à comprendre les conséquences d'une contamination. Clements (2000) propose comme alternative à l'absence de lien, l'étude simultanée des réponses des biomarqueurs et des réponses individuelles ou populationnelles à un contaminant. Dans cette démarche, Schlenk et al., 1996 ont proposé de corrélérer la mesure de la concentration en cytochrome P450 1A hépatique, de l'activité EROD ainsi que le dosage de l'ARNm codant pour une métallothionéine chez plusieurs espèces de poissons à un indice de santé des poissons et des paramètres de populations ou de communautés, comme l'abondance, la diversité, le pourcentage de sujets tolérants, le pourcentage d'espèces tolérantes et l'indice de Shannon Weaver. Certains des paramètres ont permis d'établir des corrélations significatives entre les niveaux d'organisation biologique. Les auteurs concluent que la corrélation de plusieurs biomarqueurs et de bioindicateurs peut servir à une évaluation adéquate des effets de la contamination sur la santé des organismes, mais ne permet pas nécessairement de prévoir les effets sur les populations ou les communautés.

Cette approche rejoint celle de Rose et al. (2006) qui ont évalué la réponse de plusieurs biomarqueurs (marqueur d'apoptose, dosage de métallothionéine), réponses physiologiques (taux d'alimentation, consommation d'oxygène) et trait de vie (croissance) de larves de poissons (*Atherinops affinis*) exposées à du cadmium afin d'établir des corrélations entre ces réponses. Les auteurs concluent que cette approche permet de déterminer un caractère prédictif des biomarqueurs concernant un effet sur la fitness des organismes. Toutefois, dans ces études, aucun lien mécanistique n'explique ces corrélations. Ces approches par l'établissement de corrélations ne permettent pas d'affirmer qu'il existe une relation de causalité entre les niveaux d'organisation. A une échelle globale, même si une portion notable des individus est affectée par une pollution et que cet impact peut être mis en évidence par la mesure de plusieurs biomarqueurs, cela ne signifie pas nécessairement que les caractéristiques essentielles au maintien de la population concernée vont être modifiées. En effet, la dynamique de population va être affectée par les interactions avec les facteurs physiques et chimiques du milieu, avec les proies et les prédateurs et/ou les parasites, avec d'autres populations appartenant au même niveau trophique (compétition) et les interactions entre individus au sein de la population considérée. Hors, tous ces paramètres ne peuvent pas être pris en compte simultanément sauf

dans de très lourdes approches intégrées qui ne sont pas réalistes dans le cadre de la surveillance des milieux.

1.1.4.2. Pertinence écologique du biomarqueur

Le manque d'études établissant un lien clair et irréfutable entre réponse du biomarqueur et effet individuel a engendré de nombreuses critiques mettant à mal l'idée que le biomarqueur puisse être prédictif. Pour Forbes et al. (2006), la prédictivité du biomarqueur est nulle en l'absence de preuve directe de liens. Les auteurs proposent comme alternative le développement de modèles prédictifs basés sur les performances individuelles et qui intègrent les réponses de l'individu aux différents stades du cycle de vie. C'est pour palier à ces critiques qu'une autre approche a récemment été adoptée. Elle repose sur l'établissement de liens mécanistiques quantifiables, permettant de vérifier les hypothèses sur lesquelles se fonde le changement d'échelle, et de plus en plus sur des modèles statistiques et numériques prédictifs (Allen et Moore, 2004).

Il existe peu de données quant à la relation entre réponse biochimique et conséquence au niveau individuel et populationnel. Il est admis qu'une diminution de la fertilité, de la fécondité et de la croissance peut être considérée comme significative dans l'évaluation du risque pour la population ou la communauté, même si la démonstration n'est pas totalement faite qu'une propriété caractéristique du niveau populationnel ou communautaire soit affectée (Amiard et Amiard-Triquet, 2008). La reproduction, le comportement, le développement et la croissance sont autant de traits de vie permettant de relier les effets d'une contamination à différents niveaux organisationnels. Ainsi, Xuereb et al. (2009) ont clairement démontré qu'une inhibition de l'AChE chez *Gammarus fossarum* entraînait une diminution de l'alimentation et de l'activité locomotrice. Cette étude a permis d'interpréter une inhibition de l'AChE en terme d'effet au niveau individuel. Chez *Gammarus pulex*, le taux d'alimentation a été comparé à la vitesse de décomposition de la litière et à certains aspects de la structure et du fonctionnement des communautés d'invertébrés (Maltby et al., 2002). Un lien fort entre le taux d'alimentation *in situ*, la décomposition de la matière organique, et la diversité des macroinvertébrés et l'indice biotique a été démontré. Le test d'alimentation a donc été proposé comme un indicateur précoce des réponses à une contamination au niveau des communautés et de l'écosystème.

La connaissance d'un lien entre la réponse du biomarqueur et une fonction biologique permet une prédiction à un niveau d'organisation supérieur (sub-individu/individu). Pour Amiard et Amiard-Triquet, 2008, les perturbations dues aux polluants aux niveaux individuels et sub-individuels qui paraissent avoir le plus de chance d'être liées à des effets aux niveaux d'intégration biologique supérieurs sont toutes celles qui vont affecter la reproduction. Ainsi, Miller et al. (2007) ont montré que les effets de différents contaminants (composés androgéniques et anti-androgéniques) sur les taux de vitellogénine et sur la fertilité du vairon à tête de boule ont pu être utilisés pour modéliser l'impact sur les populations. Lewis et Galloway (2009) ont établi un lien statistique entre dommages à l'ADN des spermatozoïdes du ver *Arenicola marinus* et de la moule *Mytilus edulis* et un développement anormal des embryons issus de ces spermatozoïdes comme indicateur d'une perturbation de la fonction de reproduction. La reproduction étant un processus clé dans la conservation de l'espèce, des effets au niveau populationnel sont vraisemblables. Toutefois, il faut souligner que la prédiction des conséquences sur les populations et les communautés passent également par la connaissance des ressources trophiques du milieu, des mécanismes d'adaptation, de régulation ou de densité dépendance, qui ne sont pas intégrés dans ces études (Flammarion, 2002).

L'interprétation de la réponse du biomarqueur permet de toute évidence d'améliorer l'évaluation des risques environnementaux en proposant des relations de cause à effet pour lesquelles il est alors possible d'établir un seuil au delà duquel un risque environnemental peut être encouru.

Synthèse de la partie 1

L'utilisation des biomarqueurs pour l'évaluation de la qualité biologique des hydrosystèmes

Biomarqueur : changement mesurable au niveau moléculaire ou cellulaire mettant en évidence l'exposition ou les effets d'un ou plusieurs polluants et permettant d'appréhender les mécanismes d'action du contaminant. Il doit être :

sensible, c'est-à-dire révéler l'exposition d'un organisme à une matrice contaminée,

pertinent, ce qui implique la connaissance et la compréhension de la variabilité naturelle de la réponse et de l'influence des facteurs confondants non toxiques et l'établissement d'un niveau de base,

signifiant en termes d'effets délétères pour l'individu,

prédictif, *i.e.* permettant un changement d'échelle biologique et/ou spatiotemporelle.

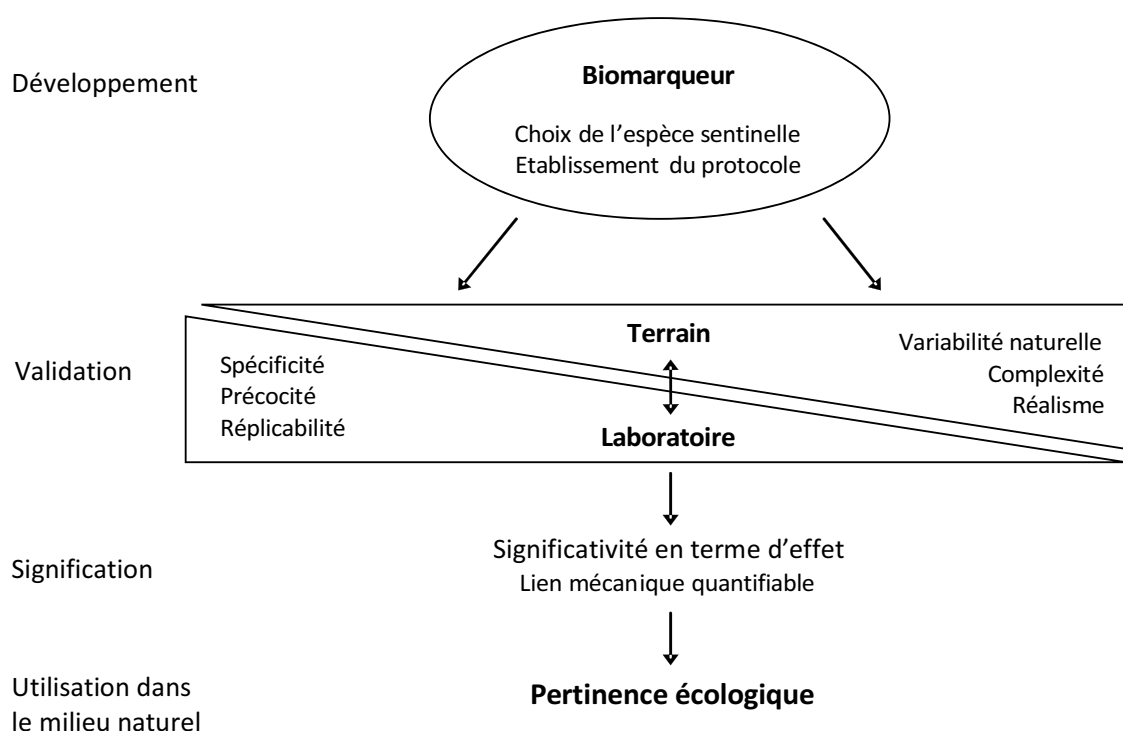


Figure I-6 : Etapes du développement d'un biomarqueur dans l'évaluation de l'état écologique du milieu aquatique (d'après Lagadic et al., 1997 ; Caquet et al., 2000 ; Amiard et Amiard-Triquet, 2008).

1.2. La génotoxicité : sources, conséquences et évaluation

La molécule d'ADN, support physique de l'hérédité, assure le fonctionnement cellulaire de tout organisme et permet à la cellule d'être réactive aux messages de son environnement. Elle assure la transmission des informations en général, mais elle peut également transmettre des informations « toxiques ». Ainsi, parmi les contaminants potentiels de la biosphère, ceux qui peuvent interagir directement ou indirectement avec le matériel génétique présentent un intérêt d'étude tout particulier car ils peuvent interférer avec l'ensemble du métabolisme cellulaire et conduire à la transmission d'informations erronées, entraînant des perturbations au niveau du cycle cellulaire, de la croissance, de la différenciation. La définition de la génotoxicité telle qu'établie par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC, 1992) inclut à la fois des effets directs et indirects sur l'ADN tels qu'une induction de mutations (géniques, chromosomiques, génomiques, par recombinaison), des événements indirectement associés à la mutagenèse (synthèse non programmée de l'ADN ou échange de chromatides sœurs), des modifications de la structure primaire de l'ADN (cassures, adduits) pouvant conduire à des mutations. Ces modifications peuvent en théorie affecter plusieurs niveaux d'organisation biologique, de la molécule à la population en affectant des fonctions telles que le développement, la reproduction, et la survie des individus et ainsi compromettre la dynamique de croissance des populations (Vasseur et al., 2008). L'exposition à des génotoxiques peut également entraîner une perte de la diversité génétique totale pouvant avoir des implications à long terme sur les populations naturelles (Würgler et Kramers, 1992 ; Anderson et Wild, 1994).

1.2.1. Dommages et sources de génotoxiques

Par définition, les génotoxiques sont des agents physiques ou chimiques capables d'induire des modifications génétiques dans des cellules vivantes. (Würgler et Kramers, 1992). Dans l'environnement, l'ADN peut être endommagé par de nombreux facteurs, même endogènes à la cellule du fait par exemple d'erreurs lors de la réplication, d'erreurs de réparation, de mutations spontanées (instabilité de certaines liaisons). Si un certain nombre de composés peuvent

exprimer directement leur génotoxicité, d'autres ont un effet génotoxique indirect et ils nécessitent l'action d'agents physiques (radiations ionisantes, radiations UV) ou biologiques (production de métabolites et d'intermédiaires métaboliques réactifs) (Eastman et Barry, 1992). Des exemples de facteurs environnementaux naturels ou anthropiques à l'origine de dommages à l'ADN sont détaillés ci après et résumés dans la figure I-7.

- **Radiations ionisantes**

L'exposition aux radiations ionisantes (cosmiques et radionucléides) provient du rayonnement extraterrestre et de la radioactivité naturelle de la terre ou de sources anthropiques. Elles sont responsables de la formation de molécules excitées et ionisées entraînant divers types de dommages, directs ou indirects et sont les principales sources de cassures double brins (Frankenberg-Schwager, 1990).

- **Radiations UV**

Les photoproduits issus de radiations UV sont principalement des liaisons covalentes entre pyrimidines adjacentes. Elles sont également responsables de la formation de liaisons entre protéines et ADN et dans des situations où l'ADN est extrêmement compacté comme dans les spermatozoïdes, des liaisons inter brins (cross-link) ont été observées (Love et al., 1986).

- **Agents alkylants**

Les agents alkylants sont des composés électrophiles avec une forte affinité pour le centre nucléophile des macromolécules organiques. Au laboratoire, de nombreux agents alkylants simples sont utilisés (MMS, EMS, MNNG, MNU). D'autres agents utilisés en chimiothérapie contre le cancer (Melphalan, Chlorambucil, Cyclophosphamide, Mitomycine C, Carboplatine, Cisplatine, moutardes à l'azote, Dacarbazine, Procarbazine) (Lawley et Phillips, 1996) peuvent se retrouver dans l'environnement via les rejets hospitaliers, décrits comme sources de substances génotoxiques par plusieurs auteurs (Jolibois et Guerbet, 2006). On trouve également des sources naturelles d'agents alkylants dans l'environnement : le chlorométhane, agent génotoxique abondant issu de la combustion de biomasse vivante, ou synthétisé par des

microorganismes et des algues marines. Enfin, des agents alkylants peuvent être produit par voie métabolique et par les réactions de peroxydation lipidique (alkyles radicalaires en non radicalaires) (Friedberg et al., 2006).

- **Agents « liants » (liaisons intra et inter brins)**

Ces agents, lorsqu'ils sont responsables de liaisons inter brins peuvent totalement bloquer la réplication et la transcription de l'ADN. Pour ces raisons, ils sont souvent utilisés pour la chimiothérapie (sels de platine, Mitomycine). L'acide nitreux, formé à partir des nitrites en condition acide (par exemple dans l'estomac) est une source endogène importante de liaisons inter brins. Enfin, les aldéhydes que l'on peut retrouver dans les matières plastiques, les colorants et les solvants contribuant également à la formation de liaison inter et intra brins sont très largement distribués dans le milieu aquatique.

- **Espèces réactives de l'oxygène (ROS) et métabolites électrophiles (RES)**

La fonction biologique des systèmes enzymatiques au niveau du réticulum endoplasmique de la cellule, tels que les cytochromes P-450, est de convertir de potentiels toxiques lipophiles non polaires en une forme soluble excrétable. Si la plupart de produits de réactions sont inoffensifs pour la cellule, certains peuvent être activés en composés électrophiles extrêmement réactifs vis-à-vis de l'ADN. Du fait de leur réactivité, ils engendrent des dommages à l'ADN très divers (Figure I-7). C'est le cas par exemple des amines aromatiques issus des produits phytosanitaires, pesticides et insecticides (Guengerich, 2000). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques et le benzène (monocyclique) sont des composés produits lors de la combustion de la matière organique et forment après métabolisation des époxydes électrophiles très réactifs pouvant former des adduits à l'ADN. La séparation des adduits de l'ADN par fragilisation au site d'attachement ou par réparation incomplète peut être à l'origine de sites abasiques alcali-labiles qui se traduisent par des cassures des brins (Nacci et al., 1996). Le benzo(a)pyrène, oxydé par une mono-oxygénase à cytochrome P450 en BP-oxydes peut être hydrolysé en BP-dihydrodiols. S'il est à nouveau oxydé, le métabolite qui en résulte, le dihydrodiolépoxyde est un des plus prompt à former des adduits. Le pouvoir génotoxique de ces composés a été largement prouvé chez de nombreuses espèces et quel que soit le compartiment (eau : Reynaud et Deschaux, 2006 ;

sol : White et Claxton, 2004 ; air : Claxton et Woodall, 2007). Il a été montré que les dommages à l'ADN induits par les ROS sont un des mécanismes impliqués dans la formation de tumeurs cancéreuses chez les populations de poissons exposés à des polluants organiques tels que les HAPs et les PCBs (Livingstone et al., 2000 ; Cajaraville et al., 2003). Dans le milieu aquatique, les métaux lourds représentent une source majeure de génotoxicité par génération de ROS au niveau des mitochondries et du réticulum endoplasmique.

• **Intercalants**

Les agents intercalants jouent un rôle majeur dans les processus de mutagenèse et de cancérogenèse. Beaucoup de ces agents sont sous forme particulaire, rejetés dans l'atmosphère. L'acroléine, présent dans la fumée de cigarette est un aldéhyde bien connu pour ces propriétés mutagènes et cancérogènes.

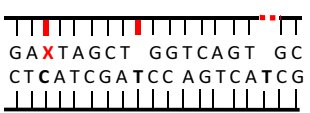



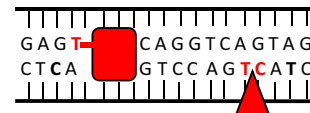
Dommages à l'ADN engendré par		Type de lésions	Processus de réparation
ROS Radiation ionisantes Agents alkylants	 <pre> G A X T A G C T G G T C A G T G C C T C A T C G A T C C A G T C A T C G </pre>	Modification de base Site abasique Cassure simple brin	Réparation par excision de base BER
UV Sels de platine HAP ROS	 <pre> G A G T C G C C T A G G T C T T G C C T C A G C G G A T C C A G A A C G </pre>	Lien intra brins Dimère de pyrimidines	Réparation par excision de nucléotides NER
Erreur de réplication	 <pre> G A G T G G C T A G G T C A G T G C C T C A T C G A T C C A G T C A T C G </pre>	Mauvaise assortiment de base Insertions/Délétions	Réparation des mésappariements MMR
ROS, UV Radiation ionisantes Agents alkylants Sels de platine	 <pre> G A G T A G C T A G G T C A A G C C T C A T C G A T C C A G T T C G </pre>	Liaisons inter brins Cassure double brins	Réparation recombinatoire NHEJ, HR
Aldéhydes Psoralènes HAP	 <pre> G A G T C A G G T C A G T A G C T C A G T C C A G T C A T C </pre>	Adduits à l'ADN Intercalation	Réparation par excision

Figure I-7 : Principaux types de dommages à l'ADN causés par des agents exogènes ou endogènes, ainsi que les potentiels processus de réparation (d'après Houtgraaf et al., 2006).

Le milieu aquatique est sévèrement contaminé par les agents génotoxiques. Ces agents sont issus des rejets partiellement traités ou non traités provenant de l'industrie chimique (pétrochimie, raffineries, aciéries, teintureries, fabrication de résines et de composés organiques), des retombées atmosphériques, du lessivage des sols agricoles, des rejets de stations d'épuration domestiques ou hospitaliers (Ohe et al., 2004). Les volumes rejetés par les STEP sont largement supérieurs aux volumes des rejets industriels. En conséquence, la charge génotoxique provenant des stations d'épuration des eaux usées municipales est souvent supérieure à celle des installations industrielles (White et Rasmussen, 1998). Ces auteurs ont mis en évidence une forte corrélation entre un accroissement démographique, certaines activités humaines et la génotoxicité des eaux de surface. Plusieurs métaux lourds, dont l'origine peut être naturelle (fonds géochimiques) ou anthropique (lixiviats de terrils, aciéries, fonderies, usines de traitement de surface) tels que l'arsenic, le plomb, le chrome, le nickel et le cadmium sont bien connus pour leur pouvoir génotoxique, *in vitro* et *in vivo* et leur toxicité a été étudiée dans de nombreux grands fleuves et rivières (Saint Laurent, Gange, Mississipi, Amazone, Rhin, Rhône...). Houk a proposé en 1992 une classification du pouvoir génotoxique des principaux rejets industriels. Cette classification est présentée dans le tableau I-1.

Tableau I-1 : Classification du pouvoir mutagène de quelques effluents industriels (magnitude de 10 entre les réponses génotoxiques) (Houk, 1992).

Pouvoir mutagène	Industries
Extrêmement élevé	Production de furazolidone, du nitrofurural
Elevé	Usine de pâte à papier Four à coke Industrie chimique : composés organiques nitrogènes Industrie chimique : composés organiques
Modéré	Résine époxy et teinture Industrie pharmaceutique Raffinerie
Faible	Fonderie Blanchiment du papier Rejet traité d'usine de pâte à papier
Sous le seuil de détection	Galvanoplastie Rejet de production de PVC

Les rejets agricoles sont également une source non négligeable de génotoxicité dans le milieu aquatique, par lessivage des sols, une mauvaise pratique agricole ou par rejet accidentel (Aina et al., 2008). Certains pesticides organochlorés et organophosphorés et insecticides ont été au centre d'études à large échelle comme le chlordécone, le parathion, le lindane, l'atrazine et le DDT (Caquet et al., 1992 ; Evrard et al., 2010).

Au bilan, il a été montré que le milieu aquatique, plus particulièrement les eaux de surface reçoivent de grande quantité d'effluents génotoxiques. Récemment, l'évaluation du potentiel génotoxique des eaux souterraines a révélé une contamination organique (amines) entraînant des dommages à l'ADN sur des lymphocytes humains (Rajaguru et al., 2002). L'irrigation des sols agricoles par des effluents domestiques et industriels a été corrélée à une augmentation du pouvoir génotoxique de la fraction liquide des sols (Aleem et Malik, 2003). Ces études montrent que la dispersion dans l'environnement de substances génotoxiques est un problème majeur, qui touche tous les compartiments et qui peut avoir des répercussions à la fois sur le biote du milieu aquatique et sur la santé humaine.

1.2.2. Les outils d'évaluation de la génotoxicité dans le milieu aquatique

Le suivi des altérations structurelles et/ou fonctionnelles de l'ADN est un outil informatif des niveaux d'exposition voire d'effet dans le cadre d'une démarche d'évaluation des risques écotoxicologiques. L'évaluation de la génotoxicité des eaux de surface peut être divisée en 2 approches : la première repose sur la mise en oeuvre d'essais bactériens, tels que le test d'Ames, le SOS chromotest et le SOS/umu test ; la deuxième est basée sur l'utilisation d'essais sur organismes et plantes aquatiques, tels que la mesure d'adduits par post marquage au ^{32}P , l'essai micronoyau, le test Comet et l'élution alcaline. Ces derniers ont l'avantage de pouvoir être réalisés au laboratoire ou avec des organismes directement prélevés sur un site contaminé.

L'utilisation des essais sur bactéries reste encore aujourd'hui largement privilégiée pour évaluer la génotoxicité des eaux de surface et en particulier leur pouvoir mutagène (Figure I-8). Mais les études d'évaluation du risque écotoxicologique se doivent de considérer l'impact génotoxique sur des espèces d'intérêt écologique. C'est pourquoi, de nombreuses méthodes permettant d'évaluer cet impact directement sur les organismes ont été développées et validées.

Elles ont aujourd'hui une place importante dans les programmes de surveillance de la qualité du milieu aquatique.

Dans cette partie, seules les techniques utilisées sur les organismes aquatiques, et plus particulièrement les invertébrés, dans le cadre de biosurveillance environnementale ou d'évaluation des risques sont présentées. Pour les invertébrés, des tableaux de synthèse bibliographique sont fournis. Les techniques abordées sont les suivantes : la mesure des adduits à l'ADN, l'étude cytogénétiques des aberrations mitotiques et plus particulièrement le test des micronoyaux, la mesure des bases oxydées, les techniques d'élution alcaline et du test Comet et les nouvelles techniques de biologie moléculaire.

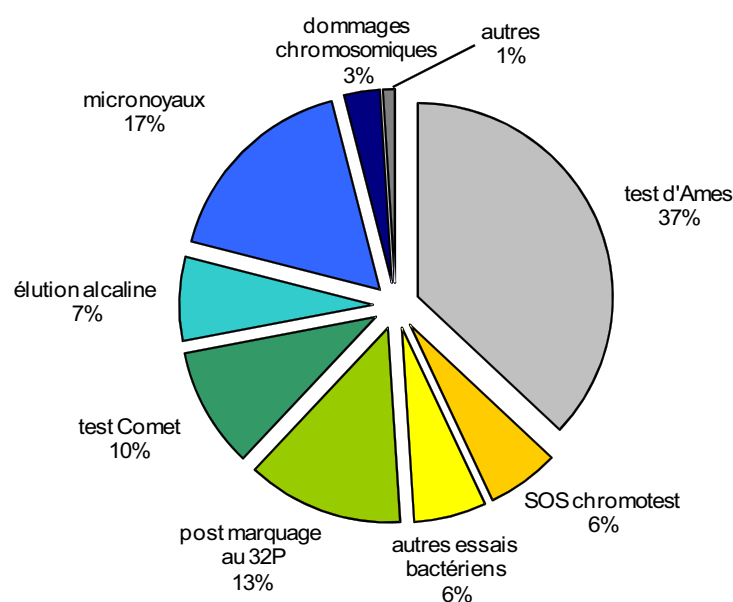


Figure I-8 : Tests utilisés pour évaluer la mutagénicité et la génotoxicité de l'eau de surface. Pourcentage calculé sur 128 publications scientifiques parues depuis 1990 (Ohe et al., 2004).

- **Adduits à l'ADN**

La présence d'adduits à l'ADN est souvent impliquée dans l'initiation de la cancérogénèse et les méthodes ont d'abord été développées dans le but d'étudier le potentiel cancérogène d'une

molécule chez les mammifères. Aujourd'hui elles permettent d'évaluer un impact génotoxique sans connaissance a priori du caractère cancérigène des polluants présents. Plusieurs méthodes sont disponibles pour mettre en évidence la présence d'adduits. Les techniques d'immunohistologie permettent un dosage sensible et une grande spécificité mais nécessitent l'utilisation d'anticorps préparés contre des adduits spécifiques, ce qui limite leur utilisation. La spectrométrie de masse a été utilisée pour détecter des adduits, mais cette technique se heurte également à la difficulté d'identifier la structure de l'adduit.

La technique de post-marquage au ^{32}P permet la mesure de niveau très bas d'adduits, et sa sensibilité peut être augmentée via un enrichissement en nucléosides avant le marquage. Les nucléotides normaux (A, T, G, C) sont séparés des adduits par chromatographie et les adduits sont détectés par autoradiographie. Les polluants de type HAP figurent parmi les facteurs de risque identifiés et cette technique a été validée en tant que biomarqueur d'exposition aux HAP sur plus de 28 espèces de poissons téléostéens (Vasseur et al., 2008). La technique de post-marquage au ^{32}P a été mise en œuvre pour examiner les relations entre la formation d'adduits et la voie d'exposition aux polluants aquatiques (Potter et al., 1994), pour la biosurveillance des milieux aquatiques et très souvent lors d'accidents pétroliers. Si la mesure est bien standardisée et spécifique, de fortes différences de sensibilité ont été relevées chez des espèces sympatriques comme la plie et la sole, mais aussi au sein d'une même espèce en fonction de paramètres abiotiques tels que la température (Shugart, 1990) et en fonction de paramètres biotiques comme le sexe, l'âge et le statut reproducteur (Akcha et al., 2004). A ce jour, cette technique a été appliquée sur un nombre restreint d'invertébrés et principalement des bivalves *Mytilus edulis* (Solé et al., 1996 ; Ericsson et al., 2002 ; Bocquené et al, 2004), *Mytilus galloprovincialis* (Bodin et al., 2004 ; Pisoni et al., 2004) et *Dreissena polymorpha* (LeGoff et al, 2006 ; Rocher et al., 2006) (Tableau I-2).

Tableau I-2 : Principaux invertébrés aquatiques sur lesquels a été appliquée la méthode de post-marquage au ³²P pour l'étude des adduits à l'ADN.

Essai	Milieu	Organisme	Espèce	Conditions d'exposition	Référence
Post-marquage au ³² P	Marin	Moule	<i>Perna viridis</i>	HAP/écosystème côtier	Xu et al., 1999
			<i>Mytilus edulis</i>	Accident pétrolier	Solé et al., 1996
			<i>Mytilus edulis</i>	Accident pétrolier	Bocquené et al., 2004
			<i>Mytilus edulis</i>	Accident pétrolier	Harvey et Parry 1997
			<i>Mytilus edulis</i>	BaP	Akcha et al., 2000
			<i>Mytilus edulis</i>	Seine	Rocher et al., 2006
			<i>Mytilus edulis</i>	Islande	Ericsson et al., 2002
			<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Génotoxiques modèles	Canova et al., 1998
			<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Cote Méditerranée	Bodin et al., 2004
			<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Golfe de Taranto (Italie)	Pisoni et al., 2004
			<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Lagune de Venise	Venier et Zamperion 2005
	Dulçaquicole	Moule	<i>Dreissena polymorpha</i>	Seine	Rocher et al., 2006
			<i>Dreissena polymorpha</i>	Seine/Somme	LeGoff et al., 2006
		Ecrevisse	<i>Orconectes limosus</i>	Meuse	Schilderman et al., 1999

- **Etudes cytogénétiques et micronoyaux**

Dès 1982, les aberrations mitotiques ont été utilisées pour la biosurveillance environnementale (Kocan et al., 1979). Aujourd'hui, les aberrations chromosomiques, structurales ou numériques, les échanges de chromatides sœurs et les micronoyaux sont des essais largement utilisés pour la détection du potentiel génotoxique du milieu aquatique.

Les aberrations chromosomiques sont provoquées par des agents clastogènes qui peuvent modifier le nombre de chromosomes ou leur structure. L'ADN de cellules en métaphase ou en anaphase est coloré puis observé en microscopie. Cette mesure est plus rarement utilisée *in vivo*.

Le test d'échange des chromatides sœurs (SCE) est réalisé par incorporation d'un analogue de la thymidine, marquage et observation après un deuxième cycle de réplication. Ce test rapide

et peu coûteux a surtout fait l'objet de validation chez le poisson (Alink et al., 2007) mais a aussi été développé chez quelques invertébrés comme le ver marin *Platynereis dumerilii* (Jha et al., 1996) et la moule *Mytilus edulis* (Dixon et al., 1985).

La technique la plus utilisée sur invertébrés pour la surveillance du milieu aquatique est la technique des micronoyaux (Tableau I-3). La formation de micronoyaux a lieu pendant l'anaphase. Un morceau de chromatine présente un retard de migration du fait d'un dysfonctionnement du fuseau achromatique ou de cassures de chromosomes suite à l'action d'un contaminant. Ce fragment, apparaissant comme un petit noyau secondaire est observé après coloration ou marquage fluorescent de la chromatine en microscopie. La mesure de micronoyaux peut également se faire en cytométrie. Cette technique utilisée dans les érythrocytes de poisson prend aujourd'hui une part importante dans les programmes d'évaluation génotoxique. Elle a fait l'objet d'une normalisation chez le triton (AFNOR 1992) et est couramment utilisée chez les amphibiens (larves de xénopes par exemple) (Mouchet et al., 2006). Ce test a également été validé chez des invertébrés marins et dulçaquicoles, notamment les bivalves (Mersch et Beauvais, 1997 ; Pavlica et al., 2000 ; Gorbi et al., 2008). Les principaux inconvénients sont la nécessité d'analyser un grand nombre de cellules et le fait que l'apparition du micronoyau nécessite un index mitotique suffisant. Toutefois, le micronoyau est un dommage irréversible qui ne peut pas être soumis à réparation et constitue donc un dommage génotoxique grave ce qui confère à ce test un intérêt marqué, en particulier en écotoxicologie aquatique.

Tableau I-3 : Principaux invertébrés aquatiques sur lesquels ont été appliquées des méthodes d'études cytogénétiques et des micronoyaux.

Essai	Milieu	Organisme	Espèce	Conditions d'exposition	Référence
Micronoyaux	Marin	Moule	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Golfe d'Oristano (Sardaigne)	Magni et al., 2006
			<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Rivière Cecina (estuaire)	Nigro et al., 2006
			<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Plateforme offshore	Gorbi et al., 2008
		Huitre	<i>Crassostrea gigas</i>	BaP, effluents de la seine	Burgeot et al., 1995
		Palourde	<i>Macoma balthica</i>	Hexabromo cyclododecane	Smolarz et Berger, 2009
	Dulçaquicole	Moule	<i>Dreissena polymorpha</i>	Triclosan	Binelli et al., 2009
			<i>Dreissena polymorpha</i>	Effluents industriels	Mersch and Beauvais, 1997
			<i>Dreissena polymorpha</i>	Decabromodiphenyl ether	Riva et al., 2007
			<i>Unio pictorum</i>	Rivières Sava et Drava	Stambuck et al., 2009
		Ecrevisse	<i>Procambarus clarkii</i>	Potassium dichromate	De la sierra et al., 2003
		Escargot	<i>Planorbarius corneus</i>	Pentachlorophenol	Pavlica et al., 2000
		Planaire	<i>Girardia tigrina</i>	Cuivre	Knakievicz et Ferreira, 2008
SCE	Marin	Moule	<i>Mytilus edulis</i>	Sédiments (port)	Jha et al., 2000
			<i>Mytilus edulis</i>	Sites contaminés	Dixon et Pascoe, 1994
			<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Bromodeoxyuridine	Pasantes et al., 1996
		Polychète	<i>Nephtys incisa</i>	Sédiments (port)	Pesch et al., 1987
Néoplasie	Marin	Huitre	<i>Crassostrea virginica</i>	Sédiments (port)	Gardner et al., 1991
Aberration chromosomique	Marin	Moule	<i>Mytilus spp</i>	Sédiments (port)	Jha et al. 2000
		Oursin	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Baie de San Francisco	Hose, 1994
Pontage ADN-protéine	Marin	Oursin	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Arsenic, nickel, chrome	Garman et al., 1997

- **Mesure de cassures simple et double brins**

Les cassures de brins sont des dommages fréquents qui peuvent être facilement détectés par plusieurs techniques. De nombreux dommages peuvent être convertis en coupures en utilisant

des conditions de pH adéquates (conditions alcalines pour détecter les sites alcali labiles) ou par la réparation incomplète de l'ADN.

L'élution alcaline est une élution sur membrane filtrante à pH alcalin. Les cellules sont incubées en présence de thymidine tritiée, ou avec un colorant pour une mesure en fluorimétrie. Après séparation des deux brins d'ADN et centrifugation, l'échantillon est passé sur une colonne. La vitesse d'élution de l'ADN simple brin étant proportionnelle à sa taille, un taux d'élution différentiel rend compte du nombre de cassures simple brin (Kohn et al., 1973).

Le déroulement alcalin est basé sur une propriété de fluorescence différentielle en fonction du poids moléculaire de l'ADN double brin (ADN_{ds}) et de l'ADN simple brin (ADN_{ss}). La molécule d'ADN est déroulée en conditions alcalines, puis soniquée pour éviter sa renaturation. Si l'ADN est endommagé il y aura un nombre plus élevé de points de déroulement et donc une quantité plus importante d' ADN_{ss} . On calcule une valeur F qui correspond à la fraction d'ADN total sous forme double brins. Le nombre de cassures est calculé en rapportant la quantité d' ADN_{ds} restant à la quantité d' ADN_{ds} présente dans le témoin. Shugart (1988) a examiné par cette méthode l'intégrité de l'ADN du foie de perches exposées pendant 40 jours à du BaP. Cette méthode a également été utilisée avec succès chez des bivalves marins (tableau I-4).

L'essai de translation de coupure ou Nick translation est basé sur l'incorporation de nucléotides marqués au niveau des cassures simple brin par l'intervention de la polymérase 1. C'est une méthode de réparation de l'ADN. Si cette technique a été utilisée avec succès sur hépatocytes de truite (Gagné et Blaise, 1995), elle est très rarement utilisée chez les invertébrés. De plus, sa sensibilité est limitée car elle ne permet pas l'expression des sites alcali labiles. L'essai de précipitation de l'ADN, mesurant des cassures simple et double brins peut être une technique complémentaire à la précédente, puisqu'elle repose également sur l'incorporation de thymidine marquée. Elle est rapide, peu coûteuse et permet d'analyser de nombreux échantillons simultanément et son seuil de sensibilité est similaire à celui de l'élution alcaline (détection de 1 cassure/ 10^{11} Da).

L'électrophorèse sur gel d'agarose emploie le principe de la migration de fragments d'ADN soumis à un champ électrique. La distance moyenne de migration est déterminée, proportionnelle au nombre de dommages simple et double brins en conditions alcalines et est comparée à des témoins de migration. A pH neutre, seules les cassures double brins sont détectées. La difficulté de cette méthode est d'utiliser une quantité d'ADN correcte afin de ne pas sous estimer ou sur estimer la longueur moléculaire moyenne. Cette technique est plus intéressante que celles

présentées précédemment pour l'évaluation génotoxique du milieu naturel (Theodorakis et al., 1994) mais elle est plus coûteuse car elle nécessite un système d'analyse d'image plus sophistiqué. Les différentes espèces d'invertébrés aquatiques pour lesquelles ces techniques ont été appliquées sont présentées dans le tableau I-4.

Actuellement en écotoxicologie, la technique de mesure des cassures de l'ADN la plus utilisée est le test Comet. Ce test ayant été utilisé dans notre travail, fait l'objet d'une présentation spécifique dans la partie I.2.4 de ce chapitre.

Tableau I-4 : Principaux invertébrés aquatiques sur lesquels ont été appliquées différentes techniques de mesure des cassures simple et double brin de l'ADN.

Essai	Milieu	Organisme	Espèce	Conditions d'exposition	Référence
Elution alcaline	Marin	Moule	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	BaP, 4-NQO	Bihari et al., 1990
			<i>Mytilus galloprovincialis</i>	BaP	Herbert et Zahn, 1990
		Concombre de mer	<i>Holothuria tubulosa</i>	BaP	Bihari et Fafandel, 2004
		Araignée de mer	<i>Maja crispata</i>	BaP	Bihari et al., 1992
	Dulçaquicole	Moule	<i>Corbicula fluminea</i>	Acétylaminofluorène	Waldmann et al., 1996
Déroulement alcalin	Marin	Moule	<i>Mytilus edulis</i>	Port et estuaire	Nacci et Nelson, 1992
			<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Sulfate de diméthyle	Accomando et al., 1991
			<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Dimethyl benzantracene	Bolognesi et al., 1996
		Huitre	<i>Crassostrea virginica</i>	Port et estuaire	Nacci et Nelson, 1992
		Pétoncle	<i>Chlamys farreri</i>	BaP	Jing-Jing et al., 2009
Electrophorèse sur gel d'agarose	Marin	Moule	<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Pression hydrostatique	Dixon et al., 2004
			<i>Perna viridis</i>	Eaux côtières (Honk Hong)	Siu et al., 2008
			<i>Mytilus edulis</i>	Perturbateurs endocriniens	Taban et al., 2008
		Huitre	<i>Crassostrea virginica</i>	Estuaire	Nacci et al., 1992
		Gammare	<i>Gammarus locusta</i>	Cuivre et rayons X	Costa et al., 2002
		Eponge	<i>Suberites domuncula</i>	Cadmium	Schroder et al., 1999
		Etoile de mer	<i>Asteria rubens</i>	Mer du Nord	Everaarts, 1997
	Dulçaquicole	Moule	<i>Anodonta grandis</i>	Plomb	Black et al., 1996

- **Bases oxydées**

Les bases oxydées apparaissent après exposition à un contaminant responsable de dommages oxydatifs. La 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxodGua) et son nucléoside correspondant (8-oxo-7,8-dihydroxyguanosine (8-oxodGuo) sont les marqueurs les plus étudiés car les produits majoritaires de l'oxydation de l'ADN. La mesure présente un intérêt notable du fait de sa signification biologique et des conséquences cellulaires éventuelles si le dommage n'est pas réparé. L'oxydation du nucléoside guanosine peut conduire à une transversion G:C en A:T, qui est une lésion hautement mutagène. De plus, les inductions de 8-oxodGuo ont été associées à des anomalies de développement et à des mortalités embryonnaires (Pagano et al., 2001).

La 8-oxodGuo peut être mesurée par plusieurs techniques, par HPLC, GC-MS, immunohistochimie, post-marquage au ³²P (Collins, 2000). Il a également été proposée une modification du test Comet, couplé à la glycolase formamidopyrimidine (Fpg). L'enzyme, en coupant la liaison glycosidique ou la base qui présente une anomalie, entraîne une coupure supplémentaire révélé par le test Comet. En comparant les niveaux de dommages obtenus avec et sans Fpg, il est possible de déterminer la part de dommages oxydatifs dans le taux total de cassures (Emmanouil et al., 2007). Toutes ces techniques ne présentent pas les mêmes seuils de détection ni la même sensibilité et une forte variabilité analytique a été démontrée par Collins (2000) qui révèle que les méthodes utilisées par plus de la moitié des laboratoires ayant analysés des échantillons de cellules humaines contenant un taux anormal de 8-oxodGuo ne permettaient pas de détecter de dose-réponse. De plus, des artéfacts d'oxydation peuvent se produire lors de l'extraction de l'ADN et au cours de la préparation des échantillons. Malgré ces difficultés, la mesure de 8-oxodG a été réalisée avec succès chez plusieurs invertébrés aquatiques (voir Tableau I-5).

Tableau I-5 : Principaux invertébrés aquatiques sur lesquels a été appliquée la mesure de bases oxydées de l'ADN par l'évaluation du taux de 8-oxodGuo (d'après Vasseur et al., 2008 et Lemièrre, 2004).

Essai	Milieu	Organisme	Espèce	Conditions d'exposition	Reference
8-OH-dGuo	Marin	Moule	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	BaP	Canova et al., 1998
			<i>Mytilus galloprovincialis</i>	BaP	Akcha et al., 2000
			<i>Mytilus edulis</i>	Site contaminé (mer d'Irlande)	Emmanouil et Chipman, 2008
			<i>Perna perna</i>	Site contaminé (Brésil)	Almeida et al., 2003
		Oursin	<i>Sphaerechinus granularis</i>	Tamoxifène	Pagano et al., 2001
		Huitre	<i>Saccostrea commercialis</i>	Site contaminé (Australie)	Avery et al., 1996
	Euryhalin	Moule	<i>Mytella guyanensis</i>	Rivière Ratones (Brésil)	Torres et al., 2002
	Dulçaquicole	Moule	<i>Unio tumidus</i>	Site contaminé (Moselle)	Charissou et al., 2004
			<i>Unio tumidus</i>	BaP, Fe ²⁺	Lemièrre et al., 2005

- **Techniques de biologie moléculaire et mutations**

Les lésions à l'ADN si elles ne sont pas réparées ou réparées de façon incomplète peuvent modifier la transcription des gènes. Avec l'apparition de nouvelles technologies, il est désormais possible de comprendre le changement de la structure d'un gène et son expression lorsqu'ils sont modulés par un stress de nature anthropique. Le profil d'expression des gènes a été proposé comme moyen d'étude du mécanisme d'action des contaminants au niveau moléculaire. La première technique de protéomique utilisée en écotoxicologie est l'électrophorèse 2D couplée à des marqueurs spécifiques. La spectrométrie de masse a été rapidement utilisée pour identifier des spots de protéines. Bjornstad et al. (2006) ont ainsi observé une altération de l'expression des protéines plasmatiques chez *Mytilus edulis* suite à une exposition chronique d'alkylphénols et de HAP. Les puces à ADN (DNA microarrays ou macroarrays) qui permettent de balayer un grand nombre de gènes sont de plus en plus développées pour pouvoir interpréter la réponse génétique à une modification de l'environnement. Toutefois cette technique reste très onéreuse et les données sont difficilement interprétables. On peut toutefois citer quelques exemples d'organismes invertébrés pour lesquels les puces à ADN ont été utilisées pour l'évaluation environnementale : le mollusque *Mytilus galloprovincialis* (Venier et al., 2003), le cladocère

Daphnia magna (Soetaert et al., 2006) et différentes espèces de coraux (Edge et al., 2005). Des scénarios d'exposition plus réalistes et tentant de relier réponse moléculaire à des conséquences écologiques ont récemment été appliqués chez des poissons et invertébrés. Denslow et al. (2004) ont montré que l'exposition de mâles et femelles de black bass (*Micropterus salmoides*) à des effluents d'usines de pâte à papier entraînait une diminution de l'expression de gènes normalement sur-exprimés pendant la vitellogénèse chez la femelle et une induction des CYP1A chez le mâle (technique de differential display RT-PCR, et expression des ARNm de la vitellogénine par Northern blot). L'observation des profils RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) permet également de détecter des dommages génomiques après exposition à des substances génotoxiques de l'environnement. Cette technique a été utilisée avec succès chez la daphnie et la moule *Mytilus galloprovincialis* (Atienzar et Jha, 2006).

Les mutations sont des événements qui peuvent être une des conséquences des dommages à l'ADN. Les mutations géniques correspondent à des modifications de séquence des gènes et constituent des accidents de copie des bases. Elles se produisent lors de la réparation ou de la réplication de l'ADN. Elles sont détectables par des techniques de biologie moléculaire et les mutations intervenant sur certains gènes, comme le p53 (une mutation de ce gène est corrélée à une prédisposition au cancer) ont été détectées chez le flet en milieu contaminé (Cachot et al., 2004, Vincent-Hubert, 2000). Actuellement, ces techniques restent encore très coûteuses et peu ont fait l'objet d'une validation *in situ*. Il est encore difficile d'évaluer leur pouvoir discriminant et leur variabilité intrinsèque et celle liée à des facteurs environnementaux.

La grande majorité des marqueurs de génotoxicité applicables sur invertébrés ont d'abord été développés en milieu marin et chez les bivalves, notamment pour des espèces d'intérêt économique comme les huîtres, ou pour leur fonction biologique de filtreur (*Mytilus spp*). Bien que l'utilisation des biomarqueurs de génotoxicité sur invertébrés soit relativement récente comparée à d'autres modèles de vertébrés comme le poisson, son intérêt dans le cadre de programmes de surveillance du milieu aquatique est aujourd'hui largement vérifié (Galloway et al., 2004 ; Jha, 2008). Parmi toutes les techniques disponibles pour évaluer un impact génotoxique, peu ont été utilisées avec des arthropodes, alors que l'étude de cet embranchement présente un intérêt majeur pour la surveillance à long terme de la qualité écologique d'un milieu, du fait du rôle central de certains taxons dans le fonctionnement de l'écosystème.

1.2.3. Le test Comet

Le test Comet est une méthode sensible et rapide pour détecter les dommages primaires à l'ADN. Son utilisation s'est très rapidement généralisée pour évaluer la génotoxicité des polluants au laboratoire et sur le terrain. L'essai repose sur une microélectrophorèse de noyaux de cellules isolées, en conditions alcalines en gel d'agarose sur lames de microscope. C'est un essai applicable à de nombreux types cellulaires qui ne nécessite qu'un faible nombre de cellules. Le test des comètes apparaît aujourd'hui comme une technique efficace et sensible d'étude des dommages à l'ADN dans le domaine de l'écotoxicologie.

1.2.3.1. Historique

C'est en 1978 que la première quantification de dommages à l'ADN sur cellules isolées a été réalisée. Rydberg et Johanson (1978) ont observé les dommages à l'ADN en lysant des cellules de mammifères incluses dans de l'agarose en conditions alcalines pour permettre le déroulement de la molécule d'ADN. En marquant l'ADN à l'acridine orange, ils ont quantifié avec un photomètre les dommages à l'ADN en rapportant la quantité d'ADN fluorescent en vert (ADN double brin) de la quantité fluorescent en orange (simple brin). Toutefois, le nom d'essai Comet est attribué à Ostling et Johanson qui en 1984 développent le premier essai d'électrophorèse sur microgel en conditions neutres. L'ADN est chargé négativement, ainsi, plus il sera endommagé, plus il migrera vers l'anode. L'image obtenue ressemble à une comète avec une tête distincte représentée par l'ADN nucléaire non endommagé et une queue contenant les fragments endommagés voire détachés du noyau (Figure I-9). En conditions neutres, l'essai permet de détecter uniquement les cassures double brins. En introduisant la technique en conditions alcalines en 1988, Singh, McCoy, Tice and Schneider ont permis la détection des cassures double brins, simple brin et des lésions labiles alcalines (à $\text{pH} > 13$). Elle permet de détecter de faible niveau d'endommagement avec une grande sensibilité. Ce protocole, historiquement appliqué en écotoxicologie aquatique chez le poisson (Deventer, 1996 ; Devaux et al., 1997 ; Belpaeme et al., 1998) est aujourd'hui le plus utilisé car il est polyvalent et permet une grande souplesse de mise en œuvre.

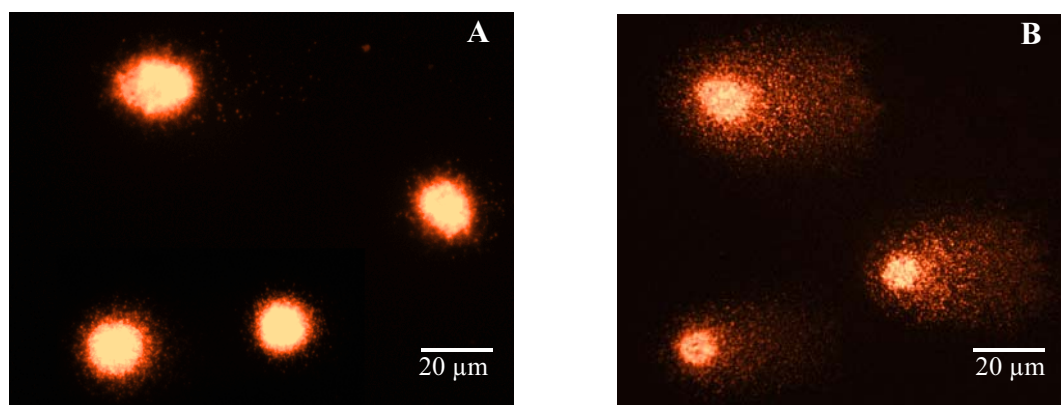


Figure I-9 : Exemple d'observations de noyaux de cellules non endommagés (A) et endommagés (B). Exposition *in vitro* d'hémolymphe de *G. fossarum* au PBS (A) et à 10 mM de MMS (B).

1.2.3.2. Avantages et inconvénients

La flexibilité et la diversité d'utilisation de l'essai Comet démontrées depuis 20 ans, rendent cette technique de plus en plus populaire. Les avantages de l'essai sont nombreux :

- Il permet l'obtention de données au niveau de la cellule comme entité individuelle permettant une analyse statistique robuste
- un nombre de cellules restreint par échantillon est nécessaire (moins de 10000), avec la possibilité de miniaturiser l'essai pour encore réduire le nombre de cellules
- il présente une bonne sensibilité pour mesurer différents types de dommages et étudier les capacités de réparation de la cellule
- il est possible d'utiliser n'importe quelle cellule nucléée eucaryote (voire certains procaryotes), *in vitro* et *in vivo*, que ce soit des cellules de populations humaines exposées à un environnement génotoxique ou des organismes aquatiques pour évaluer la qualité écologique d'un milieu (Collins et al., 1997; Dixon et al., 2002; Lee and Steinert, 2003; Jha, 2004)
- il ne nécessite pas de connaître le caryotype de la cellule ni son cycle cellulaire
- il ne nécessite pas l'utilisation de radioéléments
- il est moins coûteux que d'autres techniques d'évaluation de la génotoxicité telles que les aberrations chromosomiques et l'échange de chromatides sœurs (Dhawan et al., 2009).

L'essai Comet est recommandé par de nombreux auteurs pour les études réglementaires et tend à remplacer certains tests plus traditionnels comme le test réglementaire UDS sur cellules hépatiques (Tice et al., 2000 ; Hartmann et al., 2003 ; Burlinson et al., 2007).

Le principal inconvénient de cette technique est de travailler sur une suspension cellulaire. En effet, la dissociation des tissus (branchies, foie, glandes digestives...) ou la récupération de cellules en culture peuvent provoquer des dommages artéfactuels et un bruit de fond élevé. Il est donc nécessaire de valider préalablement les conditions d'isolement des cellules pour chaque type cellulaire nouveau et/ou organisme nouveau à l'étude. Cet outil, dans sa version de base, ne permet pas de connaître précisément le mode d'action d'un composé génotoxique. Enfin, le manque de standardisation du protocole et les différentes possibilités d'exprimer les résultats rendent parfois difficile la comparaison entre les laboratoires, y compris pour une même espèce, certains paramètres pouvant même donner lieu à de faux positifs (Belpaeme et al., 1998).

1.2.3.3. Protocole

Le protocole le plus utilisé est réalisé en conditions alcalines. Après vérification de la viabilité cellulaire de l'échantillon, la suspension cellulaire de cellules isolées est déposée sur une lame de microscope préalablement couverte d'un gel d'agarose. Les membranes et le matériel intracellulaire sont détruits chimiquement (étape de lyse) dans un tampon contenant des détergents et une forte concentration en sel, de façon à obtenir des nucléoïdes contenant l'ADN nucléaire super enroulé. Dans une cuve à électrophorèse, les lames sont mises à incuber dans de la soude pour permettre le déroulement de l'ADN par rupture des liaisons hydrogènes (étape de déroulement alcalin). L'application d'un champ électrique permet alors la migration de l'ADN, chargé négativement, vers l'anode (étape de migration). La vitesse de migration de l'ADN étant fonction de la taille des brins, les petits brins migreront plus rapidement que les grands et le nucléoïde rond s'étirera sous forme d'une comète d'où le nom de l'essai. Une étape de neutralisation à pH 7 est nécessaire pour retrouver une conformation bicaténaire de l'ADN permettant un marquage de l'ADN avec un intercalant de bases (étape de neutralisation). Les lames sont ensuite déshydratées dans l'éthanol afin de permettre leur conservation jusqu'à observation au microscope à épifluorescence. Il est alors possible de révéler les dommages par un agent fluorescent intercalant comme le bromure d'éthydiu.

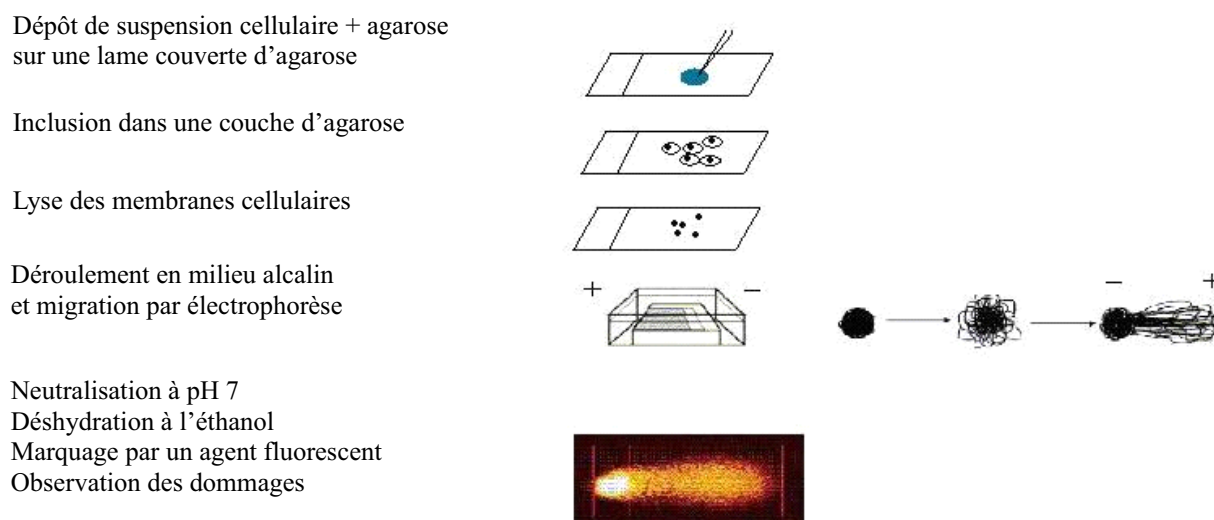


Figure I-10 : Illustration des étapes du protocole du test Comet en conditions alcalines.

La quantification de l'ADN présent dans la queue de la comète permet d'évaluer la quantité d'ADN endommagé. De nombreux paramètres permettent de quantifier ces dommages, mais le manque de standardisation dans l'expression des données limite la possibilité de comparer les valeurs entre laboratoires. La quantification peut se faire manuellement ou à l'aide d'un logiciel d'images. L'observation manuelle repose sur un tri des noyaux en 5 classes de morphologie, relative à la longueur et à l'intensité de fluorescence de la queue. Les comètes sont classées de 0 à 4, 0 étant la valeur attribuée à des cellules non endommagées, 4 à des cellules ayant le maximum de dommages. Ensuite les résultats sont donnés sous le nom de Comet score qui représente le pourcentage de cellules de chaque classe multiplié par la classe.

$$\text{Comet score} = \sum_{n=0}^4 (\% \text{ de cellules de la classe } n) \times n.$$

Une alternative à cette méthode manuelle est l'utilisation de logiciels d'analyse d'images qui permettent une bonne discrimination des dommages. Ces logiciels calculent plusieurs paramètres (une trentaine) pour chaque cellule comme la distance de migration, la longueur et l'intensité de la queue de la comète et de la tête (Figure I-11). Les paramètres les plus utilisés sont le pourcentage d'intensité dans la queue de la comète (noté % tail DNA) et le paramètre « tail moment », égal à la longueur de la queue x l'intensité relative dans la queue (Kumaravel et Jha, 2006).

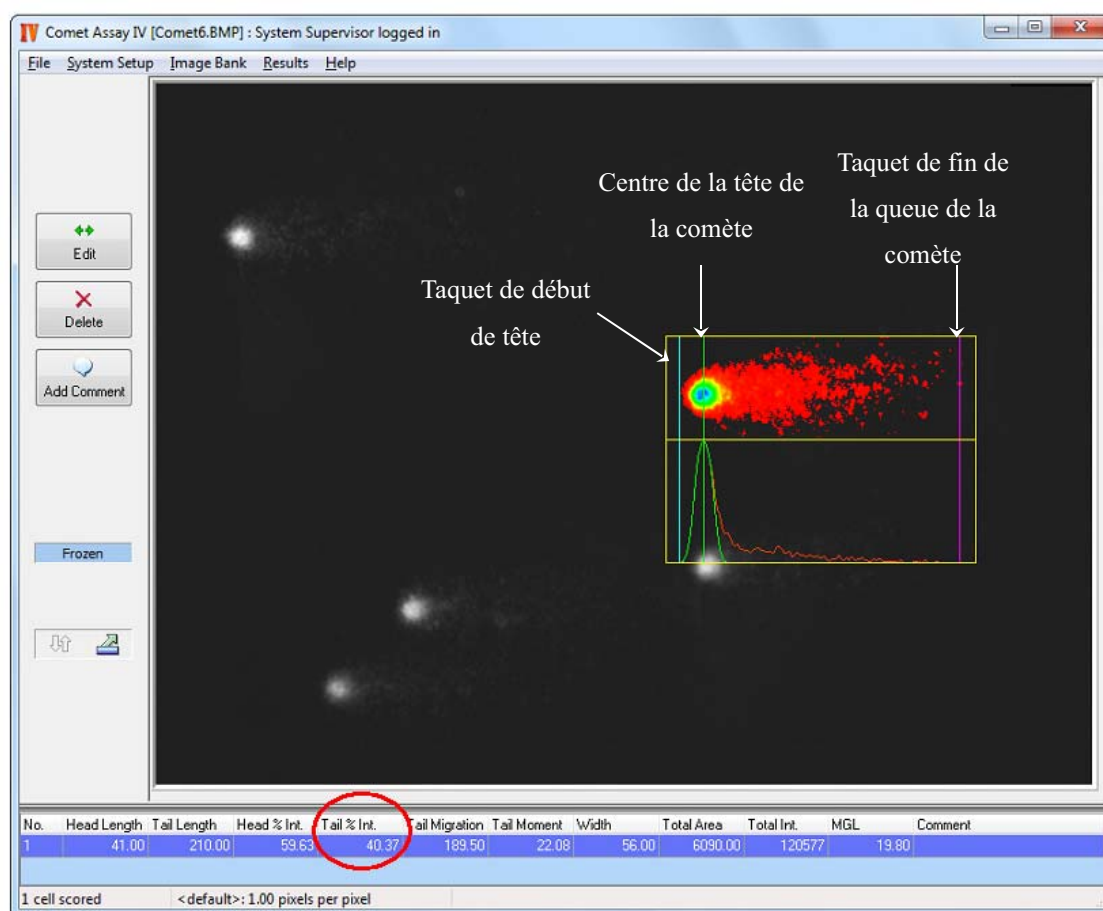


Figure I-11 : Le logiciel Comet Assay IVTM de Perceptive Instruments calcule des paramètres de mesure des dommages à l'ADN basés sur l'intensité de fluorescence des brins et leur dispersion.

1.2.3.4. Nature des dommages

Le test Comet permet de quantifier les cassures simple et double brins de l'ADN mais traduit aussi d'autres lésions telles que les modifications de bases (alkylation, oxydation, désamination), la présence de sites abasiques (en conditions alcalines, ces sites sont labiles, on parle de sites alcali-labiles), l'intercalation d'un xénobiotique, la formation d'adduits, les liaisons intrabrins (dimère de pyrimidines) et interbrins (Eastman et Barry, 1992).

A pH < 9, seules les cassures double brins sont détectées (Singh, 2000).

A $\text{pH} < 12,1$ on observe les cassures simple et double brins du fait de la dénaturation des liaisons hydrogène de la double hélice (Miyamae et al. 1997).

A $\text{pH} > 13$ les cassures simple, double brins et les sites alcali labiles sont mis en évidence.

L'apoptose et la nécrose des cellules peuvent également être étudiées, ainsi que les pontages à l'ADN (cross-link), visualisés par une diminution de la migration de l'ADN (Singh, 2000).

En combinant l'essai Comet avec certaines enzymes bactériennes comme la glycosylase formamidopyrimidine (fpg), spécifique aux purines oxydées, l'endonucléase III reconnaissant les bases pyrimidiques oxydées, la 3-méthyladénine glycosylase II, ou la T4 endonucléase V (spécifique des dimères de pyrimidines) il est possible d'augmenter le taux de migration de l'ADN en lien avec le type de dommages dont l'enzyme est spécifique et ainsi de déterminer le mécanisme d'action principal d'un contaminant (Collins, 2004). Ces modifications de protocole permettent une meilleure spécificité de l'essai pour un type particulier de dommages. Cela augmente également le seuil de détection de certains dommages, notamment dans le cas de contamination environnementale à faible dose, et offre des possibilités très intéressantes dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique (Akcha et al., 2003). En combinant la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) à l'essai comète, des séquences ou des gènes spécifiques sont mis en évidence et localisés dans la partie endommagée (la queue de la comète) ou non endommagée (la tête de la comète). Ce couplage est essentiellement utilisé en tests cliniques pour diagnostiquer la chimio-sensibilité d'un patient (Kumaravel and Bristow, 2005).

1.2.3.5. Applications du test Comet

Le test Comet est utilisé aussi bien au laboratoire que pour des applications dans le milieu naturel sur un très grand nombre d'espèces, de la bactérie à l'homme (Figure I-12).

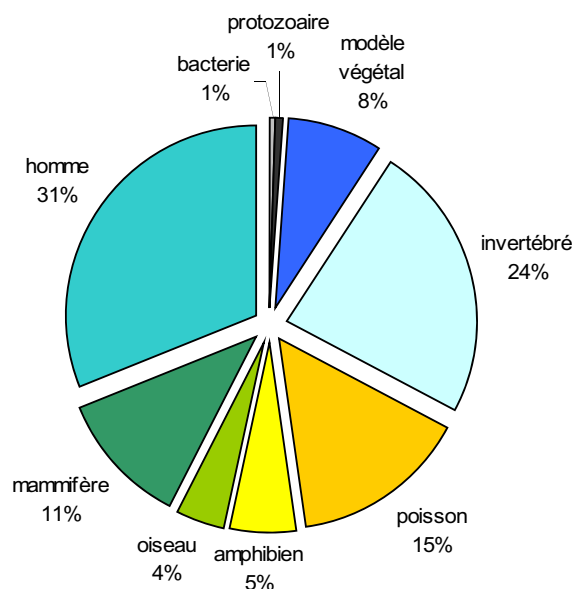


Figure I-12 : Utilisation de l'essai comète pour différents modèles, de la bactérie à l'homme (d'après Dhawan et al., 2009).

Depuis plus de 15 ans, le test Comet a été appliqué à de nombreux organismes aquatiques, marins et dulçaquicoles au travers d'études *in vitro*, *in vivo* et *in situ*. Parmi les organismes aquatiques pour lesquels l'essai a été adapté on trouve les oligochètes, les polychètes, les planaires, les cnidaires, les insectes, les crustacés, les bivalves, les gastéropodes, les échinodermes, les poissons, les amphibiens et les mammifères (Jha, 2008).

Au laboratoire, deux approches sont appréhendées, *in vitro* et *in vivo*. L'application du test Comet sur des lignées cellulaires réservée il y encore quelques années au domaine clinique s'est étendue au domaine de l'écotoxicologie aquatique car elle offre notamment la possibilité de déterminer le potentiel génotoxique d'une substance seule ou d'un effluent plus complexe sans prélèvement invasif sur l'organisme expérimental, suivant ainsi le « concept des trois R », en anglais Reduction, Refinement, Replacement, développé par Russel et Burch (1959) et les

recommandations de l'ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods). Hormis l'investissement nécessaire initialement pour mettre en place la lignée cellulaire, son maintien est relativement peu coûteux et à long terme les coûts d'expérimentation sont ainsi réduits. Enfin, la lignée cellulaire permet une standardisation plus aisée (Kosmehl et al., 2004). Que ce soit par le biais de lignées cellulaires ou par des expositions *in vitro*, sur une suspension cellulaire prélevée sur un organisme, ces conditions contrôlées permettent l'étude des relations dose-effet, de la réparation, des mécanismes d'action des génotoxiques tout en limitant le volume d'effluent génotoxique utilisé pour l'exposition.

In vivo, au laboratoire, le test Comet a été appliqué pour déterminer le mécanisme d'action d'un génotoxique ou pour évaluer le potentiel génotoxique de matrices environnementales complexes comme les rejets industriels, urbains et agricoles ou des sédiments (Clément et al., 2004 ; Mouchet et al., 2005 ; Bony et al., 2010).

De part sa sensibilité et sa rapidité de mise en œuvre, le test Comet est aussi largement utilisé dans des études de terrain, pour déterminer le potentiel génotoxique d'un milieu dans des conditions environnementales réalistes. Par cette approche, il est possible d'expliquer des phénomènes complexes intervenant sur la réponse biologique à un stress génotoxique comme l'influence de facteurs abiotiques (température, équilibre calco-carbonique, photopériode,...) (Buschini et al., 2003 ; Andrarde et al., 2004 ; Rank et al., 2007) et biotiques (statut reproducteur, âge, sexe,...) (Akcha et al., 2004), ainsi que l'influence des cycles saisonniers (Shaw et al., 2000 ; Bocchetti et al., 2008).

Les études s'intéressant au développement de l'essai Comet sur le modèle poisson sont d'abord des études en milieu dulçaquicole. Les études *in situ* ont été conduites dans le but d'évaluer le potentiel génotoxique de rejets industriels, domestiques ou agricoles (Devaux et al., 1998 ; Bombail et al., 2001 ; Bony et al., 2008). De nombreux types cellulaires ont été investigués, permettant une comparaison intertissulaire (Sumathi et al., 2001). Parmi les types cellulaires somatiques investigués on trouve des cellules fluitantes comme les érythrocytes et les leucocytes faciles à collecter, les cellules branchiales directement en contact avec le milieu naturel, les hépatocytes, les cellules rénales et les cellules intestinales dont l'utilisation est justifiée par leur fonctions métaboliques et physiologiques (Nacci et al., 1996; Belpaeme et al., 1998). L'évaluation de la génotoxicité sur les spermatozoïdes est particulièrement pertinente du

fait de leur implication dans la fonction de reproduction (Labbé et al., 2001; Zilli et al., 2003). En fonction du type cellulaire étudié, le protocole de l'essai Comet sera plus ou moins modifié. Ainsi, l'utilisation du sperme demande, en fonction de l'espèce étudiée, des modifications de l'étape de lyse ou de l'étape de déroulement du fait de l'extrême compaction de la chromatine résultant du remplacement des histones par les protamines. L'ajout de protéinase K dans la solution de lyse, une lyse de plusieurs heures ou un temps de déroulement plus long sont les modifications les plus couramment apportées. Une synthèse des modifications du protocole du test Comet appliqué aux spermatozoïdes est présentée en annexe I. Chez le poisson, l'utilisation du test Comet a également été validé en complément d'autres biomarqueurs physiologiques ou génétiques permettant d'apporter une réponse plus globale à un stress génotoxique dans le milieu naturel (Larno *et al.*, 2001; Flammarion *et al.*, 2002; Evrard *et al.*, 2010).

De nombreuses revues (Mitchelmore et Chipman, 1998 ; Cotelle et Féraud, 1999, Dixon et al., 2002 ; Lee et Steinert, 2003 ; Jha 2008 ; Frenzilli et al., 2009 ; Dhawan et al., 2009), ainsi que les tableaux 6 et 7 mettent en évidence le fait que le test Comet peut être appliqué sur de nombreuses espèces d'invertébrés. Toutefois, les organismes du milieu marin sont largement plus représentés que les organismes dulçaquicoles. De plus, les bivalves tels que les moules, huîtres et palourdes sont les organismes majoritairement étudiés. Ces organismes ont été préférentiellement choisis pour évaluer le potentiel du test Comet pour des applications de biomonitoring. En effet, leur biomasse est importante, ils jouent un rôle important dans le bon fonctionnement de l'écosystème par leur fonction de filtreur, ils peuvent accumuler fortement les contaminants et les métaboliser et ils présentent des avantages d'ordre méthodologique : ils sont faciles à collecter et sessiles. Les études de terrain sont essentiellement réalisées par des méthodes de transfert avec encagement des individus sur différents sites. Il convient de souligner que les niveaux de dommages dans les organismes de référence ou les organismes « contrôle » sont très variables. Il est intéressant de constater que des organismes prélevés dans un site propre et engagés dans un site contaminé peuvent exprimer plus de dommages à l'ADN que les organismes autochtones du site contaminé (Large et al., 2002 ; Shaw et al., 2002). Des phénomènes d'adaptation due à des mécanismes de réparation, de défense ou d'excrétion cellulaire plus efficaces, mais également des phénomènes de sélection génétique peuvent expliquer ce résultat.

Le choix du type cellulaire est un aspect important dans le développement du protocole de l'essai Comet. Dans la plupart des cas, c'est un tissu fluide, pouvant être collecté facilement qui est choisi. Chez les invertébrés aquatiques, les cellules de l'hémolymphe sont les plus utilisées. Ce type cellulaire est privilégié pour les études de terrain car son prélèvement est rapide et non invasif et permet donc un suivi des individus au cours du temps (Mitchelmore et Chipman, 1998). D'autres tissus comme les branchies et les glandes digestives sont également couramment employés. Wilson et al. (1998) recommande l'utilisation des glandes digestives, organe de métabolisation par excellence, pour le screening de molécules ou d'effluents susceptibles d'être rejetés dans l'environnement couplée à l'introduction d'antioxydant dans la suspension cellulaire pour diminuer le niveau de dommages basal chez les témoins. Plus rarement, les cœlomocytes et les embryons (broyat total) peuvent être utilisés. Il est important que le type cellulaire choisi présente un niveau bas de dommages à l'ADN dans les organismes témoins, que les cellules soient faciles à collecter et en nombre suffisant et que la population de cellules mise en suspension soit homogène ou que les cellules d'intérêt puissent être discriminées des autres types cellulaires.

Dans les tableaux 6 et 7 ci après, est présentée une revue concernant l'application du test Comet sur invertébrés aquatiques marins et dulçaquicoles, précisant les types cellulaires étudiés. D'autres informations comme la durée du maintien des organismes au laboratoire après prélèvement sur un site propre ou leur provenance de l'aquaculture sont fournies. Le niveau de dommages mesurés dans les contrôles pour un type d'exposition donnée ainsi que le paramètre choisi pour exprimer les résultats sont également indiqués.

Tableau I-6 : Application du test Comet chez les invertébrés marins : types cellulaires, paramètres d'observation et niveaux de base (la définition de chacun des paramètres de mesure est définie à la fin des tableaux I-7 et I-8).

Organisme	Espèce	Type cellulaire	Paramètre du test Comet	Durée de l'acclimatation au laboratoire	Type d'exposition	Durée de l'exposition	Valeur du contrôle	Référence
Moule	<i>Mytilus Edulis</i>	Hémolymph	% tail DNA	2 semaines	<i>In vivo</i>	7 jours	6%	Hagger et al., 2005
	<i>Mytilus Edulis</i>	Hémolymph	% tail DNA	1 semaine	<i>In vivo</i>	96 h	9%	Jha et al., 2005
	<i>Mytilus Edulis</i>	Hémolymph	% tail DNA	-	<i>In vivo</i>	5 semaines	8%	Taban et al., 2004
	<i>Mytilus Edulis</i>	Hémolymph	% tail DNA	10 jours	<i>In vivo</i>	7 jours	10%	Mamaca et al., 2005
	<i>Mytilus Edulis</i>	Hémolymph	% tail DNA	Elevage au laboratoire	<i>In vivo</i>	10 jours	10-15%	Emmanouil et al., 2007
	<i>Mytilus Edulis</i>	Hémolymph	% tail DNA	2 semaines	<i>In vivo</i>	3 jours	9.8%	Tran et al., 2007
	<i>Mytilus Edulis</i>	Hémolymph	% tail DNA	1 jour	<i>In vivo</i>	24 h	13 %	Pruski et Dixon, 2003
	<i>Mytilus Edulis</i>	Hémolymph	Tail length (µm)	30 jours	<i>In situ</i>	32 jours	11.5 ± 2.4	Steinert et al., 1998
	<i>Mytilus edulis</i>	Hémolymph	Tail moment	-	<i>In situ</i>	4 jours	2.08 ± 3.4	Rank and Jensen, 2003
	<i>Mytilus edulis</i>	Hémolymph	DNA migration	-	<i>In vivo</i>	11 jours	23 µm	Hamoutene et al., 2002
	<i>Mytilus Edulis</i>	Glande digestive	DNA migration	-	<i>In vivo</i>	11 jours	27 µm	Hamoutene et al., 2002
	<i>Mytilus Edulis</i>	Glande digestive	% tail DNA	Elevage au laboratoire	<i>In vivo</i>	7 jours	21%	Large et al., 2002
	<i>Mytilus edulis</i>	Glande digestive	% tail DNA	1 jour	<i>In vitro</i>	1 h	10-16 %	Mitchelmore et al., 1998
	<i>Mytilus edulis</i>	Branchies	% de cellules non endommagées	-	<i>In vivo</i>	1 h	>90%	Wilson et al., 1998
	<i>Mytilus Edulis</i>	Branchies	% tail DNA	1 jour	<i>In vivo</i>	24 h	22 %	Pruski et Dixon, 2003

Organisme	Espèce	Type cellulaire	Paramètre du test Comet	Durée de l'acclimatation au laboratoire	Type d'exposition	Durée de l'exposition	Valeur du contrôle	Référence
Moule	<i>Mytilus Edulis</i>	Branchies	Tail moment	-	<i>In situ</i>	4 jours	1.22 ± 1.47	Rank and Jensen, 2003
	<i>Mytilus Edulis</i>	Gonade mâle	Tail length (µm)	30 jours	<i>In situ</i>	32 jours	18.3 ± 7.9	Steinert et al., 1998
	<i>Mytilus Edulis</i>	Spermatozoïdes	% tail DNA	-	<i>In vivo</i>	3 jours	5%	Lewis and Galloway, 2009
Moule	<i>Perna viridis</i>	Hémolymphes	% tail DNA	7 jours	<i>In vivo</i>	12 jours	22%	Siu et al. 2004
	<i>Perna viridis</i>	Gonade mâle	% de cellules endommagées	-	<i>In vivo</i>	16 jours	5%	Nagarajappa et al., 2006
	<i>Brachiodontes exustus</i>	Hémolymphes	Tail length	-	<i>In vivo</i>			Sastre et al., 2005
	<i>Limnoperna fortunei</i>	Hémolymphes	Comet score	7-20 jours	<i>In vivo</i>	7 jours	11-15%	Villela et al., 2007
Huître	<i>Crassostrea gigas</i>	Embryons	% tail DNA	Elevage au laboratoire	<i>In vivo</i>	20 hours	23%	Wessel et al., 2007
	<i>Crassostrea gigas</i>	Spermatozoïdes	% d'intensité de la comète	Aquaculture	<i>In vitro</i>	cryopréservation	82%	Gwo et al., 2003
	<i>Crassostrea virginica</i>	Hémolymphes	Olive tail moment	2 semaines	<i>In vivo</i>	6 semaines + 96 h	2.7	Christl et al., 2004
Palourde	<i>Crassostrea virginica</i>	Hémolymphes	% tail DNA	Aucun	<i>In vitro</i>	20 min	1.5	Gielazyn et al., 2003
	<i>Mercenaria mercenaria</i>	Hémolymphes	% tail DNA	Aquaculture	<i>In vitro</i>	20 min	1	Gielazyn et al., 2003
	<i>Mya arenaria</i>	Hémolymphes	DNA migration	-	<i>In vivo</i>	11 jours	31 µm	Hamoutene et al., 2002
	<i>Mya arenaria</i>	Glande digestive	DNA migration	-	<i>In vivo</i>	11 jours	21 µm	Hamoutene et al., 2002
	<i>Tapes semidecussatus</i>	Hémolymphes	% tail DNA	2 semaines (élevage)	<i>In vivo</i>	21 jours	10-15%	Hartl et al., 2004
	<i>Tapes semidecussatus</i>	Branchies	% tail DNA	2 semaines (élevage)	<i>In vivo</i>	21 jours	20-24%	Hartl et al., 2004
	<i>Tapes semidecussatus</i>	Glande digestive	% tail DNA	2 semaines (élevage)	<i>In vivo</i>	21 jours	18-20%	Hartl et al., 2004

Organisme	Espèce	Type cellulaire	Paramètre du test Comet	Durée de l'acclimatation au laboratoire	Type d'exposition	Durée de l'exposition	Valeur du contrôle	Référence
	<i>Spisula sachalinensis</i>	Glande digestive	Tail length	2 jours	<i>In vivo</i>	96 h	12.1	Kim et Hyun, 2006
	<i>Spisula sachalinensis</i>	Branchies	Tail length	2 jours	<i>In vivo</i>	96 h	14.5	Kim et Hyun, 2006
	<i>Tapes japonica</i>	Branchies	Tail length	Aquaculture	<i>In vivo</i>	4 h	24-30	Sasaki et al., 1997
	<i>Scapharca ianequivalvis</i>	Erythrocytes	% tail DNA	2 semaines	<i>In vivo</i>	11 jours	30.5%	Gabbianelli et al., 2006
Pétoncle	<i>Patinopecten yessoensis</i>	Branchies	Tail length	Aquaculture	<i>In vivo</i>	4 h	30-42	Sasaki et al., 1997
Anémone	<i>Anthopleura elegantissima</i>	Broyat d'organisme	% tail DNA	6 mois	<i>In vitro</i>	1h	15-20%	Mitchelmore and Hyatt, 2004
Crustacé	<i>Palaemonetes pugio</i>	Hépatopancréas	% tail DNA	Aquaculture	<i>In vitro</i>	30 min	6%	Kuzmick et al., 2007
	<i>Palaemonetes pugio</i>	Hépatopancréas	% tail DNA	Aquaculture	<i>In vivo</i>	156 jours	10%	Kuzmick et al., 2007
	<i>Palaemonetes pugio</i>	Embryons	Tail moment	-	<i>In vivo</i>	12 h	0.6 ± 0.4	Lee et al., 2000
	<i>Callinectes sapidus</i>	Embryons	Tail length (µm)	-	<i>In vivo</i>	12 h	5 ± 2	Lee et al., 1999
	<i>Palaemonetes pugio</i>	Embryons	% tail DNA	-	<i>In vivo</i>	15 min	7%	Hook et al., 2004
polychète	<i>Nereis virens</i>	Coelomocytes	Tail moment	Aquaculture + 4-6 semaines	<i>In vivo</i>	1 h	2.8 ± 1.8	DeBoeck et Volders, 1997
	<i>Nereis virens</i>	Coelomocytes	% tail DNA	Aquaculture	<i>In vitro</i>	1 h	13%	Lewis and Galloway, 2008
	<i>Nereis diversicolor</i>	Coelomocytes	% tail DNA	-	<i>In vitro</i>	1 h	14%	Lewis and Galloway, 2008
	<i>Arenicola marina</i>	Coelomocytes	% tail DNA	2 jours	<i>In vitro</i>	24 h	12%	Lewis and Galloway, 2008
	<i>Arenicola marina</i>	Spermatozoïdes	% tail DNA	2 jours	<i>In vitro</i>	24 h	10%	Lewis and Galloway, 2008

Organisme	Espèce	Type cellulaire	Paramètre du test Comet	Durée de l'acclimatation au laboratoire	Type d'exposition	Durée de l'exposition	Valeur du contrôle	Référence
Oursin	<i>Sphaerechinus granularis</i>	Spermatozoïdes	% tail DNA	-	<i>In vitro</i>	1 h	10-12%	Pruski et al., 2009
	<i>Sphaerechinus granularis</i>	Oeuf	% tail DNA	< 1 semaine	<i>In vitro</i>	1 h	16.9%	Nahon et al., 2008
	<i>Paracentrotus lividus</i>	Oeuf	% tail DNA	< 1 semaine	<i>In vitro</i>	1 h	12.3%	Nahon et al., 2008
	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	Coelomocytes	% tail DNA	-	<i>In vivo</i>	4 semaines	10.5%	Taban et al., 2004

Tableau I-7 : Application du test Comet chez les invertébrés dulçaquicoles : types cellulaires, paramètres d'observation et niveaux de base.

Organisme	Espèce	Type cellulaire	Paramètre du test Comet	Durée de l'acclimatation au laboratoire	Type d'exposition	Durée de l'exposition	Valeur du contrôle	Référence
Moule	<i>Dreissena polymorpha</i>	Hémolymph	Tail length (µm)	1-2 semaines	<i>In vivo</i>	15 h	7-14	Buschini, 2009
	<i>Dreissena polymorpha</i>	Hémolymph	Tail length (µm)	-	<i>In situ</i>	20 jours	11-13	Pellacani et al., 2006
	<i>Dreissena polymorpha</i>	Branchies	Tail length (µm)	1-2 jours	<i>In vivo</i>	48 h	21	Osman et al., 2004
	<i>Dreissena polymorpha</i>	Hémolymph	% cellules non endommagées	-	<i>In situ</i>	-	65%	Rocher et al., 2006
	<i>Dreissena polymorpha</i>	Hémolymph	% tail DNA	3 semaines	<i>In vivo</i>	96 h	11%	Binelli et al., 2008
	<i>Dreissena polymorpha</i>	Hémolymph	% tail DNA	2 semaines	<i>In vivo</i>	96 h	10%	Parolini et al., 2010
	<i>Dreissena polymorpha</i>	Hémolymph	% tail DNA	48 h	<i>In vivo</i>	21 jours	10%	Juhel et al., 2007
	<i>Dreissena polymorpha</i>	Hémolymph	Tail moment	-	<i>In situ</i>	1 mois	40	Klobucar et al., 2003
	<i>Dreissena polymorpha</i>	Hémolymph	Tail moment	24-48 h	<i>In vivo</i>	7 jours	50	Pavlica et al., 2001
	<i>Dreissena polymorpha</i>	Hémolymph	Length Diameter Ratio	10 jours	<i>In vivo</i>	20 jours	2.5	Bolognesi et al., 2004
	<i>Dreissena polymorpha</i>	Hémolymph	Length Diameter Ratio	-	<i>In vivo</i>	168 h	1.25	Riva et al., 2007
	<i>Unio tumidus</i>	Hémolymph	% tail DNA	2 semaines	<i>In vivo</i>	24 h	3%	Štambuck et al., 2008
	<i>Unio tumidus</i>	Glande digestive	Tail moment	-	<i>In vitro</i>	1 h	0-1	Milowska et al., 2003
	<i>Unio tumidus</i>	Glande digestive	Tail moment	Quelques jours	<i>In vitro</i>	1 h	0-1	Labiencac et al., 2004
	<i>Unio tumidus</i>	Glande digestive, Branchies, Hémolymph	% tail DNA	-	<i>In vivo</i>	-	-	Lemière et al., 2005

Tableau I-7 : Suite.

Organisme	Espèce	Type cellulaire	Paramètre du test Comet	Durée de l'acclimatation au laboratoire	Type d'exposition	Durée de l'exposition	Valeur du contrôle	Référence
Moule	<i>Utterbackia imbecillis</i>	Glochidium	Tail moment	2 à 10 jours	<i>In vivo</i>	24h	0,5	Conners et Black, 2004
Crustacé	<i>Astacus leptodactylus</i>	Hémolymph	% tail DNA	2 semaines	<i>In vivo</i>	7 jours	5%	Malev et al., 2010
	<i>Daphnia magna</i>	Broyat d'organisme	Tail moment	Elevage laboratoire	<i>In vivo</i>	24 h	1	Park and Choi, 2009
Escargot	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Hémolymph	% cellules non endommagées	Elevage laboratoire	<i>In vivo</i>	-	59-69%	Grazeffe et al., 2008
Larve d'insecte	<i>Chironomus riparius</i>	Broyat d'organisme	Tail moment	Elevage laboratoire	<i>In vivo</i>	24 h	1	Park and Choi, 2009
Planaire	<i>Girardia schubarti</i>	Queue	% de cellules endommagées	1 jour	<i>In vivo</i>	13 jours	15.3±6.6%	Prá et al., 2005
	<i>Polycelis felina</i>	Broyat d'organisme	% tail DNA	1 semaine	<i>In vivo</i>	7 jours	3%	Horvat et al., 2005
Palourde	<i>Corbicula fluminea</i>	Hémolymph	Comet score	30 jours	<i>In vivo</i>	72 h	21.11	Cafetti et al., 2008

% Tail DNA : (ou % tail intensity) pourcentage d'ADN dans la queue de la comète

Tail length : longueur de la queue de la comète (en µm)

Tail moment : produit du pourcentage d'ADN dans la queue par sa longueur

Comet score (ou Damage Index) : pourcentage de cellules de chaque classe de dommages multiplié par la classe (Comet score = $\sum_{n=0}^4$ (% de cellules de la classe n) x n)

Length Diameter Ratio : rapport entre la longueur de migration totale et le diamètre de la tête de la comète

DNA migration : longueur de migration en µm, mesurée depuis le début de la comète ou depuis le début de la queue (correspond alors au Tail length)

Olive tail moment : ((longueur moyenne de la queue – longueur moyenne de la tête) x % d'ADN dans la queue) / 100

1.2.4. Interprétation des réponses à un stress génotoxique en terme d'effet biologique

Compte tenu de l'implication du génome dans l'ensemble du métabolisme cellulaire, les conséquences de la génotoxicité sont multiples. L'exposition à des agents génotoxiques peut se traduire de différentes manières, entre autres par l'induction de dommages primaires à l'ADN, par des mutations géniques ou par des altérations chromosomiques, ces modifications pouvant être liées. Ainsi, les dommages à l'ADN représentent la cause majeure d'apparition des mutations au sein des génomes cellulaires (Moustachhi, 2000). Les principales conséquences biologiques de l'atteinte de l'ADN sont présentées dans la figure I-13. Elles peuvent induire la mort cellulaire, induire des mécanismes de réparation de l'ADN qui dans le cas d'une réparation incomplète peuvent conduire à des mutations susceptibles d'être transmises aux générations suivantes si elles touchent les cellules germinales (Shugart et Theodorakis, 1996).

Globalement, trois réactions sont possibles pour la cellule après une exposition à un génotoxique : la mort (nécrose ou apoptose), la réparation, et la mutation. Les conséquences des dommages à l'ADN peuvent être l'initiation de cancers, des anomalies héréditaires, des anomalies de développement, conduisant à des figures d'embryotoxicité et de tératogénèse (Figure I-13). Depledge (1998) référence six conséquences préjudiciables pour les invertébrés d'une exposition aux génotoxiques : la perte de gamètes par mort cellulaire, la mortalité des embryons suite à des mutations létales, un développement anormal, la néoplasie, l'apparition de mutations transmissibles qui peuvent causer une augmentation ou une diminution de la diversité génétique et des changements dans l'expression affectant la fitness de l'organisme.

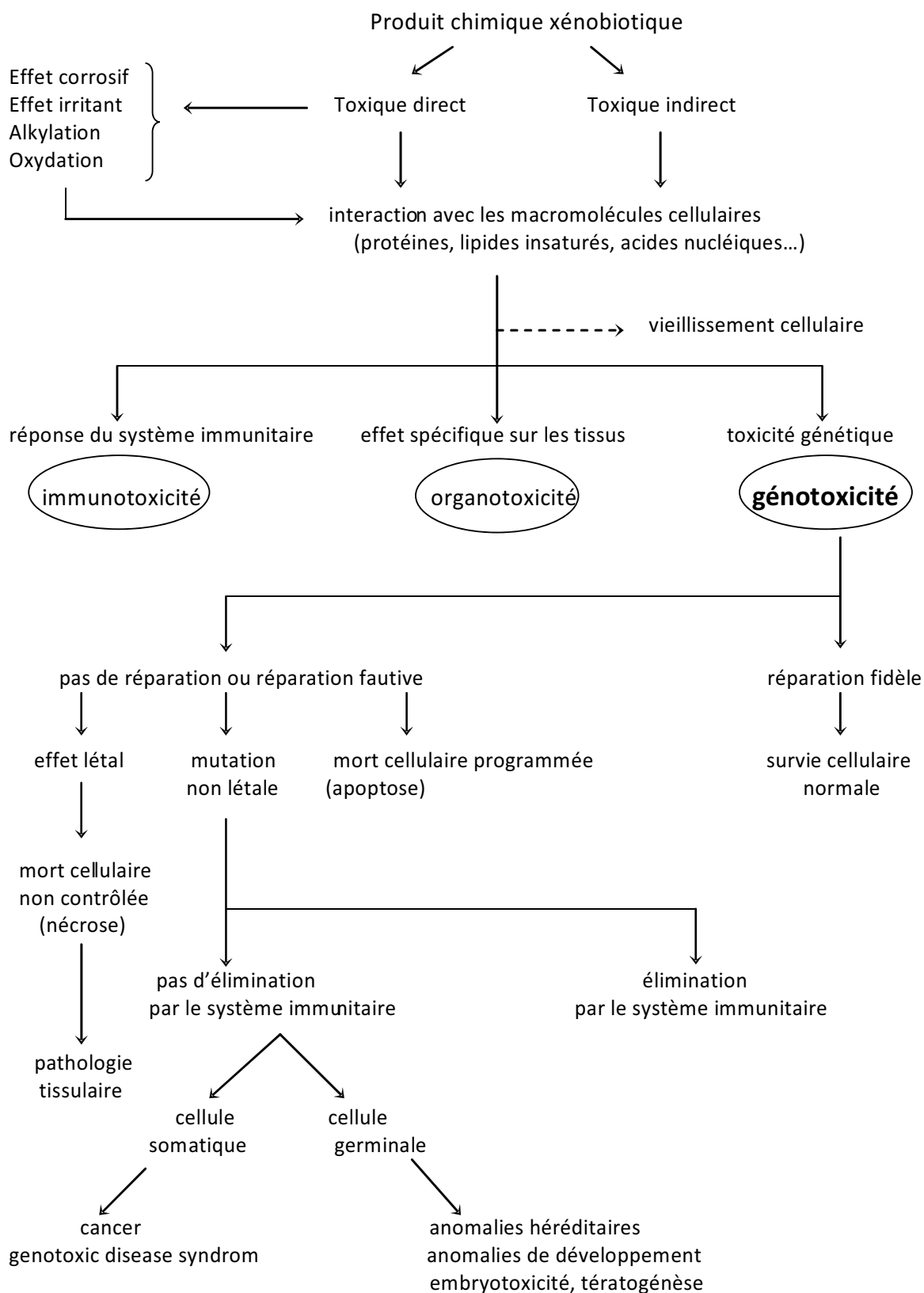


Figure I-13 : Représentation schématique des conséquences de l'exposition à un xénobiotique (d'après Frelon, 2001).

Anderson et al. (1994) ont proposé un modèle conceptuel qui relie les dommages à l'ADN à des conséquences potentielles au niveau populationnel. Mais malgré des avancées scientifiques permettant d'établir des liens mécanistiques ou statistiques entre dommages à l'ADN et conséquences individuelles, voire transgénérationnelles, il n'a pas formellement été établi de lien entre dommages à l'ADN et conséquences pour la population dans le milieu naturel. Toutefois, l'existence d'une telle relation est abordée par les travaux de Theodorakis et Shugart (Theodorakis et Shugart, 1998 ; Theodorakis, 2003) dans lesquels les auteurs montrent que la contamination en radioéléments entraîne un stress affectant le succès de la reproduction et une modification de la structure génétique à la base d'un mécanisme d'adaptation ou de résistance aux radiations. Ces auteurs ont clairement démontré une corrélation significative entre la mutagénicité des sédiments, la quantité de dommages à l'ADN de *Lepomis auritis* et la composition de la communauté piscicole (% d'espèces tolérantes). Il est à nouveau essentiel de souligner qu'il s'agit dans ce cas de corrélations et non de relations directes de cause à effet.

Dès 1994, Anderson et Wild ont établi des corrélations entre effets cytogénétiques et une diminution de la fertilité chez le ver *Neanthes arenaceodentata*. Les auteurs ont également corrélé l'exposition du nématode *Caenorhabditis elegans* à un génotoxique modèle (EMS) à une augmentation des mutations chez l'organisme et une diminution de progéniture viable. Le processus de la reproduction, donnant lieu à toute une série de réponses biologiques (des macromolécules biologiques jusqu'aux conséquences du succès reproducteur sur le maintien des populations) a été désigné comme processus clé à étudier pour l'évaluation du risque (Figure I-14) (Amiard-Triquet et Amiard, 2008).

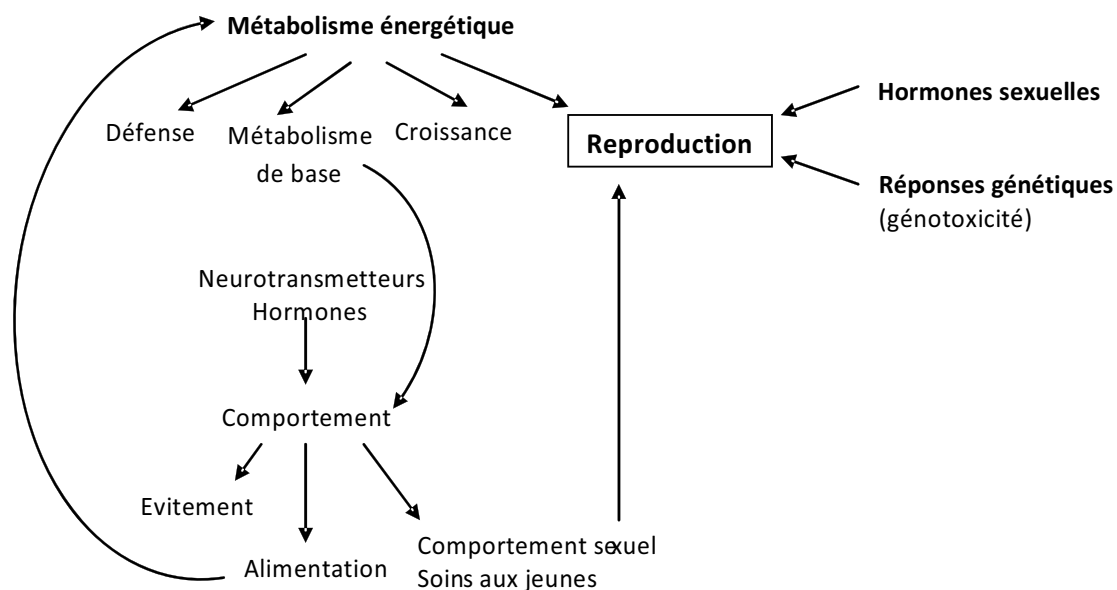


Figure I-14 : Principaux processus reliant les effets des contaminants depuis le niveau moléculaire jusqu'au niveau populationnel au travers du succès de la reproduction (Amiard-Triquet et Amiard, 2008).

Le lien entre dommages à l'ADN et effets sur la reproduction a été établi essentiellement chez les mammifères. Les effets délétères d'une fécondation avec un sperme exposé à un contaminant peuvent être une conséquence de changements spécifiques dans la séquence du génome paternel, une compaction anormale de la chromatine, des modifications épigénétiques telles qu'une modification du profil de méthylation de l'ADN ou de l'acétylation des histones (Hales et al., 2005). Harrouk et al. (2000) ont montré chez le rat que les embryons issus de spermatozoïdes dont le génome porte des dommages primaires à l'ADN suite à une exposition au cyclophosphamide, comportaient, au 1^{er} stade de la division, plus de dommages à l'ADN que les embryons témoins. Récemment, le lien entre génotoxicité exprimée au niveau des gamètes et diminution du taux de survie des embryons a été étudié chez la truite (Brown et al., 2007).

La mesure des dommages à l'ADN des cellules germinales et des spermatozoïdes en particulier est tout à fait pertinente pour relier atteinte génotoxique et effet sur la fonction de reproduction chez l'individu. Actuellement chez les invertébrés, seule l'étude de Lewis et Galloway (2009) relie sans ambiguïté les dommages à l'ADN sur spermatozoïdes de *Mytilus edulis* et *Arenicola marina*, révélés par l'essai Comet, à une perturbation du succès reproducteur. Leur étude démontre que les atteintes à l'intégrité de l'ADN du sperme ne sont pas réservées aux

mammifères mais peuvent affecter les invertébrés aquatiques. Les auteurs soulignent que la susceptibilité génétique des spermatozoïdes peut avoir des implications significatives sur la santé à long terme des populations naturelles, et que la connaissance du rôle des dommages à l'ADN paternel sur le développement embryonnaire doit permettre une meilleure compréhension des conséquences d'une exposition à un génotoxique sur la reproduction et par conséquent la dynamique de population.

Synthèse de la partie 2

La génotoxicité : sources, conséquences et évaluation

Shugart et Theodorakis (1998) considèrent qu'une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les interactions des xénobiotiques avec le matériel génétique des organismes pourrait aider à l'analyse de modifications à des niveaux d'organisation plus complexes au sein de l'écosystème.

L'essai Comet fournit un outil sensible et polyvalent pour évaluer la génotoxicité, que ce soit chez les plantes, les animaux ou chez l'homme, en milieu aquatique comme terrestre, dans le cadre d'expérimentations *in vitro*, *in vivo* et *in situ*. Toutefois, un effort important reste à faire pour optimiser, standardiser et calibrer cette technique chez différentes espèces d'intérêt écologique. Il convient de définir la variabilité des réponses dues à la variabilité inter-cellulaire, inter-individu, inter-espèce mais aussi à la variabilité technique, lié par exemple à la méthode d'observation des dommages (manuelle ou par analyse d'images) (Dhawan et al., 2009).

L'utilité du test Comet est largement reconnue pour l'évaluation de la génotoxicité en milieu aquatique et notamment chez les invertébrés (Jha, 2008). De part un habitat, un comportement, un régime alimentaire différent, chaque espèce va répondre différemment à une pression génotoxique. Or, parmi les invertébrés utilisés, la plupart sont des organismes filtreurs tels que les bivalves. Le modèle crustacé a été peu étudié, surtout dans le milieu dulçaquicole. Cette technique a été principalement éprouvée sur des cellules somatiques, telles que les cellules de l'hémolymphe bien que sa capacité à détecter des dommages à l'ADN sur les cellules germinales ait déjà été démontrée chez les mammifères principalement.

Au delà du niveau d'endommagement génétique du type cellulaire étudié, c'est sa fonction biologique qui est concernée, le problème majeur rencontré dans le développement d'un biomarqueur étant le questionnement central de la pertinence écologique du biomarqueur. Dans le but de relier les effets structuraux mesurés à l'échelle moléculaire et cellulaire et leur inscription au niveau populationnel, il convient de déterminer si des éléments essentiels à la pérennité des espèces sont affectés, comme le succès de la reproduction (Newman et Clements, 2008).

1.3. Modèle biologique : *Gammarus fossarum*

Plus de 4500 espèces appartiennent au sous-ordre des Crustacés Gammaridae (ordre des amphipodes). Parmi les amphipodes, les gammaridae sont les espèces les plus représentées et les plus largement répandus. Ils sont présents dans le milieu marin, dulçaquicole et terrestre. Le genre *Gammarus*, réparti dans tout l'hémisphère nord, comprend plus d'une centaine d'espèces dont la majorité sont dulçaquicoles (Barnard et Barnard, 1983).

1.3.1. Ecologie

L'espèce sentinelle choisie pour ce travail de thèse est l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. Sa systématique est présentée dans le tableau I-8 suivant.

Tableau I-8 : Systématique de *G.fossarum* (Martin et Davis, 2001).

Embranchement	Arthropode
Super-classe	Crustacé
Classe	Malacostracé
Sous-classe	Eumalacostracé
Super-ordre	Péracaride
Ordre	Amphipode
Sous-ordre	Gammaridea
Genre	<i>Gammarus</i>
Espèce	<i>fossarum</i> (Koch, 1835)

Les facteurs abiotiques tels que la température, l'oxygène, le pH et la pollution jouent un rôle important dans la distribution de cette espèce. Regroupés en populations de forte densité pouvant atteindre plusieurs milliers d'organismes au m² (Felten, 2003), les gammars affectionnent les substrats grossiers comme les galets ou les graviers et les substrats organiques comme les bryophytes, les végétaux rivulaires et la végétation morte. *Gammarus fossarum* occupe les ruisseaux et les rivières de plaine et de moyenne montagne, caractérisés par un fort courant et de

fortes teneurs en oxygène (Tachet et al., 2000). La température de l'eau doit être comprise entre 0°C et 25°C, la température critique létale étant située entre 28°C et 32°C (Wijnhoven et al., 2003). Bien que peu exigeants, une concentration relativement élevée en oxygène dissous est nécessaire à leur survie (Maltby 1995).

Leur aire de répartition s'étend au Sud des Pyrénées à la Grèce et au Nord jusqu'à la Pologne, incluant l'Europe centrale (Figure I-15). Des investigations récentes révèlent que l'aire de répartition de *G. fossarum* au sein de l'Europe continentale est plus étendue que ce qui était admis jusqu'à présent (Zivic et Markovic 2007).

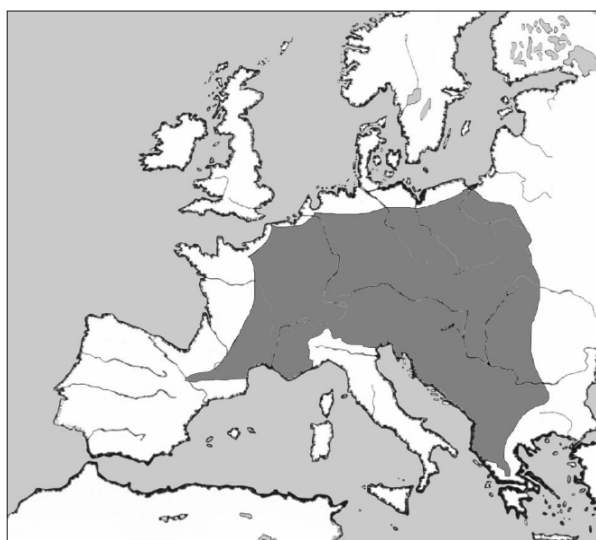


Figure I-15 : Aire de répartition géographique de *Gammarus fossarum* (Barnard et Barnard, 1983).

L'habitat des gammares leur fournit à la fois un apport de matière organique d'origine animale et végétale dont ils se nourrissent et un abri contre leurs nombreux prédateurs. Ils affichent un vaste répertoire trophique, étant herbivores, détritivores et carnivores. Leur régime alimentaire est composé de feuilles mortes, de biofilms, de chironomidés, de petits isopodes voire même de poissons morts (MacNeil et al., 1997). De plus, le cannibalisme n'est pas rare chez les amphipodes. Principalement déchetueur et se nourrissant préférentiellement de matériel détritique, le gammare est aussi une proie privilégiée pour de nombreuses espèces de macroinvertébrés, de poissons, d'amphibiens et d'oiseaux (MacNeil et al., 2002). Toutefois les principaux prédateurs sont les poissons et plus particulièrement la truite *Salmo trutta* et le chabot *Cottus cobio*. Des gammares ont été trouvés dans les contenus stomacaux de la plupart des espèces de poissons d'eau douce cohabitant avec cette espèce : anguille, vairon, saumon, loche

franche, vandoise, gardon, goujon (Maitland 1966). Le gammare est donc un organisme essentiel au bon fonctionnement écologique des rivières puisqu'il joue un rôle clé dans la décomposition et l'incorporation du matériel organique terrestre au réseau trophique aquatique et dans la redistribution de la matière et de l'énergie.

1.3.2. Morphologie et identification de l'espèce

Les amphipodes sont des Crustacés à respiration branchiale, munis de deux paires d'antennes, chez lesquels chaque anneau porte, côté ventral, une paire d'appendices articulés. Le tégument de chitine calcifiée forme un exosquelette qui leur confère une certaine dureté.

Les Gammaridae sont des amphipodes aquatiques qui se distinguent par un corps à symétrie bilatérale et aplati latéralement, divisé en 4 régions distinctes : le prosoma (céphalon), le mesosoma (thorax), le metasoma et l'urosoma (abdomen) (Chevreux et Fage, 1970) (Figure I-16). Le corps d'un gammare dépasse rarement 20 mm et est caractérisé par une convexité dorsale régulière. L'absence de carapace céphalo-thoracique ainsi que la présence, chez les femelles, d'expansions lamelleuses à disposition horizontale, ou oostégites, sont des critères permettant de distinguer les Gammaridae d'autres familles d'amphipodes.

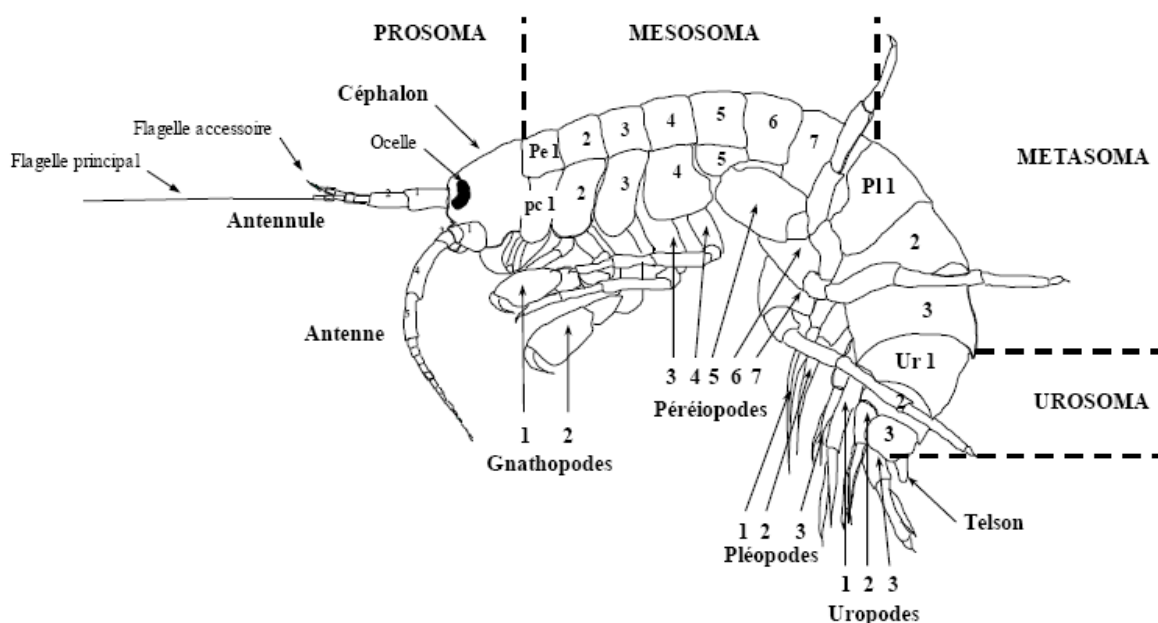


Figure I-16 : Vue latérale d'un Gammaridae (adaptée d'après Roux, 1970 ; Chevreux et Fage, 1970). pc 1-7 : plaques coxales 1-7 ; Pe 1-7 : périomères 1-7 ; Pl 1-3 : pléomères 1-3 ; Ur 1-3 : uromères 1-3.

Le mésosoma, composé de 7 périomères, porte 2 paires de gnathopodes permettant au gammaride de se fixer sur un substrat et 4 paires de périopodes ayant une fonction de locomotion. Chez la femelle le mésosoma abrite les oostégites qui forment une cavité ventrale appelée marsupium où les œufs fécondés sont déposés et se développent jusqu'à éclosion (Tachet et al., 2000). Au niveau du métasoma, les pléopodes, appendices biramés, sont continuellement agités pour ventiler la cavité branchiale et le marsupium de la femelle. Ils jouent également un rôle important dans la locomotion. L'urosoma porte 3 paires d'uropodes qui permettent d'identifier l'espèce *fossarum* d'autres espèces proches du genre *Gammarus*.

La figure I-17 donne les critères permettant d'identifier *G.fossarum* des autres espèces de Gammaridae communément rencontrées. Les espèces les plus couramment rencontrées sont *G.fossarum* et *G.pulex*. Cependant, de nombreuses espèces invasives ont colonisé les systèmes lotiques et lenticules de la France. Les principales sont : *G. roeseli* (présente depuis plus d'une centaine d'années, et parfois considérée comme autochtone), *G. duebeni*, *G. tigrinus* et *G. lacustris* (Adam, 2008). Depuis quelques années une espèce d'un genre proche de *Gammarus*, *Dikerogammarus villosus*, envahit très rapidement la plupart des bassins d'Europe de l'ouest en

excluant les espèces autochtones. On trouve actuellement cette espèce sur le Rhône et la Saône (Bollache, 2003).

L'espèce *fossarum* se caractérise par une cuticule non carénée, l'absence de rayures sur le corps plutôt lisse avec très peu d'épines ou de soies sauf sur les antennes et l'extrémité de l'urosoma, de petites ocelles ovales, une rame interne faisant 1/3 de la rame externe au niveau de l'uropode 3 (Figure I-18), et enfin de longues soies insérées sur les antennes (Roux, 1970, Xuereb, 2009).

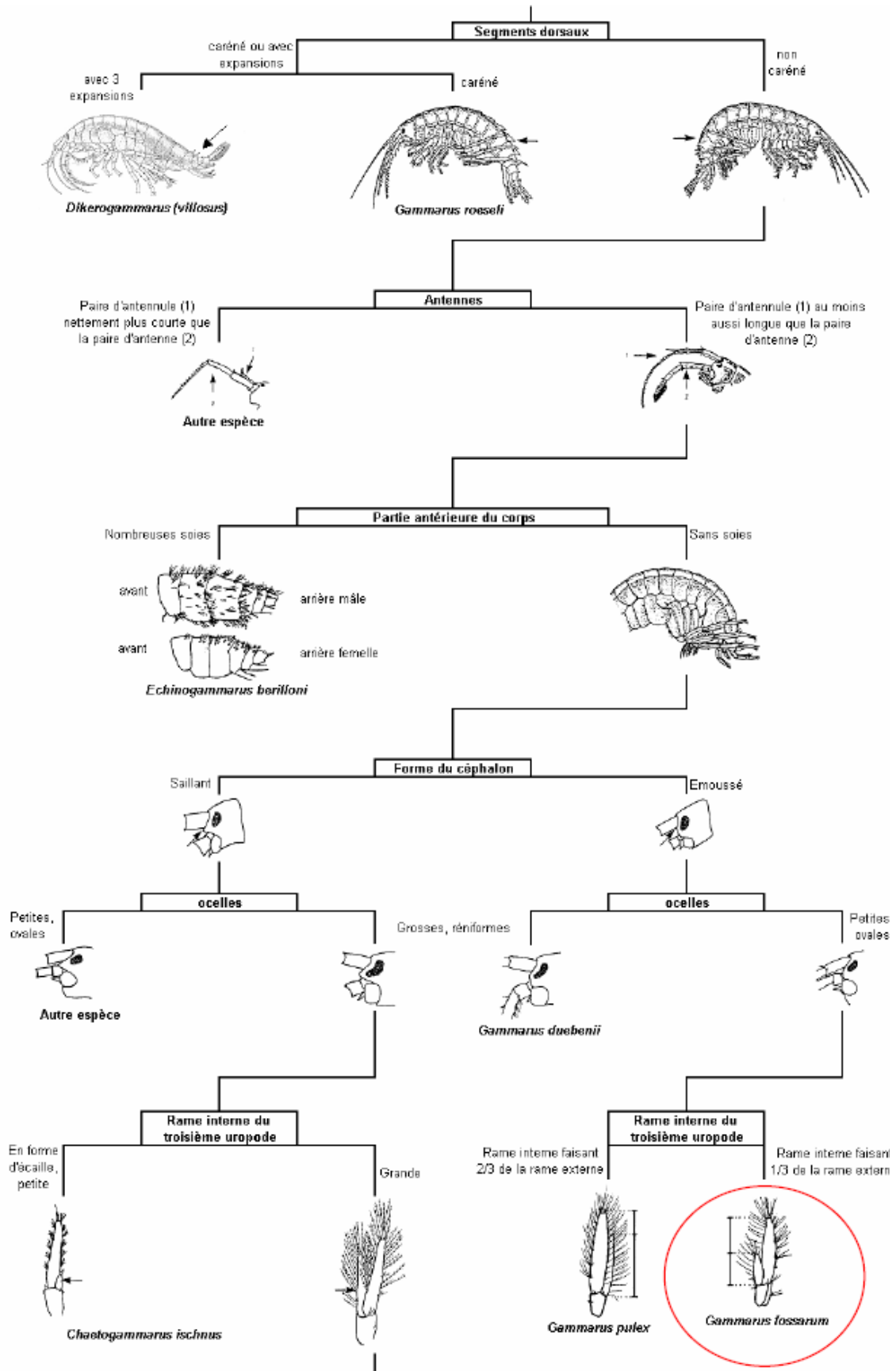


Figure I-17 : Détermination de *G. fossarum* (d'après Felten, 2003).



Figure I-18 : Uropode 3 de *Gammarus fossarum* (A) et de *Gammarus pulex* (B)
(photos : Hervé Quéau/Cemagref Lyon).

1.3.3. Anatomie et biologie

Le gammare est un organisme à croissance discontinue par mues successives. Sa durée de vie est d'environ 2 ans. Les nouveaux-nés croissent puis deviennent matures après un nombre déterminé de mues (10 mues pour *G. pulex*), la rapidité de succession de celles-ci étant température-dépendante et sexe-dépendante, les mâles ayant des phases inter-mues plus longues que les femelles (Welton et Clarke 1980).

Bien que ne soient traités dans cette partie que l'appareil circulatoire et l'appareil reproducteur, il est intéressant de disposer d'une vue générale de la localisation des organes principaux (Figure I-19).

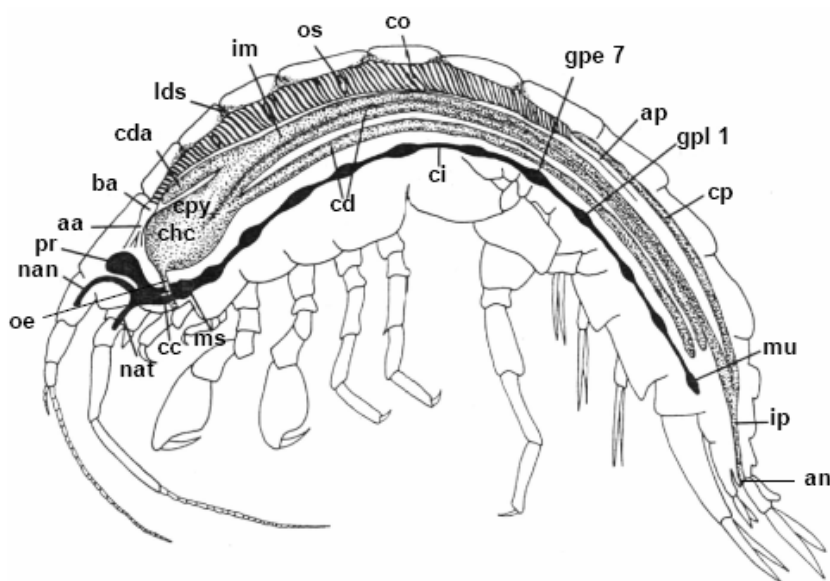


Figure I-19 : Coupe longitudinale de gammare illustrant les principaux organes (Schmitz, 1992).

aa, aorte antérieure ; an, anus ; ap, aorte postérieure ; ba, bulbe artériel ; cc, connexion circumoesophagiale ; cd, cæcum digestifs ; cda, cæcum dorsal antérieur ; chc, chambre cardiaque ; ci, connexion intersegmentaire ; co, cœur ; cp, cæcum postérieur ; cpy, chambre pylorique ; gpe, ganglion péréionique 7 ; gpl, ganglion pléonique 1 ; im, intestin moyen ; ip, intestin postérieur ; lds, ligament dorsal suspendu ; mu, masse urosomique (fusion des ganglions abdominaux 4-6) ; ms, masse suboesophagiale ; nan, nerf antennulaire ; nat, nerf antennaire ; oe, oesophage ; pr, protocérèbrum.

1.3.3.1. Circulation hémolymphatique

L'appareil circulatoire des crustacés est largement ouvert. Seul un vaisseau dorsal est présent. La circulation hémolymphatique s'effectue au moyen d'un cœur mais peut aussi être affectée par des mouvements corporels. Le cœur, positionné dorsalement au dessus de l'appareil digestif, consiste en un tube cylindrique ouvert à ses deux extrémités. Il est entouré d'une sorte de sac rempli d'hémolymphe, nommé péricarde (ou hémocoèle), et s'étend sur presque toute la longueur du mésosome (Felten, 2003).

L'hémolymphe des crustacés, dans laquelle baignent des cellules nucléées, consiste en un unique fluide extra-cellulaire qui circule dans tout le corps, étant ainsi en contact direct avec la majorité des organes (Chapman, 1998).

Les fonctions de l'hémolymphe sont très diverses, certaines étant plus spécialement assurées par le plasma (liquide extracellulaire), d'autres par les hémocytes. Le plasma hémolympatique a un rôle important dans le transport comme celui des éléments nutritifs vers des sites où ils sont métabolisés, des produits d'excrétion, des hormones transportées des glandes endocrines à leurs sites d'action (Chapman, 1998).

L'hémolymphe joue un rôle très important dans l'osmorégulation du gammare. Bien que la pression osmotique puisse varier entre les différents stades des organismes, l'osmolarité de l'hémolymphe est d'environ 300 mOsmol. La pression osmotique est nécessaire pour contrôler le contenu cellulaire en eau et la répartition des ions (Chapman 1998). Il a été montré que l'acidification des ruisseaux entraîne une modification de la concentration en ions $[Na^+]$ et $[Cl^-]$ dans l'hémolymphe chez *G.fossarum*, pouvant avoir des répercussions sur l'osmorégulation chez cette espèce (Felten et Guerold, 2004).

Enfin, l'hémolymphe est dotée d'une capacité de coagulation qui permet de protéger du milieu extérieur un organisme dont la cuticule est endommagée.

1.3.3.2. Reproduction

L'espèce *G.fossarum* est une espèce itéropare, à reproduction sexuée. Les gammares ont un cycle de reproduction relativement complexe. Généralement, la première phase de reproduction commence en décembre et atteint un maximum en avril-mai lors de la fin de la phase de la diapause. Une première génération de nouveaux-nés voit le jour de mars à juin et une partie la cohorte atteint la maturité en fin d'été. Les adultes qui ont survécu à l'hiver précédent et qui ont donné naissance à cette génération meurent progressivement. Une seconde génération voit alors le jour en début d'automne grâce aux individus nés en début d'été et arrivés à maturité. Les quelques adultes survivants de la première génération passent alors l'hiver en diapause tandis que la nouvelle génération croît lentement durant l'hiver (Hynes 1955, Adam, 2008). La température optimum de fécondité pour *G. fossarum* est de 12,1°C selon Pöckl et Humpesch (1990).

Lorsque la femelle est prête à se reproduire, le mâle s'agrippe alors sur le dos de la femelle au moyen de ses gnathopodes, et la maintient en place sous son corps. Le couple forme alors une figure appelée amplexus précopulatoire (ou *precopula*) (Figure I-20). Cela permet au mâle de

continuer à nager pour se nourrir ou se déplacer tout en maintenant la femelle prête à muer sous son corps (Sutcliffe 1993 ; Bollache and Cezilly 2004). Les gammarus restent en précopula de quelques jours à une semaine.



Figure I-20 : *Gammarus fossarum* mâle et femelle en précopula (photo : Hervé Quéau).

L'ovulation, suivie immédiatement de la fécondation chez la femelle adulte ne peut se produire qu'une fois la mue effectuée : l'expulsion des œufs vers la poche ventrale de la femelle, parfois appelée poche marsupiale, est alors rendue possible par la présence d'un oviducte relativement flexible. Aussitôt l'exuvie de la femelle éjectée, le sperme est déposé via les papilles génitales mâles dans la poche marsupiale de la femelles où plusieurs fécondations sont effectuées en quelques heures. Borowsky (1991) a démontré que la femelle n'ovule que si les spermatozoïdes sont déposés dans la poche marsupiale. Il peut arriver parfois que des *G. fossarum* et *G. pulex* s'accouplent et produisent des œufs, mais ces derniers ne sont jamais fertiles (Sutcliffe 1993).

Chez la femelle *G. fossarum*, les cycles de mue et de reproduction ont été caractérisés précisément (Geffard et al., 2010). Le cycle de mue dure environ 30 jours, à 12°C, chez la femelle adulte et se découpe en 5 stades dont la détermination se base sur l'observation microscopique du développement de la nouvelle cuticule et du décollement de l'ancienne au niveau de la griffe des péréiopodes 3 et 4 (Figure I-21).

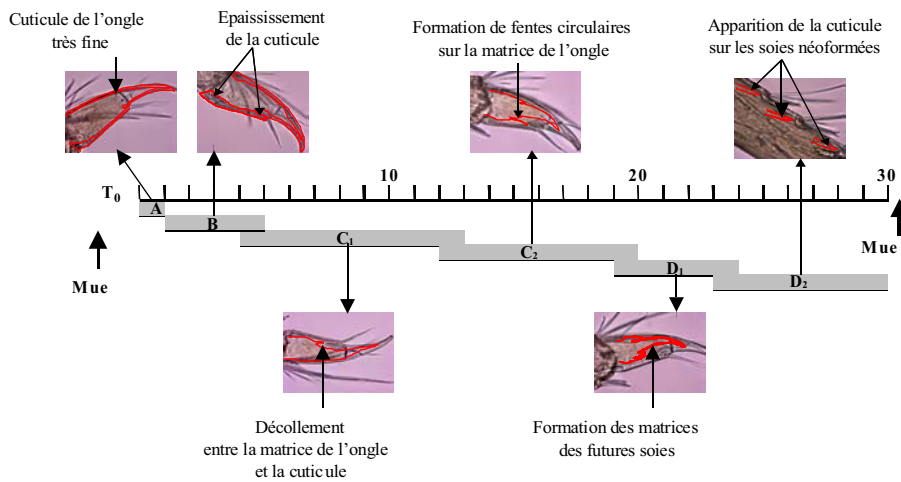


Figure I-21 : Caractérisation du cycle de mue chez la femelle *G.fossarum* (Geffard et al., 2010).

Chez les femelles sexuellement actives, la maturation des gonades (*i.e.*, vitellogénèse) et le développement des embryons dans le marsupium se déroulent de manière parfaitement synchrone, à chaque cycle d'intermue. Les juvéniles éclos sortent du marsupium peu de temps avant l'exuviation de leur mère. Suite à cette exuviation, la femelle pond une nouvelle portée d'ovocytes matures qui seront aussitôt fécondés par un mâle. Parallèlement, dans la gonade, un nouveau lot d'ovocytes primaires entre en vitellogénèse. L'exuviation peut ainsi être considérée comme le point de départ et d'aboutissement de la maturation gonadique ainsi que du développement embryon-larvaire dans le marsupium (Figure I-22).

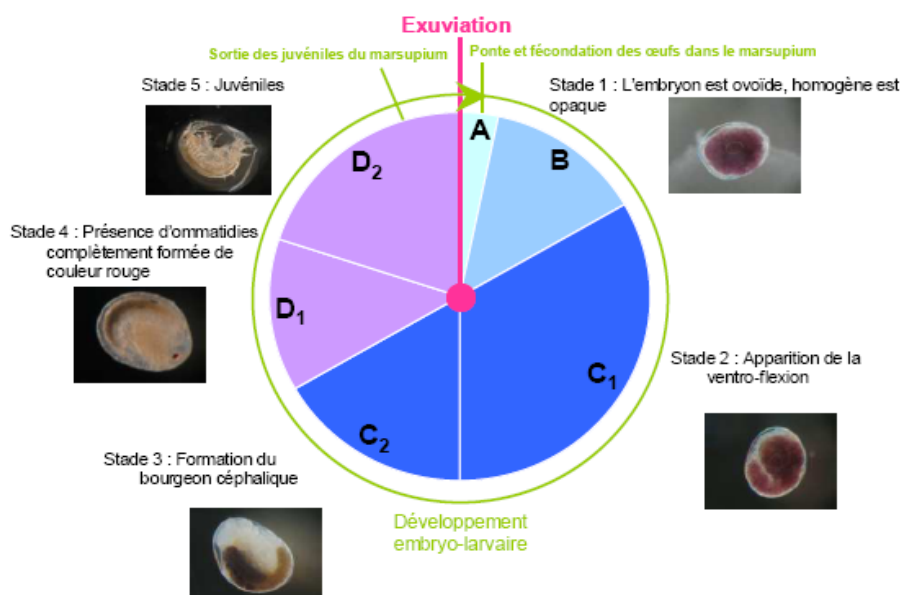


Figure I-22 : Stades embryonnaires corrélés aux stades de mues de la femelle *G.fossarum* (Xuereb, 2009).

1.3.3.3. Appareils reproducteurs, ovogenèse et spermatogenèse

Le déroulement des gamétogenèses mâle et femelle apparaît très différent. Chez la femelle l'accumulation des réserves vitellines retarde les divisions méiotiques alors que chez le mâle la spermiogenèse (phase de différenciation) suit immédiatement la spermatidogenèse (phase de maturation) (Pochon-Masson, 1994).

Dans l'ovaire, les cellules reproductrices sont disposées en rangées longitudinales, plus ou moins enchevêtrées, chacune d'elles correspondant à des degrés de développement différents. L'évolution de ces cellules se fait du bord interne vers le bord externe de l'ovaire. La première rangée formée essentiellement d'ovogonies constitue la zone germinative. Puis, viennent les ovocytes primaires, et les ovocytes secondaires. Ce sont les ovocytes secondaires qui seront pondus dans le marsupium pour y être fécondés (Figure I-23). La taille des noyaux des ovocytes augment en fonction de leur stade de maturation. A la fin de l'ovogenèse, le noyau de l'ovocyte secondaire peut atteindre 50 μm (Charniaux-Cotton, 1985).



Marsupium contenant des ovocytes récemment pondus

Figure I-23 : Femelle *G. fossarum* après exuviation et ponte des ovocytes secondaires dans le marsupium

(photo : Hervé Quéau).

Chez le mâle, la spermatogenèse a lieu dans les organes génitaux, formations paires et fusiformes situées dorsolateralement par rapport au tube digestif. Chez la plupart des amphipodes le fonctionnement des testicules est cyclique et dure généralement moins longtemps que le cycle de la femelle. L'activité spermatogénétique connaît un maxima d'intensité à la fin de l'été et au printemps, en corrélation avec des modifications saisonnières de la glande androgène. Chez *Machrobrachium idella*, des rapports avec le cycle de mue ont été observés (Sreekumar et

Adiyodi, 1983). Toutefois il est généralement accepté que les mâles du genre *Gammarus* sont capables de se reproduire tout au long du cycle de mue (Sutcliffe, 1992). D'après les travaux de Dunn et al. (2006) chez *G.duebeni*, le nombre d'accouplements possibles est également limité chez le mâle ce qui entraîne une stratégie d'allocation du sperme vers les femelles non parasitées, plus à même de produire une plus grande descendance. Chez *G.pulex*, la quantité totale de sperme est fortement corrélée au statut reproducteur du mâle mais peu à sa taille. Durant les 6 jours post-fécondation, le nombre de spermatozoïdes augmente jusqu'à un maximum d'environ 10000 spermatozoïdes par testicule (Lemaître et al., 2009). Le mâle investit une grande quantité de sa réserve de spermatozoïdes à chaque accouplement (en moyenne la moitié). La fécondation ayant lieu dans la poche marsupiale, il est possible que ce lourd investissement compense un phénomène de dilution.

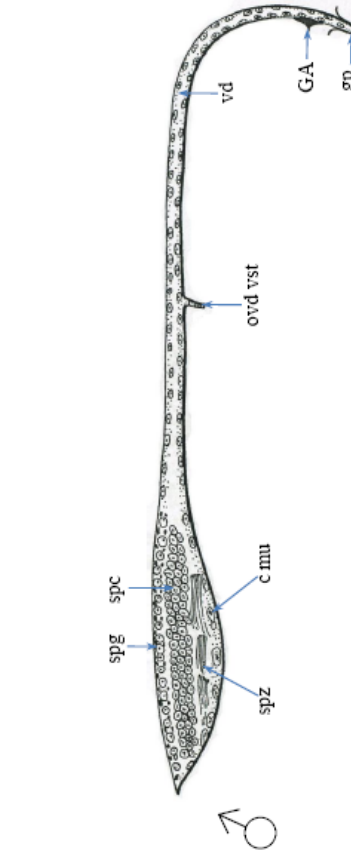
Lorsqu'une spermatogonie secondaire entre en méiose, elle se transforme en spermatocyte primaire diploïde qui produit deux spermatocytes secondaires évoluant en spermatides puis en spermatozoïdes. L'organisation générale de tous les spermatozoïdes de Crustacés s'écarte du plan classique de la longue cellule flagellée et mobile qu'est le spermatozoïde de vertébré. Le flagelle, lorsqu'il existe longe le noyau et n'est pas une pièce mobile, quand à la chromatine, elle est souvent moins dense que celle des spermatozoïdes plus conventionnels (Pochon-Masson, 1994). Le super-ordre des Pécaricides auquel appartient l'ordre des amphipodes forme des spermatozoïdes filamenteux composés d'une tête allongée et d'une hampe, longue tige pouvant être confondue avec un flagelle. Cette hampe est une invagination de la membrane cellulaire contenant des protéines. La tête allongée est caractéristique d'un spermatozoïde mature. En effet, pendant la maturation du spermatozoïde, la vésicule acrosomique s'allonge jusqu'à former un noyau en forme de bâton d'environ 20 µm de long et 0,5 µm de large (Reger, 1966). Les observations de Charniaux-Cotton (1965) chez les amphipodes montrent que la hampe peut être perdue lorsque les spermatozoïdes arrivent dans la vésicule séminale. Chez *Gammarus fossarum*, il semblerait que les spermatozoïdes soient polyfilamenteux (plusieurs hampes, observations personnelles).

La figure I-24 présente l'anatomie des appareils génitaux d'amphipodes mâles et femelles ainsi que la structure particulière d'un spermatozoïde mature d'*Armadillium vulgare* (isopode) proche de celle des amphipodes (Reger et al., 1979)

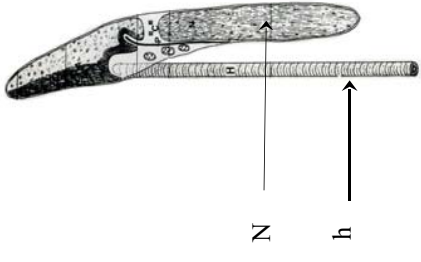
Mâle



Appareil génital en coupe longitudinale



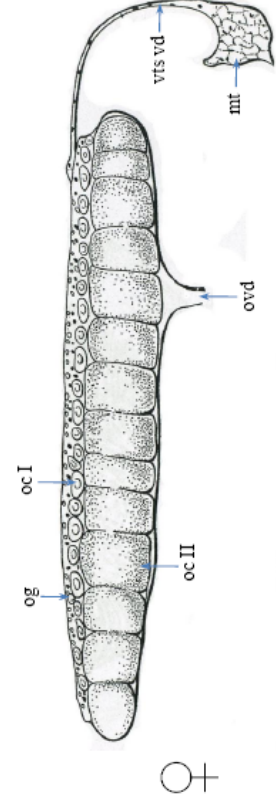
Spermatozoïdes



Femelle



Appareil génital en coupe longitudinale



Ovaire

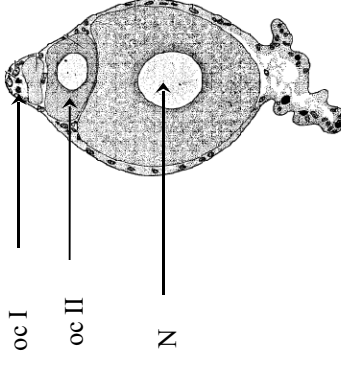


Figure I-24 : *Gammarus fossarum* mâle et femelle, appareils génitaux des amphipodes en coupe longitudinale, spermatozoïde et coupe transversale d'ovaire (d'après Charniaux-Cotton, 1965 et Reger et al., 1979).

c mu : cellules à mucus ; GA : glande androgène ; gp : papille génitale ; mt : tissu mésenchymatique indifférencié ; oc I : ovocyte en vitellogénèse primaire ; oc II : ovocyte en vitellogénèse secondaire ; og : ovogonie ; ovd : oviducte ; ovd vst : oviducte vestigial ; spc : spermatocyte ; spg : spermatogonie ; spz : spermatozoïde ; vd : vas déférent ; vts vd : vestige du vas déférent. N : noyau ; h : hampe

1.3.4. Utilisation des gammares en écotoxicologie et pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques

Du fait de leur sensibilité aux contaminants, les gammares, et en particulier *G.fossarum* sont de bons indicateurs de la santé des milieux aquatiques d'eau douce. Ils sont fréquemment utilisés dans le cadre d'étude d'évaluation de risques et de la qualité des écosystèmes aquatiques (Rinderhagen et al., 2000), par de nombreux laboratoires d'écotoxicologie dans divers scénarios contrastés (in situ, in vivo, in vitro, exposition aux sédiments, par pulse,...) (Kunz et al., 2010).

Le genre *Gammarus* est utilisé en tant que bioindicateur de certains types de perturbation : la présence/l'absence, la densité, l'histoire de vie ou la dynamique des populations des espèces considérées vont donner une information sur l'état environnemental. La pertinence écologique de cette espèce sentinelle est un facteur justifiant pleinement son utilisation dans le cadre de programmes de surveillance de la qualité biologique du milieu aquatique. Par exemple, une diminution du taux d'alimentation engendrée par une contamination environnementale peut être corrélée à une croissance réduite, une taille moindre, une diminution de la fécondité et une augmentation de la mortalité (Maltby et Naylor, 1990) voire une diminution de l'abondance des gammares, pouvant finalement affecter la structure de la communauté aquatique (Sutcliffe et Hildrew, 1989).

De plus, cette espèce présente également de nombreux avantages d'ordre technique, la validant comme espèce sentinelle. L'habitat des organismes du genre *Gammarus* est très diversifié puisqu'on le trouve dans le milieu marin, saumâtre, et dulçaquicole, mais aussi dans des écosystèmes terrestres humides. De plus, les aires de répartition de certaines espèces comme *G.fossarum* sont larges et il est possible d'utiliser un même outil sur des populations de toute l'Europe, offrant la possibilité de standardiser les méthodes d'évaluation de la qualité biologique du milieu utilisant cette espèce. Le gammare est présent souvent en forte densité et joue un rôle clé au sein du réseau trophique. Enfin, il est relativement aisé de distinguer les espèces, de les manipuler et de les conserver au laboratoire. *G. fossarum* offre la possibilité de travailler sur des populations autochtones puisque les organismes sont échantillonnables toute l'année, à tous les stades et il est également aisé de les utiliser dans le cadre de transplantation et d'encagement sur le terrain. Le tableau I-9 illustre les différentes utilisations des gammares en écotoxicologie, du niveau moléculaire au niveau populationnel.

Tableau I-9 : Utilisation de *G. pulex* et *G. fossarum* en écotoxicologie aquatique (complétée par quelques tests sur *Gammarus spp.*).

Niveau d'organisation biologique	Paramètre biologique	Test	Contaminant	Exposition	Espèce	Référence
Population		Croissance, densité de population	Cuivre	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Maund et al., 1992
		Occurrence de l'intersexualité	Effluent de station d'épuration	<i>In situ</i>	<i>G. fossarum</i>	Ladewig et al., 2006
		Taille de la population, sex-ratio, classe de taille,...	17 α -ethinylestradiol	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Watts et al., 2002
Individu	Mortalité	Pesticides, Métaux et Tensioactifs	Cadmium	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Felten et al., 2008
			3,4-Dichloroaniline	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Taylor et al., 1991
			Atrazine	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Taylor et al., 1991
			Lindane	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Abel et al., 1980
			Cuivre	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Girling et al., 2000
			16 insecticides	<i>In vivo</i>	<i>G. italicus</i>	Pantani et al., 1997
			Bisphenl A	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Watts et al., 2001
			Ethinylestradiol	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Watts et al., 2001
			Fenoxycarb	<i>In vivo</i>	<i>G. fossarum</i>	Schmidt, 2003
		Extraits de sédiments	HAPs	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Boxhall et Maltby, 1995
		Sédiments côtiers	Cuivre, lindane, HAPs,...	<i>In vivo</i>	<i>G. locusta</i>	Costa et al., 1998

Tableau I-9 : Suite.

Niveau d'organisation biologique	Paramètre biologique	Test	Contaminant	Exposition	Espèce	Référence
Individu	Alimentation	Cinétique d'alimentation	Cuivre	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Taylor et al., 1993
		Préférence alimentaire	Feuilles avec et sans antibiotiques	<i>In vivo</i>	<i>G. fossarum</i>	Bundschuh et al., 2009
		Masse de feuilles consommée	Acidification	<i>In situ</i>	<i>G. fossarum</i>	Dangles t guéroid, 2000
		Taux d'alimentation	Rivière impactée par des métaux	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	Matby et Crane, 1994
		Inhibition de l'alimentation	Zinc, alkybanzene sulfonate...	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	McLoughlin et al., 2000
		Contamination par l'alimentation	4-nonylphenol	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Gross-Sorokin et al., 2003
		Comportement alimentaire après exposition	Cadmium	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Brown et Pascoe, 1989
		Effet du parasitisme sur l'alimentation	Cadmium	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Brown et Pascoe, 1989
	Comportement	Fuite face à une contamination	Pulse d'insecticide Pyréthroïde	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Lauridsen et Friberg (2005)
		Locomotion et ventilation	Cuivre	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	Gerhardt et al., 1998
		Locomotion et repos	Composés pharmaceutiques	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	De Lange et al., 2006
		Endurance de nage	Cuivre, PCP, BaP	<i>In vivo</i>	<i>G. duebeni</i>	Lawrence et Poulter, 1998
		Ventilation	Stress acide	<i>In vivo</i>	<i>G. fossarum</i>	Felten et Gueroïd, 2001
	Reproduction	Cycle de mue, développement ovocytaire et embryonnaire	Cd, nonylphénol, jeûne	<i>In vivo</i>	<i>G. fossarum</i>	Geffard et al., 2010
		Anomalies gonadiques	Effluent de station d'épuration	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	Gross et al., 2001
		Anomalies gonadiques	Effluent de station d'épuration	<i>In situ</i>	<i>G. fossarum</i>	Schirling et al., 2005

Tableau I-9 : Suite.

Niveau d'organisation biologique	Paramètre biologique	Test	Contaminant	Exposition	Espèce	Référence
Individu	Reproduction	Fécondité	Lixiviats de décharge	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Bloor et al., 2005
		Maintien du précopula, survie des juvéniles	Esfenvalerate	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Cold et Forbes, 2004
		Formation et maintien du précopula	Bisphenol A Ethinyloestradiol	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Watts et al., 2001
Physiologique	Respiration	Respiromètre	Cuivre	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Kedwards et al., 1996
	Allocation énergétique	Calcul du budget énergétique	Zn, dichloroaniline, NH ₃ , taux d'oxygène	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Maltby et Naylor, 1990
	Maintien l'homéostasie	[Na ⁺] [Cl ⁻] dans l'hémolymphe	Stress acide	<i>In vivo</i>	<i>G. fossarum</i>	Felten et Guerold., 2006
Moléculaire	Biomarqueur	Hsp90	Bisphenol A	<i>In vivo</i>	<i>G. fossarum</i>	Schirling et al., 2006
		Métallothionéine	Cadmium, Nickel , Plomb	<i>In vivo</i>	<i>G. fossarum</i>	Geffard et al., 2010
		AChE	Chlorpyrifos	<i>In vivo</i>	<i>G. fossarum</i>	Xuereb et al., 2007
		GST	Zinc, surfactant, lindane, pyrethroïde	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	McLoughlin et al., 2000
		Quantification de l'expression des protéines	PCB	<i>In vivo</i>	<i>G. pulex</i>	Leroy et al., 2010
		Vtg	Methyl farnesoate	<i>In vivo</i>	<i>G. fossarum</i>	Simon et al., 2010

Synthèse de la partie 3

Modèle biologique : *Gammarus fossarum*

Le gammare *Gammarus fossarum* est une bonne espèce sentinelle de part son intérêt écologique, écotoxicologique et méthodologique.

Intérêts écologiques :

- rôle structurel et fonctionnel dans les écosystèmes aquatiques
- espèce clé du réseau trophique
- fort potentiel de migration et de colonisation

Intérêts écotoxicologiques :

- forte sensibilité à de nombreux micropolluants et faible sensibilité aux pollutions organiques et matières oxydables
- large distribution (dans toute l'Europe)
- nombreuses études sur d'autres biomarqueurs
- peut remplacer avantageusement la Daphnie pour des études de terrain
- test de toxicité aigu établi
- cycle de vie bien connu
- reproduction sexuée et dimorphisme sexuel

Intérêts méthodologiques :

- espèce autochtone commune ayant un cycle de vie exclusivement aquatique
- forte biomasse et abondance
- espèce présente toute l'année à tous les stades
- facilement échantillonnable
- possibilité de l'élever au laboratoire

1.4. Objectifs

Ce travail de thèse propose une démarche de validation d'un biomarqueur de génotoxicité chez un crustacé d'intérêt écotoxicologique et écologique, l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. L'objectif est de proposer un outil de diagnostic applicable dans le cadre de programmes d'évaluation de la qualité des milieux et d'évaluation du risque environnemental en mettant au point une démarche rigoureuse permettant de détecter le potentiel génotoxique de composés chimiques d'origine anthropique dans le milieu naturel et d'en évaluer l'impact pour les organismes exposés. Ce projet repose sur une double approche laboratoire-terrain, utilisant des expérimentations *in situ*, comme la transplantation d'organismes. La réalisation des quatre objectifs décrits ci après nous est apparue nécessaire pour proposer ce biomarqueur comme une biomarqueur à vocation écologique.

Développement et signification

Dans un premier temps (chapitre III), le protocole de l'essai Comet a été adapté en laboratoire chez *G. fossarum* sur trois types cellulaires : l'hémolymphe, les ovocytes et les spermatozoïdes. La majorité des études utilisant l'essai Comet sur invertébrés est réalisée sur des tissus fluides comme l'hémolymphe. En effet, les cellules sont faciles à collecter et en lien direct avec les contaminants de l'environnement du fait de leur implication dans divers mécanismes de défense. L'essai Comet a été peu développé sur les cellules germinales, alors qu'elles jouent un rôle unique et essentiel dans la fonction biologique de reproduction puisqu'elles transmettent l'ADN parental à la future génération. Ainsi, le lien entre dommages à l'ADN et reproduction a rarement été appréhendé.

L'interprétation de ce biomarqueur de génotoxicité en terme d'effet peut reposer sur l'établissement d'une relation entre dommages observés au niveau des spermatozoïdes et effet sur la reproduction. Le succès de la reproduction étant un processus clé dans la pérennité des populations, cet aspect doit nous permettre de qualifier le biomarqueur de génotoxicité développé de biomarqueur à vocation écologique.

Validation et Application

Dans le chapitre suivant (chapitre IV), l'objectif a été de valider notre biomarqueur pour évaluer *in situ*, par le biais d'encagement, un risque environnemental. Il s'est agi de comprendre la variabilité naturelle de la réponse du biomarqueur en clarifiant le rôle de facteurs confondants afin d'éviter une interprétation erronée du biomarqueur, et d'établir un niveau de référence pour ce biomarqueur. Dans un premier temps la spermatogenèse a été rapidement décrite, afin de mieux connaître la physiologie de la reproduction mâle de notre organisme modèle. Ensuite, l'impact de facteurs méthodologiques, biotiques et abiotiques sur le niveau de base des dommages à l'ADN des spermatozoïdes a été déterminé par des expérimentations contrôlées au laboratoire et par un suivi mensuel de populations autochtones prélevées dans des sites non contaminés pendant un an.

Enfin, la pertinence du biomarqueur, dans des contextes de contaminations différentes a été étudiée. Des expositions réalistes d'organismes encagés à trois grandes familles de contaminants ont été réalisées et concernent:

- Les effluents de stations d'épuration, connus comme étant les principales sources de génotoxiques dans le milieu, investigués dans trois rivières Rhône-alpines.
- Les pesticides, qui sont aujourd'hui une problématique environnementale majeure de notre société, dont l'étude a été réalisée dans les canaux expérimentaux de l'INRA de Thonon-les-Bains en choisissant deux molécules phytosanitaires d'intérêt.
- La contamination polymétallique, suivie dans le cadre d'encagement dans un bassin versant fortement contaminé au cadmium, affluent du Lot.

Chapitre II

2. Matériels et méthodes

Bien que les matériels et méthodes soient indiqués dans les articles de cette thèse, ce chapitre II permet de détailler plus amplement les choix expérimentaux.

La première partie (II.1) présente les différents sites investigués dans ce travail. La deuxième partie (II.2) concerne la manipulation de *Gammarus fossarum*, son prélèvement dans le milieu naturel, son maintien en laboratoire, les méthodes de dissection et de récupération des types cellulaires d'intérêt ainsi que la caractérisation de la spermatogenèse. La troisième partie (II.3) présente les modalités d'exposition au laboratoire. La quatrième partie (II.4) présente les modalités d'exposition *in situ*, en rivière ou dans des canaux expérimentaux. Enfin, dans la dernière partie (II.5), les expérimentations réalisées et les outils mis en œuvre pour répondre à chacun des quatre objectifs de la thèse sont présentés.

Rappelons que les quatre objectifs que nous nous sommes assignés pour proposer un biomarqueur d'évaluation de la qualité d'un milieu dulçaquicole du point de vue de sa génotoxicité sont les suivants :

1. Développer au laboratoire un outil de diagnostic des impacts génotoxiques liés à la présence de molécules chimiques sur trois tissus cibles : l'hémolymphes et les cellules reproductrices mâles et femelles du gammare en utilisant le test Comet.
2. Interpréter les dommages observés au niveau des gonades en termes d'effet sur la reproduction pour comprendre la signification fonctionnelle de la réponse du biomarqueur.
3. Valider la robustesse de la réponse du biomarqueur en définissant le rôle des facteurs naturels biotiques et abiotiques et en établissant un niveau de référence.
4. Appliquer le biomarqueur développé pour évaluer la génotoxicité *in situ* engendrée par une contamination anthropique, afin de le proposer comme outil d'évaluation du risque environnemental.

2.1. Sites de prélèvement et d'encagement

Dans cette première partie, les sites sur lesquels sont prélevés les gammares issus de populations endogènes et les sites sur lesquels sont encagés des gammares provenant du laboratoire sont décrits.

2.1.1. Sites de prélèvement dans le milieu naturel

2.1.1.1. Site de prélèvement pour la stabulation des organismes au laboratoire

Il existe peu de publications précisant les conditions d'élevage des gammares au laboratoire. Les auteurs soulignent toutefois que l'élevage n'est pas aisé (Kunz et al., 2010). Nous avons donc choisi de travailler avec des organismes collectés dans un site très peu contaminé puis acclimatés au laboratoire. Les organismes sont issus d'un site localisé dans la partie amont de la Bourbre (Isère, France), un affluent du Rhône (Figure II-1). Le site de La Tour du Pin (longitude: 05°27'34"E, latitude: 45°27'34"N) a été retenu car il héberge une population importante de gammares, exclusivement de l'espèce *G. fossarum*. La hauteur d'eau et le débit de la Bourbre permettent l'échantillonnage des organismes toute l'année (Figure II-2).

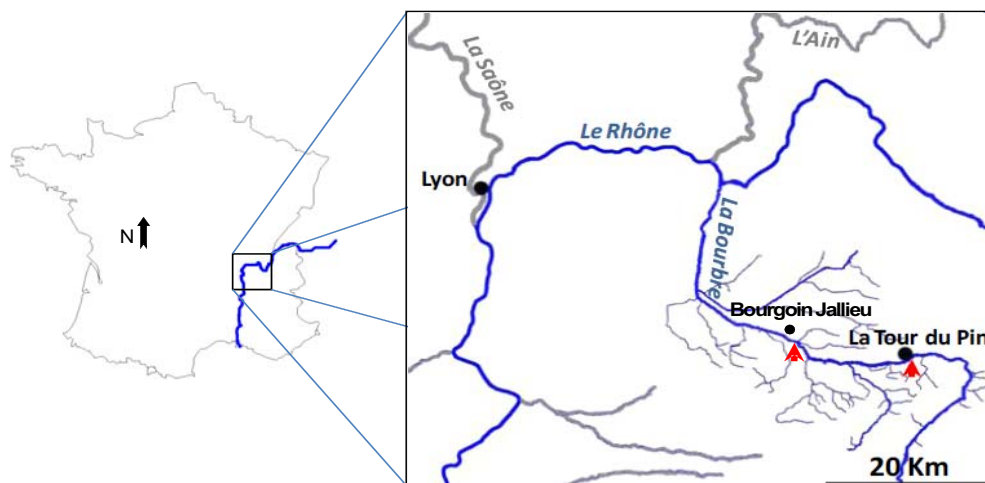


Figure II-1: Localisation géographique du site de La Tour du Pin.

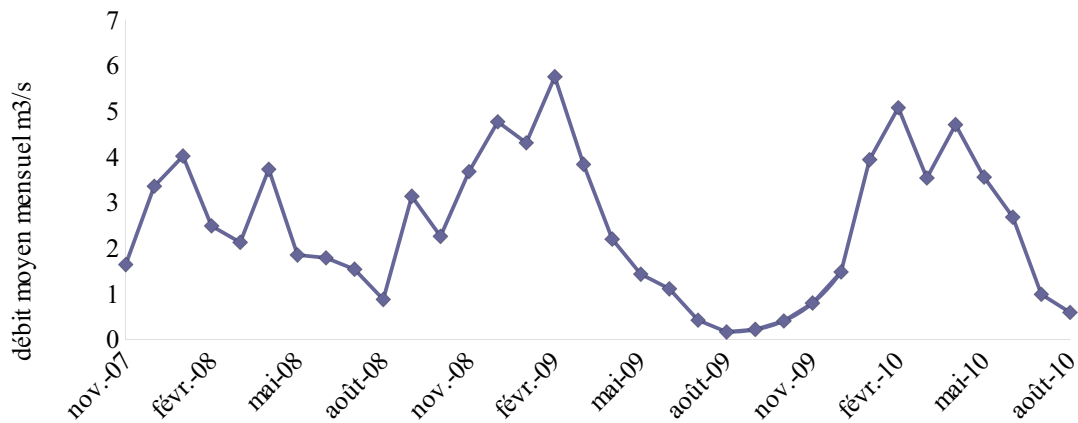


Figure II-2 : Débit mensuel moyen en m³/s de la Bourbre à Bourgoin Jallieu de Novembre 2007 à Août 2010 (Données Banque Hydro).

2.1.1.2. Sites de prélèvement pour le suivi du niveau de base des dommages à l'ADN :
les Ardillats et La Tour du Pin

Pour le suivi de populations autochtones, deux sites non contaminés aux caractéristiques physico-chimiques très contrastées ont été choisis. Il s'agit du site des Ardillats sur l'Ardière (longitude: 04°31'13"E, latitude: 46°11'10"N) et du site de La Tour du Pin sur la Bourbre, précédemment décrit. Ces deux stations sont représentatives de nombreux hydrosystèmes moyens en France. Les deux rivières présentent d'importantes variations de température au cours de l'année (de 3 à 24°C) mais une conductivité relativement constante. La nature du terrain du bassin versant et sa configuration sont très différentes pour ces deux hydrosystèmes. L'Ardière coule sur un socle granitique, ce qui se traduit par des dépôts de sable dans le lit du cours d'eau alors que le sous sol de la Bourbre est majoritairement clacaire, ce qui se traduit par des conductivités très différentes (en moyenne 110 µS/cm pour l'Ardière et 550 µS/cm pour la Bourbre). La qualité biologique de référence très bonne (données SEQ) est obtenue dans la partie amont du bassin de l'Ardière et bien que celle-ci se dégrade légèrement, elle reste bonne sur une grande partie du linéaire. En revanche, pour la Bourbre, la qualité biologique est bonne à La Tour du Pin, qui est située à environ 20 km de la source mais se dégrade de façon plus marquée à l'aval de Bourgoin Jallieu, la principale commune située sur la Bourbre.

Le tableau II-1 résume les principales caractéristiques hydrauliques et physico-chimiques des deux stations étudiées.

Tableau II-1 : Principales caractéristiques hydrauliques et physico-chimiques des deux stations de référence étudiées.

Rivière	Station	Bassin versant (km ²)	Linéaire (km)	Débit moyen (m ³ /s)	Conductivité moyenne (µS/cm)	Température (°C)		Qualité biologique (données SEQ eau RMC)
						min	Max	
Ardière	Les Ardillats	220	73	2,5	550 ± 25	3	18	Bonne
Bourbre	La Tour du Pin	750	29	0,7	110 ± 5	6	24	Très bonne

2.1.2. Sites d'encagement

2.1.2.1. Rejets de stations d'épuration

Trois stations d'épuration sur trois rivières de la région Rhône-Alpes appartenant à des bassins versants présentant un profil physico-chimique qualitativement et quantitativement différents compte tenu notamment des activités humaines (agricoles, urbaines et industrielles) ont été choisies (Figure II-3). Il s'agit des stations d'épuration de Beaujeu sur l'Ardière, de Bourgoin sur la Bourbre et de Fontaine^s/Saône sur la Saône. L'Ardière est une rivière du Beaujolais viticole, l'occupation des sols est largement agricole au niveau de Beaujeu. A Bourgoin, la Bourbre est plutôt marquée par un environnement industriel et urbain, et le bassin versant de la Saône, principal affluent du Rhône, est densément peuplé au niveau de Fontaine. La STEP de Bourgoin est la plus importante en terme d'équivalent-habitants, et c'est également celle recevant le plus de rejets industriels, comme le confirme le tableau II-2 qui résume les informations générales disponibles pour chacune des stations d'épuration.

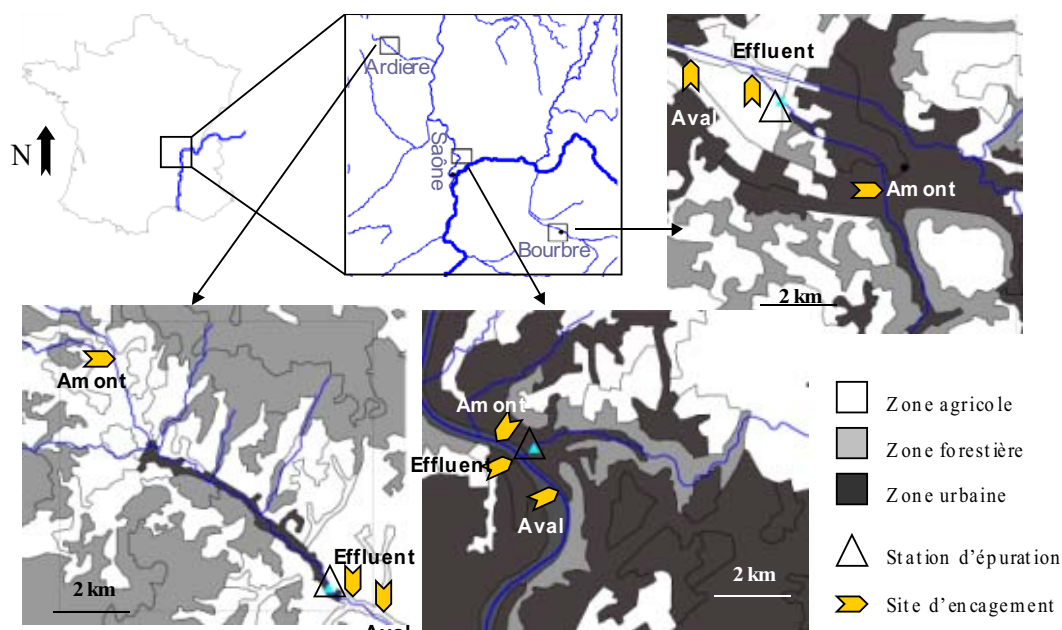


Figure II-3 : Localisation des sites d'encagement dans un contexte amont-aval de rejet de stations d'épuration et occupation du sol.

Tableau II-2 : Informations générales pour les stations d'épuration de Beaujeu, Bourgoin et Fontaine.

Rivière	STEP	Capacité (EH)	Commune raccordée	Établissements connectés	Autres rejets
Ardière	Beaujeu	2900	Beaujeu	Hôpital local (212 lits) Entrepôt boisson Fab. huiles et graisses brutes	Rejets phytosanitaires viticoles
Bourbre	Bourgoin Jallieu	78000	Bourgoin-Jallieu Domarin Les Eparres Maubec Meyrie Nivolas-Vermelle Ruy Saint-Agnin-Sur-Bion Saint-Alban-De-Roche Saint-Savin Serezin-De-La-Tour	Teinturerie Fabrique médicament Fabrique Produits Chimie Organique Centrale à béton Fabrique moteur électrique haute puissance Hypermarché Restauration Fabrique Pain Pâtisserie Fabrique Spiritueux Charpente Menuiserie	Lessivage routes et zones industrielles
Saône	Fontaine	30000	Albigny-Sur-Saone Cailloux-Sur-Fontaines Couzon-Au-Mont-D'or Curis-Au-Mont-D'or Fontaines-Saint-Martin Fontaines-Sur-Saone Poleymieux-Au-Mont-D'or Rochetaillee-Sur-Saone Saint-Cyr-Au-Mont-D'or Saint-Romain-Au-Mt-D'or Montanay Rillieux-La-Pape	Centre de séjours du Mont D'or Lycée Albert Camus	Lessivage zone urbaine

2.1.2.2. Le Lot à Decazeville

L'impact de la contamination métallique d'un bassin minier à Decazeville (Aveyron) sur le bassin versant du Riou Mort, un affluent du Lot a été suivi pendant deux ans, à raison de 4 fois par an. Les mécanismes de contamination de la zone amont du Lot par les rejets dans le Riou Mort de lessivage des stériles d'un site industriel, chargés en Cd et Zn, sont depuis quelques années bien caractérisés (Andrès et al., 1999 ; Baudrimont et al., 1999 ; Audry et al., 2004 ; Morin et al., 2008). Dans les eaux les sources de contamination ont été localisées et le flux annuel de Cd et de Zn a été caractérisé. Dans la biocénose l'accumulation de toxiques liée aux rejets de métaux est avérée dans divers maillons biologiques. C'est sur la base de ces différentes caractéristiques que cinq sites d'encagement ont été choisis (Tableau II-3 et Figure II-4).

Tableau II-3 : Description des cinq sites d'encagement sur le bassin versant du Riou Mort.

Rivière	Nom du site	Caractéristiques	Contamination en Cd et Zn
Riou Mort	Decazeville	Amont du site industriel	-
	Joany	Aval du site industriel Aval de la confluence avec le Riou Viou	+++
Riou viou	Riou Viou	Proche d'un terril	++
Lot	Lot amont	Barrage de Livinhac	-
	Lot aval	Barrage de Bouillac	+ / ++

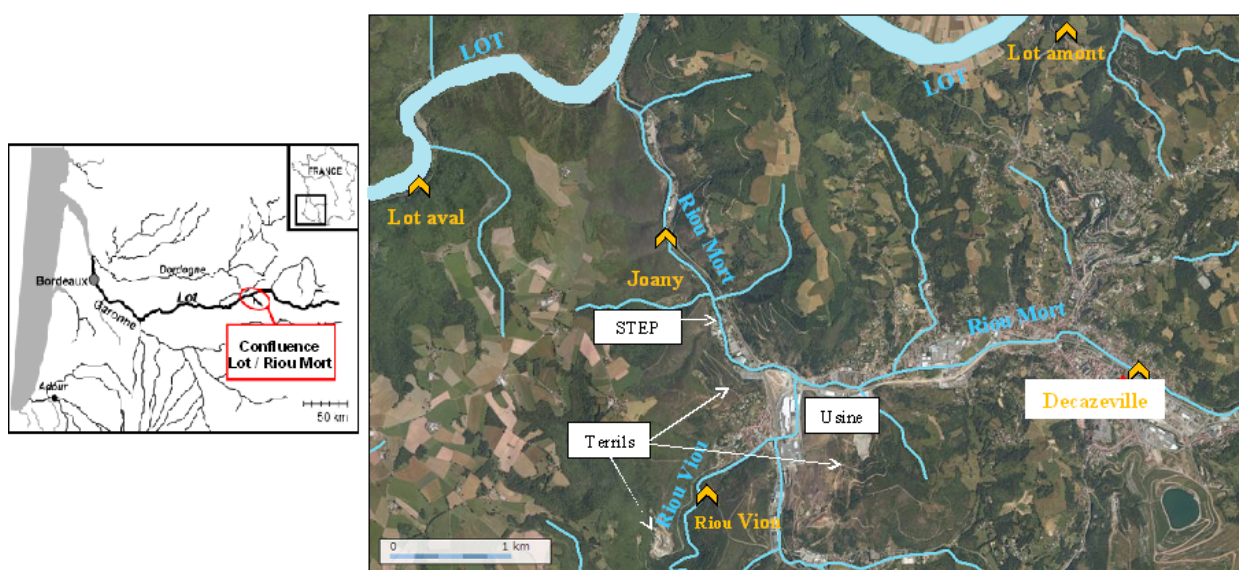


Figure II-4 : Localisation des sites d'encagement le long d'un gradient de contamination métallique dans le bassin versant du Riou Mort (Aveyron, France).

2.2. Matériel biologique

2.2.1. Technique de prélèvement des gammares

La technique de prélèvement consiste à remuer la litière et le substrat de la rivière, à la main ou au pied, pour provoquer la fuite et décrocher les organismes épibenthiques. Les organismes dérivent avec le courant et sont alors prélevés à l'aide d'un troubleau (aire rectangulaire : 25 x 18 cm ; maille 630 μm) placé à l'aval de la zone agitée. Un premier tri grossier permet de relâcher les espèces protégées ou rares comme certaines larves d'odonates et de coléoptères. Le contenu du troubleau est ensuite vidé à travers une colonne de tamis de maille 500 μm à 2,5 mm en fonction de la taille des organismes à échantillonner (Figure II-5).



Figure II-5 : Prélèvement d'organismes au troubleau et tri des gammares sur colonne de tamis.

Une fois tamisés, les organismes sont distribués dans des bidons en polyéthylène remplis d'eau du site de prélèvement, en veillant à ne pas mettre trop d'organismes dans un même bidon pour éviter des phénomènes d'anoxie. Les bidons sont immédiatement stockés dans une glacière afin de limiter les variations de température, puis ramenés au laboratoire.

2.2.2. Stabulation au laboratoire

Au laboratoire, le contenu des bidons est à nouveau tamisé et trié pour enlever le maximum de matière organique et conserver exclusivement notre espèce d'intérêt. Puis les gammares sont répartis dans des aquariums de 30 L placés dans un bain-marie thermostaté à $12 \pm 1^\circ\text{C}$ contenant de l'eau du site de prélèvement. Cette eau est remplacée goutte à goutte par un mélange d'eau de forage et d'eau osmosée à un pH compris entre 7,4 et 7,8 et une conductivité de $600 \pm 50 \mu\text{S/cm}$ correspondant au pH et à la conductivité des sites de prélèvement. Un système de bullage dans chaque aquarium permet de maintenir un taux d'oxygène dissous à saturation. La photopériode est fixée à 16 heures de jour et 8 heures de nuit sous une intensité lumineuse de 750 lux. La figure II-6 présente le système de stabulation des organismes.

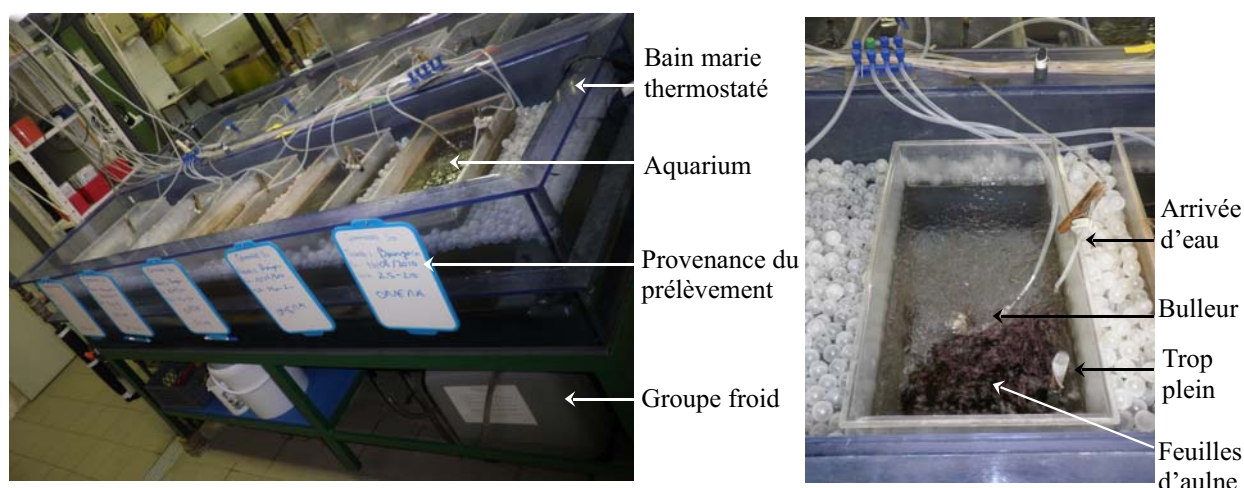


Figure II-6 : Système de stabulation des gammares au laboratoire.

Les gammares sont acclimatés au moins 15 jours au laboratoire avant toute expérimentation. Pendant ce temps de stabulation, ils sont alimentés *ad libitum* avec des feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) récoltées en automne dans une région peu anthropisée dans la localité des Ardillats (Rhône). Avant utilisation, les feuilles sont conditionnées pendant une semaine dans la même eau que celle des aquariums pour permettre leur réhydratation et le développement d'un biofilm pour augmenter leur appétence. Des tubifex déshydratés sont distribués deux fois par semaine comme apport nutritionnel complémentaire.

2.2.3. Dissection des organismes

Afin de prendre en compte l'importance du contexte cellulaire (origine et fonction) dans l'évaluation de la génotoxicité, trois types cellulaires ont été choisis pour leur importance dans la physiologie de l'organisme, et pour leur capacité à conditionner le succès reproductif. Il s'agit de l'hémolymphe, des spermatozoïdes et des ovocytes.

L'hémolymphe est un type cellulaire de choix pour l'essai Comet. Chez la plupart des invertébrés, et plus particulièrement chez les mollusques, son prélèvement est aisé et non invasif. De plus, les cellules étant libres et circulantes, aucun artéfact lié à la dissociation du tissu n'est créé. Son rôle majeur dans le système immunitaire, pour l'osmorégulation et le transport des éléments nutritifs aux organes lui confère un intérêt particulier pour l'évaluation de la génotoxicité. Les fonctions de l'hémolymphe chez le gammare ont été précédemment détaillées au paragraphe I.3.3.1.

Les spermatozoïdes et les ovocytes en vitellogénèse ont été choisis pour leur capacité à conditionner le succès de la reproduction, afin d'investiguer différents niveaux d'atteintes biologiques d'une pollution. Par le transfert du patrimoine génétique à la descendance, il est possible de relier les conséquences de la génotoxicité sur les gamètes à un niveau d'organisation biologique supérieur (celui de l'individu), et d'appréhender les éventuelles conséquences sur la descendance.

L'isolement des types cellulaires est une étape cruciale pour la suite des expérimentations. Un isolement correct et rapide permet de limiter les artéfacts de préparation de la suspension cellulaire, conditionnant la sensibilité du biomarqueur. Toutes les cellules sont récupérées dans 20 μ L de PBS, dans des microeppendorfs de 200 μ L conservés dans la glace pendant toute la dissection.

- Spermatozoïdes

Pour récupérer les spermatozoïdes, la gonade entière est disséquée et dilacérée dans du PBS. La figure II-7 illustre les principales étapes de la dissection. Le céphalon du gammare est coupé, les cæcums et le tube digestif sont extraits de la cavité thoracique (Figure II-7.A). Ensuite, les cuticules dorsales et ventrales sont découpées en veillant à ce que les lames du ciseau restent le plus près possible de la cuticule et ne s'enfoncent pas dans les organes (Figure II-7.B). Les

gonades, souvent entourées de gouttelettes lipidiques de couleur orange, sont récupérées à l'aide de forceps à pointe ultra fine (Figure II-7.C). Elles sont ensuite dilacérées dans un microtube Eppendorf contenant 20 μ l de PBS pour mettre en suspension les spermatozoïdes.



Figure II-7 : Etapes de dissection pour la récupération des spermatozoïdes de gammares. (A) découpe du céphalon, extraction des caecums et du tube digestif, (B) découpe de la cuticule ventrale et dorsale, (C) récupération des gonades.

- Hémolymphe

La collection des cellules de l'hémolymphe ne nécessite pas de dissection. Après avoir retiré toutes les gouttelettes d'eau présentes sur la cuticule du gammare à l'aide d'un papier absorbant, la cuticule est piquée à l'aide de microforceps au niveau du cœur, à l'arrière du prosoma, entre les périomères 1 et 2. La gouttelette d'hémolymphe d'environ 2 μ l qui se forme est récupérée par capillarité à l'aide d'un microcapillaire (Figure II-8). Il est nécessaire de pooler quatre organismes pour obtenir une quantité de cellules suffisante et nécessaire à la réalisation du test Comet.

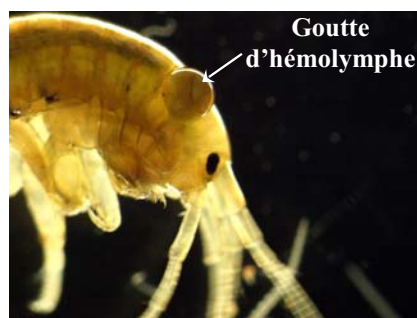


Figure II-8 : Gouttelette d'hémolymphe de *G.fossarum* collectée entre le prosoma et le mesosoma.

- **Ovocytes**

Au vu du faible nombre d'ovocytes par gonades et de la fragilité des membranes, leur récupération nécessite une dissection particulièrement minutieuse. Comme pour la récupération des spermatozoïdes (§ II.1.3, Figure II-7), l'organisme est ouvert, les caecums et l'intestin sont retirés et les gonades entières sont extraites (Figure II-9). Il est nécessaire de pooler quatre femelles pour obtenir un nombre de cellules suffisant.

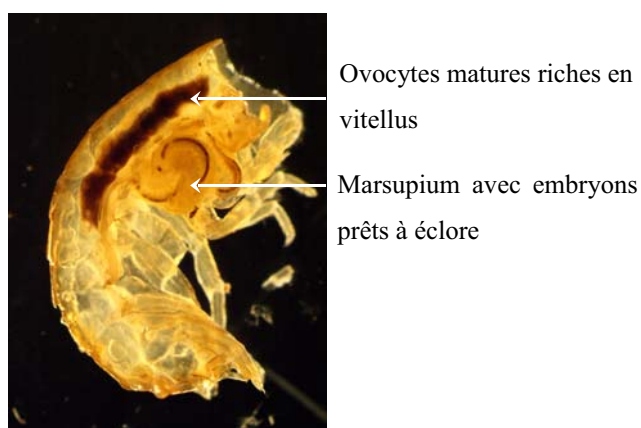


Figure II-9 : Récupération des ovocytes en vitellogénèse secondaire pour la préparation de la suspension cellulaire utilisée pour l'essai Comet.

Le tableau II-4 récapitule les méthodes de dissection utilisées pour les trois types cellulaires ainsi que le nombre d'organismes nécessaire à l'obtention d'une suspension cellulaire.

Tableau II-4 : Tableau synthétique de la procédure de dissection.

Type cellulaire	Dissection	Outils	Volume de PBS (0,1 M, pH 7,8)	Nombre d'organismes par suspension cellulaire
Spermatozoïdes	Sectionner le céphalon Retirer aux forceps les caecums et l'intestin	Ciseaux Vannas (lames 5 mm) Forceps Dumont #4 et #5 (0,05 mm x 0,02)	20 µL	1
Ovocytes	Découper la cuticule ventrale et dorsale Récupérer les gonades	Forceps recourbés (0,4 mm x 0,3 mm)	20 µL	4
Hémolymphe	Percer la cuticule entre les périomères 1 et 2 Aspirer la goutte d'hémolymphe par capillarité	Forceps Dumont #4 et #5 (0,05 mm x 0,02) Micro capillaire	20 µL	4

Attention : pendant la dissection, il faut veiller à ce que les organismes restent à 12°C et que le taux d'oxygène soit suffisant.

2.2.4. Caractérisation des stades de reproduction

Pour chaque expérience, les gammares mâles et femelles sont prélevés dans les aquariums de stabulation pour être triés en fonction de leur taille et de leur statut reproducteur. Le tri s'effectue dans un cristalliseur sur une table lumineuse. L'eau du cristalliseur est fréquemment changée pour éviter son réchauffement.

2.2.4.1. Ovogenèse

Le cycle de reproduction de la femelle est bien documenté (Xuereb, 2009 ; Geffard et al., 2010 ; § I.3.3.2) et il est aisé de sélectionner des femelles à un stade bien particulier, en observant sur une table lumineuse la couleur et la taille des ovocytes, ainsi que le contenu du marsupium visible par transparence. Toutefois, une femelle qui n'est pas en période de reproduction ne présente ni ovocytes ni marsupium. Pour ne pas confondre un mâle avec une femelle immature, il convient d'observer la présence de papilles génitales, placées ventralement au niveau de la dernière paire de pléopodes. Comme aucun critère visuel ne permet de savoir si un mâle qui n'est pas en précopula est mature sexuellement et si la vésicule séminale contient des spermatozoïdes, nous avons évalué la durée de la spermatogenèse et défini des critères permettant de choisir un mâle s'étant déjà accouplé et dont la vésicule séminale ne contient plus la totalité de la réserve de spermatozoïdes et un mâle ne s'étant pas encore accouplé et dont la réserve séminale est maximale.

2.2.4.2. Spermatogenèse

- **Protocole**

Des organismes en précopula sont triés et chaque couple est individualisé. Aussitôt après la fécondation, un premier lot de dix mâles est sacrifié pour étudier le contenu de la vésicule séminale par dénombrement des spermatozoïdes matures et immatures contenus dans la gonade. Cinq mâles supplémentaires sont utilisés pour une étude histologique des gonades. Le deuxième

lot de mâles est conservé, et chaque jour suivant la fécondation dix mâles sont sacrifiés. Des mâles en précopula sont également étudiés pour évaluer le nombre de spermatozoïdes matures et immatures lors du précopula. Les conditions expérimentales sont récapitulées dans le tableau II-5 ci après.

Tableau II-5 : Conditions expérimentales pour le suivi de la spermatogenèse.

Paramètres mesurés	Nombre de spermatozoïdes
	Histologie des gonades
Durée	7 jours à partir de la fécondation
Arrêts	Tous les jours de J0 à J7 + un arrêt mâle en précopula
Photopériode	16h jour/8h nuit
Température	12 ± 0,5°C
Conductivité	600 ± 20 µS/cm
pH	7,4 - 7,8
Renouvellement du milieu	Continu
Nombre d'organismes par arrêt	10 mâles
Nombre de réplicats	3 réplicats par temps d'arrêt
Aération	Continu
Alimentation	Feuilles d'aulnes <i>ad libitum</i> + Tubifex

- **Numération des spermatozoïdes**

Un fluorochrome vert SYTO® 9 du kit BacLight dead/life cells viability kit® de Invitrogen est ajouté à la suspension cellulaire de gonades. Le mélange est placé entre lame et lamelle (22x22 mm) pour observation au microscope à épifluorescence. Deux morphologies de spermatozoïdes bien distinctes sont observées : les spermatozoïdes sphéroïdes immatures et les spermatozoïdes filamenteux correspondant aux spermatozoïdes matures (cf § I-3.3.3). Tous les spermatozoïdes de 5 champs du milieu de la lamelle sont comptés.

- **Histologie des gonades mâles**

Le gammare entier est fixé dans une solution de Bouin (75 % de solution saturée d'acide picrique, 20 % de formaldéhyde, 5 % d'acide acétique) durant 48 h. Les échantillons sont ensuite

rincés durant plusieurs jours avec de l'éthanol 70° régulièrement renouvelé. Après déshydratation par passage dans des bains successifs d'éthanol 90° (3 x 90 min) et 100° (3 x 45 min), les organismes sont placés dans un bain de butanol (24 h), puis d'HistoChoice® clearing agent (Sigma) (3 h) afin d'assurer la transition entre l'éthanol et le milieu d'inclusion. Les échantillons sont alors inclus dans du Paraplast X-tra® (Sigma-Aldrich) liquide par différents bains successifs à 55 °C (3 x 2 h et 1 x 12 h) - garantissant ainsi la pureté du milieu d'inclusion - et mis en bloc à l'aide de barres de Leuckart pour des coupes transversales ou des cassettes d'inclusion pour des coupes longitudinales.

Des coupes sériées transversales et longitudinales de 5 µm d'épaisseur sont obtenues au moyen d'un microtome RM 2245 (Leica). Les coupes sont étalées et collées à chaud sur des lames de verre préalablement traitées avec de la poly-L-lysine. Après séchage à l'étuve (24 h à 37 °C), déparaffinage (bains successifs d'HistoChoice® clearing agent, 2 x 10 min, et de butanol, 1 x 5 min) et réhydratation (bains successifs de 5 min d'éthanol 100°, 95° et 75°), les lames sont colorées à l'hémalum éosine (Martoja et Martoja-Pierson, 1967), puis recouvertes d'une lamelle enduite du liquide de montage HistoChoice® mounting medium (MicomFrance). Les observations histologiques et les photographies sont réalisées au moyen d'un microscope DM 2500® (Leica) associée à une caméra numérique Infinity2-1C® (Lumenera) et du logiciel d'acquisition et de traitement d'image Visilog® v 6.4 (NOESIS).

2.3. Caractéristiques des expositions au laboratoire

Au laboratoire, les expériences en conditions contrôlées ont d'abord eu pour objectif d'évaluer la faisabilité du test Comet sur les trois types cellulaires choisis : l'hémolymphe, les ovocytes et les spermatozoïdes.

D'autre part, dans le but de déterminer la signification fonctionnelle du biomarqueur, les réponses observées au niveau sub-individuel ont été reliées à un trait de vie de l'individu, la reproduction. Pour cela, des gammares matures ont été exposés à deux génotoxiques modèles (le MMS et le Dichromate de potassium) puis transférés en milieu non contaminé juste avant la fécondation. Les embryons de cette fécondation sont donc issus de gamètes dont le génome est endommagé, mais se sont développés en milieu non contaminé.

Enfin, l'impact de facteurs biotiques (comme le statut reproducteur), abiotiques (comme la température et la conductivité) et méthodologique (tel que la durée d'exposition) sur la réponse du biomarqueur a été évalué indépendamment.

2.3.1. Exposition en continu

Il s'agit d'un suivi des organismes sans apport de contaminant. Ces conditions sont utilisées pour l'étude de la spermatogenèse, pour étudier le développement embryonnaire et pour étudier l'influence de facteurs biotiques et abiotiques sur la réponse du biomarqueur.

Pour étudier l'effet de la température et de la conductivité, et décrire la spermatogenèse, les organismes sont conditionnés en béchers alimentés en continu. L'arrivée d'eau est réglée par des pompes péristaltiques permettant un renouvellement constant au cours du temps et parfaitement similaire entre les béchers. Les béchers sont équipés d'une surverse afin d'évacuer le trop-plein. L'ouverture des surverses est obstruée par de la toile à bluter (maille : 300 μm) pour empêcher les éventuelles pertes d'organismes.

Le développement embryonnaire n'est pas réalisé en bécher mais dans des systèmes où les couples sont individualisés. Les systèmes sont conservés dans un bain marie thermorégulé à 12°C et sont alimentés en continu par le même milieu que celui de la stabulation (600 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Un système de bullage supplémentaire est également mis en place. Une sonde programmable enregistre toutes les 2 heures la température. Les caractéristiques physico-chimiques et la survie des organismes sont suivies quotidiennement.

2.3.2. Exposition en conditions semi-statiques

2.3.2.1. Dispositif expérimental

- ***In vitro***

Les hémocytes, les ovocytes et les spermatozoïdes de gammares sont recueillis dans des microeppendorf contenant 20 µl de PBS frais, puis exposés à des concentrations croissantes de MMS pendant 1 heure à 4°C et à l'obscurité.

- ***In vivo***

Les expositions sont toutes réalisées en condition semi-statique avec un renouvellement quotidien du milieu, mais sans nouvel apport de feuilles d'aulne. Le milieu utilisé est le même que celui alimentant les aquariums de stabulation. Les milieux contaminés renouvelés sont collectés dans un bidon contenant du charbon actif et retraités par un prestataire spécialisé.

Les gammares sont exposés dans des béciers de 500 ml en verre afin d'éviter l'adsorption du contaminant sur les parois, ou en polypropylène dans le cas de l'exposition au cadmium. Une pièce de toile à bluter en polyamide (maille : 500 µm ; longueur x largeur : 6 x 5 cm) est disposée dans chaque bécier de sorte à fournir une surface d'accroche, permettant ainsi de minimiser les agressions entre organismes.

Le milieu d'exposition est maintenu à $12^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ dans un bain marie thermorégulé par un groupe froid d'aquariophilie (Teco) dont l'eau est homogénéisée à l'aide de pompes. Pour éviter un éventuel gradient de température entre les béciers, ceux-ci sont disposés aléatoirement dans le bain-marie. Les caractéristiques physico-chimiques du milieu d'exposition (i.e., pH, conductivité, O₂ dissous et température) ainsi que la survie des organismes sont suivis quotidiennement. Une sonde de température programmable est placée dans le bain marie afin de mesurer très précisément les variations de température éventuelles (Figure II-10)

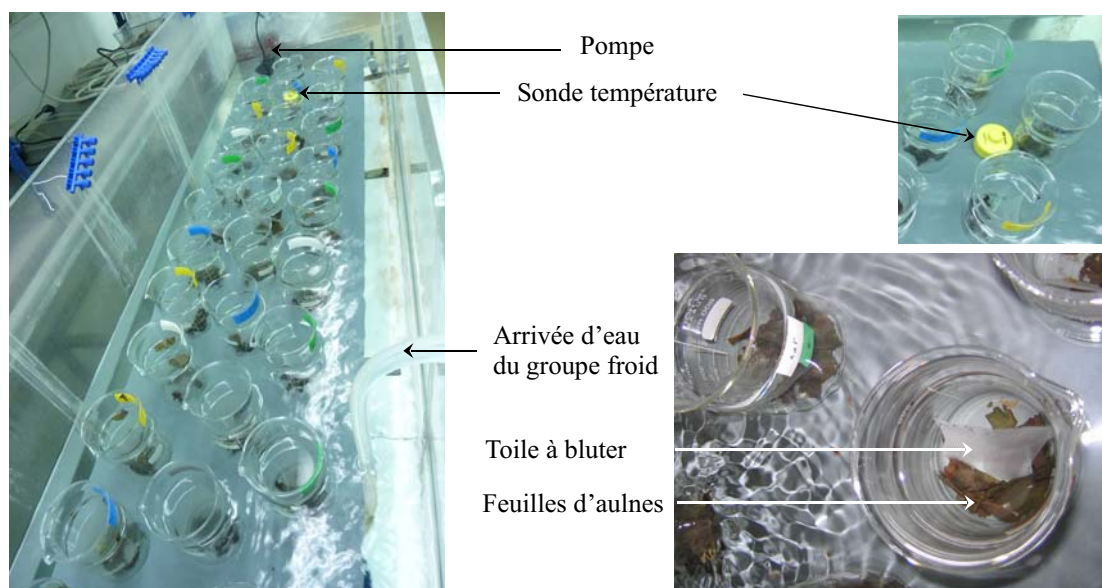


Figure II-10 : Dispositif expérimental semi-statique.

2.3.2.2. Contaminants utilisés au laboratoire

Au laboratoire, six molécules reconnues ou suspectées génotoxiques pour les organismes aquatique ont été utilisées. Il s'agit d'un génotoxique modèle le méthyle méthane sulfonate (MMS) et de cinq composés industriels ou agricoles : le benzo[a]pyrène, le cadmium, le dichromate de potassium, le pesticide Paraquat et un métabolite du glyphosate, l'acide aminométhyle phosphorique (AMPA). Quelques éléments de justifications de l'emploi de ces composés dans le cadre de notre travail sont fournis ci-après.

- **MMS**

Le MMS est un composé génotoxique modèle recommandé par de nombreux auteurs comme témoin positif dans les études de génotoxicité. Il est décrit comme un clastogène puissant et fait partie de la liste des substances recommandées par le Centre Européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM), pour évaluer la performance de nouveaux tests d'évaluation de la génotoxicité ou dans le cadre de leur optimisation (Kirkland et al., 2008).

- **Benzo[a]pyrène**

Le benzo[a]pyrène (BaP) est également une substance génotoxique recommandé par l'ECVAM. C'est un cancérigène reconnu susceptible de former des adduits à l'ADN, des dommages oxydatifs, des dépurinations et des cassures simple brin. Son activation par métabolisation est nécessaire. Il existe 3 principales voies de métabolisation des HAP (Lemaire et Livingstone, 1997). La plus importante implique la famille des cytochromes P450 (CYP450) qui catalyse l'oxygénation des HAP en époxyde. La 2ème voie repose sur la formation d'un radical cation suite à l'oxydation à un électron des HAP, catalysée par des cytochromes P450 peroxydase. Enfin une troisième voie implique la formation de quinones catalysée par des dihydrodiols déshydrogénases. En milieu marin, plusieurs études ont montré une atteinte de l'ADN au niveau des hémocytes de crabes et d'huîtres après exposition au BaP (Bihari et Fafandel, 2004 ; Wessel et al., 2007).

- **Cadmium**

Le cadmium est classé comme cancérigène inorganique par l'IARC et comme génotoxique de référence par l'ECVAM. Son potentiel génotoxique, bien que parfois faible chez certains organismes aquatiques est du à la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) (Bertin et Averbeck, 2006). Chez la moule, le cadmium a été associé à une augmentation des dommages à l'ADN lié à un stress oxydant et à une diminution des capacités de réparation (Emmanouil et al., 2007).

- **Dichromate de potassium**

Le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) est considéré comme un oxydant direct. Toutefois, sur culture de cellules de nageoire du poisson Medaka (OLHNI2), le Cr(VI) et la réduction en Cr(III) peuvent provoquer des anomalies chromosomiques, des adduits à l'ADN et des cassures double-brins (Goodale et al., 2008).

- **Paraquat**

Le Paraquat (1,1-diméthyl-4,4-bipyridylium dichlorure) est l'un des herbicides les plus utilisés au monde, vendu dans plus de 120 pays. Bien que la vente du produit ait été interdite en Europe depuis 2007, aucun délai de distribution, ni d'utilisation des stocks existants n'ont été établis. C'est pourquoi il présente toujours un risque pour l'environnement et la santé humaine (Bus et Gibson, 1984). La production de ROS serait responsable de la génotoxicité du Paraquat comme le confirme l'exposition *in vitro* de leucocytes humains (Ribas et al., 1995). Il semble que ce mode d'action soit également lié à une augmentation des dommages à l'ADN sur érythrocytes d'amphibiens exposés *in vivo* (Yin et al., 2008).

- **Acide aminophosphorique**

L'acide aminophosphorique AMPA est le produit de dégradation majeur de l'herbicide glyphosate. Le glyphosate est largement utilisé en agriculture moderne. Sa toxicité *a priori* modérée est augmentée par l'adjonction de surfactants soupçonnés de potentialiser sa toxicité pour le milieu aquatique. L'AMPA est considéré comme plus dangereux pour l'environnement que la molécule-mère et présente une persistance dans l'environnement plus importante. En plus d'aberrations chromosomiques, l'AMPA peut provoquer la formation d'adduits chez l'homme (Peluso et al., 1998). Manas et al. (2009) ont montré le pouvoir clastogène de l'AMPA sur les hémocytes de souris et la génotoxicité de ce composé a été validée par l'utilisation de trois tests de génotoxicité : les aberrations chromosomiques, le test du micronoyau et le test Comet.

2.4. Caractéristiques des expositions *in situ*

Pour valider notre outil d'évaluation de la génotoxicité dans un contexte de contamination environnementale réaliste, plusieurs campagnes de terrain ont été menées avec des organismes transplantés.

2.4.1. Méthodes d'encagement

Les organismes triés pour les expérimentations d'encagement proviennent des aquariums de stabulation dont une partie est alimentée par un mélange eau de forage/eau osmosée à une conductivité de 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ et l'autre partie est alimentée par une eau à 600 $\mu\text{S}/\text{cm}$. En fonction de la conductivité du site sur lesquels les organismes sont encagés, ils sont issus d'un aquarium à 600 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ou d'un aquarium à 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ pour éviter un choc osmotique trop important. Ils sont répartis dans des chambres cylindriques d'encagement en polypropylène de 5 cm de diamètre et 12 cm de hauteur. Ces systèmes sont clos par un couvercle au préalable percé, vissé sur un carré de toile à bluter de 500 μm de vide de maille (Figure II-11). Le fond de la chambre d'encagement est un carré de toile à bluter fondu sur les bords du tube de polypropylène. Un maximum de 20 organismes peut être contenu dans ces systèmes. Des feuilles d'aulne conditionnées sont ajoutées dans les chambres d'encagement.

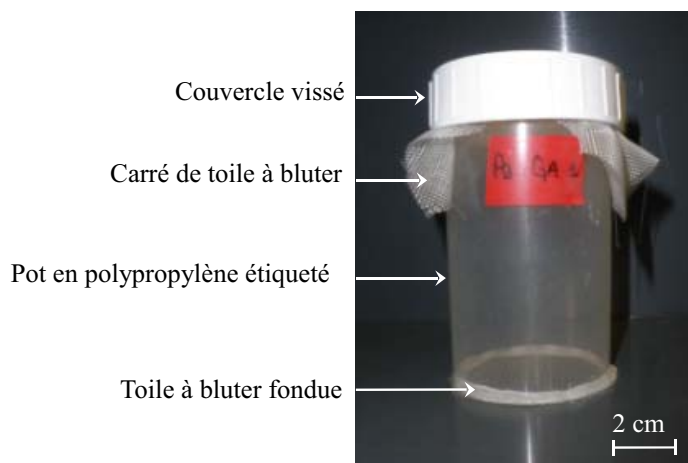


Figure II-11 : Chambre d'encagement en polypropylène.

Les systèmes sont transportés dans des bidons en polypropylène contenant le même milieu que celui de stabulation. Lors du transport sur les sites, les bidons sont placés dans des glacières avec un système de bullage.

Les chambres d'encagement sont protégées des branches ou des pierres pouvant déchirer les toiles par des caisses en PVC (longueur x largeur x hauteur : 60 x 40 x 20 cm) lestées par des pierres trouvées sur le site et par un bloc rocheux posé sur le couvercle (Figure II-12). Une sonde

programmable enregistrant la température toutes les 4 heures est fixée à l'intérieur de la caisse. Les caisses sont fixées sur la berge par une corde et un panneau d'information précisant l'objet des expériences est accroché pour éviter tout vandalisme (Figure II-13).



Figure II-12 : Caisses d'encagement

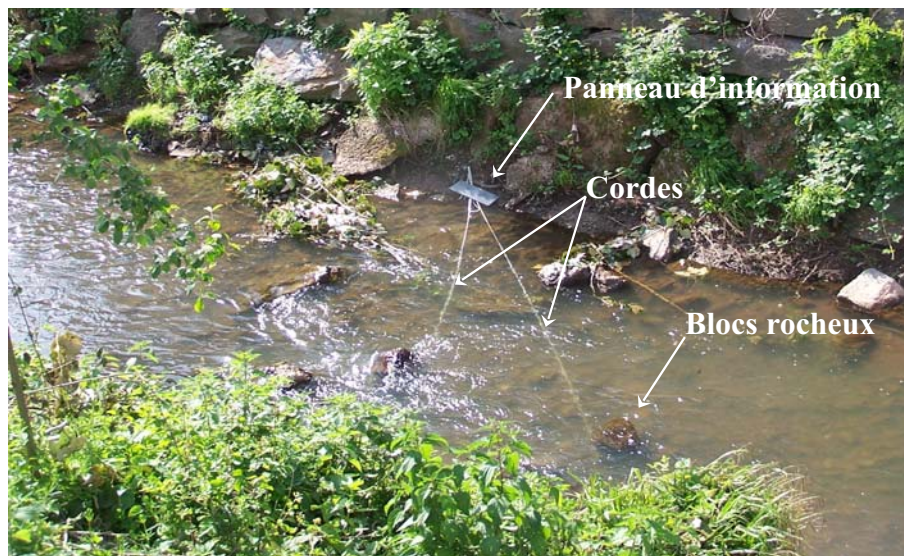


Figure II-13 : Systèmes d'encagement dans une rivière installés depuis la berge

Les sites d'encagement au niveau des barrages nécessitent de pouvoir descendre les organismes sans avoir accès à la rivière. Les chambres d'encagement sont donc accrochées dans un seau percé, lui-même placé dans un seau plus large rempli d'eau du site pour éviter que les organismes soient hors de l'eau lors de la descente du système d'encagement (Figure II-14).

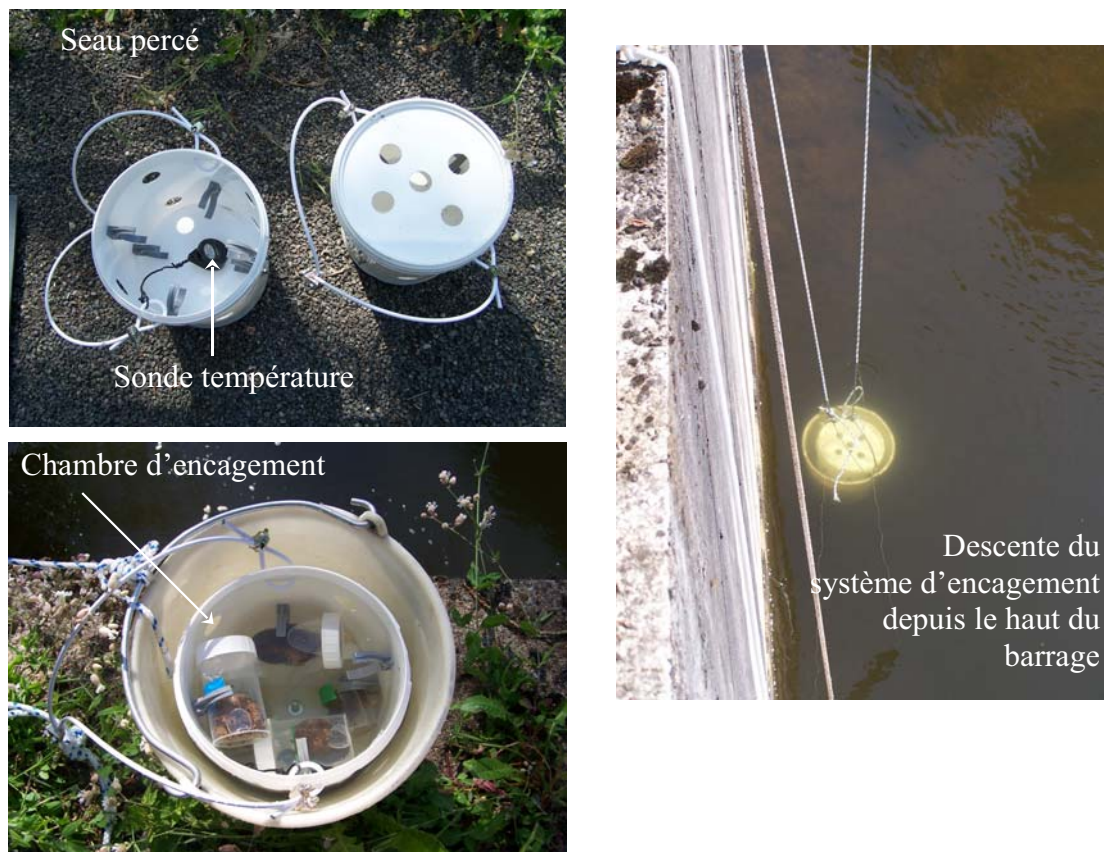


Figure II-14 : Systèmes d'encagement dans une rivière installés depuis un barrage

Les chambres d'encagement sont relevées au minimum toutes les semaines pour mesurer le taux de survie des organismes et ajouter de la nourriture si besoin. Si les conditions climatiques se dégradent (forte pluie, crue), les caisses sont relevées et nettoyées dès le lendemain pour éviter une sédimentation trop importante de la matière organique. Lors de l'arrêt d'une expérimentation de terrain, les gammarès sont ramenés au laboratoire dans leurs chambres d'encagement originelles placées dans un bidon contenant de l'eau du site. En fonction de la durée du retour au laboratoire un système de bullage peut être mis en place (expériences sur le Lot par exemple).

2.4.2. Mesures physico-chimiques

Lors de chaque installation de caisses d'encagement sur un site, des mesures physico-chimiques de base, à savoir pH, conductivité, température sont effectuées à l'aide d'une sonde multimètre WTW Multi350i. La teneur en oxygène est mesurée par un oxymètre. En plus de ces

mesures, un échantillon d'eau est prélevé dans un flacon de 500 ml en polyéthylène nettoyé au préalable au laboratoire avec de l'eau déminéralisée. Sur le terrain, le flacon est rincé 3 fois avec de l'eau du site, rempli, puis rebouché sous l'eau afin d'éviter tout phénomène de dégazage et conserver ainsi les caractéristiques physico-chimiques de l'eau prélevée. Les échantillons d'eau sont ensuite ramenés au laboratoire dans une glacière remplie de pains de glace.

Dans les 48 heures suivant l'échantillonnage, le pH, la conductivité, les concentrations en anions majeurs Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} et NO_2^- , PO_4^{3-} , HCO_3^- , en cations Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , et NH_4^+ , la teneur en matières en suspension (MES) et le carbone organique dissous (COD) dans l'eau filtrée sont déterminés.

2.4.3. Exposition en canaux expérimentaux

Une exposition à deux pesticides en mélange, le diuron et le tébuconazole, deux produits phytosanitaires utilisés en agriculture et notamment en viticulture et très présents dans les eaux de surface, a été réalisée en canaux artificiels lotiques, sur la plate-forme expérimentale de l'INRA à Thonon.

Le diuron est un herbicide utilisé en viticulture. C'est le sixième pesticide le plus détecté dans les eaux potables en France (Ministère de la Santé, 2005). Il est relativement peu soluble dans l'eau (35,6 mg/L). Son potentiel génotoxique sur le milieu aquatique a déjà été démontré chez plusieurs espèces de poissons (*Phoxinus phoxinus* et *Danio rerio*, Bony et al., 2008 ; Bony et al., 2010). Le tébuconazole est un fongicide de la famille des triazoles, utilisé à la fois en viticulture et en céréaliculture. Comme le diuron il est relativement peu soluble dans l'eau (36 mg/L). Aucune donnée n'existe concernant son pouvoir génotoxique.

La plate-forme, créée dans le cadre de la thèse de Laurence Volatier (2004), est composée de 4 canaux (longueur 4 m x largeur 40 cm x profondeur 35 cm) chacun s'écoulant dans une cuve carrée de 1,5 m³. C'est dans ces cuves que sont engagés les gammares. Les canaux sont situés en extérieur et sont non couverts, ce qui permet d'avoir une photopériode naturelle (Figure II-15).

Ils sont alimentés par l'eau du lac Léman, pompée à 36 m de profondeur. Le débit de pompage permet un renouvellement du milieu 4 fois par jour. Le trop plein contaminé est filtré sur du charbon actif avant d'être rejeté. Deux canaux sur quatre sont alimentés en continu par

une solution mère de pesticides purs, de qualité analytique, au moyen de pompes péristaltiques. La concentration en pesticides est maintenue constante au cours de l'expérimentation par l'ajustement du flux d'entrée des pesticides. Les deux autres canaux sont des canaux témoins.

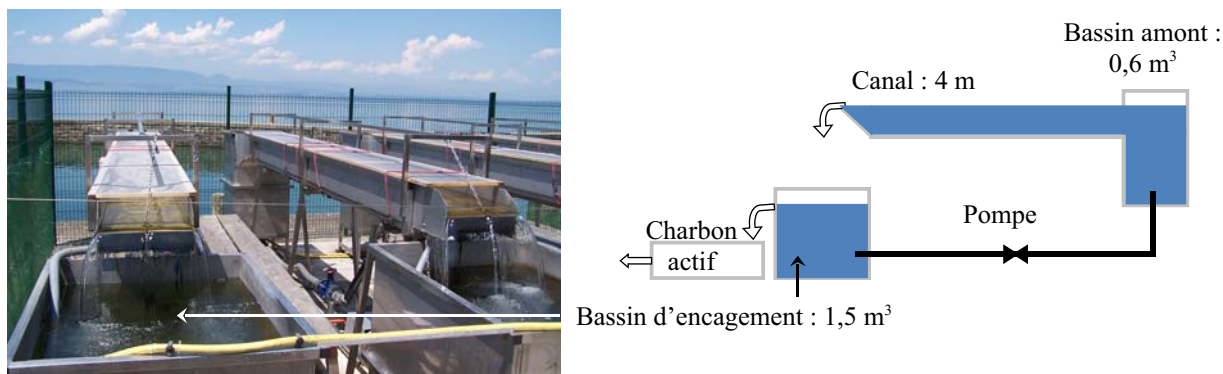


Figure II-15 : Description des canaux expérimentaux lotiques (photo et schéma).

2.5. Expérimentations mises en œuvre pour répondre aux objectifs de la thèse

Afin de faciliter la clarté de cette partie, les différentes informations relatives aux outils mis en oeuvre sont synthétisées pour chacun des objectifs traités dans ce travail. Pour chaque objectif, correspond également une publication scientifique dans laquelle les matériels et méthodes sont rappelés.

2.5.1. Développement du biomarqueur

Pour développer le biomarqueur de génotoxicité sur les trois types cellulaires d'intérêt, la première étape a consisté à vérifier la viabilité des cellules prélevées, par la méthode d'exclusion au bleu Trypan et par la méthode de BacLight™.

La validité du protocole de l'essai Comet a ensuite été vérifiée pour les trois types cellulaires, par l'établissement de relation dose-effet, suite à des expositions *in vitro* et *in vivo* au

méthyle méthane sulfonate (MMS). Le protocole a du être adapté pour les spermatozoïdes, comme déjà décrit pour certaines espèces (§ I.2.4 et Annexe I).

Pour appréhender le potentiel de cette technique pour des études écotoxicologiques utilisant le gammare comme organisme sentinelle, la réponse génotoxique de cinq contaminants environnementaux (Cadmium, Acide aminophosphorique AMPA, Dichromate de potassium, BaP, Paraquat) a été évaluée.

2.5.1.1. Viabilité cellulaire

Les étapes de conservation des suspensions cellulaires, la plupart du temps par cryopréservation, entraînent souvent une diminution de la viabilité et peuvent également engendrer des dommages à l'ADN artéfactuels lorsque les cellules sont décongelées. C'est pourquoi, il a été choisi de travailler exclusivement sur des échantillons de cellules fraîchement prélevées. La viabilité des cellules est évaluée immédiatement après collecte et avant de procéder au test Comet.

Deux techniques ont été mises en œuvre. Pour les hémocytes et les ovocytes la mesure de la viabilité est réalisée par le test d'exclusion au Bleu Trypan. Ce test de coloration permet de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes car celles-ci se colorent en bleu. La coloration bleue des cellules nécrotiques ou apoptotiques peut être due à leur membrane dégradée, par pénétration du Bleu Trypan que la cellule n'est plus à même d'excréter.

Pour les spermatozoïdes, la viabilité est évaluée par un kit commercial, le kit Baclight dead/life cells viability kit[®], développé par Invitrogen, pour les bactéries. Ce kit a été utilisé pour les spermatozoïdes uniquement car le test d'exclusion au Bleu Trypan ne permettait pas une détection nette et sans ambiguïté de l'état de viabilité de la cellule. Ce test permet de mesurer la proportion de bactéries vivantes ou mortes dans une population observée en microscopie à épifluorescence. Le kit emploie deux fluorochromes spécifiques des acides nucléiques, un agent fluorescent vert le SYTO[®] 9 et l'iodure de propidium, un agent intercalant de l'ADN. Lorsqu'il est utilisé seul le SYTO[®] 9 colore toutes les cellules vivantes ou mortes. A l'inverse l'iodure de propidium ne pénètre que dans les cellules ayant subi un endommagement de leur membrane, et réduit le SYTO[®] 9. Les cellules vivantes fluorescent en vert alors que les cellules mortes à la membrane endommagée fluorescent en rouge. Etant initialement conçu pour évaluer la viabilité

bactérienne, une première étape de validation du test Baclight a été nécessaire afin de s'assurer de son pouvoir discriminant, en exposant les spermatozoïdes pendant une heure à 4°C à une gamme croissante d'éthanol (éthanol dilué dans du PBS). Les résultats de cette expérience préliminaire sont présentés dans la figure II-16.

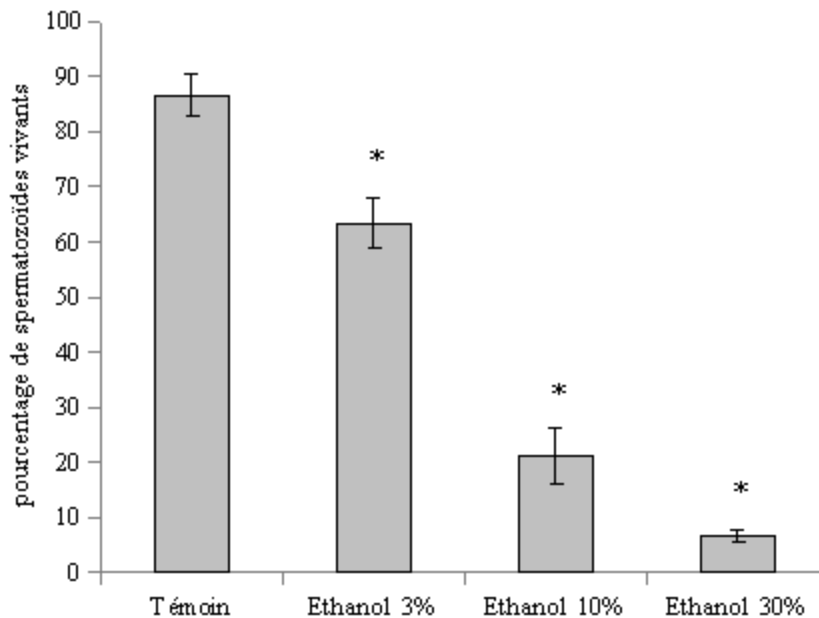


Figure II-16 : Pourcentage de viabilité des spermatozoïdes exposés à une gamme croissante d'éthanol mesuré par le test Baclight. * significativement différent du témoin

L'établissement d'une dose-réponse significative confirme qu'il est possible d'utiliser le kit Baclight pour évaluer la viabilité des spermatozoïdes.

Le tableau II-6 résume les étapes des protocoles d'évaluation de la viabilité pour les trois types cellulaires, par les deux méthodes décrites précédemment.

Tableau II-6 : Tableau synthétique du protocole des test de viabilité cellulaire

Type cellulaire	Volume de réactifs	Incubation	Observation	Montage	Dénombrement
Spermatozoïdes	10 µL de SYTO® 9 10 µL d'iodure de propidium	15 minutes à 4°C à l'obscurité	Microscope à épifluorescence	Entre lame et lamelle (22x22 mm)	200 cellules
Ovocytes Hémolymphes	20 µL de bleu Trypan	Aucun	Microscope inversé à contraste de phase	Sur cellule de Malassez	nombre moyen de cellules par carré x facteur de dilution x 10 ⁴ (comptage sur 10 carrés)

2.5.1.2. Protocole du test Comet

La technique de l'essai Comet est une microélectrophorèse de noyaux de cellules isolées sur gel d'agarose, en conditions alcalines. Le protocole suivi pour ce travail repose en grande partie sur le protocole décrit par Singh et al. en 1988. A $\text{pH} > 13$, le test permet de révéler les dommages simple et double brins et les sites alcali-labiles. Deux étapes sont considérées comme critiques. La première est l'étape d'obtention des suspensions cellulaires qui peut nécessiter une dissociation tissulaire pouvant entraîner des dommages artéfactuels. La deuxième étape critique est celle de lyse des matrices extracellulaires et de la membrane nucléaire. Si de nombreux types cellulaires comme l'hémolymphé et les ovocytes n'imposent pas de contraintes majeures pour la lyse, l'application du test Comet sur les spermatozoïdes nécessite de suivre un protocole expérimental modifié, du fait de la résistance de leur membrane et de la forte condensation de l'ADN dans ces cellules (Reger, 1979). Toutefois, si la chromatine des spermatozoïdes d'invertébrés est plus condensée que dans les autres types cellulaires, elle l'est moins que celle des spermatozoïdes de mammifères (Reger, 1979). Ainsi, dans notre cas, aucun ajout d'enzymes telle que la protéinase K n'est nécessaire pour permettre un déroulement correct de l'ADN. Seule une augmentation de la durée de lyse a été appliquée (voir Note 1 du chapitre 3).

Les huit étapes du protocole du test Comet sont détaillées ci après.

Préparation des lames

- Des lames de microscope sont couvertes d'une couche d'agarose normal à haut point de fusion à 0,8% préparé dans du PBS sans Mg^{2+} ni Ca^{2+} .
- Les lames sont laissées toute une nuit à 20°C pour permettre la polymérisation du gel.

Inclusion des cellules

- Un gel d'agarose à bas point de fusion à 1% dans du PBS est maintenu en surfusion dans un bain-marie à 37°C .
- 20 μL de suspension cellulaire sont mélangés à un volume égal de cet agarose.

- Les 40 μL de mélange obtenus sont homogénéisés doucement à l'aide d'une micropipette de 20 μL .

- Ce mélange est déposé sur une lame pré-couverte d'agarose.

- Une lamelle de 22x22 mm est ajoutée et la lame est maintenue à 4°C à l'obscurité pendant 10 minutes pour permettre la polymérisation de la deuxième couche d'agarose.

Remarque : il est courant de déposer une troisième couche d'agarose sur la lame mais dans notre cas, cette étape n'a pas été nécessaire.

Attention : la suite du protocole doit être réalisée à l'obscurité ou sous lumière inactinique pour éviter d'induire des dommages à l'ADN lié aux rayonnements.

Lyse cellulaire

- Après les 10 minutes de polymérisation, la lamelle est retirée avec précaution et la lame est plongée dans une cuve contenant une solution de lyse à pH 10, fraîchement préparée.

- La cuve est maintenue à l'obscurité et à 4°C.

- L'étape de lyse dure 1 h pour les hémocytes et les ovocytes. Pour les spermatozoïdes, la durée de l'étape de lyse a fait l'objet d'une mise au point qui est décrite dans la Note 1 du chapitre III.1. Elle a été fixée à 18 h. La composition de la solution de lyse est présentée dans le tableau II-7.

Tableau II-7 : Composition de la solution de lyse pour le test Comet

Composant	Concentration	Rôle
NaCl	2,5 M	Dégradation des protéines (histones)
Tris	10 mM	Assure les conditions alcalines
Na ₂ EDTA	100 mM	Inhibition des nucléases, enzymes de dégradation de l'ADN en complexant les cofacteurs métalliques
DMSO	10%	Antioxydant
Triton X-100	1%	Détergent assurant la destruction des membranes cellulaires et nucléaires

Déroulement de l'ADN

- Les lames sont sorties de la cuve de lyse et légèrement éponnées sur du papier absorbant pour enlever le restant de solution de lyse.

- Elles sont installées dans une cuve à électrophorèse horizontale et calées avec des lames en verre.

- Elles sont alors immergées dans le tampon d'électrophorèse fraîchement préparé (0.3 M NaOH, 1mM Na₂EDTA, pH>13.0) pendant 40 minutes, à 4°C.

Electrophorèse

- L'électrophorèse est réalisée sous un champ électrique de 0,6 V/cm (20V), avec une intensité de 300 mA et pendant 24 minutes.

Les molécules d'ADN chargées négativement migrent vers l'anode. Les fragments libres se détachent du nucléoïde et forment les figures caractéristiques des comètes.

Neutralisation

- A la fin de l'électrophorèse, les lames sont sorties de la cuve électrophorétique et légèrement éponnées.

- Elles sont rincées 3 fois avec une solution de Tris (0,4 M, pH 7,5) pendant 5 minutes à chaque fois.

Cette étape permet de rétablir l'appariement de l'ADN en double brins, ce qui permet ultérieurement la fixation du bromure d'ethidium, agent intercalant, utilisé pour la lecture des lames. Il est alors possible de travailler à la lumière du laboratoire.

Déshydratation et conservation

- Les lames sont déshydratées au moins 15 minutes dans de l'éthanol absolu puis séchées à l'air libre (20°C).

Cette étape permet de conserver les lames jusqu'à l'étape de lecture.

Lecture des lames

Les lames sont colorées avec 20 μ L de bromure d'ethidium à 10% (0,05 mM) et couvertes d'une lamelle 22x22 mm. Elles sont observées à un grossissement x400 sous un microscope à épifluorescence (Axioscope, Zeiss-Cermany) équipé d'une caméra monochrome CDD (Hitachi). Les cellules sont traitées individuellement à l'aide du logiciel d'analyse d'image Comet Assay IV développé par Perceptive Instruments (voir § I.2.4). Cinquante cellules par lames sont comptées et 5 lames par condition sont analysées (parfois 3 selon l'expérience (voir § II.2.4). Les paramètres de mesure « % Tail intensity » moyen et médian, représentatifs de la proportion d'ADN dans la queue de la comète et le paramètre « Tail moment » produit du pourcentage d'ADN dans la queue par sa longueur ont été retenus. Après avoir vérifié la cohérence entre les paramètres, les résultats ont tous été exprimés par le pourcentage médian d'ADN dans la queue (median % tail DNA).

Pour l'analyse statistique des résultats, des tests non paramétriques ont été appliqués à l'aide du logiciel Statistica 9 (StatSoft Inc.). Le test de Kruskal-Wallis, équivalent non paramétrique de l'analyse de variance qui compare les moyennes sans condition de normalité, a été utilisé. L'hypothèse d'une différence significative entre deux moyennes représentatives de deux conditions expérimentales distinctes a été testée par l'application d'un test de Mann-Whitney, portant sur deux échantillons indépendants. Les jeux de données peuvent contenir un nombre différents d'observations ou même faire référence à deux variables différentes car ce test utilise non pas les valeurs prises par les observations mais leur rang une fois les observations réunies dans un même ensemble. Dans le cas d'une relation dose-réponse, sa linéarité est confirmée ou non par une régression linéaire simple et le calcul du coefficient de corrélation de Pearson rapport de la covariance entre x et y sur le produit des écarts-types.

Dans le tableau II-8, les caractéristiques des expérimentations réalisées pour répondre à l'objectif du développement du protocole du test Comet sont décrites sous forme synthétique.

Tableau II-8 : Développement du biomarqueur : expérimentations en laboratoire

	Viabilité cellulaire	Etablissement du protocole du test Comet pour les spermatozoïdes	Exposition <i>in vitro</i> à un génotoxique modèle	Exposition <i>in vivo</i> à un génotoxique modèle	Exposition <i>in vivo</i> à des contaminants environnementaux
Stresseur	Ethanol	MMS (10 mM, 1h)	MMS	MMS	Cd, Pq, BaP, K ₂ Cr ₂ O ₇ , AMPA
Durée	2 h	24h	1h	5 jours	5 jours
Paramètre variable	% d'éthanol 0, 3, 10, 30%	Temps de lyse 1h, 3h, 18h, 24h	[MMS] 0, 0.5, 1, 5 mmol/L	[MMS] 0, 4, 20, 100 µmol/L	Témoin, témoin DMSO [Cd] 0.015, 0.15, 1.5 µg/L [Pq] 0.16, 0.63, 2.5, 10 mg/L [BaP] 2.5, 25, 250, 2500 µg/L [K ₂ Cr ₂ O ₇] 0.06, 0.25, 1, 4 mg/L [AMPA] 0.06, 0.25, 1, 4 mg/L
Photopériode	Obscurité	Obscurité	Obscurité	16/8 h	16/8 h
Température °C	4	4	4	12 ± 0,5	12 ± 0,5
Conductivité µS/cm	-	-	-	600 ± 30	600 ± 30
pH	-	-	-	7,6-8	7,6-8
Renouvellement du milieu	Aucun (<i>in vitro</i>)	Aucun (<i>in vitro</i>)	Aucun (<i>in vitro</i>)	Toutes les 24 h	Toutes les 24 h
Alimentation	-	-	-	<i>Ad libitum</i>	<i>Ad libitum</i>
Nombre de réplicats par conditions	3	3	3	3	3
Organismes sacrifiés par réplicat	1 ♂	1 ♂	1 ♂, 4 ♀ en D2, 4 ♂ (pour hémolymph)	1 ♂, 4 ♀ en D2, 4 ♂ (pour hémolymph)	1 ♂
Nombre d'organismes par béchers	-	-	-	7 ♂, 7 ♀	12 ♂
Paramètres mesurés (type cellulaire)	Viabilité (spermatozoïdes)	Viabilité et dommages à l'ADN (spermatozoïdes)	Viabilité et dommages à l'ADN (spermatozoïdes, ovocytes et hémolymph)	Mortalité Viabilité et dommages à l'ADN (spermatozoïdes, ovocytes et hémolymph)	Mortalité Viabilité et dommages à l'ADN (spermatozoïdes)

2.5.2. Signification et interprétation du biomarqueur en terme d'effet

Dans le but d'interpréter les réponses observées au niveau sub-individuel à un trait de vie de l'individu (la reproduction), la relation pouvant exister entre l'atteinte génotoxique des cellules germinales et une altération de la reproduction a été étudiée. Pour cela, des expériences au laboratoire et sur le terrain ont été menées, comme indiquées dans le tableau II-9. Les niveaux de dommages à l'ADN des ovocytes et des spermatozoïdes ont été mesurés par le test Comet dont le protocole est décrit précédemment (II.6.1.2). Des gammares matures ont été exposés à deux génotoxiques modèles (le MMS et le Dichromate de potassium) et à un rejet de station d'épuration sur la Bourbre. Après exposition, les organismes sont transférés en milieu non contaminé juste avant la fécondation.

Les embryons sont gardés pendant 21 jours à 12°C en milieu non contaminé. L'apparition d'anomalies dans le développement embryonnaire est alors reliée à un transfert d'anomalies génétiques, d'origine paternelle et/ou maternelle. Après 21 jours de développement, plusieurs critères quantitatifs et qualitatifs d'observation des embryons et des femelles sont retenus. La fertilité, la fécondité, le stade de mue des femelles, le stade du développement des embryons contenus dans la poche marsupiale et leur taille, ont été évalués comme marqueurs d'un impact sur la reproduction et d'un transfert de dommages des géniteurs à la descendance. Les méthodes d'observation de chacun de ces critères sont détaillés ci-dessous.

- **Stade de mue**

Le stade de mue de la femelle est déterminé par l'observation microscopique des tissus de l'extrémité des périopodes, selon la méthode décrite par Xuereb (2009) et par Geffard et al. (2010) (§ I.3.3.2). Les extrémités des périopodes des 3èmes et 4èmes paires sont sectionnées avec des ciseaux de Wecker et montées entre lame et lamelle dans du milieu de stabulation. L'apparition de la nouvelle cuticule est appréciée au moyen d'un microscope DM 2500® (Leica) aux grossissements x 400 et x 630.

- **Fécondité**

Les ovocytes secondaires en vitellogénèse sont comptés *in vivo* en observant les ovaires par transparence à travers la cuticule (grossissement x 30). La femelle est ensuite photographiée sous une loupe binoculaire équipée d'un appareil photo numérique, pour évaluer sa taille par le logiciel d'analyse d'image SigmaScan® Pro v5.0 (Systat Software).

- **Fertilité**

Les embryons au 21^{ème} jour de développement (sur 30 à 12°C), sont extraits de la poche marsupiale de la femelle vivante à l'aide d'un forceps à points ultra-fines, sous une loupe binoculaire, et sont déposés dans une goutte du milieu de stabulation sur une lame. Les embryons sont dénombrés et pris en photo (x30).

- **Stade de développement embryonnaire et anomalies**

Le stade de développement embryonnaire est évalué après 21 jours de développement à 12°C sur la base des critères définis par Geffard et al. (2010). La longueur et la largeur des embryons est mesurée par le logiciel SigmaScan® Pro v5.0. Les anomalies de développement des embryons sont décrites et dénombrées. La figure II-17 est une photographie d'embryons normaux après 21 jours de développement à 12°C. La figure II-18 présente les différents types d'anomalies rencontrées et considérées comme telles. Il peut s'agir d'un décollement de la membrane de fécondation, d'un avortement, d'un retard de développement important, d'œdèmes, de malformations non spécifiques.

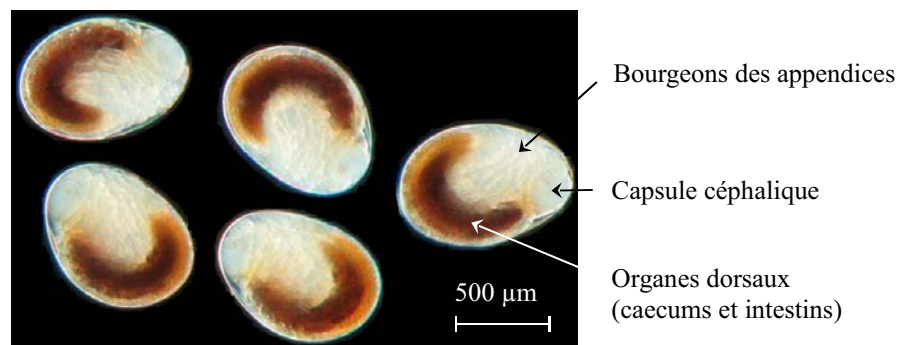


Figure II-17 : Photographie d'embryons de *G.fossarum* après 21 jours de développement à 12°C (stade 3).

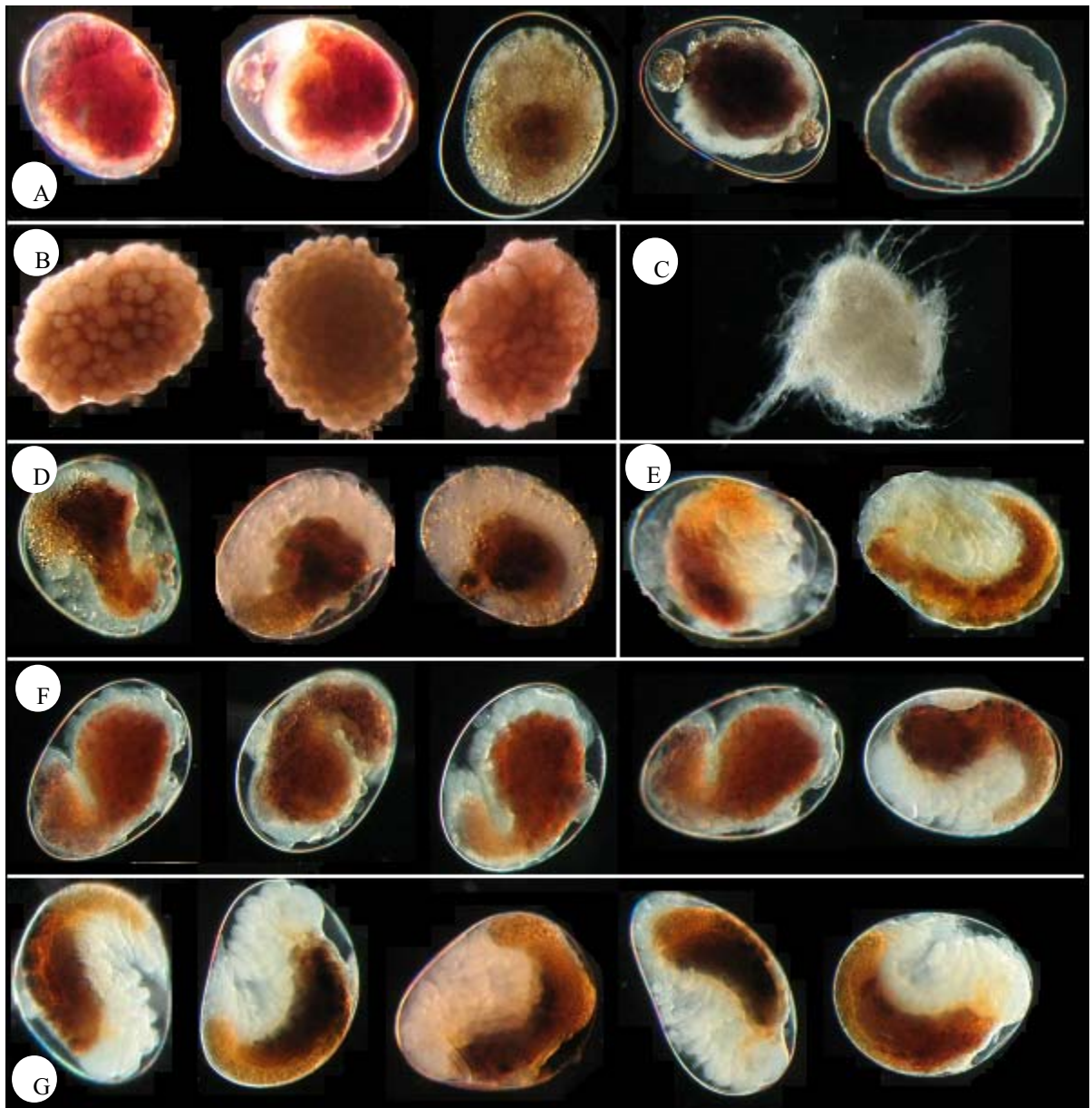


Figure II-18 : Photographie sous loupe binoculaire d'embryons de *G.fossarum* présentant divers types d'anomalies après 21 jours de développement à 12°C (stade 3). (A) Embryons avortés (quelques divisions cellulaires) et non fécondés, (B) embryons non différenciés dont les cellules ont dégénéré, (C) embryon moisi, (D et E) divisions cellulaires anarchiques, oedèmes, (F) retard de développement important (absence de céphalon), (G) anomalies non spécifiques, allongement, décollement de la membrane.

Tableau II-9 : Signification du biomarqueur : expérimentations au laboratoire et au terrain

	Laboratoire		Terrain
	Evaluation des capacités de réparation de l'ADN	Effet des dommages à l'ADN sur la reproduction	Effet des dommages à l'ADN sur la reproduction
Stresseur	MMS et K ₂ Cr ₂ O ₇	MMS et K ₂ Cr ₂ O ₇	Rejet de STEP
Durée	5 jours d'exposition + 4 jours en milieu non contaminé	5 jours d'exposition + transfert en milieu non contaminé juste avant la ponte et pendant 21 jours	15 jours d'exposition + transfert en milieu non contaminé juste avant la ponte et pendant 21 jours
Paramètre variable	[MMS] 0, 0.44, 2.2, 11 mg/L [K ₂ Cr ₂ O ₇] 0.06, 0.25, 1, 4 mg/L Jours de récupération : 0, 2, 4	[MMS] 0, 0.44, 2.2, 11 mg/L [K ₂ Cr ₂ O ₇] 0.06, 0.25, 1, 4 mg/L	Bourbre amont Rejet de STEP Bourbre aval
Photopériode	16/8 h	16/8 h	Naturelle (mois de novembre) Au laboratoire : 16/8 h
Température °C	12 ± 0,1	12 ± 0,1	11,5-13,5 (terrain) 12 ± 0,1 (labo)
Conductivité µS/cm	600 ± 30	600 ± 30	590-800 (rejet)
pH	7,6-8	7,6-8	7,6-7,9
Renouvellement du milieu	Toutes les 24 h	Toutes les 24 h pour l'exposition Continu en milieu non contaminé	Continu en milieu non contaminé
Alimentation	<i>Ad libitum</i> Nouvelles feuilles en milieu non contaminé	<i>Ad libitum</i> Nouvelles feuilles en milieu non contaminé + tubifex	<i>Ad libitum</i> Nouvelles feuilles en milieu non contaminé + tubifex
Nombre de réplicats par conditions	5 réplicats par concentration	Génotoxicité : 5 Reproduction : 5	Génotoxicité : 5 Reproduction : 5
Organismes sacrifiés par réplicat	1 ♂, 4 ♀ en D2	Génotoxicité : 1 ♂, 4 ♀ en D2 Reproduction : 2 ♀ ayant pondus dans les 2 jours après transfert en milieu non contaminé	Génotoxicité : 1 ♂, 4 ♀ en D2 Reproduction : 2 ♀ ayant pondus dans les 2 jours après transfert en milieu non contaminé
Nombre d'organismes par béciers/chambres d'encagement	6 ♂, 6 ♀ en D2	7 ♂, 7 ♀ en D2 début	7 ♂, 7 ♀ en C2
Paramètres mesurés (type cellulaire)	Mortalité Viabilité Dommages à l'ADN (spermatozoïdes et ovocytes)	Génotoxicité	Génotoxicité
		Reproduction	Reproduction
		Mortalité Viabilité Dommages à l'ADN (spermatozoïdes et ovocytes)	Mortalité Viabilité Dommages à l'ADN (spermatozoïdes et ovocytes)
		Mortalité Fertilité Fécondité Anomalies embryonnaires Taille des embryons	Mortalité Fertilité Fécondité Anomalies embryonnaires Taille des embryons

2.5.3. Validation du biomarqueur : variabilité naturelle et niveau de base

La validation de la mesure des dommages à l'ADN sur spermatozoïdes de *G.fossarum*, par le test Comet, passe par l'étude de la variabilité de la réponse de ce biomarqueur et par l'établissement d'un niveau de base de dommages. Cet objectif a été réalisé par la mise en place d'expérimentations au laboratoire et sur le terrain détaillées dans le tableau II-10.

La variabilité de la réponse du biomarqueur peut être limitée par des choix expérimentaux (statut reproducteur de l'organisme standard et durée d'exposition standard) et par la connaissance de l'impact de facteurs naturels.

Dans un premier temps, au laboratoire, l'influence du statut reproducteur du mâle sur la réponse à un stress génotoxique a été évaluée. Pour cela, nous avons d'abord décrit brièvement la spermatogenèse de *G. fossarum* afin de s'assurer de travailler avec des mâles matures contenant des spermatozoïdes. Le protocole de cette expérience est décrit dans la partie II.2.4.2 de ce chapitre.

L'influence de facteurs abiotiques a ensuite été évaluée en exposant les organismes selon les conditions décrites dans la partie II.3.1 pour évaluer les effets de la température et de la conductivité.

Enfin, pour établir une valeur de référence de notre biomarqueur, deux populations de gammares autochtones, prélevées dans des sites non contaminés, ont fait l'objet d'un suivi annuel. Une fois par mois, 15 mâles en précopula de chaque site, les Ardillats sur l'Ardière et la Tour du Pin sur la Bourbre sont prélevés. Aussitôt après le prélèvement, les mâles sont disséqués pour évaluer le taux de dommages à l'ADN des spermatozoïdes (protocole du test Comet décrit précédemment dans le paragraphe II.6.1.2).

Tableau II-10 : Validation du biomarqueur : expérimentations au laboratoire et au terrain

	Laboratoire				Terrain
	Spermatogénèse	Effet du statut reproducteur	Cinétique de dommages	Effet de la température et de la conductivité sur le niveau de base des dommages à l'ADN	Suivi annuel de populations autochtones
Stresseur	Aucun	MMS	MMS	Aucun	Aucun
Durée	8 jours	7 jours	21 jours	15 jours	Un an
Paramètre variable	Arrêt quotidien après la reproduction pendant 8 jours	[MMS] 0, 0,8, 2,4, 7, 22 mg/L ♂ exposés après reproduction ou avant reproduction	[MMS] 0, 0,8, 2,4, 7 mg/L Arrêt J2, J4, J7, J15 et J21	Température 6, 12, 18, 24 Conductivité 300, 600 Arrêt J1 et J15	Prélèvement une fois par mois
Photopériode	16/8 h	16/8 h	16/8 h	16/8 h	Naturelle
Température °C	12 ± 0,5	12 ± 0,5	12 ± 0,5	-	De 3 à 24
Conductivité µS/cm	600 ± 30	600 ± 30	600 ± 30	-	Ardière : 110 ± 5 Bourbre : 550 ± 25
pH	7,6-8	7,6-8	7,6-8	7,6-8	Ardière : 7,3 ± 0,4 Bourbre 8,0 ± 0,1
Renouvellement du milieu	Continu	Toutes les 24 h	Toutes les 24 h	Continu	-
Alimentation	<i>Ad libitum</i>	<i>Ad libitum</i>	<i>Ad libitum</i>	<i>Ad libitum</i>	-
Nombre de réplicats par conditions	3	3	3	3	-
Organismes sacrifiés par réplicat	3 ♂	2 ♂	2 ♂	2 ♂	15 ♂ en précopula par rivière
Nombre d'organismes par béchers/chambres d'encagement	6 ♂, 6 ♀ en D2 Après reproduction retrait de la femelle fécondée et ajout de femelles en C1	8 ♂	8 ♂	8 ♂	-
Paramètres mesurés (type cellulaire)	Quantité de spermatozoïdes matures et immatures par gonade Taille des mâles	Viabilité Dommages à l'ADN (spermatozoïdes)	Viabilité Dommages à l'ADN (spermatozoïdes)	Viabilité Dommages à l'ADN (spermatozoïdes)	Dommages à l'ADN (spermatozoïdes)

2.5.4. Application du biomarqueur au milieu naturel

La pertinence du biomarqueur de génotoxicité développé a été étudiée dans des contextes de contaminations différentes. Des expositions réalistes à trois grandes familles de contaminants ont été réalisées, par des méthodes d'encagement d'organismes comme décrit dans le chapitre II.4.1. Les trois types d'exposition *in situ* sont les suivants :

- Les pesticides, qui sont aujourd'hui une problématique environnementale majeure de notre société, dont l'étude a été réalisée dans les canaux expérimentaux de l'INRA Thonon (cf II.5).
- Les effluents de stations d'épuration, connus comme étant les principales sources de génotoxiques dans le milieu, investigués dans trois rivières Rhône-alpines.
- La contamination polymétallique, suivie dans le cadre d'encagement dans un bassin versant fortement contaminé au cadmium, affluent du Lot. Ces expériences ont été réalisées quatre fois par an pendant deux ans. Le dosage des métaux dans les organismes nous a permis de caractériser la toxicité des sites d'encagement en fonction de la biodisponibilité du zinc et du cadmium.

Le tableau II-11 détaille les protocoles de chacune de ces trois expérimentations d'encagement.

Remarque : le protocole du dosage des métaux (Cadmium et Zinc) dans les organismes est présenté en annexe II.

Tableau II-11 : Application du biomarqueur : expérimentations en mésocosme et sur le terrain

	Canaux artificiels		Terrain	
	Engagement de gammares mâles et femelles		Engagement de gammares mâles et femelles	Engagement de gammares mâles
Stresseur	Diuron : 1,1 ± 0,82 µg/L Tebuconazole : 0,59 ± 0,55 µg/L		Rejets de STEP	
Durée	15 jours + 21 jours en milieu non contaminé		15 jours	
Paramètre variable	Canaux contaminés/témoins		3 sites d'encagement	
Photopériode	naturelle		naturelle	
Température °C	16-18		15-18,5	
Conductivité µS/cm	300 ± 10		Ardière : 125 ± 10 Bourbre : 650 ± 50 Saone : 480 ± 5	
pH	7,9-8,2		Ardière : 7,6-8,0 Bourbre : 7,8-7,9 Saone : 7,9-8,1	
Renouvellement du milieu	Continu en milieu non contaminé		-	
Alimentation	<i>Ad libitum</i>		<i>Ad libitum</i>	
Nombre de réplicats par conditions	Génotoxicité : 5 Reproduction : 5		5	
Organismes sacrifiés par réplicat	Génotoxicité : 1 ♂, 4 ♀ en D2 Reproduction : 2 ♀ ayant pondus dans les 2 jours après transfert en milieu non contaminé		1 ♂, 4 ♀ en D2, 4 ♂ (pour hémolymphes)	
Nombre d'organismes par béciers/chambres d'encagement	7 ♂, 7 ♀ en C2		7 ♂, 7 ♀ en C2	
Paramètres mesurés (type cellulaire)	Génotoxicité	Mortalité Viabilité Dommages à l'ADN (spermatozoïdes et ovocytes)	Mortalité Viabilité Dommages à l'ADN (spermatozoïdes, ovocytes et hémolymphes)	Mortalité Teneur en Cd et Zn dans les organismes Viabilité Dommages à l'ADN (spermatozoïdes et ovocytes)
	Reproduction	Mortalité Fertilité Fécondité Anomalies embryonnaires Taille des embryons		
				Contamination polymétallique sur le Lot
				7 jours
				5 sites d'encagement
				De 3,5 à 16,5
				Amont : 5-15 Aval : 5-15 Riou Viou : 4-16 Decazeville : 5-17,5 Joany : 6-17
				7-8
				-
				<i>Ad libitum</i>
				Génotoxicité : 2 Bioaccumulation : 3
				Génotoxicité : 3 ♂ Bioaccumulation : 5 ♂
				10 ♂

Chapitre III

3. Développement et signification du biomarqueur

Le chapitre III de ce travail regroupe l'ensemble des travaux relatifs au développement d'un biomarqueur de génotoxicité chez le gammare *G. fossarum* ainsi que ceux relatifs à la compréhension de sa signification fonctionnelle pour l'organisme.

La première partie (III.1) traite de la mise en place du protocole du test Comet sur trois types cellulaires : l'hémolymphe et les cellules germinales mâle et femelle. Cette partie se compose d'une publication intitulée « *Genotoxicity assessment in the amphipod Gammarus fossarum by use of the alkaline Comet assay* » et d'une note concernant la modification du protocole propre aux spermatozoïdes (Note 1 : *Optimisation du protocole du test Comet pour la lecture des dommages à l'ADN sur spermatozoïdes de G. fossarum*).

La deuxième partie (III.2) présente les travaux concernant l'interprétation du biomarqueur de génotoxicité en terme d'effet sur la reproduction. Cette partie s'intéresse à comprendre la signification des dommages à l'ADN au niveau des cellules germinales sur le développement embryonnaire et le succès reproducteur, au laboratoire et sur le terrain. Cette partie a fait l'objet d'une publication intitulée « *Linking genotoxic responses in Gammarus fossarum germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay* ».

3.1. Développement d'un biomarqueur de génotoxicité chez le gammare *G.fossarum*

3.1.1. Publication 1 : Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by the use of the alkaline Comet assay

Résumé

De nombreux xénobiotiques ainsi que des molécules nouvellement développées et rejetées dans le compartiment aquatique sont ou sont suspectées génotoxiques pour les organismes vivant dans ce compartiment. Il est important de développer des biomarqueurs de génotoxicité pour différents phyla et d'améliorer notre compréhension de l'impact des substances génotoxiques chez les invertébrés et plus particulièrement les crustacés. Les invertébrés dulçaquicoles et les amphipodes en particulier sont des espèces d'intérêt écologique majeur. Pourtant, leur réponse à un stress génotoxique est peu investiguée et représente aujourd'hui une lacune importante dans l'évaluation du risque génotoxique.

Le but de cette étude est d'optimiser l'utilisation du test Comet chez un invertébré d'eau douce sur trois types cellulaires : l'hémolymphe, les ovocytes et les spermatozoïdes. Dans un premier temps, le test a été utilisé pour évaluer l'intégrité du génome des trois types cellulaires suite à une exposition *in vitro* et *in vivo* à un génotoxique modèle, le méthylméthane sulfonate (MMS). Les résultats établissent clairement pour les trois types cellulaires une relation dose-effet, une faible variabilité et une bonne sensibilité de la réponse, démontrant la possibilité d'utiliser le test Comet pour détecter une pression génotoxique chez cet amphipode. Dans une deuxième partie, afin de déterminer le potentiel de cette technique pour l'évaluation de la génotoxicité de différentes molécules au laboratoire, les dommages à l'ADN d'organismes exposés à cinq composés suspectés ou avérés génotoxiques ont été évalués.

Mots clés

Test Comet ; Génotoxicité ; Invertébré d'eau douce ; Cellules germinales ; Hémolymphe



Contents lists available at ScienceDirect

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gentox
 Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay

Emilie Lacaze^{a,b}, Olivier Geffard^b, Sylvie Bony^a, Alain Devaux^{a,*}

^a Université de Lyon, ENTPE-INRA, Laboratoire des Sciences de l'Environnement, rue Maurice Audin, Vaulx en Velin, F-69518, France
^b Cemagref, MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3 bis quai Chauveau, 69336 Lyon, Cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2009
 Received in revised form 30 March 2010
 Accepted 19 April 2010
 Available online 6 May 2010

Keywords:

Comet assay
 Genotoxicity
 Freshwater invertebrate
 Germ cell
 Haemocyte

ABSTRACT

Many xenobiotics and newly developed substances released in the aquatic environment have been found genotoxic for living organisms. There is interest in developing biomarkers of genotoxicity in different phyla and the need to increase our understanding of the impact of genotoxic insult on invertebrates, particularly on crustaceans. Freshwater invertebrates and particularly amphipods are highly relevant species ecologically. However, genotoxic responses of such species are rarely studied, whereas understanding these responses is becoming an urgent concern.

The aim of this study was to develop and optimize the Comet assay in the freshwater invertebrate *Gammarus fossarum* by use of different cell-types: haemocytes, oocytes and spermatozoa. In a first step, the Comet assay was performed on these three cell types after exposure to the model genotoxicant methyl methanesulfonate (MMS) *in vitro* and *in vivo*. Results showed a clear dose–response relationship for all tissues, a low variability and a high sensitivity of the response, demonstrating the effectiveness of the Comet assay to detect genotoxic insult in amphipods. In a second step, to explore the potential of this technique for use in ecotoxicological studies with amphipods, these organisms were exposed to five known or suspected genotoxic compounds. The results demonstrated the possibility to use the freshwater amphipod *G. fossarum* in environmental genotoxicity studies with the Comet assay.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The European Water Framework Directive (WFD 2000/60/CE) specifies the need for monitoring programs in order to reach the good chemical and ecological status for all water bodies by 2015. To improve or maintain a stable health condition of aquatic ecosystems, early and robust tools such as biomarkers have to be developed and validated in ecologically relevant species (i.e. ecological scope biomarkers).

Many xenobiotics and newly developed substances released in the environment have been found genotoxic for living organisms [1]. Genotoxic agents may produce a cascade of adverse changes from the cellular to the individual levels [2]. A variety of methods have been developed for detecting DNA damage. Among them, the single-cell gel electrophoresis assay (also called the Comet assay) is a rapid, sensitive, relatively inexpensive method, requiring only a small number of cells and providing the opportunity to study DNA damage and repair in individual cells [3]. The Comet assay

has been developed in a large range of aquatic species along a broad phylogenetic diversity, taking into account the species sensitivity towards genotoxic pressure. In the marine environment, attention has been essentially paid to invertebrates such as grass shrimp, sea urchin, sea anemone, polychaete and bivalve [4–8]. In contrast, in freshwater hydro-systems the assay has been mainly carried out in fish to assess the extent of DNA damage at polluted sites [9–11]. To our knowledge, no data concerning genotoxicity assessment are presently available for freshwater amphipods such as gammarids, even though they occupy key ecological niches and have been widely used as sentinel species in ecotoxicological studies [12–14]. In this study, *Gammarus fossarum* was selected because this species is currently used in ecotoxicological tests, widespread and abundant in Europe, and known to be sensitive to a wide range of stresses [15]. Moreover, this species constitutes an important food resource for macroinvertebrates, fish and amphibian species [16]. It also plays a major role in the leaf litter breakdown process and, consequently, in the entire food web [17].

In the majority of genotoxicity studies that use the Comet assay on aquatic species the assay is performed on fluent cells such as haemocytes or erythrocytes, rarely on spermatozoa and never on oocytes. Haemocytes are closely exposed to environmental agents through their role in the transport of toxicants and in var-

* Corresponding author. Tel.: +33 04 72 04 71 78; fax: +33 04 72 04 77 43.
 E-mail addresses: emilie.lacaze@cemagref.fr (E. Lacaze),
olivier.geffard@cemagref.fr (O. Geffard), sylvie.bony@entpe.fr (S. Bony),
alain.devaux@entpe.fr (A. Devaux).

ious defence mechanisms. Spermatozoa and oocytes perform the unique and critical biological function to propagate the DNA used for the development of the next generation. While genotoxicity in somatic cells can lead to disorders at the individual level, genotoxic effects in germ cells can be passed on to future generations.

Thus, the present work deals with the development and validation of a genotoxicity biomarker by use of the Comet assay in three somatic and germ-cell types, respectively, haemocytes, oocytes and spermatozoa of the crustacean *G. fossarum* exposed to environmental contaminants. As it is not known to what extent the Comet assay can detect DNA damage in amphipod haemocytes, oocytes and spermatozoa, a positive control was required. For this purpose, the model genotoxicant methyl methanesulphonate (MMS) was selected, as recommended in the evaluation of new assays [18]. To test the feasibility and the sensitivity of the Comet assay on the three cell-types selected, *in vitro* MMS exposure was conducted. *In vivo* MMS exposure was then explored in order to take into account the overall metabolism of the organism in the various cell-type responses to the genotoxic insult. Finally, in order to assess the potential of this genotoxicity biomarker for application in ecotoxicological studies, gammarids were exposed to five industrial or agricultural chemicals, known or presumed to be genotoxic for aquatic species: the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene (BaP), the heavy metals cadmium and chromium, the pesticide paraquat and the pesticide metabolite aminomethyl phosphonic acid (AMPA, a breakdown product of glyphosate). BaP, forming bulky adducts and cadmium chloride, an inorganic carcinogen, are recommended as positive control chemicals in the report of the 2008 ECVAM workshop [18]. Potassium dichromate is considered as a reference mutagenic compound [19]. Paraquat has been one of the most widely used herbicides in the world for many decades. Although its use has been recently banned in the European Union, it still represents a known hazard to human and environment health. Glyphosate is also largely used in modern agriculture and raises some concerns regarding possible health and environmental hazards. AMPA, its main breakdown product, has a greater environmental persistence than glyphosate and poses a risk for aquatic pollution [20].

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit was purchased from Invitrogen Life Technologies. Phosphate-buffered saline (PBS), normal and low melting-point agarose, ethidium bromide, methyl methanesulphonate (MMS) [CAS number 66-27-3], BaP [CAS number 50-32-8], cadmium chloride [CAS number 10108-64-2], K₂Cr₂O₇ [CAS No. 7778-50-9], paraquat [CAS number 4685-14-7] and AMPA, Triton X-100, dimethyl sulfoxide (DMSO), and all other reagents of analytical grade were supplied by Sigma-Aldrich Chemicals (France).

2.2. Collection and maintenance of animals

Amphipods were collected in an upstream part of the Bourbre River (Isère, France), known to have a very low level of pollution. Sexually mature *G. fossarum* were collected with a hand-held net (2–2.5 mm) during March and April 2008 and quickly brought to the laboratory where they were transferred to 30-L aquarium tanks. Organisms were kept for 21 days at 12 ± 0.5 °C, with a 16/8 h light/dark cycle, continuously supplied with aerated uncontaminated groundwater (conductivity 600 µS/cm) before being used for experiments. They were fed *ad libitum* on alder leaves (*Alnus glutinosa*). These rearing conditions were applied during all further experiments. Organisms in precopula and with an average body length of 9 ± 1 mm were selected for the experiments in order to choose mature and same age-ranked organisms.

2.3. Cell isolation and cell-viability measurements

Samples of haemolymph fluid were collected with hand-made glass microcapillary tubes, as described by Felten et al. [21]. The cuticle was punctured between the cephalon and the first pereopod, allowing to sample a haemolymph drop by capillarity. The haemolymph sample was then placed in a 200-µL Eppendorf tube containing 20 µL of chilled PBS. For each replicate (three replicates per condition)

haemolymph collected from four gammarids were pooled in order to obtain a few thousand cells per tube for analysis in the Comet assay.

In order to collect mature spermatozoa and oocytes, only gammarids in precopula were chosen. Organisms were dissected under stereomicroscope magnification and tissues of interest were collected in 20 µL of chilled PBS following the procedure as described below. The cephalon was cut with microscissors and the four caecums were removed. Then, dorsal and ventral cuticles were excised. The male gonads including the seminal vesicle were gently removed with fine forceps. For genotoxicity measurement, the seminal vesicle from one male, which contains around 6000 mature spermatozoa (unpublished data from a previous study of *G. fossarum* spermatogenesis) was mixed with 20 µL chilled PBS with a micropipette. Three replicates corresponding to three males were processed. Mature females have two batches of up to 20 oocytes at the last stage of vitellogenesis (before the oocytes are deposited in the marsupium). These two batches of oocytes were collected at once in 20 µL of PBS. A pool of four females was required to collect enough mature oocytes per replicate. Three replicates were done.

The viability of the haemocytes and oocytes was assessed by the Trypan-blue exclusion method. The LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit was used to assess the viability of the spermatozoa. The test uses two nucleic acid stains, SYTO® 9 and propidium iodide, which differ in their ability to penetrate healthy cells. Contrary to SYTO® 9, propidium iodide penetrates only cells with damaged membranes. One hundred cells were examined by fluorescence microscopy. The ability of the test to distinguish between dead and viable gammarid cells was first validated by exposing the cells to ethanol at concentrations ranging from 3% to 30% in PBS. A significant dose–response relationship was established ($p < 0.001$) (data not shown).

2.4. Exposure conditions

2.4.1. *In vitro* exposure to MMS

Methyl methanesulphonate (MMS) was chosen as a direct-acting genotoxicant, in order to eliminate any confounding factors associated with route of uptake or biotransformation. Three replicates were performed for each cell type and each condition. For each replicate, 10 µL of the different cell-type suspensions previously prepared (corresponding to a pool of 4 organisms for haemocytes and oocytes, and to one organism for spermatozoa) were gently mixed with 10 µL of MMS solution at concentration of 1, 2, 10 and 20 mmol/L or 10 µL of PBS for the control. Stock solutions of MMS were prepared in PBS. The cells, kept on ice and in the dark, were thus exposed for 1 h to MMS at concentrations ranging from 0.5 to 10 mmol/L. The control cells were maintained under the same condition. Genotoxicity was further assessed in the different cell types by use of the alkaline Comet assay.

2.4.2. *In vivo* exposure to MMS

Adult *G. fossarum* specimens in precopula were exposed for 5 days to MMS (0, 4, 20 and 100 µmol/L) to study the dose–response relationship in the three cell types studied. MMS stock solutions were prepared in PBS at concentrations ranging from 1 to 100 mmol/L. Exposure media were obtained by adding 500 µL of the appropriate MMS stock solution to 500 mL of uncontaminated natural water. Three replicates of 14 gammarids were placed in glass flasks containing 500 mL of each test solution and media were renewed daily. At the end of the exposure period, living organisms were sacrificed and the three cell types were immediately collected for assessment of DNA damage.

2.4.3. *In vivo* exposure to environmental contaminants

Adult male *G. fossarum* specimens were first exposed to a concentration range of cadmium chloride, potassium dichromate, paraquat, AMPA and BaP for 5 days to determine the highest non-lethal concentration to be used for genotoxicity measurements. Stock solutions were prepared in distilled water except for BaP, which was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). Test solutions were obtained by adding 500 µL of stock solution to 500 mL of uncontaminated natural water. Three groups of 10 mature male gammarids were placed in flasks containing 500 mL of each test solution. Glass flasks were used for BaP, AMPA and paraquat exposure, whereas polypropylene flasks were used for cadmium chloride and potassium dichromate exposure in order to limit adsorption of pollutants on flask surfaces. Two control conditions (each performed in triplicate) were tested: one in 500 mL uncontaminated natural water and another one obtained by adding 500 µL of DMSO to 500 mL of uncontaminated natural water. Media were renewed daily. At the end of the exposure period and for each compound, living organisms exposed to the highest non-lethal concentration in the concentration range of pollutants were sacrificed in order to assess cytotoxicity prior to evaluation of genotoxicity by the Comet assay.

2.5. Comet-assay procedure

The alkaline version of this technique, introduced by Singh et al. in 1988 and recommended by international expert groups for genotoxicity testing, allows evaluation of DNA damage including single- and double-strand breaks, DNA cross-links, alkali-labile sites and incomplete repair sites [22].

Only cell suspensions with viability >90% were used, unless otherwise stated.

Frosted microscope slides were first covered with melted normal agarose in PBS (0.8%) and dried overnight at 20 °C. After collection of the cells, 20 µL of 1%

low-melting agarose (LMA) in PBS (37 °C) were mixed with 20 μ L cell suspension, added onto the coated slides and finally covered with a 22 \times 22-mm coverslip. Slides were cooled for 5 min at 4 °C for solidification of the agarose. After removal of the coverslip, slides were placed in a freshly prepared lysing solution at 4 °C (2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na₂EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10) in the dark. Lysis was conducted for 1 h for haemocytes and oocytes. For spermatozoa, a preliminary experiment (data not shown) was carried out in order to determine the optimal duration of the lysis step; this led to an 18-h lysis time. After cell lysis, slides were gently placed in a horizontal electrophoresis chamber filled with freshly prepared chilled buffer (300 mmol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA, pH 13). DNA was then allowed to unwind for 40 min. Electrophoresis was performed under 0.6 V/cm and 300 mA for 24 min. Lysis, DNA unwinding and electrophoresis were performed at 4 °C. After the electrophoresis, the slides were washed (three times for 5 min) in a neutralization buffer (0.4 mol/L M Tris-HCl, pH 7.5). All the steps described above were performed under yellow light or in the dark to prevent artifactual DNA damage. Finally, slides were dried for 15 min in absolute ethanol.

2.6. Slide scoring and statistical analysis

After staining with 0.05 mmol/L ethidium bromide, the slides were covered with a cover glass and observed under an epifluorescence microscope (Axioscope, Zeiss Germany) equipped with a CCD camera (Hitachi). Three slides were prepared per assay and fifty cells per slide were analysed with the Comet IV image-analysis system (Perspective Instruments Ltd, UK). Because spermatozoa were collected by mixing the gonads, some somatic cells were present on the slide but the population of somatic cells did not exceed 5% of the total cell population. Moreover, mature spermatozoa in *G. fossarum* displayed an unmistakable, elongated shape (see Fig. 1) and could not be confounded with somatic cells. Somatic cells were also present in female gonads. Oocyte comet scoring was based on the diameter of the mature oocyte nucleus (around 50 μ m), which is much larger than that of somatic cells (diameter around 15–20 μ m). As suggested by Kumaravel and Jha (2006), the percentage of DNA in the comet tail (% tail DNA) has been chosen as the most reliable and meaningful comet measurement [23]. Comet figures showing an undistinguished head and a prominent tail were always excluded from the scoring.

Statistical analysis was performed with the Statistica 8.0 software (StatSoft Inc). Since the distribution of DNA damage measured by the Comet assay did not follow a Gaussian distribution, both the Kruskal–Wallis and the Mann–Whitney non-parametric tests were used for data analysis. The occurrence of a dose–response relationship was tested by means of linear regression.

3. Results

Fig. 1 shows typical photomicrographs of nuclei of haemocyte, oocyte and spermatozoa of *G. fossarum* observed after the Comet-assay procedure. Comet figures from exposed cells (10 mmol/L MMS during 1 h) clearly exhibit more DNA damage than those from control cells.

3.1. Validation of the Comet-assay procedure on the three cell-types

3.1.1. In vitro exposure to MMS

Fig. 2 illustrates the response of haemocytes, oocytes and spermatozoa exposed *in vitro* for 1 h to the alkylating agent MMS. DNA damage (expressed as % tail DNA) in the control varies from 3.4% to 4.0% for haemocytes, from 4.9% to 9.6% for oocytes and from 1% to 4.5% for spermatozoa. Thus, while non-exposed oocytes are significantly more damaged than spermatozoa and haemocytes (Mann–Whitney *U*-test, $p < 0.05$), basal DNA-damage levels remain low, ensuring the adequacy of cell collection procedures here applied. All cell types exhibit a clear dose–response relationship, significant at 1 mmol/L MMS concentration and above (Kruskall–Wallis ANOVA, $p < 0.01$). No significant difference in DNA-damage level between the three cell types was observed, irrespective of the MMS concentration.

3.1.2. In vivo exposure to MMS

After a 5-day exposure to MMS, DNA damage in spermatozoa, oocytes and haemocytes follow a significant, positive linear dose–response relationship (Fig. 3). Besides, all tissues show a low DNA-damage level in the control samples and the response variability between replicates is low (control % tail DNA in haemocytes, $2.8 \pm 0.7\%$; oocytes, $4.7 \pm 2.1\%$; spermatozoa, $2.8 \pm 0.8\%$). A positive

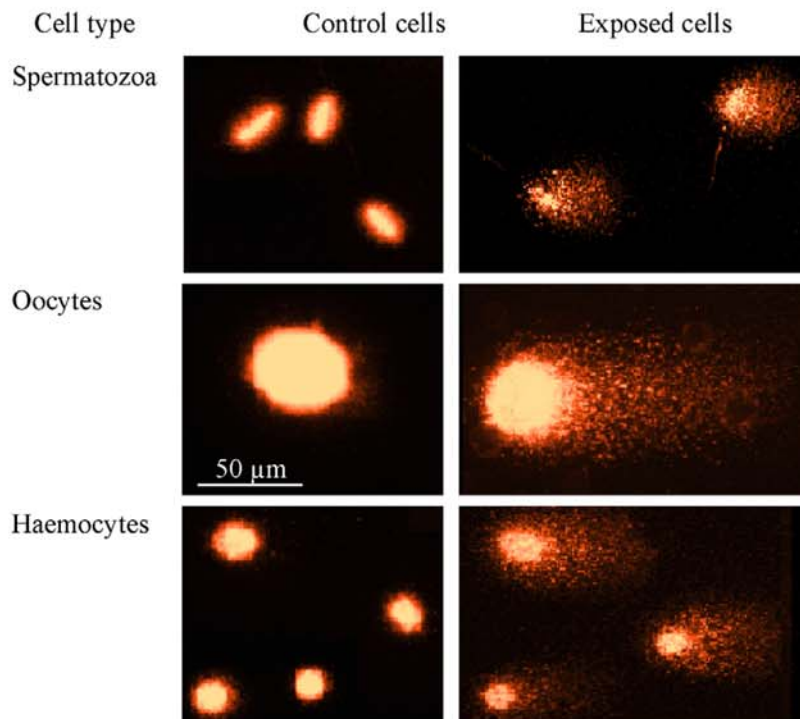


Fig. 1. DNA damage as detected by the Comet assay in *Gammarus fossarum* spermatozoa, oocytes and haemocytes exposed *in vitro* for 1 h to MMS.

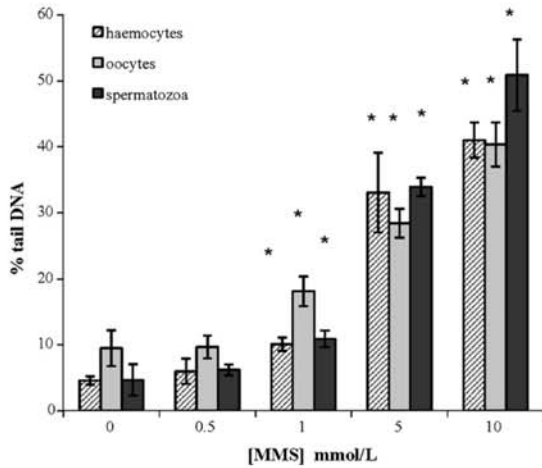


Fig. 2. Comparison of the response of haemocytes, oocytes and spermatozoa to *in vitro* MMS exposure for 1 h at 4 °C. Each block is the mean % tail DNA from three replicates ± standard error (error bars). (*) significantly different from control.

correlation between the responses of haemocytes and oocytes is observed after 5 days of exposure (Pearson's correlation coefficient = 0.969, $p < 0.05$) but not between those of haemocytes and spermatozoa (Pearson's correlation coefficient = 0.870, $p = 0.130$). Among the three cell types, spermatozoa appear to be the most sensitive towards MMS. At the concentration of 20 μM MMS, spermatozoa show a 4-fold higher level of DNA damage than oocytes and a 6-fold higher damage level than haemocytes. At 100 μM MMS, the DNA-damage ratio is 2.3 between haemocytes and spermatozoa, and 3.2 between oocytes and spermatozoa.

To summarize, Table 1 shows a DNA-damage induction factor for the three cell-types studied when subjected to exposure to MMS *in vitro* (1 h) and *in vivo* (5 days). These data clearly reveal differences in sensitivity of different cell types: spermatozoa always exhibit higher induction factors than haemocytes and oocytes, irrespective of the MMS concentration.

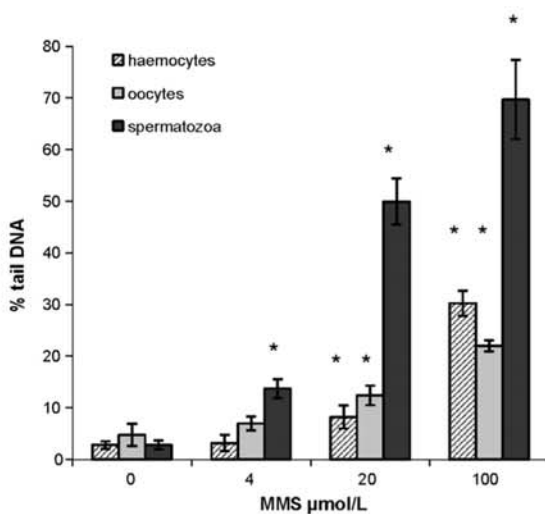


Fig. 3. Levels of DNA damage in haemocytes, oocytes and spermatozoa from gammarids exposed for 5 days to MMS. Each block is the mean % tail DNA from three replicates ± standard error (error bars). (*) significantly different from control.

Table 1
DNA damage-induction factor in haemocytes, oocytes and spermatozoa after exposure to MMS.

	Induction factor		
	Haemocytes	Oocytes	Spermatozoa
<i>In vitro</i> (1 h exposure, mmol/L)			
1	2.2 [*]	1.9 [*]	2.3 [*]
5	7.2 [*]	3.0 [*]	7.2 [*]
10	8.9 [*]	4.3 [*]	10.8 [*]
<i>In vivo</i> (5 days exposure, μmol/L)			
4	1.1	1.5	4.9 [*]
20	2.9 [*]	2.6 [*]	17.7 [*]
100	9.5 [*]	4.6 [*]	24.8 [*]

Induction factor (IF) was calculated as follows: IF = % tail DNA in exposed cells/% tail DNA in control.

^{*} IF significantly different from 1.

3.2. *In vivo* exposure to environmental contaminants

Since *in vivo* exposure to MMS in the previous experiment led to the highest response in sperm among the different cell types, experiments dealing with *in vivo* exposure to environmental contaminants were carried out only in male gammarids, in order to assess genotoxicity in sperm.

3.2.1. Assessment of the non-lethal concentration

A range of concentrations of each contaminant (cadmium chloride, potassium dichromate, paraquat, AMPA and BaP) was first used in order to choose the highest non-lethal concentration required for conducting the Comet assay properly. Table 2 summarizes the survival percentage for all xenobiotic test concentrations. The final concentration of each compound chosen for assessment of *in vivo* genotoxicity was then as follows: paraquat 0.16 mg/L, AMPA 1 mg/L, K₂Cr₂O₇ 1 mg/L, CdCl₂ 1.5 μg/L, BaP 2.5 mg/L.

3.2.2. Assessment of genotoxicity of environmental contaminants

After 5 days of exposure, only AMPA was found to be cytotoxic for spermatozoa. The viability of spermatozoa decreased to 69%, whereas more than 90% of the spermatozoa were viable after

Table 2
Percentage of gammarid survival after 5 days of exposure to a range of concentrations of paraquat, AMPA, K₂Cr₂O₇, cadmium chloride and BaP. Concentrations chosen to further assess genotoxicity correspond to the highest ones allowing a minimum survival of 93%.

	Concentration	Survival %
Paraquat, mg/L	0.16	100
	0.625	83
	2.5	40
	10	33
AMPA, mg/L	0.0625	100
	0.25	97
	1	97
	4	93
K ₂ Cr ₂ O ₇ , mg/L	0.0625	97
	0.25	100
	1	97
	4	63
Cd, μg/L	0.015	97
	0.15	97
	1.5	93
	15	59
BaP, μg/L	2.5	97
	25	97
	250	93
	2500	100

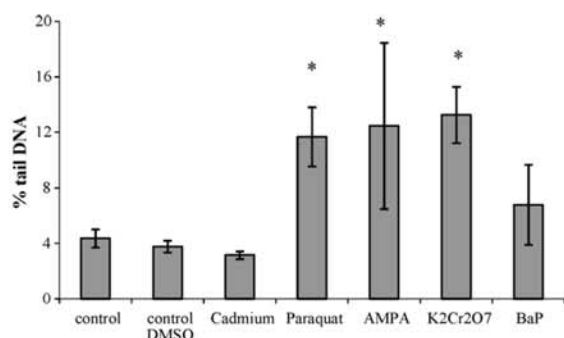


Fig. 4. Levels of DNA damage in spermatozoa from exposed gammarids (5 days of exposure to cadmium, paraquat, AMPA, K₂Cr₂O₇ and BaP) measured by the Comet assay. Each block is the mean of tail DNA % from three replicates \pm standard error. (*) significantly different from control.

exposure to paraquat, cadmium chloride, potassium dichromate and BaP.

Among the five different compounds studied, paraquat and K₂Cr₂O₇ exhibit a significant genotoxic effect on gammarid spermatozoa (Mann–Whitney *U*-test, $p < 0.05$) (Fig. 4). The DNA-damage level is 2.7-fold higher after 5 days of paraquat exposure and 3-fold higher after K₂Cr₂O₇ exposure than in the control. The Comet assay has also been performed after exposure to AMPA, even if it was found to be cytotoxic for spermatozoa. After AMPA exposure a 3-fold increase in DNA damage is observed between control and exposed organisms. For BaP and cadmium, no significant genotoxic effect on spermatozoa is observed.

4. Discussion

In the present work, the Comet assay has been successfully carried out in three cell types of *G. fossarum*. The different cell types used in this study show a low basal level of DNA damage and a low variability in response, whatever the exposure conditions.

Until now, only a limited number of research groups have used crustaceans in genotoxicity studies. Most of the studies focused on marine crustacean species [24] such as grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) [25] or crab (*C. sapidus*) [26]. In freshwater, the only crustacean species used was *Daphnia* spp. [27]. The majority of freshwater genotoxicity studies using invertebrates focused on filter-feeding organisms such as bivalve [28] like *Corbicula fluminea* [29], *Unio pictorum* [30], *Dreissena polymorpha* [31], *Limnoperna fortunei* [32]. Other invertebrate species have also been used, e.g., planarians [33], snails (*Biomphalaria glabrata*) [34], and chironomidae (*Chironomus riparius*) [35]. Because of differences in feeding behaviour between invertebrates, different routes of uptake of the genotoxicants could be expected and, therefore, different responses to genotoxic insult in the field.

Freshwater crustaceans like *G. fossarum* play a major role in the food chain, both because they are detritivore and because they represent an important food resource for fish. Furthermore, *G. fossarum* has several advantages for use in *in vivo* genotoxicity tests: it is well adapted to laboratory conditions and it can be used for field studies directly or as caged organism [36] which allows assessment of genotoxicity whatever the field conditions.

To our knowledge, the literature so far only refers to one study dealing with the assessment of genotoxicity on gammarids [37]. Costa et al. (2002) studied *Gammarus locusta*, a marine amphipod, as a sentinel species and the Comet assay was performed on the whole organism because of inherent difficulties to isolate specific tissues. Although this study demonstrated that it was possible to detect DNA damage in whole-body amphipods, the main drawback was a

high interindividual and intercellular variability, which limited the statistical power of the analysis.

As demonstrated by an abundant literature, the Comet assay is a well-established genotoxicity test, mainly performed on somatic cells. However, this technique offers also the possibility to detect DNA damage in germ cells and has already been used to demonstrate the ability of a substance to interact with the genetic material of germ cells, mainly in mammals [38]. In the present work, the response of germ cells toward genotoxicants was also explored. This is the first report of the Comet assay performed on oocytes and spermatozoa of a freshwater invertebrate. Because of the highly compact structure of chromatin in spermatozoa, additional steps to allow migration of DNA are currently applied by authors working with sperm [38]. Proteinase K is mainly used and added directly to the lysis solution, or added in an additional step after lysis. Moreover, a prolonged lysis-time (16 h, 18 h or overnight) has been successfully used. Furthermore, the use of treatment with dithiothreitol [DTT] or lithium diiodosalicylate [LIS] allows a quicker de-condensation of the DNA [38]. Nevertheless, the different approaches to optimize sperm-chromatin decondensation may significantly influence the baseline DNA damage. Incubation with proteinase K is normally performed at room temperature or at 37 °C, which would not be suitable for *G. fossarum* because its viability is reduced at temperatures above 20 °C. Consequently, in the present work we chose to perform a long lysis time (18 h) at 4 °C without any additional treatment.

In our work, the control cells show a low level of DNA damage. This has probably enhanced the strength of the dose–response relationship towards MMS treatment, whatever the cell type. The basal DNA damage in control cells results from normal cellular functioning and from a possible cellular stress related to cell isolation. Since the tail-DNA value measured *in vivo* in the control organisms never exceeded 5% in the three cell types, the chosen procedures of cell isolation seem to be suitable. However, DNA-damage levels measured in the control cells during *in vitro* exposure, although low, remained higher than those from *in vivo* exposure, possibly because of the time delay (1 h) required for the exposure step. Evidence of a clear dose–response relationship in cells from MMS-exposed gammarids was also facilitated by the low variability observed between replicates. In contrast, since no dose-dependent effect was demonstrated in *Nereis virens* exposed to BaP, mainly due to the high variability of the response, DeBoeck and Kirsch-Volders concluded that this species was not suitable to assess the genotoxic risk from exposure to this compound [39]. In the present study, we used MMS as a model compound because alkylating agents are thought to be the most potent and abundant genotoxic contaminants in aquatic environments [40]. Spermatozoa, oocytes and haemocytes of *G. fossarum* exhibited a clear dose–response relationship upon MMS exposure both *in vitro* and *in vivo*, as was previously shown in different cell types of other aquatic species. As an example, Rank and Jensen [41] have shown an increase in DNA damage after *in vitro* and *in vivo* exposure of mussel cells to MMS: for all tissues studied there was a direct relationship between MMS concentration and DNA damage, whatever parameter was used to quantify the damage.

Here spermatozoa clearly exhibited a higher response towards MMS than did oocytes and haemocytes. This could mainly result from the inability of sperm to repair DNA damage and in particular alkylating damage [42]. Of course, this hypothesis is based on mammalian sperm studies, since the response to genotoxicants in spermatozoa from aquatic invertebrate species has so far been investigated only once by Lewis and Galloway in the marine organism *Arenicola marina* [7].

When studying the effects of five known or suspected genotoxic compounds in different gammarid cell types, our results show that the Comet assay is a suitable method and *G. fossarum* sperm a

suitable cell type to highlight the genotoxicity of paraquat, potassium dichromate and AMPA. Paraquat tends to be a very reactive compound that can bind covalently to DNA. Besides, it is known that paraquat is toxic for humans and animals due to the induction of reactive oxygen species, which may be involved in the production of DNA-single strand breaks as observed in gammarid in the present work [43]. Although there is growing evidence that AMPA may pose a risk for water pollution, relatively little is known about the biological activity of AMPA, the main breakdown product of glyphosate. Manas et al. [44] underlined the high sensitivity of the Comet assay to detect genotoxicity of AMPA in Hep-2 cells and recommended the Comet assay as an alternative tool for chemical screening. Moreover, Clements et al. [45] reported DNA damage using the Comet assay in erythrocytes of *Rana catesbeiana* tadpoles following exposure to glyphosate, noticing that its biotransformation, possibly to AMPA, could result in the production of reactive intermediates such as reactive oxygen species. Chromium is a well-known reference mutagen that can cause a large array of genotoxic effects in aquatic organisms. Among these, the formation of DNA double-strand breaks and the generation of oxidative stress could have accounted for the effects observed in *G. fossarum* spermatozoa [46]. Cadmium is one of the most toxic and most widespread heavy metals and a well-known genotoxic compound in mammals and in some aquatic organisms [47,48]. However, in *G. fossarum* spermatozoa no genotoxicity has been detected with the Comet assay in the present study, after a 5-day exposure at the concentration of 1.5 µg/L CdCl₂. It should be noted that with 15 µg/L CdCl₂ a high increase in lethality was observed. This could be related to the high sensitivity of *G. fossarum* toward cadmium, which can strongly impact the osmolality, ventilation, feeding rate and locomotor activity [21]. Moreover, DNA repair and apoptosis can be triggered after exposure to cadmium. The lack of cadmium genotoxicity has already been described in other aquatic organisms, even at higher cadmium concentrations than those investigated in the present work, which can be considered as environmentally relevant. Pruski and Dixon (2002) found that cadmium was not genotoxic in mussel gill cells under acute and chronic exposure conditions (0.2 mg/L CdCl₂ for 4 weeks) [49]. Similarly, cadmium at the concentration of 0.1 mg/L did not lead to DNA damage in gilthead sea-bream erythrocytes after 4 and 11 days of exposure [50]. Chang et al. (2009) observed an increase in DNA damage measured in haemocytes and hepatopancreas cells of the white shrimp after exposure to 0.45 and 0.9 mg/L Cd²⁺ for 6 h, followed by a significant decrease in DNA damage after 36 h of exposure [51]. BaP can be genotoxic following different biotransformation pathways, mainly by producing electrophilic compounds susceptible to bind to DNA, forming DNA adducts, or through the production of reactive oxygen species. Both events can lead to DNA strand breaks potentially revealed by the Comet assay. However, in our study no significant genotoxic impact after BaP exposure has been shown in *G. fossarum*. As previously observed in other invertebrates, the hypothesis of a weak or even absent metabolism of BaP cannot be ruled out in gammarids.

5. Conclusion

The present work is to our knowledge the first attempt to measure the effect of genotoxicants in the freshwater invertebrate *G. fossarum*. The Comet assay has been successfully performed on three cell types: haemocytes, oocytes and spermatozoa. Of particular interest is the response towards genotoxicants observed in spermatozoa, which showed after exposure to MMS a higher DNA-damage level than was observed in oocytes and haemocytes, perhaps due to a less efficient repair capacity in sperm. This hypothesis should be tested in further experiments. Thus, because of its

high sensitivity, sperm could be considered as a preferential target in the sentinel species *G. fossarum*. Since the response of freshwater crustaceans towards genotoxicants appear to be different than those commonly observed in vertebrates, we suggest that ecologically relevant invertebrates should be used more widely as sentinel species for regulatory genotoxicological studies. The study of sperm integrity could contribute to clarify the link between sub-individual effects of pollutants and effects at the individual level [42] by correlating the genotoxic response in spermatozoa with other relevant biological endpoints such as reproduction success. Because genotoxic pressure is suspected to drive adverse effects at the population level by altering reproductive success of individuals, direct assessment of damage to germ cells is relevant [52] and could allow understanding how toxicant-induced changes in the genome may affect the long-term survival of populations. Finally, this study has proven that the freshwater invertebrate *G. fossarum*, a relevant species for ecotoxicological studies, is a good candidate for genotoxicity assessment, using specific cell types, from somatic cells to germ cells.

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgements

This research was funded via the Cluster recherche Environnement Rhône-Alpes. The authors thank Delphine Goyet for her help during experiments and Isabelle Gaillard for her technical support.

References

- [1] L.D. Claxton, V.S. Houk, T.J. Hughes, Genotoxicity of industrial wastes and effluents, *Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res.* 410 (3) (1998) 237–243.
- [2] L. Shugart, C. Theodorakis, New trends in biological monitoring; application of biomarkers to genetic ecotoxicology, *Biotherapy* 11 (2–3) (1998) 119–127.
- [3] R.F. Lee, S. Steinert, Use of the single cell gel electrophoresis/Comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, *Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res.* 544 (1) (2003) 43–64.
- [4] S.E. Hook, R.F. Lee, Genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late developmental stages of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* embryo as measured by the Comet assay, *Aquat. Toxicol.* 66 (1) (2004) 1–14.
- [5] I.C. Taban, R.K. Bechmann, S. Torgrimsen, T. Baussant, S. Sanni, Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using Comet assay, *Mar. Environ. Res.* 58 (2–5) (2004) 701–705.
- [6] C.L. Mitchelmore, S. Hyatt, Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay, *Mar. Environ. Res.* 58 (2–5) (2004) 707–711.
- [7] C. Lewis, T. Galloway, Genotoxic damage in polychaetes: a study of species and cell-type sensitivities, *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 654 (1) (2008) 69–75.
- [8] S.A. Steinert, DNA damage as a bivalve biomarker, *Biomarkers* 4 (6) (1999) 492–496.
- [9] A. Buschini, A. Martino, B. Gustavino, M. Monfrinotti, P. Poli, C. Rossi, M. Santoro, A.J.M. Dörr, M. Rizzoni, Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization, *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 557 (2) (2004) 119–129.
- [10] M.J. Winter, N. Day, R.A. Hayes, E.W. Taylor, P.J. Butler, J.K. Chipman, DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK, *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 552 (1–2) (2004) 163–175.
- [11] A. Devaux, P. Flammarion, V. Bernardon, J. Garric, G. Monod, 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) (1998) 257–262.
- [12] L. Maltby, S.A. Clayton, R.M. Wood, N. McLoughlin, Evaluation of the Gammarus pulex in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: robustness, responsiveness, and relevance, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2) (2002) 361–368.
- [13] M.M. Watts, D. Pascoe, K. Carroll, Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 α -ethinylestradiol, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2) (2002) 445–450.
- [14] B. Xuereb, E. Lefèvre, J. Garric, O. Geffard, Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration, *Aquat. Toxicol.* 94 (2) (2009) 114–122.

- [15] J.L. Barnard, C.M. Barnard, *Freshwater Amphipoda of the World. I. Evolutionary Patterns*, Hayfield Associates, Virginia, 1983, p. 357.
- [16] C. Macneil, J.T.A. Dick, R.W. Elwood, The trophic ecology of freshwater Gammarus spp. (Crustacea: Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 72 (3) (1997) 349–364.
- [17] D.M. Forrow, L. Maltby, Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: direct and indirect effects on detritivore feeding, *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (8) (2000) 2100–2106.
- [18] D. Kirkland, P. Kasper, L. Müller, R. Corvi, G. Speit, Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: a follow-up to an ECVAM workshop, *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 653 (1–2) (2008) 99–108.
- [19] B. Kaya, A. Creus, A. Velázquez, A. Yanikoğlu, R. Marcos, Genotoxicity is modulated by ascorbic acid: studies using the wing spot test in *Drosophila*, *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 520 (1–2) (2002) 93–101.
- [20] F. Manas, L. Peralta, J. Raviolo, H. García Ovando, A. Weyers, L. Ugnia, M. Gonzalez Cid, I. Larripa, N. Gorla, Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (3) (2009) 834–837.
- [21] V. Felten, G. Charmantier, R. Mons, A. Geffard, P. Rousselle, M. Coquery, J. Garric, O. Geffard, Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium, *Aquat. Toxicol.* 86 (3) (2008) 413–425.
- [22] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1) (1988) 184–191.
- [23] T.S. Kumaravel, A.N. Jha, Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals, *Mutat. Res.* 605 (1–2) (2006) 7–16.
- [24] D.R. Dixon, A.M. Pruski, L.R.J. Dixon, A.N. Jha, Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview, *Mutagenesis* 17 (6) (2002) 495–507.
- [25] R. Lee, G.B. Kim, K.A. Maruya, S.A. Steinert, Y. Oshima, DNA strand breaks (Comet assay) and embryo development effects in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryos after exposure to genotoxicants, *Mar. Environ. Res.* 50 (1–5) (2000) 553–557.
- [26] R.F. Lee, S.A. Steinert, K. Nakayama, Y. Oshima, Use of DNA Strand Damage (Comet Assay) and Embryo Hatching Effects to Assess Contaminant Exposure in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) Embryos, ASTM Special Technical Publication, 1999.
- [27] S.Y. Park, J. Choi, Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol A exposure in aquatic biomonitoring species: freshwater Crustacean, *Daphnia magna*, and Aquatic Midge, *Chironomus riparius*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (2009) 1–6.
- [28] G. Frenzilli, M. Nigro, B.P. Lyons, The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments, *Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res.* 681 (1) (2009) 80–92.
- [29] J. Rigonato, M.S. Mantovani, B.Q. Jordão, Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity, *Genet. Mol. Biol.* 28 (3) (2005) 464–468.
- [30] A. Štambuk, M. Pavlica, L. Malovi, G.I.V. Klobučar, Persistence of DNA damage in the freshwater mussel *Unio pictorum* upon exposure to ethyl methane-sulphonate and hydrogen peroxide, *Environ. Mol. Mutagen.* 49 (3) (2008) 217–225.
- [31] M. Pavlica, G.I.V. Klobučar, N. Mojaš, R. Erben, D. Papeš, Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using Comet assay, *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 490 (2) (2001) 209–214.
- [32] I.V. Villela, I.M. de Oliveira, J. da Silva, J.A.P. Henriques, DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants, *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 605 (1–2) (2006) 78–86.
- [33] T. Guecheva, J.A.P. Henriques, B. Erdtmann, Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay), *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 497 (1–2) (2001) 19–27.
- [34] V.S. Grazeffe, L.F. Tallarico, A. Pinheiro, T. Kawano, M.F. Suzuki, K. Okazaki, C.A. Pereira, E. Nakano, Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 654 (1) (2008) 58–63.
- [35] S.W. Lee, K. Park, J. Hong, J. Choi, Ecotoxicological evaluation of octachlorostyrene in fourth instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae), *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (5) (2008) 1118–1127.
- [36] B. Xuereb, A. Chaumot, R. Mons, J. Garric, O. Geffard, Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda). Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys, *Aquat. Toxicol.* 93 (4) (2009) 225–233.
- [37] F.O. Costa, T. Neuparth, M.H. Costa, C.W. Theodorakis, L.R. Shugart, Detection of DNA strand breakage in a marine amphipod by agarose gel electrophoresis: exposure to X-rays and copper, *Biomarkers* 7 (6) (2002) 451–463.
- [38] G. Speit, M. Vasquez, A. Hartmann, The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity, *Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res.* 681 (1) (2009) 3–12.
- [39] M. De Boeck, M. Kirsch-Volders, *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) is not an adequate sentinel species to assess the genotoxic risk (Comet assay) of PAH exposure to the environment, *Environ. Mol. Mutagen.* 30 (1) (1997) 82–90.
- [40] D.W. Kuehl, J. Serrano, S. Naumann, Identification of potentially mutagenic contaminants in the aquatic environment by liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric characterization of in vitro DNA adducts, *J. Chromatogr. A* 684 (1) (1994) 113–119.
- [41] J. Rank, K. Jensen, Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54 (3) (2003) 323–329.
- [42] R.J. Aitken, M.A. Baker, Oxidative stress, sperm survival and fertility control, *Mol. Cell. Endocrinol.* 250 (1–2) (2006) 66–69.
- [43] J.S. Bus, J.E. Gibson, Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity, *Environ. Health Perspect.* 55 (1984) 37–46.
- [44] F. Manas, L. Peralta, J. Raviolo, H.G. Ovando, A. Weyers, L. Ugnia, M.G. Cid, I. Larripa, N. Gorla, Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28 (1) (2009) 37–41.
- [45] C. Clements, S. Ralph, M. Petras, Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet) assay, *Environ. Mol. Mutagen.* 29 (3) (1997) 277–288.
- [46] B.C. Goodale, R. Walter, S.R. Pelsue, W.D. Thompson, S.S. Wise, R.N. Winn, H. Mitani Sr., J.P. Wise, The cytotoxicity and genotoxicity of hexavalent chromium in medaka (*Oryzias latipes*) cells, *Aquat. Toxicol.* 87 (1) (2008) 60–67.
- [47] D. Beyersmann, A. Hartwig, Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms, *Arch. Toxicol.* 82 (8) (2008) 493–512.
- [48] C. Risso-De Faverney, A. Devaux, M. Lafaurie, J.P. Girard, B. Bailly, R. Rahmani, Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species, *Aquat. Toxicol.* 53 (1) (2001) 65–76.
- [49] A.M. Pruski, D.R. Dixon, Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L., *Aquat. Toxicol.* 57 (3) (2002) 127–137.
- [50] G. Isani, G. Andreani, F. Cocchioni, D. Fedeli, E. Carpené, G. Falcioni, Cadmium accumulation and biochemical responses in *Sparus aurata* following sub-lethal Cd exposure, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (1) (2009) 224–230.
- [51] M. Chang, W.N. Wang, A.L. Wang, T.T. Tian, P. Wang, Y. Zheng, Y. Liu, Effects of cadmium on respiratory burst, intracellular Ca²⁺ and DNA damage in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Comp. Biochem. Physiol.-C Toxicol. Pharmacol.* 149 (4) (2009) 581–586.
- [52] A.N. Jha, Ecotoxicological applications and significance of the comet assay, *Mutagenesis* 23 (3) (2008) 207–221.

3.1.2. Note 1 : Optimisation du protocole du test Comet pour la lecture des dommages à l'ADN sur spermatozoïdes de *G. fossarum*.

Résumé

Du fait de la forte condensation de la chromatine des spermatozoïdes, la mesure des dommages à l'ADN sur spermatozoïdes par le test Comet implique une modification du protocole. Quatre temps de lyse, de plus en plus longs ont été testés. Finalement, une étape de lyse de 18 heures à 4°C s'est révélée être la procédure la plus efficace pour décondenser la chromatine des spermatozoïdes de gammarés et permettre l'évaluation des dommages à l'ADN sur ce type cellulaire par le test Comet.

Mots clés

Spermatozoïdes ; test Comet ; temps de lyse ; *G. fossarum*

Optimisation du protocole du test Comet pour la lecture des dommages à l'ADN sur spermatozoïdes de *G. fossarum*

Introduction

Le test Comet est un test de génotoxicité largement utilisé aussi bien en toxicologie génétique qu'en écotoxicologie aquatique, bien que de nombreux efforts restent à faire dans ce domaine pour améliorer la standardisation des protocoles et le choix des types cellulaires investigués (Jha, 2008). Il est le plus souvent appliqué sur des cellules somatiques de différents organes pour déterminer l'activité génotoxique de certaines substances ou dans le cadre de programme d'évaluation du risque environnemental. Toutefois, des études ont démontré qu'il était possible de déterminer les effets d'un stress génotoxique sur les cellules germinales (Speit et al., 2009). La mesure des dommages à l'ADN sur spermatozoïdes, que ce soit pour des études *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* implique une modification du protocole de l'essai Comet ou des étapes supplémentaires du fait de la forte condensation de la chromatine des spermatozoïdes (Baumgartner et al., 2009). De nombreuses modifications du protocole ont été proposées pour permettre la décondensation et la migration de la molécule d'ADN mais aucun protocole standard n'a encore été établi. La grande majorité des études utilisant l'essai Comet sur spermatozoïdes relèvent de la toxicologie génétique. Dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique, le test Comet sur spermatozoïdes n'a été développé que chez les poissons (Labbe et al., 2001 ; Ciereszko et al., 2006 ; Zhou et al., 2006). Pour ces espèces, aucune modification du protocole n'a été nécessaire.

Le but de cette étude est d'optimiser le protocole de l'essai Comet pour permettre la mesure des dommages à l'ADN sur spermatozoïdes de *Gammarus fossarum*. Pour cela, différents temps de lyse, allant jusqu'à 24 heures ont été testés.

Matériel et méthode

Des mâles en précopulat acclimatés durant deux semaines au laboratoire sont triés et disséqués. Les spermatozoïdes sont collectés dans 20 µl de PBS frais maintenu dans la glace. Ils sont ensuite exposés pendant une heure à 4°C et à l'obscurité à 10 mM de MMS, dont la solution mère est préparée dans le PBS. Après exposition, l'intégrité du génome des spermatozoïdes est évaluée par le test Comet, dont la procédure est décrite dans l'article précédent (§ III.1, article 1) mais dont la durée de l'étape de lyse a été modifiée. Quatre temps de lyse sont testés : 1h, 3h, 18h et 24h.

Résultats et discussion

La plupart des auteurs utilisant l'essai Comet sur spermatozoïdes recourent à l'utilisation de la protéinase K comme une étape supplémentaire du protocole, ou directement ajoutée dans la solution de lyse, afin d'éliminer les protamines bloquant la migration de l'ADN dans l'agarose (annexe I de ce travail). Il est recommandé d'incuber la protéinase K à 37°C (Speit et al., 2009), or cette température n'est pas appropriée pour les cellules de *G. fossarum* puisque leur viabilité est réduite dès 20°C (données non présentées). Dans cette étude, seule l'étape de lyse du protocole de l'essai Comet en conditions alcalines, initialement décrit par Singh et al. (1988), a été modifiée. Après exposition à 10 mM de MMS pendant 1 heure, quatre temps de lyse ont été testés pour mesurer le niveau de dommages à l'ADN des spermatozoïdes.

La figure 1 représente les niveaux de dommages à l'ADN des spermatozoïdes dans les contrôles (PBS) et exposés au MMS, obtenus après 4 temps de lyse différents. Les résultats sont exprimés par le % tail DNA, qui représente le pourcentage d'intensité d'ADN dans la queue de la comète, et par le Tail moment (TM), c'est à dire la longueur de la queue de la comète x le % tail DNA, deux paramètres recommandés par Kumaravel et Jha (2006) comme étant les plus fiables et les plus pertinents.

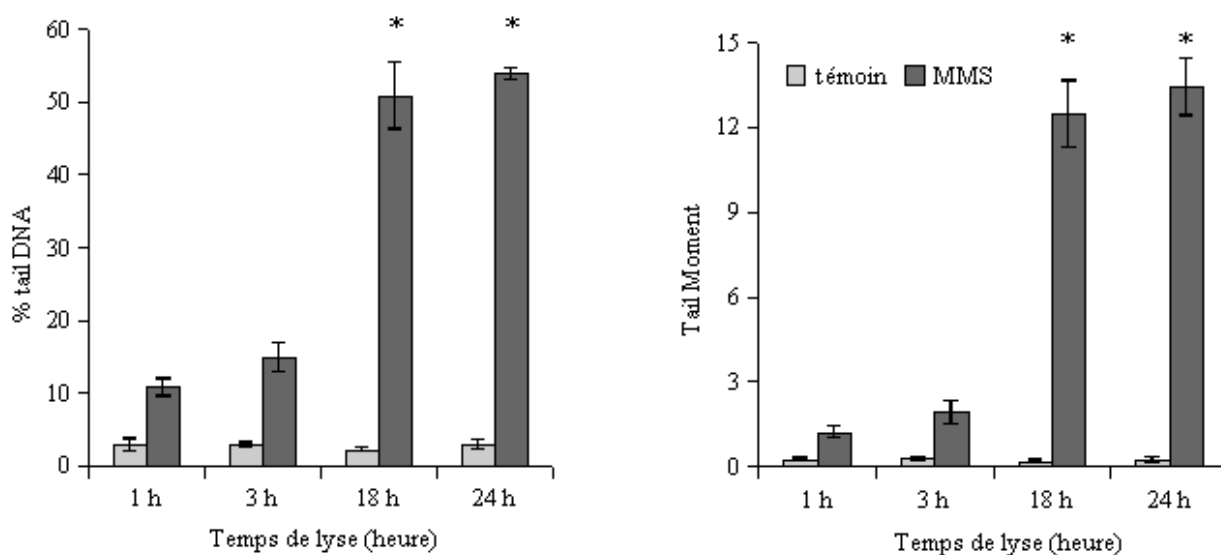


Figure 1 : Influence du temps de lyse sur les niveaux de dommages à l'ADN dans les spermatozoïdes de *G. fossarum* exposés *in vitro* pendant 1 heure à 10 mM de MMS. * différence significative entre les temps de lyse (test de Mann Whitney, $p < 0,05$).

Les différentes approches permettant la décondensation de la chromatine peuvent influencer le niveau de base des dommages. Dans notre cas, aucun effet du temps de lyse sur l'intégrité de l'ADN n'est noté, puisque les niveaux de dommages dans les cellules témoins restent très bas (moins de 3% tail DNA (Fig. 1.A) et inférieur à 0,3 TM (Fig 1.B)). Les cellules exposées au MMS présentent toujours des niveaux de dommages à l'ADN significativement supérieurs à ceux des témoins, quel que soit le temps de lyse. Toutefois, des niveaux de dommage 11 fois supérieurs après 18 heures de lyse qu'après 1 heure ou 3 heures de lyse sont mesurés dans les spermatozoïdes exposés (Mann-Whitney u -test, $p < 0.05$). Les niveaux de dommages atteignent un plateau après 18 heures de lyse, et aucune différence significative n'est mesurée entre 18 heures et 24 heures de lyse. Finalement, un temps de lyse de 18 heures a été choisi. Une augmentation du temps de lyse (16 h, 18 h ou toute la nuit) a été testée avec succès chez d'autres espèces notamment chez l'homme, le singe, la souris et le sanglier (Aravindan et al., 1997 ; Li et al., 2007 ; Garagna et al., 2005 ; Fraser et Strzezek, 2007) et également chez un amphibien (Morse-Gaudio et Risley, 1994).

La figure 2 montre la corrélation entre les paramètres % tail DNA et Tail moment pour les niveaux de dommages obtenus précédemment.

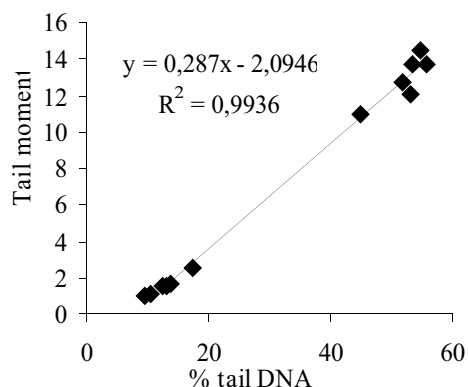


Figure 2 : Relation entre les paramètres % tail DNA et tail moment du test Comet, obtenus par le logiciel d'analyse d'images Comet IV.

L'existence d'une relation linéaire significative entre les deux paramètres nous permet d'exprimer nos résultats avec l'un ou l'autre paramètre indifféremment. Il a été choisi d'utiliser le seul paramètre % tail DNA, utilisé dans de nombreuses études de la bibliographie et recommandé par Kumaravel et Jha (2006) comme le paramètre le plus approprié pour les études réglementaires et pour une harmonisation inter-laboratoire.

Conclusion

Une modification du protocole du test Comet est nécessaire pour permettre la mesure des dommages à l'ADN des spermatozoïdes de *G.fossarum*. Contrairement à de nombreuses études de toxicologie génétique, aucune modification de la composition de la solution de lyse, aucune étape supplémentaire, ni aucune modification de l'étape de déroulement n'ont été étudiées. En revanche, une étape de lyse de 18 heures à 4°C permet de détecter un maximum de dommages à l'ADN, sans effet délétère sur le niveau de base dans les témoins.

Référence

- Aravindan G.R., Bjordahl J., Jost L.K., Evenson D.P. (1997) Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Experimental Cell Research*, 236(1): p. 231-237.
- Baumgartner A., Cemeli E., Anderson D. (2009) The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell Biol Toxicol* 25(1): p.81-98.
- Ciereszko A., Wolfe T.D., Dabrowski K. (2005) Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir. *Aquatic Toxicology*, 73:p. 128–138.
- Garagna S., Vasco C., Merico V., Esposito A., Zuccotti M., Redi C.A. (2005) Effects of a low dose of bentazon on spermatogenesis of mice exposed during foetal, postnatal and adult life. *Toxicology*, 212(2-3): p. 165-174.
- Fraser L. and Strzezek J. (2007) Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*, 99(3-4) : p. 317-329.
- Jha A.N. (2008) Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23 (3) p: 207–221.
- Kumaravel T.S., Jha A.N. (2006) Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals, *Mutation Research* 605(1-2): p. 7-16.
- Labbe C., Martoriatti A., Devaux A., Maise G. (2001) Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 60(3): p.397-404.
- Li M.W., Meyers S., Tollner T.L., Oversteet, J.W. (2007) Damage to chromosomes and DNA of rhesus monkey sperm following cryopreservation. *Journal of Andrology*, 28(4): p. 493-501.
- Morse-Gaudio M. and Risley M.S. (1994) Topoisomerase II expression and VM-26 induction of DNA breaks during spermatogenesis in *Xenopus laevis*. *Journal of Cell Science*, 107(10) : p. 2887-2898.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1): p. 184-191.

Speit G., Vasquez M., Hartmann A. (2009) The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res.* 681 (1) : p.3-12.

Zhou B., Liu W., Siu W.H.L., O'Toole D., Lam P.K.S., Wu R.S.S (2006) Exposure of spermatozoa to duroquinone may impair reproduction of the common carp (*Cyprinus carpio*) through oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 77: p. 136–142.

3.2. Signification fonctionnelle du biomarqueur de génotoxicité : lien avec la reproduction

3.2.1. Publication 2 : Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay.

Résumé

Les cellules germinales jouent un rôle unique et critique dans les fonctions biologiques : ils sont en charge du transfert du patrimoine génétique à la génération suivante. Il est donc essentiel de comprendre comment l'exposition des adultes à un stress génotoxique peut se traduire au niveau de sa descendance. Ce travail soulève la question des conséquences des dommages à l'ADN des cellules germinales sur le succès reproducteur chez un crustacé d'eau douce *Gammarus fossarum*. Dans un premier temps, la sensibilité de la réponse des ovocytes et des spermatozoïdes a été comparée au laboratoire en exposant des organismes à deux génotoxiques modèles le MMS et le $K_2Cr_2O_7$ et en mesurant les niveaux de dommages par le test Comet. L'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes et des ovocytes a également été évaluée sur des organismes exposés *in situ* à un rejet de station d'épuration. Quel que soit le type d'exposition, les spermatozoïdes sont toujours plus intégrateurs d'un message génotoxique et apparaissent donc plus sensibles que les ovocytes. Dans un deuxième temps, un lien statistique significatif a été établi entre le niveau de dommages à l'ADN des spermatozoïdes et le taux d'anomalies des embryons issus de ces spermatozoïdes et dont le développement s'est déroulé en milieu non contaminé. Ce lien permet d'interpréter la réponse du biomarqueur au niveau moléculaire à un niveau d'organisation biologique supérieur et de prédire les conséquences pour la génération suivante. Une altération de la reproduction est observée pour un niveau de dommages à l'ADN

des spermatozoïdes supérieur à un seuil, pour lequel les effets sur la reproduction pourraient entraîner des conséquences sur la dynamique de population de cette espèce d'intérêt écologique majeur.

Mots clés

Génotoxicité ; Cellules germinales ; Altération de la reproduction ; Développement embryonnaire ; *Gammarus fossarum*

Article soumis à Environmental Research

Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay

Emilie Lacaze ^{a,b}, Olivier Geffard ^b, Delphine Goyet ^a, Sylvie Bony ^a, Alain Devaux ^a

^a Université de Lyon, INRA-ENTPE, Laboratoire des Sciences de l'Environnement, rue Maurice Audin, Vaulx en Velin, F-69518, France

^b Cemagref, MALY, Laboratoire d'Ecotoxicologie, 3 bis quai Chauveau, 69336 Lyon, Cedex 9, France.

Abstract

Germ cells perform a unique and critical biological function: they pass down DNA that will be used for the development of the next generation. Thus there is an increasing need to understand how adult exposure to genotoxicants could negatively impact on the offspring of aquatic organisms. Hence this work addresses the question of the consequences of germ cell DNA damage resulting from parental exposure on reproduction quality in the freshwater crustacean *Gammarus fossarum*, a high ecologically relevant species. Initially, the response sensitivity of mature oocytes and spermatozoa to two model genotoxicants, MMS and K₂Cr₂O₇, was compared by implementing the Comet assay after the exposure of these gammarids in the laboratory and after the exposure of caged organisms in the field. Spermatozoa appeared significantly more susceptible than oocytes to genotoxicants whatever the exposure conditions. Secondly, a significant correlation between the level of damage to the sperm DNA of exposed parents and the abnormality rate in embryos that had developed in non contaminated water was demonstrated. Interestingly, this relationship bridges the biomarker response measured in germ cells at molecular level and its consequences at individual level for the subsequent generation. Moreover, reproduction defects were observed for a level of DNA damage exceeding a minimal threshold, which could have significant consequences for the population dynamics of this highly ecologically relevant species.

Keywords: Genotoxicity, germ cell, reproduction impairment, embryo development, *Gammarus fossarum*

1. Introduction

During the past 25 years, substantial efforts have been devoted to developing and applying biomarkers for use in ecotoxicology and ecological risk assessment (Forbes et al., 2006). Sub-cellular responses are suggested to be more sensitive to chemical stressors than alterations measured at organism level and they are generally easier to measure compared to longer term responses at higher levels of biological organization (Miller et al., 2007). Consequently, efforts have been focused on investigating the effects of potentially genotoxic compounds on aquatic organisms (Jha, 2004). Such genotoxic biomarkers can be powerful tools for detecting damage at molecular and cellular levels in somatic and germ cells. In order to confer ecological relevancy to biomarkers, several authors have proposed establishing empirical or mechanistic links between biomarker responses and impacts at higher biological levels, for example, through the study of fitness impairment (e.g. growth, survival and reproduction) (Allen et al., 2004; Amiard et al., 2008). However, to date, few studies have linked DNA damage with the reproductive parameters possibly affecting the fitness of organisms.

Spermatozoa and oocytes perform the unique and critical biological function of propagating the DNA used for the development of the next generation. The integrity of paternal and maternal genomes is therefore of paramount importance in the conception of viable offspring. It has been shown that sperm DNA can be modified through various mechanisms (Sakkas and Alvarez, 2010) and that sperm DNA damage is related to poor fertilization rate, defective embryonic development and high offspring morbidity, most of which have been demonstrated in mammals (Aitken and De Iuliis, 2007; Fatehi et al., 2006). Sperm is potentially more susceptible to contaminant-induced damage than somatic cells or oocytes, since it is generally considered to have poor DNA repair capacity and antioxidant defences. The Comet assay has proven to be a relevant, sensitive and rapid technique for detecting DNA damage in germ cells, mainly in mammal sperm (Speit et al., 2009) though more rarely in oocytes (Stachowiak et al., 2009). Whereas the Comet assay has been used to evaluate genotoxicant response in fish spermatozoa (Baumgartner et al., 2007), studies on invertebrate species are rare except for free-spawning marine organisms (Gwo et al., 2003; Lewis and Galloway, 2009; Pruski et al., 2009). Contrary to free-spawning invertebrates, *Gammarus fossarum* reproduces throughout the year and is easy to collect at a specific reproduction stage (it exhibits precopulatory mate guarding). This species has proven to be appropriate for genotoxicity assessment in laboratory studies (Lacaze et al.,

2010) and in aquatic ecotoxicology studies (Xuereb et al., 2009). *Gammarus* is considered to be the main link between detritus and fish and the reduction of its abundance can crucially affect the stream community structure (Kunz et al., 2010). Consequently, any impact on the reproduction of these invertebrates may have repercussions on river food chains, providing further reasons for finding out whether the genotoxicity expressed has detrimental effects on gammarid reproduction.

The purpose of the present work was to:

i) study *Gammarus fossarum* germ cell responses to genotoxicants by using laboratory exposure to the direct alkylating reference genotoxic agent, methyl methanesulfonate (MMS), leading to strand breaks and to the indirect acting genotoxicant, potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) known to induce oxidative damage, strand breaks and cross-links (Dana Devi et al., 2001). The recovery capacity of sperm and oocytes after DNA damage was also explored to facilitate understanding of the consequences of germ cell DNA damage on the reproduction of *Gammarus fossarum*. Genotoxicity assessment in germ cells was also carried out in the field at sites impacted by waste water treatment plant effluent to ensure environmental relevance.

ii) investigate the link between germ cell DNA integrity, fertilization success and embryonic development, in order to propose an easier and more meaningful interpretation of DNA damage measurements.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Methyl methanesulfonate (MMS) [CAS number 66-27-3] and potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) [CAS No.7778-50-9] and other chemicals and reagents were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (France).

2.2. Collection and maintenance of animals

Amphipods were collected in a known unpolluted upstream section of the Bourbre River (Isère, France). Sexually mature *Gammarus fossarum* were collected using a hand-held net during January and March 2009. The organisms collected were sieved (2 mm to 2.5 mm) to

separate juveniles and adults and quickly taken to the laboratory where they were transferred to 30-L aquarium tanks. The latter were filled with aerated uncontaminated groundwater whose conductivity was equivalent to that of the river water (600 $\mu\text{S}/\text{cm}$) and the organisms were acclimated to laboratory conditions. The organisms were kept for 15 days at $12\pm 0.5^\circ\text{C}$, subjected to a 16/8 h light/dark cycle, and continuously supplied with aerated uncontaminated groundwater before being used for the experiments. They were fed *ad libitum* on alder leaves (*Alnus glutinosa*) and received dried tubifex worms as a complementary food resource.

2.3. Cell isolation and cell viability measurement

Spermatozoa and oocytes were collected from mature gammarids in precopula pairs by microdissection, as described in a previous work (Lacaze et al., 2010). Gonads were carefully removed from the body and mixed in 20 μl of PBS with a micropipette to homogenize cell suspension. Cells were kept in 20 μl of fresh PBS kept on ice before being used for the Comet assay. All the cell samples were checked for cell viability prior to use. Viability was expressed as the percentage of viable cells measured with Trypan blue for oocytes and with the LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Invitrogen Life Technologies) for spermatozoa. A hundred cells were counted on three fresh samples.

2.4. Exposure conditions

Laboratory exposure to MMS and $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Mating males and females were exposed before moult to a range of concentrations of genotoxicants, i.e. the alkylating agent MMS (0, 0.44, 2.2 and 11 mg/L) and the oxidative compound $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (0, 0.0625, 0.25 and 1 mg/L) for five days. Adult gammarids in precopula pairs with an average body length of 9 ± 1 mm were selected in order to choose mature and same age-ranked organisms for exposure to the two genotoxicants. Females were chosen at the end of the reproductive cycle before hatching, with large and dark oocytes corresponding to the last stage of vitellogenesis, before transfer of the oocytes to the marsupium. For each concentration of genotoxicant, including the control, three batches of three replicates each containing 20 gammarids at precopula stage were placed in glass flasks containing 500 mL of test solution.

Exposure conditions were obtained by adding 500 μL of the appropriate genotoxicant stock solution to 500 mL of uncontaminated groundwater. Mixtures were renewed daily. Physicochemical parameters were as follows during exposure time: pH 7.47 ± 0.1 ; conductivity: $615 \pm 30 \mu\text{S/cm}$; temperature: $11.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

In situ exposure

In situ experiments were performed by using caging systems installed upstream and downstream of a wastewater treatment plant effluent output, revealed to be genotoxic for *Gammarus fossarum* in a previous work (data not shown). Site localization is presented in Figure 1. Station (a) was on the Bourbre River, located upstream of the confluence of the Bourbre with the Bion River, station (b) was on the Bion River, upstream of the WWTP effluent discharge, station (c) was located at the confluence of the Bourbre River with the Bion River, 100 meters downstream of station (a), the least polluted station. Station (d) on the Bourbre River, was located 500 meters downstream of station (c) (confluence). Females were chosen at an earlier stage of oogenesis than those selected for the laboratory experiments. In *Gammarus fossarum*, as in other gammarid species, the reproductive cycle is closely linked to the moulting cycle, allowing the selection of females at an intermoult stage by observing the embryos held in the marsupium (Charniaux-Cotton, 1985). For this experiment, we chose females whose maturation stage was roughly 15 days at 12°C before hatching, i.e. at the intermoult stage, characterized by the highest follicle growth and embryos at stage 3 (comma-like shape and appearance of the cephalothorax and segmented appendages) (Geffard et al., 2010). Males were added to cages to allow the formation of gammarid pairs. Caged amphipods were exposed for 15 days at the four stations described previously. Amphipods were caged in polypropylene cylinders closed by net at either end to guarantee the free circulation of water. The cylinders were placed in a perforated box to protect them against the entry of foreign objects (Dedourge-Geffard et al., 2009). After 15 days of caging, some organisms were used for oocyte and spermatozoa DNA damage measurements while others were transferred to the laboratory for fertilization and then for monitoring embryonic development in non contaminated water, in order to take into account only the involvement of parental exposure in possible progeny defects.

2.5. Comet assay procedure and slide scoring

At the end of exposure to MMS and $K_2Cr_2O_7$ and after exposure in the field, the first batch of living organisms was sacrificed for the Comet assay procedure. The alkaline version of this technique (pH > 13) developed by Singh et al. (1988) and previously adapted to *G. fossarum* spermatozoa and oocytes (Lacaze et al., 2010) was applied. At the end of exposure, only organisms at precopula stage were chosen to ensure the collection of mature spermatozoa and oocytes (just before transfer to the marsupium) (Geffard et al., 2010; Schirling et al., 2005). Five replicates were prepared for both sexes. Only cell suspensions exhibiting viability > 90% were used. Frosted microscope slides were precoated with normal melting point agarose in PBS (0.8%) and dried overnight. After cell collection, a solution of 20 μ L of 1% low melting point agarose in PBS (37°C) was mixed with an equal volume of cell in suspension and then deposited on the coated slides. Slides were cooled for 5 min at 4°C for agarose polymerisation. The slides were then placed in a freshly prepared lysing solution at 4°C (2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10) in the dark. The duration of lysis was 1 h for oocytes and 18h for spermatozoa. After lysis, the slides were carefully placed in a horizontal electrophoresis tank filled with freshly prepared chilled buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13). DNA was then allowed to unwind for 40 min. Electrophoresis was performed under 0.66 V/cm and 300 mA for 24 min. After electrophoresis, the slides were washed (three times for 5 min) in a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5). All the steps described above were performed under yellow light or in the dark to prevent artifactual DNA damage. Finally, the slides were dried for 15 min in absolute ethanol. After staining with 0.05 mM ethidium bromide, five slides per condition were observed and fifty cells per slide were analysed using the Comet IV image analysis system (Perspective Instruments Ltd, UK). As suggested by Kumaravel and Jha (2006), the percentage of DNA in the comet tail (% tail DNA) was chosen as the most reliable and meaningful comet measurement. Comet figures exhibiting an undistinguishable head and a prominent tail were always excluded from the scoring since they were considered to be apoptotic forms or to originate from necrosis (Fairbairn et al., 1995).

2.6 Gammarid transfer in non contaminated water: recovery and reproduction

At the end of exposure to MMS, $K_2Cr_2O_7$ or in the field, the remaining organisms in precopula pairs were transferred to clean water to allow the completion of fertilization and embryonic development in uncontaminated water. In order to correctly assess embryonic development after 21 days, the precopula pairs were individualized in polypropylene cages. The main water quality parameters were as follows: pH 7.6 ± 0.1 , conductivity: $570 \pm 25 \mu S/cm$, temperature: $11.5 \pm 0.1^\circ C$.

Organisms exposed to uncontaminated water were used as controls and treated in the same way as those exposed to MMS and $K_2Cr_2O_7$. After transfer to non contaminated water, precopula pairs required one to four days until fertilization occurred. During this period, some repair of DNA damage in spermatozoa and oocytes could be expected. Hence, the recovery capacity of male and female gammarids was also studied in assessing DNA damage in mature spermatozoa and oocytes after MMS and $K_2Cr_2O_7$ treatment. To do this, a second batch of animals was sacrificed to collect mature germ cells and perform the Comet assay after 2 and 4 days of recovery for assessing potential repair capacity and recovery performance.

To evaluate embryo quality, fertilized females were kept for 21 days at exactly $11.5 \pm 0.1^\circ C$. After having fertilized and released the female, each male was removed from the polypropylene cage to avoid cannibalism. Embryo development was assessed after 21 days in clean water. Ten females per exposure condition were observed. The embryos were carefully extracted from the marsupium by being teased out through the oostegites by using fine forceps. They were immediately placed onto a slide and immersed in a drop of water for observation under a binocular light microscope to define their development stage. Figure 2.A shows a normal type embryo at stage 3 after 21 days development at $11.5^\circ C$. The embryo is characterized by its comma-like shape, the cephalon has acquired a rounded shape, the dorsal organ is formed and segmented appendages and embryo organs are visible (Sundelin and Eriksson, 1998). Some of the different types of malformations in embryos are illustrated in Figures 2.B to 2.I., such as undeveloped embryos (B and C), undifferentiated embryos in which cells have degenerated (D), aberrant cleavages and oedema (E), non-specific malformations (F and G), enlarged embryos and impaired membranes (H), dead embryos (I).

The complete experimental design for exposure conditions and endpoint measurements is summarized in Figure 3.

2.7 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistica 8.0 software (StatSoft Inc). Since the distribution of DNA damage measured by the Comet assay did not follow a Gaussian distribution, both Kruskal-Wallis and Mann-Whitney non-parametric tests were used for data analysis. The occurrence of a dose-response relationship was tested by using linear regression. The Chi-squared test was used for the statistical analysis of embryo abnormalities.

3. Results

3.1. Genotoxicity assessment

Laboratory exposure to model genotoxicants

Figure 4.A illustrates the response of spermatozoa and oocytes from gammarids after days exposure to the alkylating agent MMS. Results are shown as percentage of tail DNA \pm standard deviation. The percentage of tail DNA in the control varied within a narrow range: $4.3 \pm 1.3\%$ for spermatozoa and $7 \pm 1.8\%$ for oocytes. DNA damage in spermatozoa and oocytes then followed a significant positive linear dose-response relationship. Spermatozoa appeared to be more sensitive to MMS than oocytes whatever the MMS concentration. At a concentration of 2.2 mg/L MMS, the damage to spermatozoa DNA was 4 times greater than that to oocytes.

After $K_2Cr_2O_7$ exposure, control spermatozoa and oocytes also exhibited low DNA damage levels with low variability between replicates ($3.4 \pm 0.1\%$ in spermatozoa and $2.3 \pm 0.8\%$ in oocytes) and significant dose-response to $K_2Cr_2O_7$ was measured in sperm and oocytes (Fig. 4.B). Again, spermatozoa appeared to be the more sensitive cell type, reaching a maximal tail DNA value of $14.7 \pm 3.2\%$ compared to $10.1 \pm 2.2\%$ in oocytes. Moreover, in sperm, a significant 1.4-fold increase of DNA damage was obtained at the lowest concentration of $K_2Cr_2O_7$ (0.0625 mg/L), whereas oocyte DNA damage did not increase at this concentration. At 1 mg/L $K_2Cr_2O_7$, the DNA damage induction ratio reached a value 4.2 times higher than the control spermatozoa and a value 4.7-times higher than the control oocytes.

In situ experiments

After 15 days caging at the different stations of the Bourbre and Bion Rivers, the survival rate of *Gammarus* remained higher than 80% and was respectively: $84 \pm 2\%$ at station (a), $85 \pm 7\%$ at station (b), $88 \pm 8\%$ at station (c) and $87 \pm 5\%$ at station (d). Figure 5 shows the results of genotoxicity assessment in spermatozoa and oocytes of organisms caged at the four stations. Contrasting genotoxic pressure measured both in spermatozoa and oocytes was observed at the stations. At station (a) the % of tail DNA in spermatozoa and oocytes of exposed gammarids was low and varied within ranges of $6.1 \pm 2.9\%$ and $5.7 \pm 2.4\%$ respectively. The confluence station (c) (that closest downstream of the WWTP discharge), clearly exhibited higher genotoxicity than station (a) upstream of the Bourbre River. At station (c), tail intensity in the spermatozoa of exposed animals reached $20.9 \pm 6.4\%$, corresponding to a 3.5 fold increase in DNA damage compared to station (a). Oocyte DNA damage followed the same trend as that of spermatozoa, although it was not statistically significant. Intermediate levels of DNA damage in both spermatozoa and oocytes were found at stations (b) and (d), with values comprised between those obtained at station (a) upstream of the Bourbre River and those of station (c) at the confluence. It should be noted that, as in the laboratory experiments, spermatozoa appeared to be more sensitive to genotoxic injury than oocytes, and it only this cell type allowed significant discrimination of the most polluted station.

3.2 Recovery after MMS and $K_2Cr_2O_7$ exposure

Figure 6 shows a significant difference between spermatozoa and oocyte DNA damage after MMS exposure during recovery time. In control organisms, there was no significant drift of DNA damage levels which varied within a narrow range ($1.7 \pm 0.3\%$ to $2.4 \pm 0.9\%$). After the four day recovery period, no significant decrease in DNA damage was observed in spermatozoa, whatever the concentration tested. In control oocytes, DNA damage was within the range $2.1 \pm 0.8\%$ - $3.8 \pm 1.7\%$ throughout the 4 day experiment. After 2 days recovery, a significant three-fold decrease in oocyte DNA damage compared to day 0 was observed for organisms exposed to 2.2 mg/L MMS. In the oocytes of organisms exposed to the highest MMS concentration, no significant decrease was observed after 2 days recovery. After the 4 day recovery period, the level of DNA damage measured in mature oocytes decreased to the control values for the two

lowest MMS concentrations, indicating efficient repair of alkylating-induced DNA damage. At the highest MMS concentration (11 mg/L), the value obtained was 2.5 times less in comparison to day 0 ($14.7 \pm 2.3\%$ versus $36.2 \pm 5.5\%$ tail DNA).

After $K_2Cr_2O_7$ exposure, no change in the control level of DNA damage was observed, whatever the duration of recovery or tissue (Figure 7.A and 7.B). In exposed animals and whatever the concentration of $K_2Cr_2O_7$, no reduction in genotoxic damage was measured in mature spermatozoa and oocytes after 2 and 4 days recovery.

3.3 Impact on offspring (fertilization and embryonic development)

Table 1 shows the mean number of embryos developed per female after exposure to MMS and $K_2Cr_2O_7$ in the laboratory and in situ. No decrease in the number of embryos produced was observed whatever the exposure conditions except at the highest MMS concentration. On average females carried 11 to 16 embryos in their marsupiums, whereas 5.5 ± 1.3 embryos were counted in females exposed to 11 mg/L MMS. Therefore, except at the highest MMS concentration, the success of fertilization did not appear to be significantly affected by DNA damage in germ cells whatever the treatment. At the highest MMS concentration (11mg/L), the decrease in the number of embryos could be considered as an increase in abnormal embryos. Thus, to obtain better assessment of the percentage of abnormalities at this concentration, the number of abnormal embryos in the 11mg/L assay was corrected in relation to the total number of control embryos. The number of abnormal embryos was calculated as follows: number of abnormal embryos (11 mg/L MMS) + total number of control embryos – total number of embryos (11 mg/L MMS).

Abnormalities in embryonic development included embryos with irregular cleavages, necrosis, non-specific malformations, enlargement and oedemas (Fig. 2). However, no further attempt was made to distinguish the different types of aberration when calculating the percentage of abnormalities. For MMS and $K_2Cr_2O_7$ exposure, the percentage of abnormalities in control embryos was $5.6 \pm 2.2\%$ and $6.5 \pm 1.9\%$ respectively (Fig. 8.A and B). A mean value of $3.5 \pm 2.5\%$ of abnormal embryos was obtained after caging adults at a non polluted site (station a) (Fig.8.C). After parental exposure to MMS and $K_2Cr_2O_7$, significant disruption of normal embryo development was recorded. A dose-dependant effect was observed in the embryos derived from MMS-exposed adults. The frequency of embryo aberrations was very significantly higher after

exposure to the two highest MMS concentrations compared to the control (Fig. 8.A). Abnormality rate reached $29.5 \pm 4.1\%$ and the highest value of $60.0 \pm 6.1\%$ after parental exposure to 2.2 mg/L and 11 mg/L MMS, respectively. However, because of the decrease in the number of embryos at 11 mg/L MMS, the percentage of abnormalities was corrected on the basis of the number of control embryos. After correction, the value of 80% abnormality was obtained. At a concentration of 1 mg/L $K_2Cr_2O_7$, the percentage of abnormalities was also significantly higher compared to the control ($19.2 \pm 3.9\%$) (Fig.8.B). After in situ exposure, few embryos collected in females caged at the four stations showed abnormal development, the percentage of abnormalities ranging from $3.5 \pm 2.5\%$ to $9.1 \pm 3.5\%$ depending on the station (Fig. 8.C).

Spermatozoa were used to test the possible correlation between genotoxicity responses and the response observed in embryos. Therefore a negative correlation between the percentage of normally developing embryos derived from adults exposed to MMS and sperm DNA damage generated by the alkylating agent was observed (Pearson's correlation coefficient $r = -0.92$) (Fig. 9.A). Furthermore, a negative correlation was also observed following $K_2Cr_2O_7$ exposure (Pearson's correlation coefficient $r = -0.96$) (Fig.9.B).

4. Discussion

This work demonstrates that spermatozoa and oocytes from an ecologically relevant species, the crustacean *Gammarus fossarum*, can be affected by genotoxicants with different modes of action. The Comet assay appeared to be a convenient tool for assessing such damage since a strong dose-response relationship was observed using two different genotoxicants (MMS and $K_2Cr_2O_7$ respectively). In situ experiments revealed that municipal wastewater effluents do have genotoxic activity, as observed by several authors (Dizer et al. 2002; Žegura et al., 2009). In our study, such genotoxic activity was detected after 15 days of in situ exposure only in spermatozoa, which showed a level of DNA damage higher than 20% expressed as % tail intensity. As a rule, spermatozoa clearly exhibited higher sensitivity towards genotoxicants than oocytes, particularly marked under exposure to MMS, a genotoxicant acting directly that does not generate indirect damage by enzyme cutting. Potassium dichromate is known to be responsible for oxidative damage, cross-links and lipid peroxidation. Since spermatozoa contain a large amount of unsaturated fatty acids, they are particularly susceptible to lipid peroxidation (Aitken and De Iuliis, 2007), leading to an increase in DNA damage after exposure to potassium dichromate.

Our results showed that after 5 days exposure to MMS and 4 days recovery, spermatozoa exhibited no decrease in DNA damage, contrary to oocytes which showed DNA damage levels far lower than the value measured before the recovery period. The observed time-dependent variations in the levels of oocyte DNA strand breaks can be explained by the DNA-repair theory proposed by Ching et al. (2001) who suggest that a DNA-repair system may be activated after the exposed cell has accumulated sufficient toxicant above a threshold level. It should be emphasized that the loss of breaks may not be just a feature of repair even if it could obviously be influenced by them. However, because no apoptotic nucleus forms were observed, the loss of strand breaks was not simply due to cell death.

Lack of decrease in DNA damage in spermatozoa, even after 4 days recovery in uncontaminated water suggests a lack of repair capacity in this cell type. The same trend was observed for potassium dichromate. Moreover, for this latter compound, DNA damage did not decrease in oocytes either, contrary to the decline of MMS-DNA damage observed in oocytes through recovery time. These results suggest a persistence of oxidative-induced DNA damage in *Gammarus fossarum* oocytes. According to the literature, potassium dichromate has been described as a DNA repair activity inhibitor. Chromium is known to impair different DNA repair capacities such as the down-regulation of human OGG1 (Hodges and Chipman, 2002). It has also been described in the mussel as being an inhibitor of the repair activity of AAG, a base excision repair glycolase for alkylating damage (Emmanouil et al., 2007).

Higher sensitivity of spermatozoa to DNA damage compared to oocytes could mainly result from the inability of sperm to repair DNA. Mammalian studies have revealed that, the spermatozoa capacity for DNA repair is reduced (Aitken and De Iuliis., 2007). Given that the only protection spermatozoa have is a capacity to condense chromatin, they remain sensitive targets of DNA-reactive chemicals (Andrabi, 2007). DNA integrity in mammal spermatozoa has been widely studied (Cordelli et al., 2007) but nothing is known regarding DNA repair efficiency in invertebrate spermatozoa. Significant recovery in DNA integrity has been demonstrated in *Mytilus edulis* sperm, suggesting repair capability in this cell type, but this was significantly reduced compared to mussel somatic cells (Lewis and Galloway, 2009). Although spermatozoa repair capacity is still controversial, it is well-known that oocytes possess a variety of enzymatic mechanisms that repair damaged DNA (Ashwood-Smith and Edwards, 1996). It has also been shown that oocytes from different species including humans and fish are capable of repairing sperm DNA even after fertilization (Menezo, 2006). The possibility that X-ray damage induced

in sperm or oocytes was reparable in the fertilized eggs of the mouse and that various types of repair processes were involved was indicated by (Matsuda and Tobari, 1989). Amadhi and Ng (1999) demonstrated that the hamster oocyte is capable of repairing sperm DNA damage up to a certain level ($\leq 8\%$ of damage) and that damage beyond this level resulted in low rates of embryonic development.

In our study, no effect on embryo production after exposure to $K_2Cr_2O_7$ or field study exposure was observed, revealing that DNA-damaged sperm are capable of fertilizing oocytes. The only decrease in the number of embryos, recorded at the highest concentration of MMS, could be due to the early loss of dead embryos that died shortly after fertilization. Not much more than 6.5% of the progeny derived from non exposed gametes had % abnormalities, with a mean of 5.3%, a value approaching the maximum reference value of 10% of malformed embryos in control *Gammarus fossarum* proposed by Geffard et al. (2010). The frequency of malformed embryos in the amphipod *Monoporeia affinis* observed in the Baltic Sea ranged between 1.5 and 4.9% with a mean of 3% in reference areas (Sundelin and Eriksson, 1998). In *Gammarus wilkitzkii* embryos, less than 10% of abnormalities was measured in non exposed organisms (Camus and Olsen, 2008). On the other hand, when resulting from DNA-damaged germ cells in the lab experiment, embryonic development was severely affected and the control value was significantly exceeded. Embryos derived from germ cells carrying DNA damage had highly irregular cleavage patterns, incomplete blastula development, necrosis, non-specific malformations and enlargement. These abnormalities could be associated with a defect in offspring viability. However, such an impact on the viability of the embryo was not observed after in situ experiments. Up to now, the consequences of germ cell DNA damage on embryonic development success in aquatic organisms have been given little attention. Previous studies from Thorgaard et al. (1985) revealed that rainbow trout sperm with fragmented DNA (UV irradiated) used to fertilize eggs in vitro, resulted in an evident increase in embryonic aneuploidy. Results from these experiments show a significant reduction in the survival of embryos produced with UV irradiated sperm compared to control embryos. Similarly, loach (*Misgurnus fossilis*) sperm cryopreservation significantly decreased embryo survival after the 20th stage of development (Kopeika et al., 2003), whereas rainbow trout sperm cryopreservation had no consequences on the development quality of the embryos and fry. This lack of detrimental effect on progeny could be due to the very low magnitude of DNA alteration caused by the cryopreservation of trout sperm (Labbe et al., 2001).

A significant relationship was revealed between DNA damage in sperm and the percentage of embryos developing normally in *Arenicola marina* and *Mytilus edulis* (Lewis and Galloway, 2009). DNA damage in other aquatic invertebrate spermatozoa has also led to post fertilization failures, impaired hatching of embryos and impaired subsequent survival of offspring as demonstrated in the sea-urchin (Gwo et al., 2003; Pruski et al., 2009).

In the present study, *Gammarus fossarum* males had the highest degree of detrimental effects. Consequently, although both sexes were affected by genotoxicant injury, correlations between normal embryonic development and the degree of DNA damage were found only with sperm. This result agrees with the work of Hales et al. (2005) who suggested that in humans, most mutations in fertilized eggs are derived from the sperm. A threshold value of DNA damage expressed as tail intensity beyond which a low rate of normal embryonic development will take place could be estimated. In line with the results obtained and the Comet assay protocol used in this study, a value of 20% tail intensity in spermatozoa could be linked to effects on reproduction. The MMS experiment revealed that the link between genotoxicity response and embryonic development was significant beyond this 20% value. The hypothesis that oocytes possess the capacity to repair sperm DNA damage up to 20% tail intensity could be raised, an assumption strengthened by the lack of a significant link observed in the field experiment, despite the damage to sperm DNA approaching this figure.

The use of *Gammarus fossarum* is particularly adapted for monitoring the impact of genotoxicity in aquatic systems. Indeed, contrary to species with seasonal reproduction such as mussels, oysters and fish, this species allows measuring genotoxic injury in mature germ cells throughout the year with the potential of easier linking of DNA damage to reproduction impairments. Moreover, knowledge of moult and reproductive cycles allows the exposure of precopula pairs for a specified period before mating for in situ experiments with caged organisms. Finally, understanding the potential impacts of genotoxicant compounds on gammarids is critical because of the ecological relevance of such species. The results of this study provide further evidence to support the use of Gammaridae in ecotoxicology studies, taking into account factors such as ease of culture (Kunz et al., 2010), knowledge of reproductive cycle (Geffard et al., 2010) and the availability of a genotoxicity assay (Lacaze et al., 2010).

In this work, experiments were carried out using acute exposures with rather high concentrations of two chemicals with well-described genotoxicity mechanisms. While such experiments cannot be considered as environmentally relevant, the levels of DNA damage

caused to spermatozoa after laboratory exposures have in fact been measured in the field, but without any correlation with significant reproduction effects. Therefore it would be interesting to determine whether higher DNA damage level in germ cells could occur in contaminated sites and what the consequences of this damage could be for reproductive success.

5. Conclusion

We demonstrated that genotoxic injuries can be measured by the Comet assay in oocytes and spermatozoa of the freshwater amphipod *Gammarus fossarum*. Our results provided correlations between the induction of DNA strand breaks in sperm and consecutive abnormalities in embryos. While certain studies are available in the literature reporting the assessment of genotoxic damage in sperm, there have been few attempts to directly link this damage with significant reproductive impacts. *Gammarus fossarum* proved to be a good indicator due to its reproductive cycle and sensitivity to genotoxicants. Moreover, since *Gammarus* is considered as the main link between detritus and fish and thus reduction of its abundance can affect stream community structure (Kunz et al., 2010), studies of any impact on the reproduction of this invertebrate are of importance. Nevertheless, it should not be forgotten that the reduction of gamete quality does not necessarily result in population-level effects as other life-history traits may be important for population persistence. It could be interesting to study additional endpoints at vulnerable life stages, for example, hatching time and delay in juvenile growth, that can reduce chances of survival (Lawrence and Poulter, 2001).

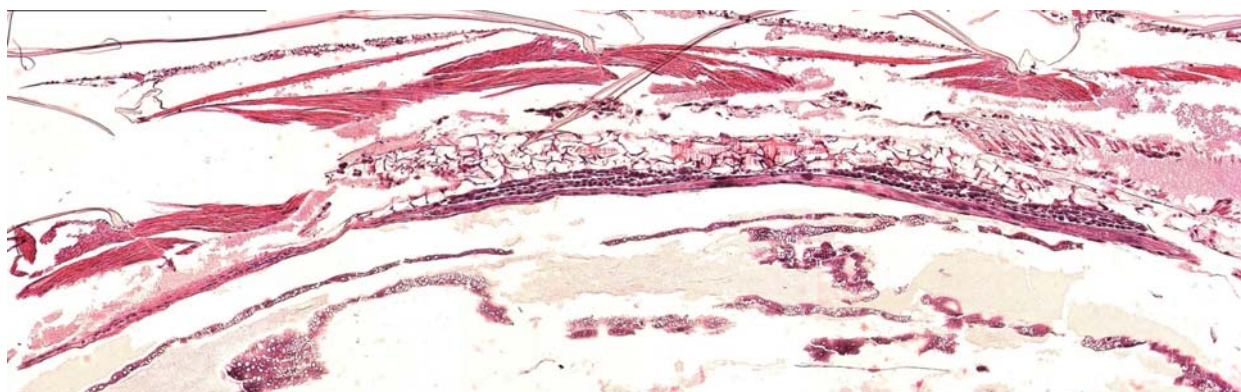
Acknowledgments

The authors are thankful to the Recherche Environnement Cluster of the Rhône-Alpes Region for its financial support. The authors also thank Isabelle Gaillard for her technical support for the laboratory experiment and Marion Gust, Claire Noël and Raphaël Mons for their assistance in the field experiments. The authors also wish to thank Mr Keith Hodson for his very helpful critical reading of the English of the manuscript.

References

- Aitken R.J., De Iuliis G.N., 2007. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod. BioMed. Online.* 14(6), 727-733.
- Aitken R.J., Koopman P. Lewis S. E., 2004. Seeds of concern. *Nature.* 43, 48-52.
- Andrabi S.M.H., 2007. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 561-569.
- Ashwood-Smith M.J., Edwards R.G., 1996. DNA repair by oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 2(1), 46-51.
- Baumgartner A., Cemeli E., Anderson D., 2009. The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell Biol. Toxicol.* 25(1), 81-98
- Camus L., Olsen G.H., 2008. Embryo aberrations in sea ice amphipod *Gammarus wilkitzkii* exposed to water soluble fraction of oil. *Mar. Environ. Res.* 66, 221–222.
- Charniaux-Cotton, H., 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. *Am. Zool.* 25, 197–206.
- Ching E.W.K., Siu W.H.L., Lam P.K.S., Xu L., Zhang Y., Richardson B.J., Wu R.S.S., 2001. DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo[a]pyrene: dose and time-dependent relationships, *Mar. Pollut. Bull.* 42, 603–610.
- Cordelli E., Fresegna A.M., D'Alessio A., Eleuteri P., Spano M., Pacchierotti F., Villani P., 2007. ReProComet: A New In Vitro Method to Assess DNA Damage in Mammalian Sperm. *Toxicol. sci.* 99(2), 545–552.
- DanaDevi K., Rozati R., Saleha Banu B., Jamil K., Grover P., 2001. In vivo genotoxic effect of potassium dichromate in mice leukocytes using comet assay. *Food Chem. Toxicol.* 39, 859–865
- 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.* 11, 1569-1576.
- Dizer H., Wittekindt E., Fischer B., Hansen P.D., 2002. The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers. *Chemosphere.* 46, 225–233.

- Emmanouil C., Sheehan T.M.T, Chipman J.K., 2007. Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (*Mytilus edulis* L.) gill following exposure to Cd and Cr(VI). *Aquatic Toxicol.* 82, 27–35
- Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L, 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339, 37-59.
- Fatehi A.N., Bevers M.M., Schoevers E., Roelen A.J., Colenbrander B., Gadella B.M., 2006. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J. Androl.* 27, 176-188.
- Forbes V.E., Palmqvist A., Bach L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(1), 272–280.
- Geffard O., Xuereb B., Chaumot A., Geffard A., Biagianti S., Noël C., Abbaci K., Garric J., Charmantier G., Charmantier-Daures M., 2010. Reproductive toxicity test in *Gammarus fossarum*. *Environ. Toxicol. Chem.* In press.
- Gwo J.C., Wu C.Y., Chang W.S., Cheng H.Y., 2003. Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay. *Cryo Letter.* 24, 171–180.
- Hales B.F., Aguilar-Mahecha A., Robaire B., 2005. The stress response in gametes and embryos after paternal chemical exposures. *Toxicol. Appl. Pharm.* 207, 514-520.
- Hodges N.J., Chipman J.K., 2002. Down-regulation of the DNA-repair endonuclease 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (hOGG1) by sodium dichromate in cultured human A549 lung carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 23(1), 55–60.
- Jha A.N., 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat. Res.* 552, 1–17.
- Kopeika, J., Kopeika E.; Zhang T., Rawson D.M., 2004. Studies on the toxicity of dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol and glycerol to loach (*Misgurnus fossilis*) sperm and the effect on subsequent embryo development. *Cryo-letters.* 24(6), 365-374.
- Kumaravel T. S., Jha A.N., 2006. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat. Res.* 605(1-2), 7-16.
- Kunz P.Y., Kienle C., Gerhardt A., 2010. *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests. *Rev. Environ. Cont. Toxicol.* 205, 1-76.



- Labbe C., Martoriati A., Devaux A., Maise G., 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol. Reprod. Dev.* 60(3), 397–404.
- Lacaze E., Geffard O., Bony S., Devaux A., 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* using alkaline Comet assay. *Mutat. Res.* 700, 32-38.
- Lawrence A. J. Lawrence, Poulter C., 2001. Impact of copper, pentachlorophenol and benzo[a]pyrene on the swimming efficiency and embryogenesis of the amphipod *Chaetogammarus marinus*. *Mar. ecol. Prog. Ser.* 223, 213–223.
- Lewis C., Galloway T., 2009. Reproductive Consequences of Paternal Genotoxin Exposure in Marine Invertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 43(3), 928-933.
- Matsuda Y, Tobari I., 1989. Repair capacity of fertilized mouse eggs for X-ray damage induced in sperm and mature oocytes. *Mutat. Res.* 210(1), 35–47.
- Menezo Y., 2006. Oocyte capacity to repair DNA damage induced in sperm. *Journal de gynecologie obstetrique et biologie de la reproduction.* 35(5), 19-23.
- Miller D.H., Jensen K.M., Villeneuve D.L., Kahl M.D., Makynen E.A., Durhan E.J., Ankley G.T., 2007. Linkage of biochemical responses to population-level effects:a case study with vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 26(3), 521–527.
- Pruski A.M., Nahon S., Escande M.L., Charles F., 2009. Ultraviolet radiation induces structural and chromatin damage in Mediterranean sea-urchin spermatozoa. *Mutat. Res.* 673, 67–73.
- Sakkas D., Alvarez, J.G., 2010. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.* 93(4), 1027-1036.
- Schirling M., Jungmann D., Ladewig V., Nagel R., Triebkorn R., Köhler H.R., 2005. Endocrine Effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Influence of Wastewater Effluents, Temporal

- Variability, and Spatial Aspects on Natural Populations. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 49, 53–61.
- Singh N.P, McCoy M. T., Tice R., Schneider E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175(1), 184-191.
- Speit G., Vasquez M., Hartmann A., 2009. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutat. Res.* 681, 3–12.
- Stachowiak E.M., Papis K., Kruszewski M., Iwanenko T., Bartomiejczyk T., Modlinski J.A., 2009. Comparison of the Level(s) of DNA Damage Using Comet Assay in Bovine Oocytes Subjected to Selected Vitrification Methods, *Reprod. Dom. Anim.* 44, 653–658.
- Sundelin B., Eriksson A.K., 1998. Malformations in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monoporeia affinis* in the Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 171, 165-180.
- Thorgaard G.H., Scheerer P.D., Parsons J.E., 1985. Residual paternal inheritance in gynogenetic rainbow trout: Implications for gene transfer, *Theor. Appl. Genet.* 71, 119–121.
- Xuereb B., Lefèvre E., Garric J., Geffard O., 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicol.* 94, 114–122.
- Žegura B., Heath E., Černoša A., Filipič M., 2009. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere.* 75, 1453–1460.

Table and Figures

Table 1: Mean number of embryos per female \pm SEM (N=10) after MMS exposure, $K_2Cr_2O_7$ exposure and *in situ* experiment. (*) significantly different from control condition ($p < 0.05$)

	mg L ⁻¹	Number of embryos per female
MMS	0	10.6 \pm 1.3
	0.44	10.6 \pm 0.9
	2.2	8.7 \pm 0.9
	11	5.4 \pm 1.3 *
$K_2Cr_2O_7$	0	15.3 \pm 1.4
	0.0625	12.9 \pm 1.9
	0.25	12.6 \pm 2.1
	1	14.1 \pm 0.8
Bourbre River	a	12.9 \pm 1.9
	b	11.2 \pm 2.5
	c	16.5 \pm 0.75
	d	12.4 \pm 1.6

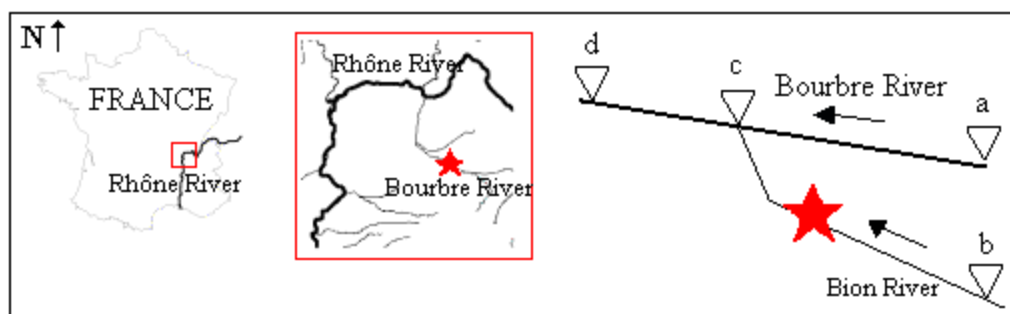


Figure 1: Localization of the investigated areas of caging in the Bourbre River and the Bion River, affluents of the Rhone River in the south east part of France.

Red star points out the waste water treatment plant effluent. Station (a), the upstream part of the Bourbre River is the less contaminated site. Station (b) is situated 1 km upstream the effluent output. Station (c) is at the confluence between the Bourbre River and the Bion River, near the WWTP effluent output. Station (d) is located at the downstream part of the Bourbre River, 500 meters below the station (c).

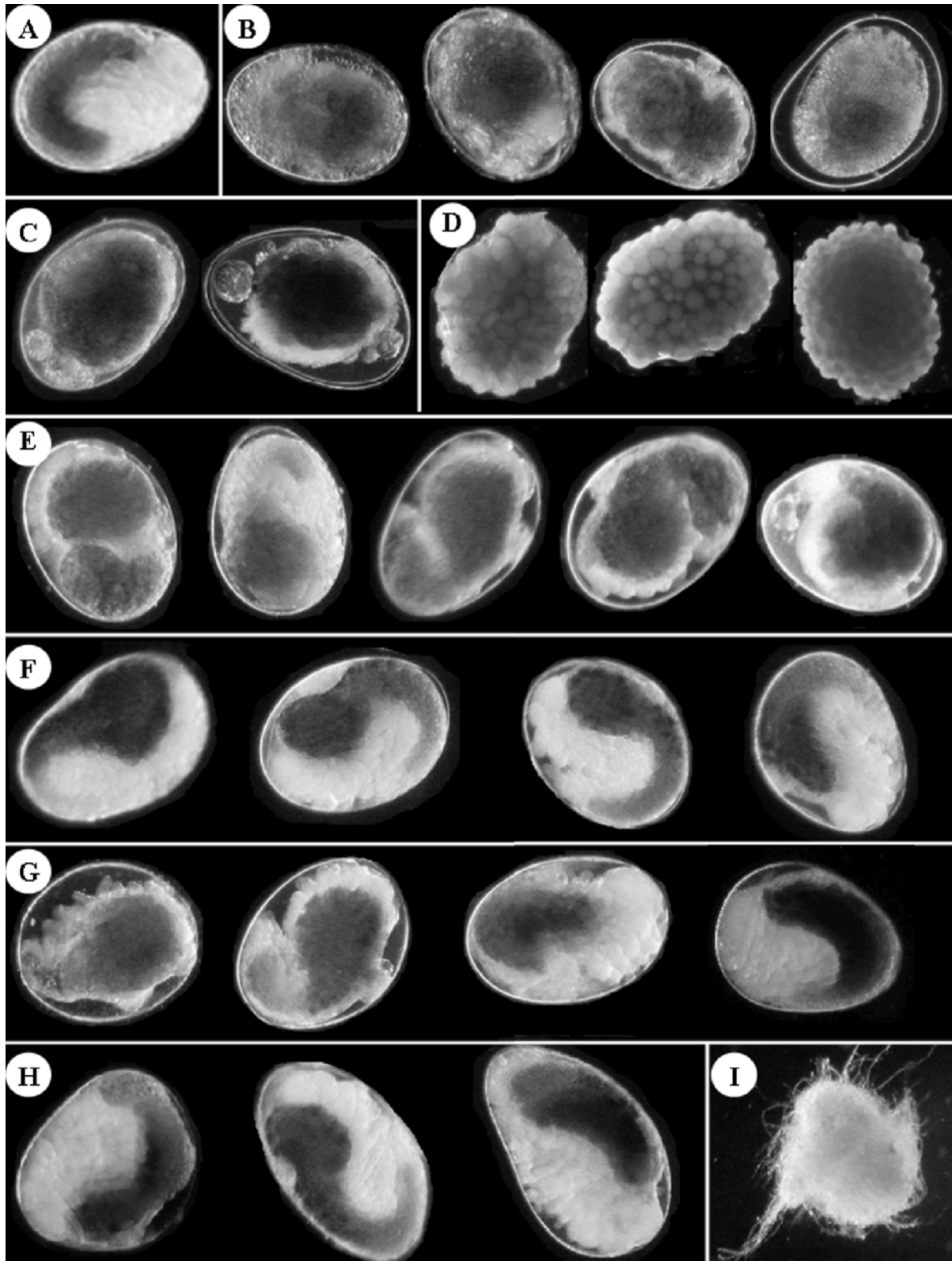


Figure 2: 21 days-old embryos developed in non contaminated water at 12°C.

A: Example of normal embryos of *Gammarus fossarum*. B and C: undeveloped embryos, D: undifferentiated embryos in which cells have degenerated, E: aberrant cleavages and oedema, F and G: non-specific malformations, H: enlarged embryos and impaired membranes, I: dead and mouldy embryo.

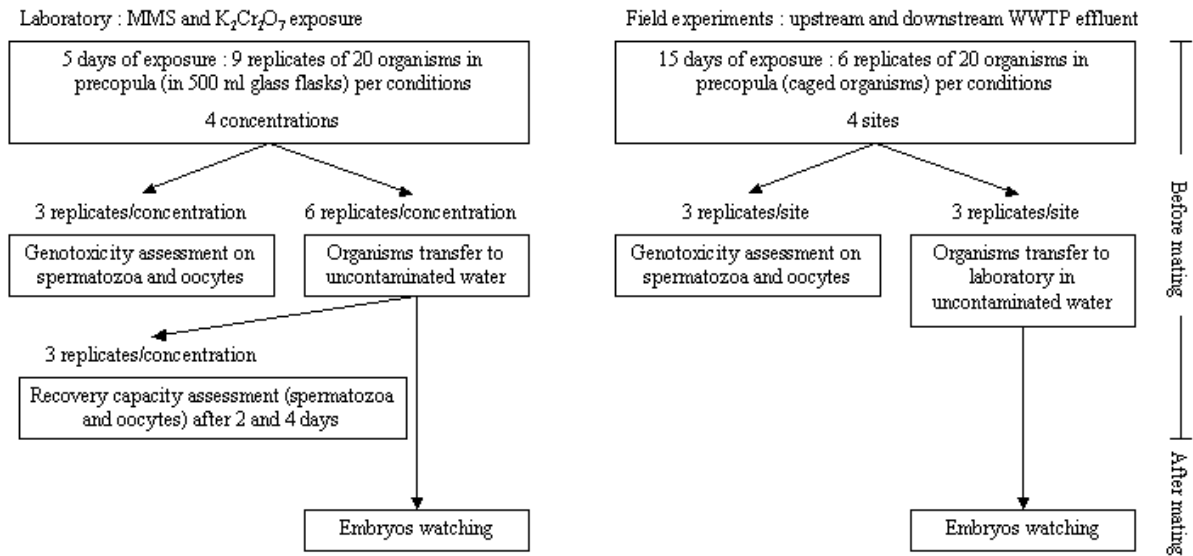


Figure 3: Chart illustrating the experimental design adopted in this study to evaluate the genotoxic effects on *Gammarus fossarum* germ cells of MMS, K₂Cr₂O₇ and in situ genotoxic pressure of a WWTP effluent and the consequences of this parental exposure on the offspring.

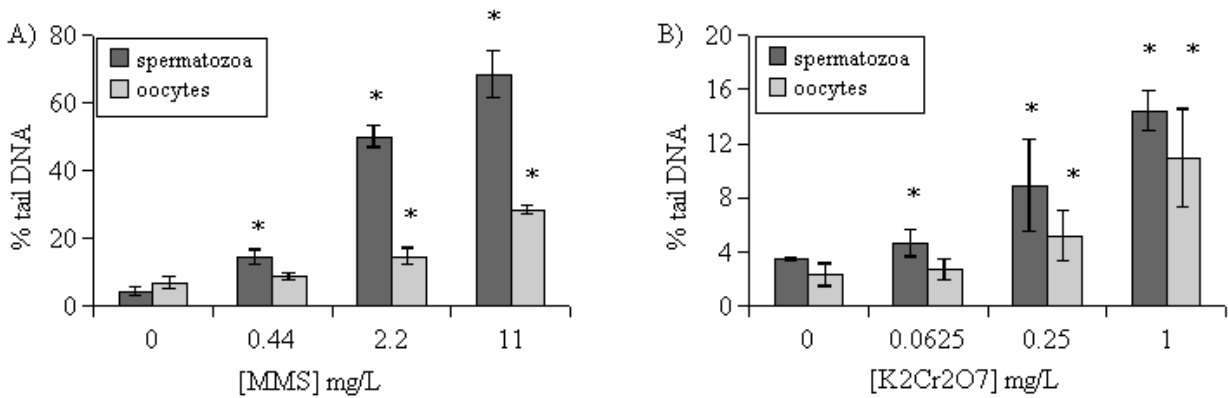


Figure 4: Comparing the response of oocytes and spermatozoa to *in vivo* MMS exposure (A) and K₂Cr₂O₇ exposure (B) for 5 days at 12°C. Each block is the mean % tail DNA from five replicates ± standard error (error bars). (*) Significantly different from control.

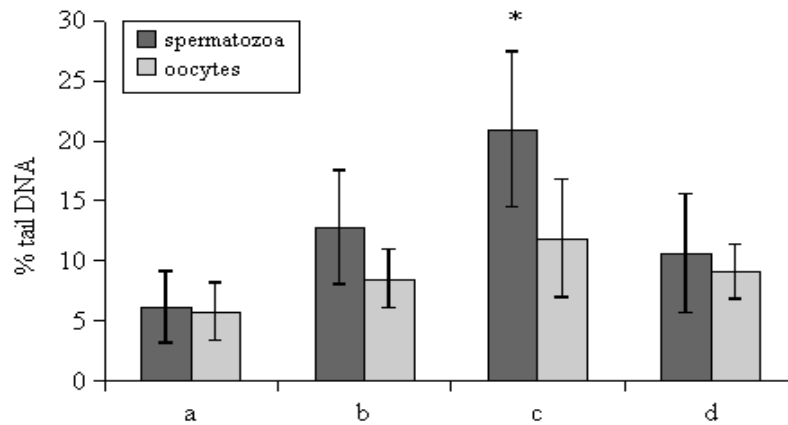


Figure 5: Levels of DNA damage in *G. fossarum* oocytes and spermatozoa after 15 days of caging in the Upstream Bourbre River (a), the Bion River (b), the Confluence (c) and Downstream Bourbre River (d). N=5, (*) Significant difference in DNA damage compared with organisms caged et the upstream Bourbre River station.

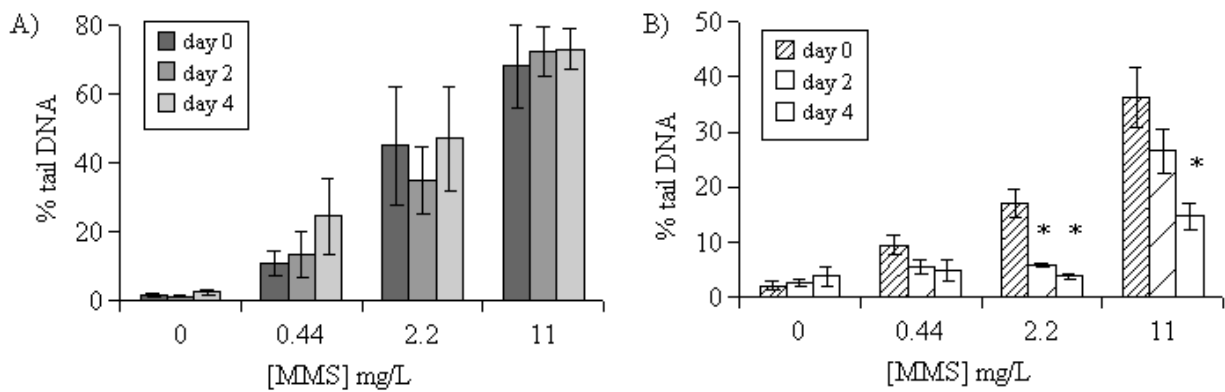


Figure 6: Four days recovery experiment after exposure to a range concentration of MMS during 5 days A) in spermatozoa and B) in oocytes. (*) Significant difference in % tail DNA compared with the day 0.

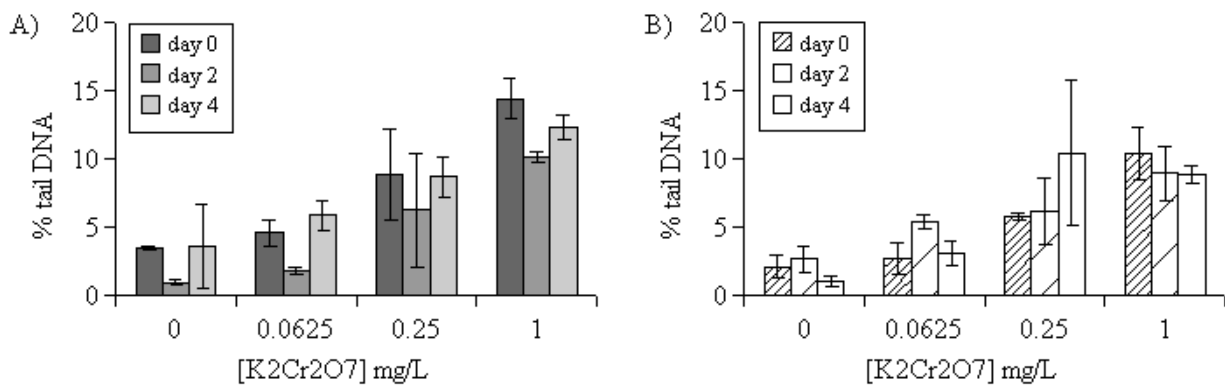


Figure 7: Four days recovery experiment after exposure to a range concentration of $K_2Cr_2O_7$ during 5 days A) in spermatozoa and B) in oocytes.

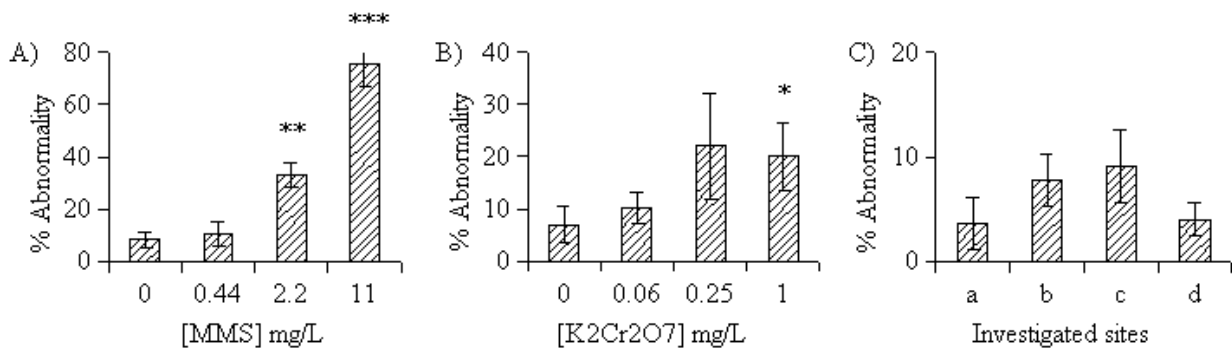


Figure 8: Effects of adult exposure on embryonic development measured after 21 days in non contaminated water (12°C). Data as percentage of abnormalities per female \pm SEM. N=10. A) MMS exposure. B) K₂Cr₂O₇ exposure and C) *in situ* experiment. (*) significantly different from control condition ($p < 0.05$). (**) and (***) highly and very highly significantly different ($p < 0.005$ and $p < 0.0005$ respectively).

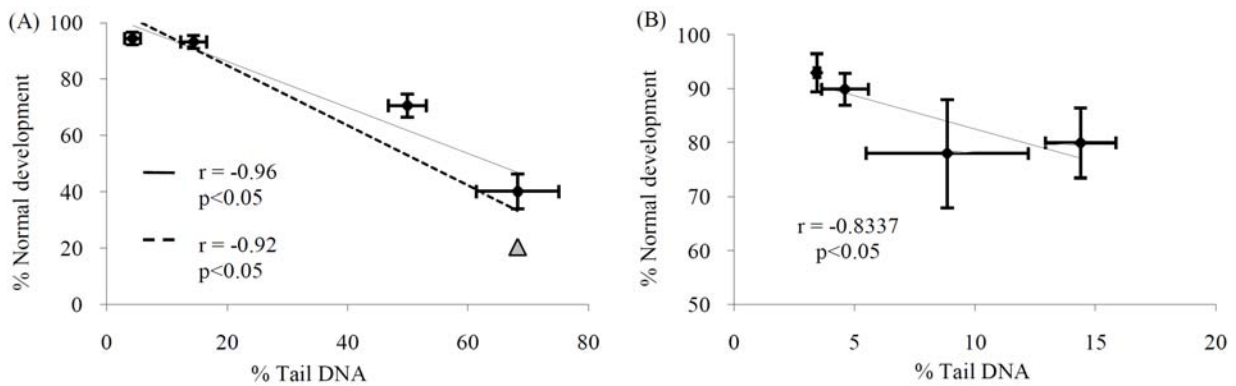


Figure 9: Linking DNA damage in spermatozoa of *G. fossarum* with the resulting percentage of abnormal development observed in 21 days-old embryos after MMS (A) and K₂Cr₂O₇ (B) exposure. The grey triangle corresponds to the recalculated percentage of abnormalities based on the number of control embryos.

Chapitre IV

4. Validation et application du biomarqueur

Le chapitre IV de ce travail regroupe l'ensemble des travaux relatifs à la validation et à l'application du biomarqueur au milieu naturel.

La première partie de ce chapitre (IV.1) a pour objectif de valider notre biomarqueur pour évaluer *in situ*, par le biais d'encagement, un risque environnemental. Dans un premier temps la spermatogénèse a été rapidement décrite, afin de mieux connaître la physiologie de la reproduction mâle de notre organisme modèle (Note 2 : *Description de la spermatogénèse chez Gammarus fossarum*)

Pour valider le biomarqueur, un protocole standard a été défini. Dans un deuxième temps, l'influence de facteurs abiotiques, tels que la température et la conductivité, sur le niveau de base des dommages à l'ADN des spermatozoïdes a été évaluée au laboratoire. Enfin, un niveau de référence, c'est-à-dire un niveau de dommages à l'ADN basal dans les spermatozoïdes de mâles en précopula a été calculé par un suivi mensuel de populations autochtones prélevées dans des sites non contaminés pendant un an. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dont l'objectif était de définir comment éviter une interprétation erronée du biomarqueur (Publication 3 : « *How to avoid the misinterpretation of Comet assay in Gammarus fossarum sperm as a biomarker of genotoxic pressure: intrinsic variability and reference level* »).

Dans la deuxième partie de ce chapitre (IV.2), la pertinence du biomarqueur, dans des contextes de contaminations contrastés a été étudiée. Des expositions réalistes d'organismes engagés, à trois grandes familles de contaminants ont été réalisées. Dans la Note 3, les gammarus

ont été exposés à deux pesticides viticoles en mélange (Note 3 : *Evaluation du risque génotoxique de pesticides viticoles sur l'amphipode d'eau douce G.fossarum : étude en mésocosme*). D'autre part, les organismes ont été exposés à des effluents de stations d'épuration, connus comme étant les principales sources de génotoxiques dans le milieu naturel. Enfin, l'impact d'une contamination polymétallique dans un bassin versant fortement contaminé au cadmium a été suivi pendant deux ans. Les résultats de ces expérimentations sont présentés dans la publication 4 intitulée « *DNA damage in caged Gammarus fossarum amphipods: a tool for freshwater quality assessment* ».

4.1. Validation du biomarqueur : variabilité naturelle et niveau de base

4.1.1. Note 2 : Description de la spermatogenèse chez *G.fossarum*

Résumé

Nous avons cherché à caractériser le statut reproducteur d'un mâle *Gammarus fossarum*. Pour cela, la spermatogenèse a été brièvement décrite par trois approches : par des observations au microscope électronique à balayage du contenu de la gonade de mâles venant de se reproduire et de mâles en précopula, par le suivi quotidien de la production de spermatozoïdes d'un mâle en cours de spermatogenèse et par des observations histologiques des gonades. Cette étude confirme qu'il est possible de distinguer les spermatides des spermatozoïdes par la morphologie caractéristique de leur noyau. De plus, le statut reproducteur d'un organisme influence fortement la quantité totale de spermatozoïdes, qui est maximale environ 7 jours après la reproduction. Cette quantité est alors similaire à celle d'un mâle en précopula. Il convient donc de choisir un mâle en précopula pour sélectionner un mâle mature, en fin de spermatogenèse.

Mots clés

Spermatozoïdes ; *G. fossarum* ; Morphologie ; Spermatogenèse

Description de la spermatogenèse chez *Gammarus fossarum*

Introduction

Dans la publication 3 « *How to avoid the misinterpretation of Comet assay in Gammarus fossarum sperm as a biomarker of genotoxic impact: intrinsic variability and reference level* » nous avons proposé un protocole standard de mesure des dommages à l'ADN sur spermatozoïdes par le test Comet. Pour cela, le statut reproducteur auquel il convient d'exposer les organismes a été étudié, afin de limiter la variabilité de la réponse, et que celle-ci soit la plus intégrative possible.

Le cycle de reproduction du gammare mâle étant très peu documenté, il nous est apparu important d'apporter des informations préliminaires concernant la cinétique de la spermatogenèse chez *G. fossarum*, afin de pouvoir discriminer un organisme en fin de spermatogenèse, d'un organisme en début de spermatogenèse.

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, de longueur et de volume très variable (Chevaillier, 1967 ; Koch et Lambert, 1990). Les spermatozoïdes d'amphipode ont été décrits comme filamenteux, aflagellés, mais possédant un appendice appelé hampe ou queue qui est une extension de la membrane plasmique. Leur noyau est généralement fin et allongé (Reger, 1966). Deux types cellulaires pseudo-flagellés sont retrouvés majoritairement dans la vésicule séminale : les spermatides et les spermatozoïdes. Au cours de la spermiogenèse, les spermatides subissent de fortes modifications morphologiques, dont une perte du cytoplasme et un remodelage important de la chromatine nucléaire par la condensation du matériel génétique, pouvant se traduire par l'élongation du noyau (Chevaillier, 1967).

L'objectif de cette note est de décrire la spermatogenèse chez *Gammarus fossarum* et de proposer des critères de sélection d'un mâle mature et d'un mâle en cours de spermatogenèse.

Pour cela, trois approches ont été appliquées :

- Par l'observation de la structure des deux types cellulaires pseudo-flagellés contenus dans la gonade de mâle venant de se reproduire et de mâle en précopula, en microscopie à balayage.
- Par la description de l'évolution du contenu de la gonade au cours de la spermatogenèse, en évaluant la proportion de ces deux types cellulaires au cours du temps.
- Par l'observation histologique des gonades de mâles venant de se reproduire et 7 jours après la reproduction.

Matériel et méthode

- L'observation de suspensions cellulaires de gonades, prélevées sur des mâles venant de se reproduire et des mâles en précopula, a été réalisée par microscopie électronique à balayage en configuration wet-STEM (wet Scanning Transmission Electronic Microscopy), dont les échantillons sont maintenus en pression réduite de vapeur d'eau.
- La deuxième méthode a consisté à dénombrer quotidiennement le contenu des gonades juste après la reproduction et pendant 7 jours. Pour cela, des mâles en précopula, maintenus à 12°C, ont été isolés et tous les jours après qu'ils se soient reproduits, le contenu de leur gonade est récupéré dans 20 µl de PBS et observé en microscopie à épifluorescence après marquage des noyaux au fluorochrome Syto[®] 9. Lors du comptage cellulaire, les spermatozoïdes sont discriminés des spermatides sur la base des critères morphologiques décrits dans la littérature et suite à nos propres observations en microscopie à balayage.
- Afin de vérifier nos observations, des coupes histologiques réalisées selon la procédure décrite au chapitre II.2.4.2 ont été réalisées sur des mâles venant de se reproduire et 7 jours après la reproduction.

Résultats et discussion

• Observation microscopique

La figure 1 illustre la différence de morphologie entre spermatozoïdes matures issus de mâles en précopula, et spermatozoïdes immatures ou spermatides issus d'un mâle venant de se reproduire. Il est important de souligner que les spermatides possèdent bien un pseudo-flagelle, ce qui les distingue des autres types cellulaires contenus dans la gonade. Comme décrit dans la littérature, la forme du noyau des spermatozoïdes est oblongue, alors que les spermatides ont un noyau ovoïde.

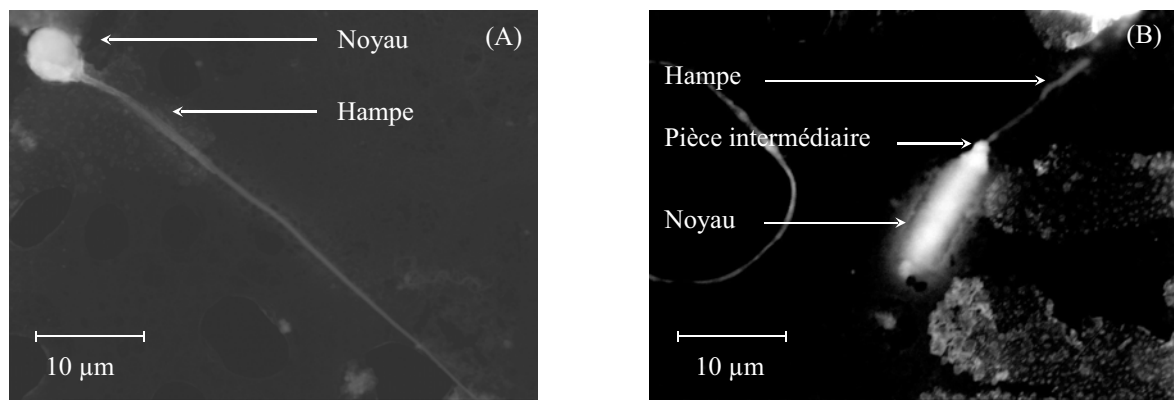


Figure 1 : Micrographies de spermatide (A) et de spermatozoïde (B) en microscopie électronique à balayage utilisé en mode wet-STEM (x 2022).

• Numération des spermatozoïdes

La figure 2 montre l'évolution quotidienne du nombre de spermatozoïdes et de spermatides contenus dans les gonades de mâles venant de se reproduire. Le jour J-1 correspond au contenu des gonades de mâles en précopula. On constate que 2 jours après la reproduction, seul le nombre de spermatozoïdes augmente, alors que le nombre de spermatides reste constant. Cela renforce l'hypothèse que les cellules au noyau oblong sont bien des spermatozoïdes. Il y a donc en permanence dans la gonade une production continue de spermatides à partir des spermatocytes et une accumulation des spermatozoïdes, jusqu'à une quantité maximale. La quantité de spermatides, après un maximum le jour suivant la reproduction, diminue constamment jusqu'au jour 7. Au jour 7, la quantité de spermatozoïdes est maximale et similaire

au nombre de spermatozoïdes de mâles en précopula. On peut donc évaluer la durée de la spermatogenèse chez *Gammarus fossarum* à environ 7 jours à 12°C.

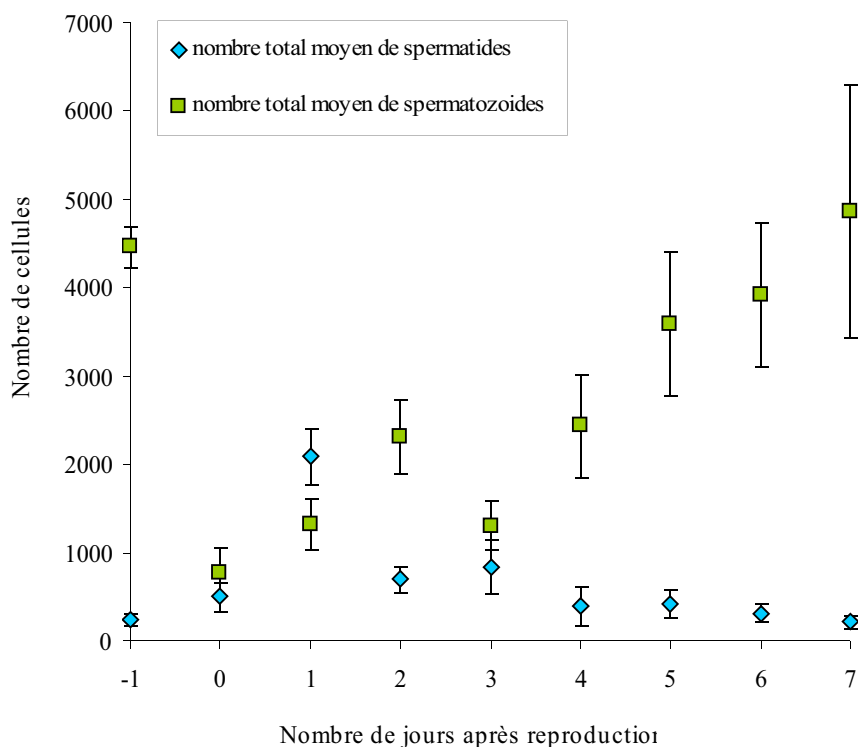


Figure 2 : Nombre de spermatozoïdes et de spermatides contenu dans la gonade en fonction du nombre de jour après reproduction (J-1 : mâles en précopula). N=10.

Le nombre total de cellules pseudo-flagellées (spermatozoïdes + spermatides) par gonade est d'environ 5000. Il a été démontré que la taille des mâles n'influçait pas la quantité de spermatozoïdes chez *Gammarus pulex* (Lemaître et al., 2009). C'est pourquoi dans cette étude, cette quantité n'a pas été normalisée par la taille des organismes. Dunn et al. (2006) ont également démontré que la quantité de spermatozoïdes n'était pas influçée par le poids des organismes chez *Gammarus duebeni*. Lemaître et al. (2009) soulignent en revanche que le statut reproducteur du mâle influence très fortement la quantité de gamètes ($p < 0.0001$), comme le confirment nos résultats. Chez les mâles *Gammarus pulex* en précopula, le nombre total de gamètes est d'environ 10000 par organisme (Lemaître et al., 2009), alors qu'il d'environ 40000 chez *Gammarus duebeni*. Il convient de souligner que ces dénombrements ont été réalisés à partir du nombre de pseudo-flagelles (ou hampe). Or nous avons constaté que les spermatozoïdes peuvent être polyfilamenteux, c'est à dire avec deux pseudo-flagelles. Cette méthode de dénombrement pourrait être une source de surestimation de la quantité totale de gamètes.

La spermiogénèse a lieu rapidement puisque le rapport entre le nombre de spermatozoïdes et le nombre total de cellules pseudo-flagellées est proche de 1 au bout de 4 jours seulement (Figure 3).

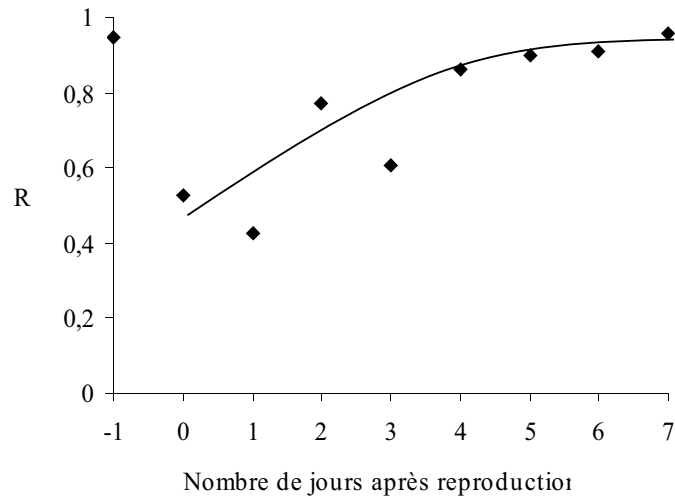


Figure 3 : R = rapport entre le nombre de spermatozoïdes par gonade et le nombre de cellules pseudo-flagellées (spermatozoïdes + spermatides) en fonction du nombre de jours post reproduction.

Le fait que le rapport R ne soit jamais inférieur à 0,4 indique que le mâle n'alloue jamais toute la réserve de spermatozoïdes lors de la fécondation. Lemaître et al. (2009) ont reporté un ratio similaire entre les mâles venant de se reproduire et les mâles en précopula. Les auteurs ont en effet calculé un investissement d'environ 60% de la réserve totale de spermatozoïdes lors de la fécondation.

• Observation histologique des gonades mâles

La figure 4 est une coupe longitudinale de gammare mâle observé immédiatement après la reproduction. La gonade apparaît très fine, vide de spermatozoïdes. La figure 5 est une coupe longitudinale de gonade de gammare mâle, 7 jours après la reproduction. La vésicule séminale contient une grande quantité de spermatozoïdes matures dont le noyau est clairement allongé.

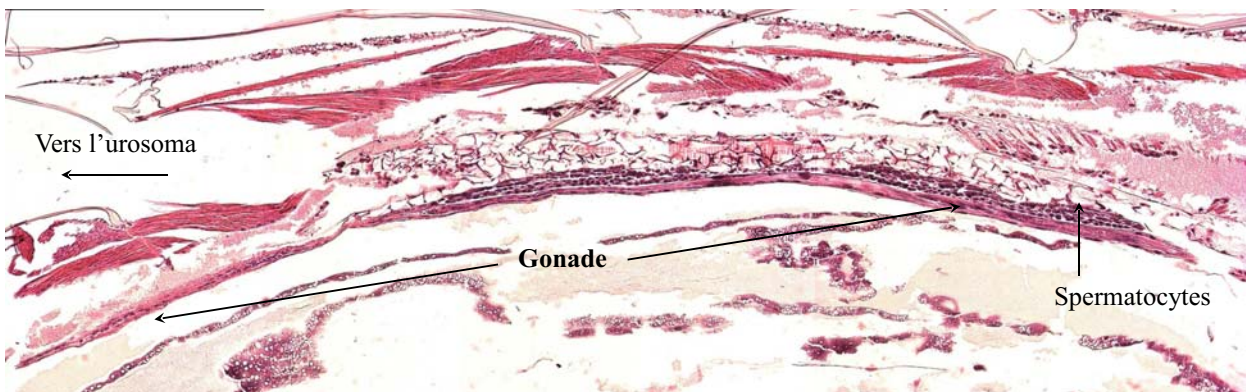


Figure 4 : Coupe histologique longitudinale de gammare mâle, juste après la reproduction : gonade entière (x 50).

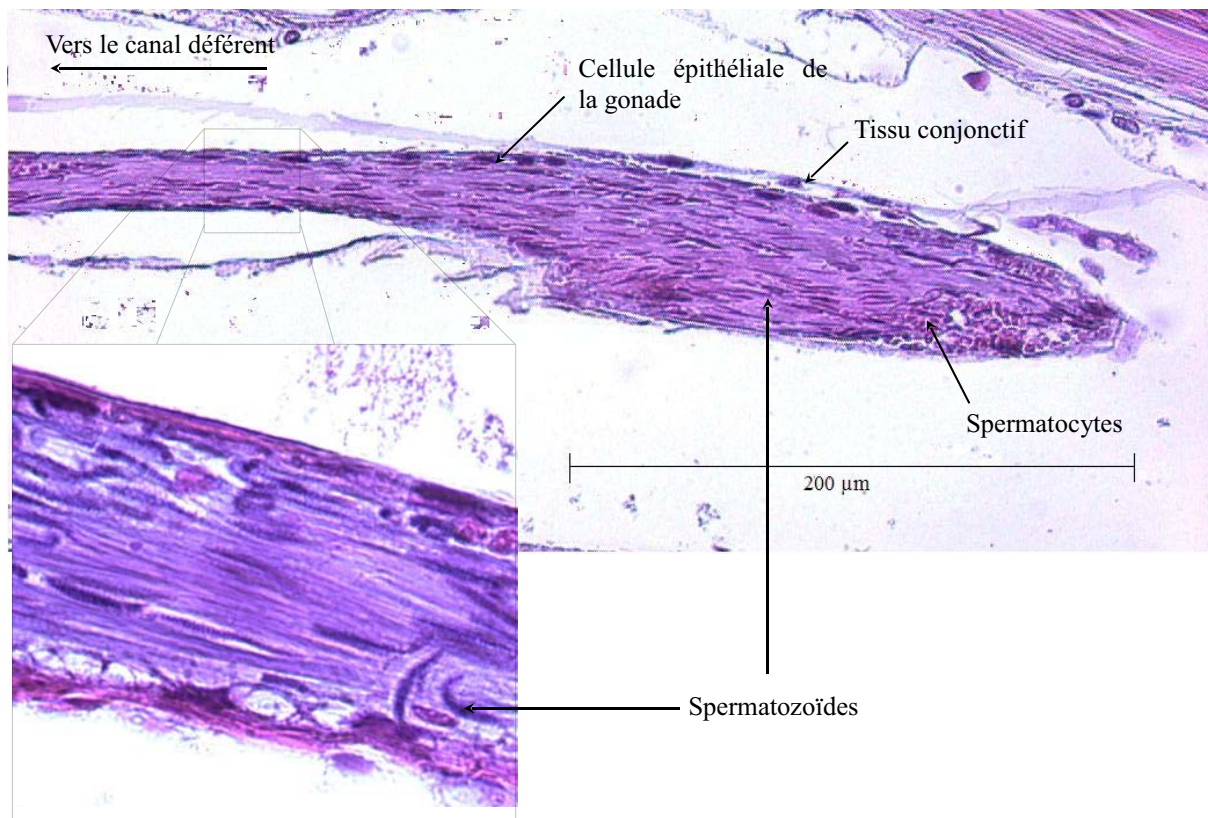


Figure 5 : Coupe histologique longitudinale de gammare mâle, 7 jours après la reproduction : vésicule séminale (x 200) et détail (x1000)

La figure 6 est une coupe transversale de gammare mâle, 7 jours après la reproduction. Les papilles génitales, décrites chez *Gammarus fasciatus* et *Gammarus lacustris lacustris* comme des extensions du tégument composées de tissus non vivants (Schmitz, 1992) sont ici remplies de

spermatozoïdes. Bousfield (1973) a montré que les spermatozoïdes matures sont éjaculés des papilles génitales au cours du précopula. La présence de spermatozoïdes dans les papilles génitales de mâles observés 7 jours après la reproduction confirme qu'ils peuvent se reproduire de nouveau.

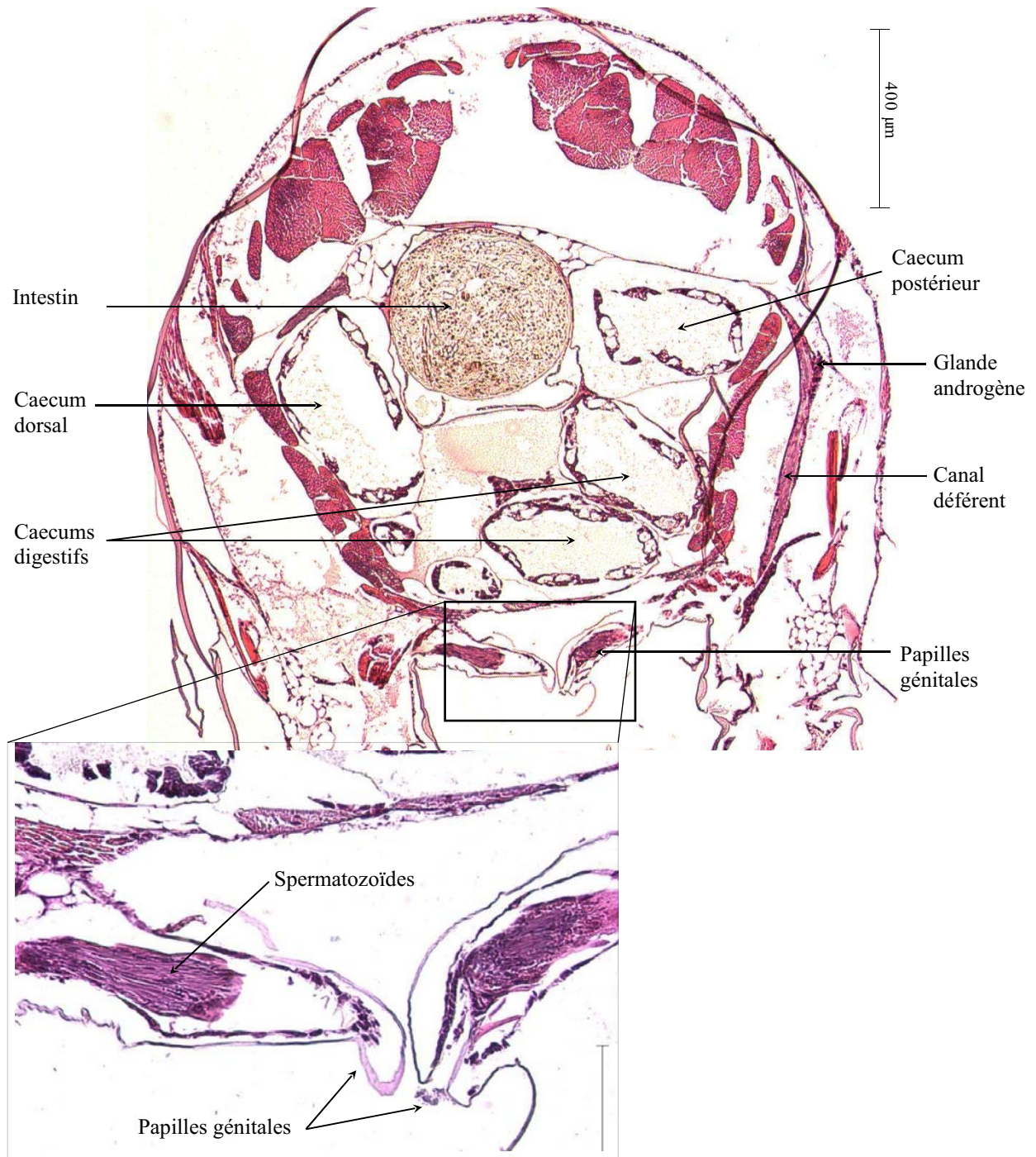


Figure 6 : Coupe histologique transversale de gammare mâle, 7 jours après la reproduction : papilles génitales, canal déférent (x 50) et détail des papilles génitales (x 200)

Conclusion

Cette note décrit brièvement la spermatogenèse chez *Gammarus fossarum*. La durée de maturation d'un mâle venant de se reproduire est d'environ 7 jours. Pour choisir un mâle mature, il convient de sélectionner un mâle dont la quantité de spermatozoïdes dans les gonades est maximale, c'est-à-dire, un mâle en précopula. Au cours de la spermiogenèse, les spermatides subissent des modifications morphologiques, jusqu'à former les spermatozoïdes dont le noyau oblong est une caractéristique intrinsèque de leur état de maturité.

Référence

- Bousfield E.L. (1973) Shallow-water gammaridean Amphipoda of New England, Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Chevallier P. (1967) Mise en évidence et étude cytochimique d'une protéine basique extranucléaire dans les spermatozoïdes des crustacés décapodes, *Journal of cell biology*, 32(3) p : 547-556.
- Dunn A.M., Andrews T., Ingrey H., Riley J., Wedell N. (2006) Strategic sperm allocation under parasitic sex-ratio distortion, *Biological Letter*, 2 p : 78-80.
- Koch R.A. et 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 p: 115-154.
- Lemaître J.F., Rigaud T., Cornet S., Bollache L. (2009) Sperm depletion, male behaviour and reproductive "time-out" in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda), *Animal Behaviour*, 77 p: 49-54
- Reger J.F. (1966) A comparative study on the fine structure of developing spermatozoa in the isopod *Oniscus asellus* and the amphipod *Orchestoidea* sp., *Zeitschrift für Zellforschung*, 75 p: 579-590.
- Schmitz E.H. (1992) Amphipoda. In Harrison F.W. & Humes A.G. (eds.), *Microscopic anatomy of invertebrates*, vol. 9 : Crustacea. John Wiley and Son, New York, 443-529.

4.1.2. Publication 3 : How to avoid the misinterpretation of DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure: intrinsic variability and reference level

Résumé

L'utilisation appropriée d'un biomarqueur nécessite une bonne connaissance du niveau de base de la réponse du biomarqueur ainsi que de sa variabilité naturelle, liée aux facteurs environnementaux biotiques et abiotiques. Afin de proposer un biomarqueur de génotoxicité sensible et fiable sur une espèce d'intérêt écologique, le test Comet a été développé sur les spermatozoïdes d'un amphipode *Gammarus fossarum*. Dans le but d'utiliser cet outil dans des études de biomonitoring ou pour l'évaluation du risque environnemental, nous avons proposé un protocole standard pour lequel la variabilité engendrée par des facteurs méthodologiques tels que la durée d'exposition et des facteurs biotiques comme le statut reproducteur est minimale. Ensuite, un niveau basal de référence a été établi, en tenant compte de la variabilité spatio-temporelle du milieu naturel. Le statut reproducteur et la durée d'exposition ont des impacts forts sur la réponse du biomarqueur. Un organisme standard (un mâle en précopula) et une durée d'exposition ont donc été choisis. Au laboratoire, aucun effet de la température ni de la conductivité n'est relevé sur le niveau de base des dommages à l'ADN. De même, aucune variabilité relative au changement saisonnier ou liée aux caractéristiques physico-chimiques des sites de prélèvements n'est significative. Suite à ces résultats, un niveau de référence et un seuil de dommages ont été établis pour l'organisme standard.

Mots clés

Test Comet ; *Gammarus fossarum* ; spermatozoïdes, variabilité intrinsèque, niveau de base

How to avoid the misinterpretation of DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure: intrinsic variability and reference level

Emilie Lacaze^{1,2}, Alain Devaux¹, Guillaume Jubeaux², Raphaël Mons², Hervé Quéau², Maud Gardette¹, Sylvie Bony¹, Jeanne Garric², Olivier Geffard²

¹Université de Lyon, ENTPE-INRA, Laboratoire des Sciences de l'Environnement, rue Maurice Audin, Vaulx en Velin, F-69518, France

²Cemagref, MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3 bis quai Chauveau, 69336 Lyon, Cedex 9, France.

Abstract

In the perspective of a biomonitoring application for assessing genotoxicity of freshwater ecosystems, the Comet assay has recently been developed on spermatozoa in the amphipod *Gammarus fossarum*, in order to propose a sensitive and reliable genotoxicity biomarker in an ecologically relevant freshwater species. The appropriate use of a genotoxicity biomarker requires good knowledge of its basal level and its natural variability related to intrinsic biotic and environmental abiotic factors. We propose a procedure for which the lowest biomarker variability related to methodological (exposure time duration) and intrinsic biotic factors (reproductive status) is obtained and reference values of biomarker basal response taking into account its spatiotemporal changes has been defined. A strong impact of spermatogenesis status and exposure time on the response to genotoxicant pressure was observed. These reports led us to select a standard organism, i.e., the mature male gammarid in precopula. No effect of temperature and conductivity on baseline DNA damage was observed in the laboratory for the tested range (6–24°C and 300/600 $\mu\text{S cm}^{-1}$). Similarly, no spatiotemporal change relative to season or the physicochemical characteristics of the water was recorded during the field survey. On the basis of these results, a reference level with maximal threshold values has been proposed for the standard gammarid.

Key words: Comet assay, *G. fossarum*, spermatozoa, intrinsic variability, reference value

1. Introduction

It is a well-established fact that mutagenic and genotoxic compounds, whether known or unknown, can have adverse health effects on humans and indigenous biota [1]. The need to evaluate the potential impact of genetic damage in wild species has only been on the forefront for the last two decades [2]. Once the field of aquatic ecotoxicology had taken interest in studying genetic damage, the Comet assay became one of the most popular tests for detecting strand breaks in aquatic animals [3]. The Comet assay has been increasingly applied for 15 years to species used in biomonitoring or developed for a wide range of ecologically relevant organisms to assess genotoxicity potential in the laboratory and in the field [4]. It has proven to be a sensitive tool and a large number of studies, using varied test organisms such as bivalves, amphibians and fish, have reported that the Comet assay is the most sensitive when compared with other biomarkers commonly used in genotoxicology such as the micronucleus test [5-9].

Invertebrates make up more than 90% of extant animals and play a major role in ecosystem functioning. Although genotoxicity biomarkers have been developed in many marine invertebrates, there has been less attention paid to the freshwater invertebrates, in particular to the crustacean, even though they occupy key ecological niches. Among freshwater species, crustacean amphipods are suitable organisms for ecotoxicological assessment of environmental pollutants [10]. Gammarids are ecologically relevant species since they are an important reserve of food for macroinvertebrate, fish, bird, and amphibian species and play a major role in leaf litter breakdown processes [11, 12]. In order to assess a sensitive and reliable genotoxicity biomarker in this ecologically relevant freshwater species, the Comet assay has recently been developed on spermatozoa in the amphipod *Gammarus fossarum* [13].

Genotoxicity biomarkers are considered integrative tools, able to provide complementary information to chemical and ecological analyses used for field monitoring. However, DNA damage may arise as a result of processes unrelated to mutagen exposure. Several authors have demonstrated that biotic and abiotic factors can affect the basal level of DNA damage [14], [15, 16]. For example, temperature and salinity are known to cause DNA damage [17]. Furthermore, in the aquatic environment, seasonal variations have sometimes been linked to DNA damage variability [18, 19]. Hence, identifying the biological factors (e.g., age, life stages, sex, reproductive stage, interindividual variability) in addition to physicochemical factors (e.g., temperature, pH, conductivity, etc.) influencing the outcome of the assay, is important to yield

reproducible and reliable results for environmental hazard and risk assessment [2]. Overall, these confounding factors contribute to misinterpreting the biomarker responses and have slowed down the use of biomarkers in environmental risk assessment [20]. To avoid the misinterpretation of the biomarker response, a robust baseline has to be defined, based on laboratory and field studies and taking into account biotic and abiotic factors. The establishment of a baseline accepted as the reference value would improve the classical approach to field studies based on upstream-downstream comparisons, for which noncontaminated sites exhibiting similar hydrogeological characteristics are not always available [21].

In the perspective of field biomonitoring dedicated to genotoxicity assessment of freshwater ecosystems, it is therefore essential to (i) develop a procedure for which the lowest biomarker variability related to methodological and intrinsic biotic factors is obtained and (ii) define reference values of the biomarker's basal response taking into account its spatiotemporal changes. The objectives of the present study were first to choose a standard procedure taking into account the influence of biotic and methodological factors, such as the impact of spermatogenesis stage and exposure time on *G. fossarum* spermatozoa response to genotoxicant pressure in the laboratory, and second to establish a baseline level of DNA damage in amphipod spermatozoa taking into account its natural variability. In this perspective, two complementary approaches were investigated. The first one was undertaken on wild *G. fossarum* populations in unpolluted sites in order to gather information on the seasonal variations and the natural background levels of DNA damage in spermatozoa and interindividual variability. The second one was conducted in the laboratory to explore the influence of two abiotic factors (water temperature and conductivity).

2. Materials and methods

2.1 Animal collection and maintenance

Amphipods used for laboratory experiments were collected from La Tour du Pin, a known unpolluted upstream part of the Bourbre River (Isère, France). Sexually mature *G. fossarum* were collected using a hand-held net. The gammarids collected were sieved (2–2.5 mm) to separate juveniles and adults and quickly brought to the laboratory where they were transferred in 30-L aquarium tanks, which were supplied with aerated uncontaminated groundwater with a

conductivity equivalent to the river water conductivity ($600 \mu\text{S cm}^{-1}$). The gammarids were kept 15 days at $12 \pm 0.5^\circ\text{C}$, using a 16/8 h light/dark cycle, continuously supplied with aerated uncontaminated groundwater before being used for experiments. They were fed *ad libitum* on alder leaves (*Alnus glutinosa*) and received dried tubifex worms as a complementary food resource.

2.2. Chemicals

Methyl methanesulfonate (MMS) [CAS number 66-27-3] and all other analytical grade reagents were supplied by Sigma-Aldrich Chemicals (France).

2.3 Comet assay procedure

Spermatozoa were collected by microdissection from mature male gammarids in precopula as described in a previous study [13]. Cells were kept in 20 μL of fresh PBS maintained on ice before being used for the Comet assay. All cell samples were checked for cell viability prior to use. Viability was expressed as the percentage of viable cells measured with LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Invitrogen Life Technologies). Only cell suspensions exhibiting viability greater than 90% were used.

At the end of the exposure, the gammarids were sacrificed for the Comet assay procedure. The alkaline version of this technique ($\text{pH} > 13$) was applied. After cell collection, 20 μL of 1% low-melting-point agarose in PBS (37°C) were mixed with an equal volume of cell suspension and were deposited on precoated slides (agarose 0.8%). Slides were cooled for 5 min at 4°C for agarose polymerization and were then placed in a freshly prepared lysing solution at 4°C (2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10) in the dark. After lysis (18 h), slides were placed in a horizontal electrophoresis tank filled with chilled buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13) where DNA unwound for 40 min. Electrophoresis was performed under 0.66 V cm^{-1} and 300 mA for 24 min. After electrophoresis, the slides were washed (three times for 5 min) in a neutralization buffer (0.4 mM Tris-HCl, pH 7.5). Finally, the slides were dried in absolute ethanol. After staining with 0.05 mM ethidium bromide, 50 cells per slide were analyzed with the Comet IV image analysis system (Perspective

Instruments Ltd, UK). The percentage of DNA in the comet tail (% tail DNA) was chosen as the most reliable and meaningful comet measurement.

2.4 Proposal for a standard procedure using a model genotoxicant

In this part of the study, methyl methanesulfonate (MMS) was chosen as a direct acting genotoxin that induces DNA damage via methylation with no production of reactive oxygen species (ROS).

2.4.1 Importance of the spermatogenesis stage

The experiment was conducted with male gammarids chosen during spermatogenesis and mature males, i.e., at the end of spermatogenesis, to assess how the response to genotoxicants was affected by the spermatogenesis stage. Adult male in precopula were selected as mature males, i.e., at the end of spermatogenesis. Males at the beginning of spermatogenesis and mature males were exposed for 7 days to MMS (0, 0.8, 2.4, 7 and 22 mg L⁻¹) to study the dose–response relationship in spermatozoa collected from males exhibiting two different degrees of maturity. Seven days of exposure allows spermatogenesis to be completed. Three replicates of eight male gammarids were placed in glass flasks containing 500 mL of each test solution and media were renewed daily. During the exposure time, the physicochemical parameters were as follows: conductivity, 615 ± 30 μS cm⁻¹; temperature, 12.0 ± 0.2°C. At the end of exposure, two living organisms (among the eight) from each glass flask were sacrificed and spermatozoa were immediately collected for assessing DNA damage.

2.4.2 Influence of exposure time

Adult gammarids in precopula pairs with an average body length of 9±1 mm were selected in order to choose mature and same age-ranked organisms to be exposed to the genotoxicant. Male gammarids were exposed 21 days to MMS (0, 0.8, 2.4, 7 mg L⁻¹). In order to determine the influence of exposure time on (i) the biomarker response within control conditions and (ii) the response profile to genotoxicant pressure, males were sacrificed to perform the Comet assay after 2, 4, 7, 15 and 21 days of exposure. Three replicates of 12 male gammarids were placed in

glass flasks containing 500 mL of each test solution and media were renewed daily. During the exposure time, temperature was maintained at $12.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ and conductivity at $590 \pm 40 \mu\text{S cm}^{-1}$. At the end of each exposure time, a pool of six gammarids was sacrificed.

2.5 Natural variability of *G. fossarum* baseline DNA damage

2.5.1 Spatiotemporal variability of the baseline DNA damage

The field survey of DNA damage levels in male *G. fossarum* in precopula was carried out over 12 months (January to December 2009) in order to set seasonal reference levels and the range of natural variability in a population living under the typical environmental constraints of French streams. The two catchment areas, the Bourbre River and the Ardière River, have identical temperature profiles with strong variations throughout the year, but differ in their water conductivity (600 and $120 \mu\text{S cm}^{-1}$, respectively). Gammarids were collected in the upstream part of the Bourbre River at La Tour du Pin (eastern France, longitude: $05^\circ27'34''\text{E}$, latitude: $45^\circ27'34''\text{N}$) and in the upstream part of the Ardière River at Les Ardillats (eastern France, longitude: $04^\circ31'13''\text{E}$, latitude: $46^\circ11'10''\text{N}$). The sites studied are located in areas without urban and industrial input, and good chemical and ecological water quality according to RNB French Watershed Bio-monitoring Network was recorded for both stations (analysis of the Standardized Global Biological Index; 94 NF T 90-350). Every month, 15 male gammarids in precopula with homogeneous size were selected at each site. It was not possible to assess DNA damage at the Bourbre River site in February and May because no precopula pairs were collected. Water temperature, conductivity, pH and concentrations of Ca^{2+} and HCO_3^- were recorded monthly (Table 1).

2.5.1 Influence of temperature and conductivity

The influence on DNA damage level in *G. fossarum* sperm of two major environmental factors, temperature and conductivity, was tested. In the first experiment, the gammarids were kept for 15 days in clean water at four different temperatures to assess how the DNA damage baseline was affected by temperature. The first experiment was conducted in the laboratory using

a thermostatic water bath. Mature males were exposed in glass beakers for 15 days at 6, 12, 18 and 24°C, corresponding to temperatures encountered during the year in the Ardière and the Bourbre Rivers, and in Rhône-Alpes region's rivers housing gammarids in general. Beakers were supplied with aerated uncontaminated groundwater with a conductivity of 600 $\mu\text{S cm}^{-1}$. In the second experiment, conducted at 12°C, the batches of organisms were kept 15 days in glass beakers continuously supplied with aerated uncontaminated groundwater with a conductivity of $600 \pm 15 \mu\text{S cm}^{-1}$ or a conductivity of $300 \pm 10 \mu\text{S cm}^{-1}$ obtained by mixing groundwater and deionized water. After 1 and 15 days of exposure, a pool of six gammarids per condition was sampled and sacrificed to assess DNA damage.

2.6 Statistical analysis

All results are expressed as the mean \pm standard deviation. Statistical analysis was performed using the Statistica 8.0 software (StatSoft Inc). Since the distribution of DNA damage measured by the Comet assay did not follow a Gaussian distribution, both Kruskal-Wallis and Mann-Whitney nonparametric tests were used for data analysis. For field data analysis, minimum and maximum reference thresholds of DNA damage were constructed on the basis of the variation range of the data collected from the two pristine stations, as the 95% confidence interval (95% CI) of monthly means.

3. Results

3.1 Proposal for a standard procedure using a model genotoxicant

3.1.1 Influence of the spermatogenesis stage

Figure 1 shows the DNA damage expressed as the percentage of tail DNA in spermatozoa from two batches of male gammarids exposed for 7 days to MMS. The first batch contained males exposed during spermatogenesis and the second one mature males. No significant impact of the maturity of sperm on the basal level of DNA damage was observed. In both controls, basal level values were very low (1.2 and 1.9% tail DNA). In males exposed during spermatogenesis and in mature males, a significant dose–response relationship was observed ($p < 0.05$, $r = 0.927$ and

$r=0.879$, respectively). After MMS exposure, significantly higher DNA damage was recorded in spermatozoa collected in mature males. DNA damage measured in spermatozoa from mature males was 4.8 ($p=0.029$), 2.7 ($p=0.012$) and 2.2 ($p=0.043$) times greater than the DNA damage in spermatozoa from males exposed during spermatogenesis for MMS concentration of 2.4, 7 and 22 mg L⁻¹, respectively. A smaller interindividual variability was obtained in males exposed at maturity instead of males exposed during spermatogenesis.

3.1.2 Influence of the exposure time

Figure 2 shows the time and dose response to MMS of mature male gammarids, measured as the percentage DNA in the comet tail. No significant difference between baseline DNA damage was observed at the different exposure times ($p=0.31$). Significant and dose-dependent DNA damage values were observed on days 2, 4 and 7 ($p=0.007$, $p=0.02$ and $p=0.035$, respectively). After 15 days and 21 days of exposure, no relationship between dose and DNA damage was observed, as % tail DNA reached a plateau from the lowest MMS concentration (0.8 mg L⁻¹). DNA damage clearly increases with time in *G. fossarum* exposed to MMS.

3.2 Natural variability of *G. fossarum* baseline DNA damage

3.2.1 Spatiotemporal variability of the baseline DNA damage

Figure 3 presents the DNA damage measured in two *G. fossarum* populations studied from January 2009 to January 2010. DNA damage measured in gammarids throughout the year did not present a seasonal variability trend except during the warmest month. The annual means (average of monthly means) recorded on the Bourbre and the Ardière Rivers ($3.5 \pm 0.5\%$ and $2.8 \pm 1.0\%$, respectively) were not significantly different (Student *t*-test, $p=0.12$). This result reveals that the watersheds show no impact, whereas they exhibit severe physicochemical differences (conductivity, hardness), as shown in Table 1. Since no spatial variations of DNA damage occurred, the mean value of DNA damage was calculated using data collected from both rivers, excluding the value measured in July on the Bourbre River. The mean baseline level was 3.1% and the 95% confidence intervals ranged from 2.6% to 3.5% tail DNA. The largest monthly variation was recorded in July in the gammarids collected at the Boubre River, which exhibit

significantly higher DNA damage than the reference value ($10.7 \pm 4.2\%$ versus 3.1% , $p=0.0006$). Except in July, all the monthly DNA damage values remained within the reference range (95% CI).

3.2.2 Influence of temperature and conductivity

Figure 4.A presents the DNA damage of gammarids kept at water temperatures ranging from 6 to 24°C for 1 or 15 days (conductivity = $600 \mu\text{S cm}^{-1}$). No significant differences were detected whatever the tested temperature after both 1 and 15 days of exposure ($p=0.12$ and $p=0.23$, respectively). Figure 4.B shows the influence of conductivity on the basal level of DNA damage in *G. fossarum*. There is a trend toward a slight increase in DNA damage after 15 days at $300 \mu\text{S cm}^{-1}$, but this increase is not significant ($p=0.11$). As no significant differences were observed, the calculation of the DNA damage reference level was based on the average of the two time point values (1 and 15 days) resulting from the two experiments. Finally, the baseline level varied in the low range of $2.8 \pm 1.2\%$, quite similar to that obtained in the field survey.

4. Discussion

Biomarkers used in environmental biomonitoring should ideally be affected only by contaminants. In reality, all biomarkers are influenced by variables such as temperature and pH and by the organism's intrinsic variables such as reproductive status, age and sex [2, 20, 23]. Therefore, knowledge of confounding factors and of the interindividual variability of the biomarker response may significantly improve biomarker interpretation [24]. The present study aimed to define a standard methodology for assessing genotoxicity using the Comet assay in *G. fossarum* spermatozoa and to determine a reference value and its variability in order to minimize the misinterpretation of this biomarker. Given that a lack of repair enzymes in spermatozoa make them more susceptible to accumulating DNA damage [25], and subsequently that the Comet assay performed on spermatozoa measures permanent DNA damage [26], assessment of sperm DNA damage could provide highly relevant information for biomonitoring and environmental risk assessment. The relevance of this measurement is enhanced by the fact that DNA damage in spermatozoa tends to have detrimental consequences on reproductive success, an important measure of long-term effects [27]. All these compelling arguments are consistent with a more

extensive use of the sperm Comet assay for environmental purposes, as suggested recently in several reviews [2, 28, 29]. However, many points need to be considered when applying the Comet assay.

4.1 Proposal for a standard procedure using a model genotoxicant

To choose the most sensitive individuals, their reproductive status has to be taken into account since the gametogenesis stage and reproductive status could affect the strength of DNA strand break induction by environmental agents. Akcha et al. (2004) [30] have shown that during the spawning period, the Comet assay revealed significant differences between sampling sites in dab erythrocytes, whereas these differences were not confirmed during the vitellogenesis period. Gorbi et al. (2008) [31] suggested that a higher frequency of micronucleus in mussels caged at both reference and contaminated sites during the winter were potentially associated with spawning events. In *G. fossarum*, Xuereb et al. (2009) [32] selected the male to measure the AChE activity in order to limit the variability related to reproductive status in females. However, although the influence of sex was taken into account, the influence of the reproductive status of males was not studied. In the present study, exposure of mature *G. fossarum* engendered a greater DNA damage response than exposure during spermatogenesis. Furthermore, exposure of males during spermatogenesis led to higher variability in the response than in mature males. Since the sensitive response and reduced variability were obtained with mature male gammarids, i.e., in precopula, we recommend choosing them as standard organisms. In gammarids, the reproductive cycle covers the entire year [33], meaning that standard organisms for genotoxicity biomonitoring are available throughout the year, contrary to seasonal reproducers such as bivalves and fish. Furthermore, identification of mature males is facilitated by the precopula pair forming and the ease with which females are distinguished at the last stage of reproduction, i.e., before oocytes are deposited (D2 female) [34].

Gammarids exposed to MMS showed increased DNA damage with increased exposure time and dose. Interestingly, in the controls, no drift of the DNA damage baseline was observed according to the exposure time, ensuring that laboratory maintenance and exposure conditions were not responsible for additive stress. In fathead minnow, handling stress in negative controls (without chemical exposure) for 7, 14 and 21 days was related to a significant increase in micronuclei frequency in erythrocytes according to time [35]. The detrimental effects of

laboratory maintenance conditions shown by Menezes et al. (2006) [36] on several biomarker responses on the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. also proved the importance of such studies for better knowledge of the role played by the toxic effect ascribable to the chemical. There was a continuous increase in DNA damage over time until a maximum value was reached. This profile of DNA damage strengthens the hypothesis that spermatozoa are devoid of DNA repair capacity and that the damage measured was not transient damage, which are more critical lesions for the organisms than those that could be repaired [37]. These results validate the accuracy and the relevancy of spermatozoa as a standard cell type to assess DNA damage by the Comet assay.

4.2 Natural variability of *G. fossarum* baseline DNA damage

Since biomarkers should reflect adverse biological responses to anthropogenic contamination, it is necessary to be aware of natural temporal and spatial factors that could affect biomarker response. In the literature, a number of studies have shown the influence of seasonal and spatiotemporal variations on the DNA damage level. The study of response variability is a useful preliminary step in the development of a biomarker to determine a baseline level as the reference value.

In the present study, no difference in DNA damage levels was observed in male gammarids collected monthly for both the Ardière and the Bourbre Rivers, meaning that watershed hydrogeological characteristics have negligible influence on DNA damage and that no spatial variability was generated. This result is strengthened by the lack of conductivity effect on the DNA damage level after 1 and 15-day exposure, as demonstrated in laboratory.

Several authors have reported a significant seasonal variability with considerable variations of basal levels of DNA damage. For example, in dab and mussel, Akcha et al. (2004) and Pisanelli et al. (2009) [14, 38] observed the highest incidence of strand breaks during the coldest months. At the same time, higher DNA damage levels in summer have been reported in several species with different genotoxicity biomarkers (micronuclei frequency, DNA strand breaks measured by the elution rate or the Comet assay) [18, 39]. Therefore, the seasonal variability did not follow the same trend for all species, as also demonstrated by Bocchetti et al. (2008) [18], who found that during the summer clams exhibited the highest values of micronuclei frequency and mussels the lowest.

During our annual field survey, no significant seasonal variation in the *G. fossarum* DNA damage base level was shown, nor was a water temperature effect observed on DNA damage after 1 and 15 days in the laboratory. Nevertheless, it should be noted that during July, a significant increase in DNA damage was measured for the Bourbre River, with the level tripling compared to the mean annual value. Although in several studies high temperature was suggested as being responsible for an increase in the DNA damage baseline [15], [16, 40], the increase observed in summer in the Bourbre River could instead be related to a global stress. In July, both water temperature exceeding the optimal living temperature and minimal flow rates could be associated with an oxygen concentration decrease (24°C over 3 days in July and low water flow rate equal to $0.3 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ versus an average flow during the year equal to $2 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$). These extreme and atypical conditions for gammarids were also linked to a decrease in the adult population of gammarids (R. Coulaud, unpublished data). Deviations from the optimal living conditions of a species can be stressful, as shown in sea catfish *Netuma* sp. and in the mussel *Dreissena polymorpha*, where extreme temperatures of 37°C generated an increase in DNA damage, with damage frequency being about 20% tail DNA in sea catfish and three times higher at 37°C than at 4°C, and 1.7 times higher than at 18°C in mussel (which is the optimal living temperature for *D. polymorpha* [15], [16]).

Finally, genotoxicity assessment using the Comet assay should not be based only on absolute values of DNA integrity, but rather on its variation from the appropriate (i.e., seasonal) reference level. Developing a substantial background database with the normal range of biomarker responses is essential. Assuming that no seasonal effect on *G. fossarum* baseline DNA damage was observed and that no relationship was found between the DNA integrity and the physicochemical parameters (temperature, conductivity and flow rates), reference and threshold values were defined for a standard organism (male in precopula). The reference value was found to be 3.1% tail DNA and the maximal and minimal thresholds 2.6% and 3.5% tail DNA, respectively, corresponding to the 95% confidence intervals. This very low basal level is convenient for applying the Comet assay to assess genotoxicity in the field as suggested by Frenzilli et al. (2009) [4], who recommended the flatfish turbot as a better indicator species than clams for genotoxicity field experiments due to naturally lower levels of background DNA damage in this fish. Rank et al. (2005) [41] also defined very low levels of DNA damage in *Mytilus edulis* in a nonindustrialized coastal area taking into account seasonal variations and proposed this baseline as a reference level of DNA damage for *in situ* screening of genotoxic

marine sites. Caution is necessary when generalizing the reference value, however. For example, high variations in the baseline level of DNA damage on *M. edulis* hemocytes, one of the most extensively used invertebrates for the Comet assay – attributed by the authors to heterogeneity between sampling sites (or between animals provided by different hatcheries), laboratory acclimatization and exposure conditions, handling, transportation between the field sites and the laboratory – make it difficult to compare results and to propose a standard reference [42-44]. Given that *G. fossarum* baseline DNA damage was very low and did not seem to be influenced by conductivity and water temperature within the conditions tested, the capability of this tool to discriminate a genotoxic impact in the field was increased and this species was found particularly convenient for genotoxicity studies.

5. Conclusion

The aim of this study was to obtain a standard procedure to assess genotoxicity in *G. fossarum* by the Comet assay, taking into account biotic, abiotic and methodological factors. The sensitivity of mature *G. fossarum* and the accuracy of the spermatozoa DNA damage baseline have been proved. Seasonality and watershed hydrogeological characteristics have negligible impacts on the variability of DNA damage levels in this species, as confirmed by the temperature and conductivity laboratory experiments. Consequently, given the low level of baseline DNA damage and its low variability, we propose to define a reference control value (3%) and a threshold value (4%) beyond which the damage may be attributed to a contaminant exposure, for an accurate genotoxicity assessment and to avoid misinterpretation of the biomarker.

Acknowledgment

The present study was funded by the Cluster Environnement Région Rhône-Alpes. Claire Noël is gratefully acknowledged for her technical help in gammarid collection in the field, as is Romain Coulaud for the annual physicochemical parameter data of the Bourbre and the Ardère Rivers.

Reference

1. Dearfield, K.L., M. C. Cimino, N. E. McCarroll, I. Mauerc, L. R. Valcovic, *Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2002. **521**(1-2): p. 121-135.
2. Jha, A.N., *Ecotoxicological applications and significance of the comet assay*. Mutagenesis, 2008. **23**(3): p. 207-221.
3. Ohe, T., T. Watanabe, and K. Wakabayashi, *Mutagens in surface waters: A review*. Mutation Research - Reviews in Mutation Research, 2004. **567**(2-3 SPEC. ISS.): p. 109-149.
4. Frenzilli, G., M. Nigro, and B.P. Lyons, *The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2009. **681**(1): p. 80-92.
5. Bolognesi, C., A. Buschini, E. Branchi, P. Carboni, M. Furlini, A. Martino, M. Monteverde, P. Poli, C. Rossi, *Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants*. Science of the Total Environment, 2004. **333**(1-3): p. 127-136.
6. Kim, I.Y. and C.K. Hyun, *Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006. **64**(3): p. 288-297.
7. Villela, I.V., I. M. de Oliveira, J. da Silva, J. A. P. Henriques, *Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions*. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2007. **628**(2): p. 76-86.
8. Huang, D., Y. Zhang, Y. Wang, Z. Xie, W. Ji, *Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China*. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2007. **629**(2): p. 81-88.
9. Šrut, M., A. Štambuck, M. Pavlica, G. I. V. Klobučar., *Cage exposure of European sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) for in situ assessment of pollution-related genotoxicity*. Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju, 2010. **61**(1): p. 29-36.
10. Kunz, P.Y., C. Kienle, and A. Gerhardt, *Gammarus spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: Toward integrated multilevel tests*, in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2010. p. 1-76.

11. MacNeil, C., J.T.A. Dick, E. Bigsby, R.W. Elwood, *The validity of the Gammarus : Asellus ratio as an index of organic pollution: abiotic and biotic influences*. Water Research, 2002. **36**(1): p. 75-84.
12. Maltby, L., S. A. Clayton, R. M. Wood, N. McLoughlin, *Evaluation of the Gammarus pulex in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2002. **21**(2): p. 361-368.
13. Lacaze, E., O. Gefard, S. Bony, A. Devaux, *Genotoxicity assessment in the amphipod Gammarus fossarum by use of the alkaline Comet assay*. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2010. **700**(1-2): p. 32-38.
14. Akcha, F., G. Leday, and A. Pfohl-Leszkowicz, *Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (Limanda limanda) collected in the field: Effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage*. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2004. **552**(1-2): p. 197-207.
15. Buschini, A., P. Carboni, A. Martino, P. Poli, C. Rossi, *Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of Dreissena polymorpha*. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2003. **537**(1): p. 81-92.
16. Andrade, V.M., T.R.O. de Freitas, and J. da Silva, *Comet assay using mullet (Mugil sp.) and sea catfish (Netuma sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2004. **560**(1): p. 57-67.
17. Dixon, D.R., A. M. Pruski, L. R. J. Dixon, A. N. Jha, *Marine invertebrate ecogenotoxicology: A methodological overview*. Mutagenesis, 2002. **17**(6): p. 495-507.
18. Bocchetti, R., C. V. Lamberti, B. Pisanelli, E. M. Razzetti, C. Maggi, B. Catalano, G. Sesta, G. Martuccio, M. Gabellini, F. Regoli, *Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, Tapes philippinarum, and mussels, Mytilus galloprovincialis, from Adriatic sea*. Marine Environmental Research, 2008. **66**(1): p. 24-26.
19. Shaw, J.P., A.T. Large, J.K. Chipman, D.R. Livingstone, L.D. Peters, *Seasonal variation in mussel Mytilus edulis digestive gland cytochrome P4501A- and 2E-*

immunoidentified protein levels and DNA strand breaks (Comet assay). Marine Environmental Research, 2000. **50**(1-5): p. 405-409.

20. Sanchez, W., B. Piccini, J.M. Ditché, J.M. Porcher, *Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring*. Environment International, 2008. **34**(6): p. 791-798.

21. Flammarion, P. and J. Garric, *Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers : A relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker?* Chemosphere, 1997. **35**(10): p. 2375-2388.

23. Wiklund, A.K.E. and B. Sundelin, *Biomarker sensitivity to temperature and hypoxia - A seven year field study*. Marine Ecology Progress Series, 2004. **274**: p. 209-214.

24. Jemec, A., D. Drobne, T. Tišler, K. Sepčić, *Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species*. Environmental Science and Pollution Research, 2010. **17**(3): p. 571-581.

25. Aitken, R.J. and M.A. Baker, *Oxidative stress, sperm survival and fertility control*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2006. **250**(1-2): p. 66-69.

26. Lewis, C. and T. Galloway, *Genotoxic damage in polychaetes: A study of species and cell-type sensitivities*. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2008. **654**(1): p. 69-75.

27. Lewis, C. and T. Galloway, *Reproductive consequences of paternal genotoxin exposure in marine invertebrates*. Environmental Science and Technology, 2009. **43**(3): p. 928-933.

28. Speit, G., M. Vasquez, and A. Hartmann, *The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity*. Mutation Research - Reviews in Mutation Research, 2009. **681**(1): p. 3-12.

29. Villani, P., M. Spanò, F. Pacchierotti, M. Weimer, E. Cordelli, *Evaluation of a modified comet assay to detect DNA damage in mammalian sperm exposed in vitro to different mutagenic compounds*. Reproductive Toxicology, 2010. **30**(1): p. 44-49.

30. Akcha, F., G. Leday and A. Pfohl-Leszkowicz, *Measurement of DNA single-strand breaks in gill and hemolymph cells of mussels, Mytilus sp., collected on the French Atlantic Coast*. Marine Environmental Research, 2004. **58**(2-5): p. 753-756.

31. Gorbi, S., C. V. Lamberti, A. Notti, M. Benedetti, D. Fattorini, G. Moltedo, F. Regoli, *An ecotoxicological protocol with caged mussels, Mytilus galloprovincialis, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea*. Marine Environmental Research, 2008. **65**(1): p. 34-49.
32. Xuereb, B., A. Chaumot, R. Mons, J. Garric, O. Geffard, *Acetylcholinesterase activity in Gammarus fossarum (Crustacea Amphipoda). Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys*. Aquatic Toxicology, 2009. **93**(4): p. 225-233.
33. Roux, L.A., *Les gammares du groupe pulex. Essai de systématique biologique-Etude Morphologique et Morphométrique*. Archives de Zoologie Expérimentale et Générale, 1970. **111**: p. 313-356.
34. Geffard, O., B. Xuereb, A. Chaumot, A. Geffard, S. Biagianti, C. Noël, K. Abbaci, J. Garric, G. Charmantier, M. Charmantier-Daures, *Ovarian Cycle and Embryonic Development in Gammarus fossarum: Application for Reproductive Toxicity Assessment*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2010.
35. De Lemos, C.T., P. M. Rödel, N. R. TERRA, B. Erdtmann, *Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001. **20**(6): p. 1320-1324.
36. Menezes, S., A. M. V. M. Soares, L. Guilhermino, M. R. Peck, *Biomarker responses of the estuarine brown shrimp Crangon crangon L. to non-toxic stressors: Temperature, salinity and handling stress effects*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2006. **335**(1): p. 114-122.
37. Collins, A.R., V. L. Dobson, M. Dušinská, G. Kennedy, R. Štětina, *The comet assay: What can it really tell us? Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1997. **375**(2): p. 183-193.
38. Pisanelli, B., M. Benedetti, D. Fattorini, F. Regoli, *Seasonal and inter-annual variability of DNA integrity in mussels Mytilus galloprovincialis: A possible role for natural fluctuations of trace metal concentrations and oxidative biomarkers*. Chemosphere, 2009. **77**(11): p. 1551-1557.
39. Magni, P., G. De Falco, C. Falugi, M. Franzoni, M. Monteverde, E. Perrone, M. Sgro, C. Bolognesi, *Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of Mytilus galloprovincialis along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean)*. Environmental Pollution, 2006. **142**(1): p. 65-72.

40. Oliveira, M., V.L. Maria, I. Ahmad, M. Pacheco, M.A. Santos, *Golden grey mullet and sea bass oxidative DNA damage and clastogenic/aneugenic responses in a contaminated coastal lagoon*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010. **73**(8): p. 1907-1913.
41. Rank, J., K. Jensen, and P.H. Jespersen, *Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (Mytilus edulis) sampled from coastal sites in Denmark*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2005. **585**(1-2): p. 33-42.
42. Mamaca, E., R. K. Bechmann, S. Torgrimsen, E. Aas, A. Bjørnstad, T. Baussant, S. Le Floch, *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*, 2005. **75**(3): p. 191-201.
43. Tran, D., A. J. Moody, A. S. Fisher, M. E. Foulkes, A. N. Jha, *Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes*. *Aquatic Toxicology*, 2007. **84**(1): p. 11-18.
44. Emmanouil, C., T.M.T. Sheehan, and J.K. Chipman, *Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (Mytilus edulis L.) gill following exposure to Cd and Cr(VI)*. *Aquatic Toxicology*, 2007. **82**(1): p. 27-35.

Figures and Table

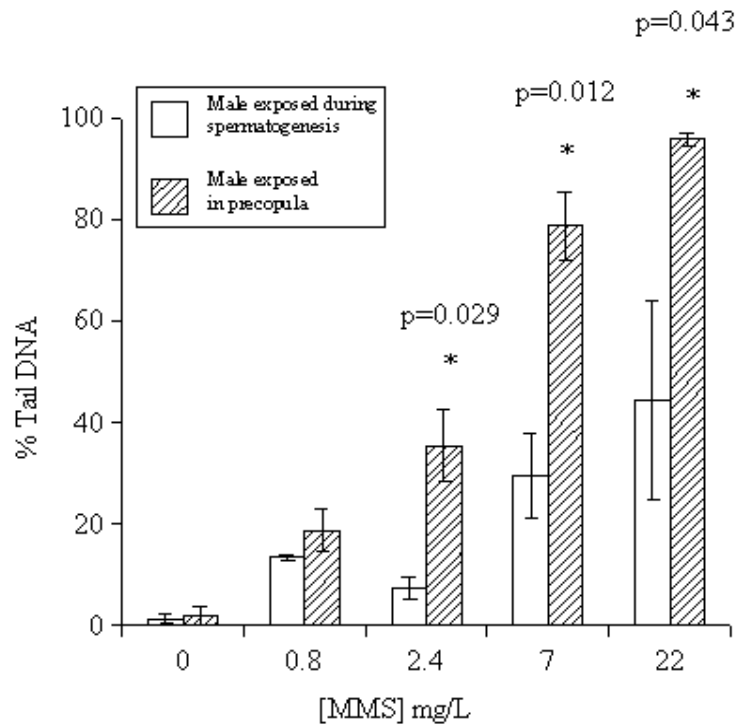


Figure 1: Percentage of tail DNA in spermatozoa from male gammarids exposed for 7 days to MMS before spermatogenesis (a) and at the end of spermatogenesis (b). Data are reported as mean ± standard deviation (n=6).

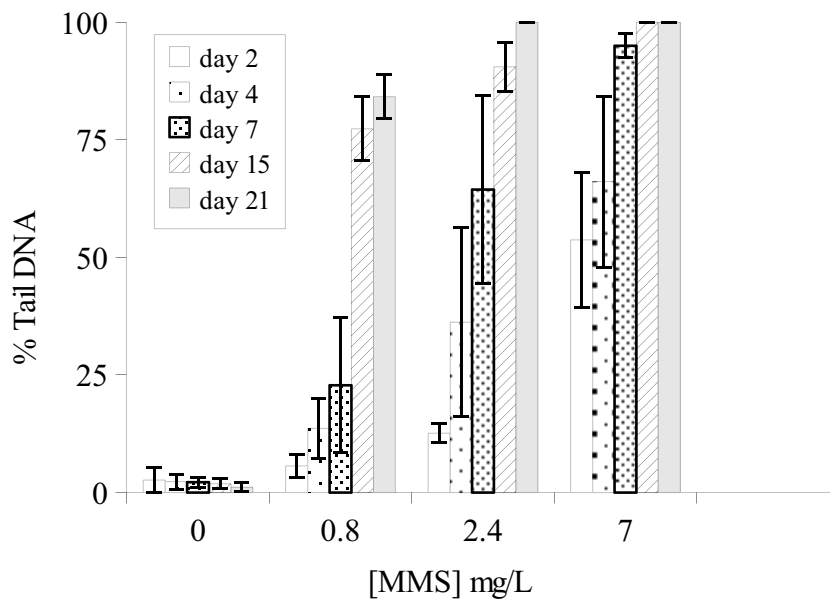


Figure 2: Kinetic study of % tail DNA in spermatozoa from mature male gammarids after MMS exposure. Data are reported as mean ± standard deviation (n=6).

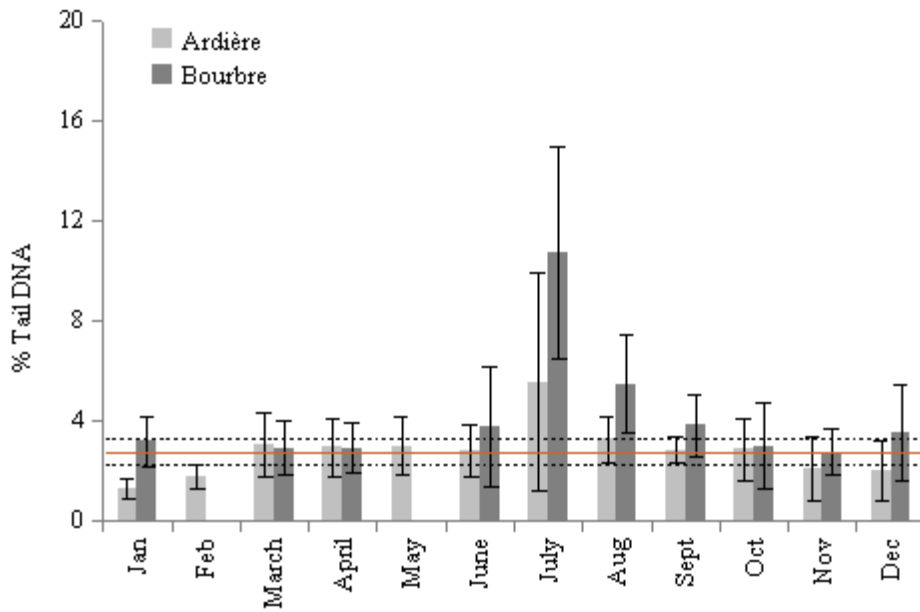


Figure 3: Monthly variations of DNA damage (% tail DNA) measured in male *G. fossarum* in precopula collected from January 2009 to December 2010 in the upstream part of the Ardière River and the Bourbre River. Data reported are mean \pm standard deviation ($n=15$). Continuous line represents the annual mean of DNA damage values obtained for both rivers (3.1% tail DNA) excluding the value measured in July at the Bourbre river site and dotted lines, the 95% confidence intervals (2.6–3.5% tail DNA).

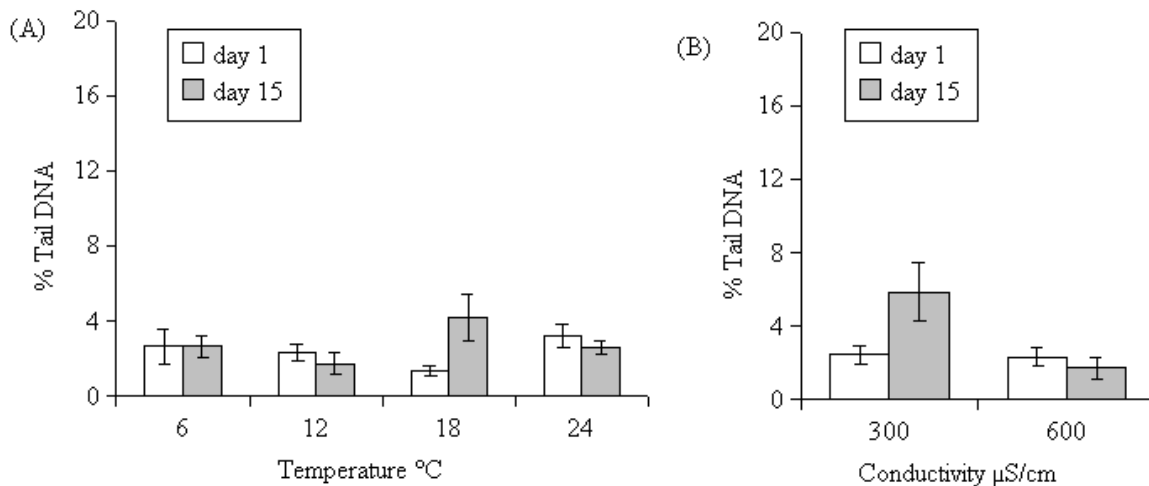


Figure 4: Percentage of tail DNA measured in mature spermatozoa from male *G. fossarum* kept 1 and 15 days at four different temperatures: 6, 12, 18 and 24°C (conductivity = 600 $\mu\text{S cm}^{-1}$) (A), and at two different conductivities: 300 and 600 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (temperature=12°C) (B). Data are reported as mean \pm standard deviation ($n=6$).

Table 1: Physicochemical water characteristics (temperature, pH, conductivity, Ca^{2+} and HCO_3^-) measured at each sampling time and the monthly flow rate of the studied sites. A: Ardière River and B: Bourbre River. (- : not measured).

	Temperature		Conductivity		pH		Flow rate		Ca^{2+}		HCO_3^-	
	°C		$\mu\text{S cm}^{-1}$				$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$		mg L^{-1}		mg L^{-1}	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
January 09	4.6	5.3	110	535	7.2	7.9	1.2	4.2	9	116	<30	290
February	5.1	5.9	105	530	7	8	1.4	5.5	9	110	<30	290
March	6.8	7.9	100	530	7.6	8	0.7	3.7	8	107	<30	290
April	10.1	12.1	115	525	7.1	8	0.4	2.2	10	111	<30	295
May	12.9	15.1	115	540	7.7	8	0.3	1.4	10	105	<30	295
June	14.2	16.6	115	535	7.8	8	0.5	1.1	10	110	<30	295
July	15.9	19.1	110	550	7.6	7.9	0.1	0.4	-	-	-	-
August	16.2	19.1	105	585	7.5	8.2	0.1	0.1	-	-	-	-
September	13.7	15.4	105	560	7.1	8	0.1	0.2	11	112	<30	290
October	10.7	10.7	120	525	6.4	8	0.1	0.4	11	111	<30	280
November	8.3	8.9	110	605	7	8	0.4	0.8	10	124	<30	330
December	6.2	6.7	115	580	7.1	8.1	0.7	1.5	9	115	<30	305

4.2. Application du biomarqueur au milieu naturel

4.2.1. Note 3 : Evaluation du risque génotoxique de pesticides viticoles sur l'amphipode d'eau douce *G.fossarum* : étude en mésocosme.

Résumé

Le milieu aquatique est particulièrement soumis à la pression toxique des pesticides. Toutefois, le potentiel génotoxique de ces composés est relativement peu étudié en milieu naturel. Afin d'évaluer le risque génotoxique lié à la présence d'un mélange de pesticides sur les organismes aquatiques, des gammares ont été engagés 15 jours dans des canaux expérimentaux soumis à un flux de pesticides et les niveaux de dommages à l'ADN ont été mesurés sur trois types cellulaires. Les concentrations en diuron et tébuconazole ont été choisies comme étant représentatives de la contamination du bassin versant de l'Ardière, subissant la pression de pesticides viticoles. Une augmentation significative des dommages à l'ADN des spermatozoïdes et des ovocytes a été mesurée. De plus, une tendance entre atteinte génotoxique des gamètes et une augmentation des anomalies sur la descendance a été soulevée. Ce travail confirme que la présence de pesticides, et plus particulièrement du diuron et du tébuconazole dans le milieu aquatique présente un risque génotoxique pour les organismes tels que les invertébrés. Cela confirme également la pertinence du biomarqueur de génotoxicité développé sur *G.fossarum* pour une évaluation pronostique du risque environnemental.

Mots clés

Pesticides ; génotoxicité ; succès reproducteur ; biomarqueur ; spermatozoïdes ; *G.fossarum*

Évaluation du risque génotoxique de pesticides viticoles sur l'amphipode d'eau douce *G.fossarum* : étude en mésocosme.

Introduction

La toxicité et la persistance des pesticides dans le milieu aquatique sont considérées aujourd'hui comme un problème environnemental majeur (Buchanan *et al.*, 2009). En France, cette prise de conscience récente s'est traduite en 2008 par une demande de réduction de 50% de leur utilisation d'ici 10 ans par le ministère de l'agriculture et de la pêche. Bien que le milieu aquatique soit particulièrement soumis à la pression toxique des pesticides peu d'études se sont intéressés à leur potentiel génotoxique pour les organismes aquatiques, et plus particulièrement pour les invertébrés. Au laboratoire, Connors et Black (2004) ont observé l'expression d'une réponse génotoxique chez la moule d'eau douce *Utterbackia imbecillis* exposée à l'atrazine et au diazinon à des concentrations inférieures aux NOEC. Dans le milieu naturel, l'évaluation de la génotoxicité des pesticides, ou indirectement du lessivage de sols agricoles, a été essentiellement étudiée chez les vertébrés comme les poissons et les amphibiens (Whitehead *et al.*, 2004 ; Bony *et al.*, 2008 ; Clements *et al.*, 1997 ; Lockwood *et al.*, 1997).

En France, de grandes régions viticoles font encore un usage intensif des pesticides. Dans la région du beaujolais, l'impact néfaste des pesticides viticoles pour l'écosystème aquatique a été démontré sur plusieurs espèces non cibles, des communautés de biofilms aux poissons (Montuelle *et al.*, 2010 ; Bony *et al.*, 2008). Dans le bassin versant de l'Ardière et de la Morcille, faisant partie du programme de recherche de la zone atelier bassin du Rhône (ZABR), deux pesticides sont plus particulièrement rencontrés et étudiés : un herbicide, le diuron et un fongicide, le tébuconazole. Leur toxicité a fait l'objet d'études en canaux expérimentaux, à des concentrations environnementales réalistes (Rimet et Bouchez, 2010). Dans le cadre de cette étude, des gammares ont été encagés pendant 15 jours, l'objectif étant d'évaluer le potentiel génotoxique de ces deux composés en mélange et de déterminer les conséquences de cette exposition sur la reproduction. Les niveaux de dommages à l'ADN de trois types cellulaires ont été évalués par le test Comet : l'hémolymphe, les ovocytes et les spermatozoïdes. L'existence d'un lien entre les dommages à l'ADN sur les cellules reproductrices et leurs impacts au niveau de la descendance a été éprouvée afin de déterminer les conséquences biologiques au niveau de l'individu d'une exposition réaliste à un mélange de pesticides viticoles.

Matériel et méthode

Les gammares adultes mâles et femelles de taille homogène ont été prélevés sur la Bourbe, au niveau de La Tour du Pin, après acclimatation au laboratoire pendant 15 jours (conductivité : 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$, T°C : 12°C, pH : 7,4-7,8) les organismes sont triés, la veille de l'encagement. Sept femelles au stade C2 et sept mâles sont placés dans une chambre d'encagement avec suffisamment de feuilles d'aulne conditionnées. Dix chambres d'encagement par canaux sont installées. Les gammares sont encagés dans quatre canaux expérimentaux, alimentés par l'eau du lac de Genève pompée à 36 m de profondeur (conductivité : 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$, T°C : entre 16 et 18°C). Deux des canaux sont alimentés par un mélange diuron-tébuconazole à la concentration respective de $1,1 \pm 0,82 \mu\text{g}/\text{L}$ et $0,59 \pm 0,55 \mu\text{g}/\text{L}$.

Après 15 jours d'encagement dans les canaux, Les chambres d'encagement sont relevées pour évaluer le taux de survie, le niveau d'atteinte à l'ADN et l'impact sur la reproduction des gammares. Le potentiel génotoxique des pesticides est évalué par le test Comet appliqué sur trois types cellulaires prélevés sur les gammares encagés : l'hémolymphe, les spermatozoïdes et les ovocytes (Lacaze *et al.*, 2010).

Un lot de gammares encagés est transféré en milieu non contaminé au laboratoire (conductivité : 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$, T°C : 12°C, pH : 7,4-7,8). Les femelles ayant pondues dans les 3 jours suivant le transfert sont isolées individuellement pendant 21 jours. Après cette période, la fertilité, la fécondité, le stade de développement embryonnaire et les anomalies des embryons sont évalués.

Résultats et discussion

Après 15 jours d'exposition au mélange diuron-tébuconazole dans les canaux expérimentaux, aucun impact génotoxique n'est décelé dans l'hémolymphe mais une augmentation significative des dommages à l'ADN mesurée sur les spermatozoïdes et les ovocytes est observée (Figure 1). L'augmentation des dommages atteint un facteur 2 pour les deux types cellulaires bien que les spermatozoïdes présentent une valeur d'endommagement supérieure à celle des ovocytes.

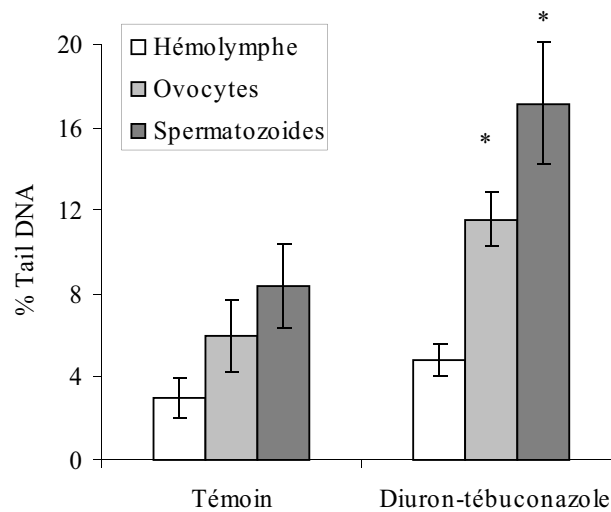


Figure 1 : Dommages à l'ADN dans les hématocytes, les ovocytes et les spermatozoïdes de *G.fossarum* encagés 15 jours dans des canaux témoins et soumis à un mélange diuron-tébuconazole. * différence significative entre les conditions « Témoin » et « Diuron » (test de Mann Whitney, $p < 0,05$).

Aucunes données concernant la génotoxicité du tébuconazole dans le milieu aquatique ne sont disponibles. Ce composé est considéré par l'EPA comme modérément toxique pour le poisson et est suspecté comme cancérigène possible. Selon une note réglementaire produite par l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire Santé Canada, les essais de génotoxicité sur rat et lignée cellulaire humaine ont donné des résultats négatifs. En revanche, à une concentration de diuron similaire à celle de notre étude (4.3 nM dans la littérature et 4.7 nM dans notre cas) une augmentation significative des dommages à l'ADN chez *Danio rerio* a été observée après 7 et 14 jours d'exposition (Bony *et al.*, 2010).

Il est intéressant de constater que le niveau de dommages à l'ADN des spermatozoïdes témoin est 2 fois plus élevé que le niveau de dommage basal rencontré dans les sites de référence (voir § IV.1) ou dans les expérimentations au laboratoire. Plusieurs phénomènes pourraient expliquer cette valeur élevée. La première hypothèse est une atteinte à l'ADN liée à une exposition aux UVs. Cette expérience a été réalisée au mois de juin, où la durée d'ensoleillement est maximale et les chambres d'encagement n'étaient pas protégées par une caisse en polyéthylène (§ II.2.2.2). Les gammarés habituellement lucifuges ont pu souffrir de cet ensoleillement. La deuxième hypothèse est une température relativement élevée (entre 16 et 18°C) qui a parfois été décrite comme un facteur pouvant influencer négativement l'intégrité de l'ADN (Buschini *et al.*, 2003 ; Andrade *et al.*, 2004). Toutefois, il convient de souligner le caractère peu réaliste des températures investiguées dans ces études (allant jusqu'à 37°C). Au laboratoire, s'il n'a pas été

démontré un effet de la température sur le niveau de dommage à l'ADN des spermatozoïdes de *G.fossarum*, une augmentation significative de l'atteinte à l'ADN chez les populations naturelles prélevées pendant les mois les plus chauds a été enregistrée (§ IV.1).

Dans une deuxième partie, nous avons évalué l'impact d'une atteinte génotoxique des gamètes sur le succès de la reproduction, processus clé de la conservation des espèces. Cette démarche permet une évaluation pronostique de l'effet des contaminants à un niveau individuel. Après 15 jours d'exposition et 21 jours en milieu non contaminé, la fertilité et le stade de mue des femelles sont évalués. Comme le montre la figure 2, aucun effet de l'exposition sur la fertilité n'est remarqué. En revanche, il semble qu'un retard dans le stade de mue soit observé (Figure 2.B).

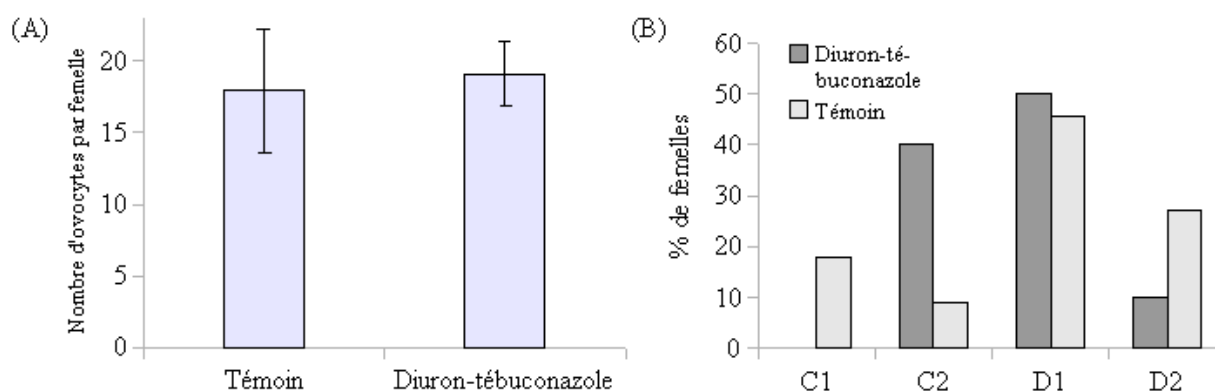


Figure 2 : Effet de l'exposition des femelles pendant 15 jours au mélange diuron-tébuconazole sur le cycle de reproduction suivant (i.e. 21 jours en milieu non contaminé à 12°C). Evaluation de la fertilité (nombre moyen d'ovocytes par femelle \pm SEM, N=10) (A) et stade de mue des femelles (B).

Les figures 3.A et 3.B présentent le nombre d'embryons moyen normaux et anormaux par femelle ainsi que le pourcentage d'anomalies de développement embryonnaire dans les deux conditions expérimentales. L'atteinte génotoxique des gamètes de *G. fossarum* liée à une exposition réaliste à un mélange de pesticides, entraîne une induction des anomalies embryonnaires d'un facteur 3, bien que celle-ci ne soit pas significative (test de Mann-Whitney).

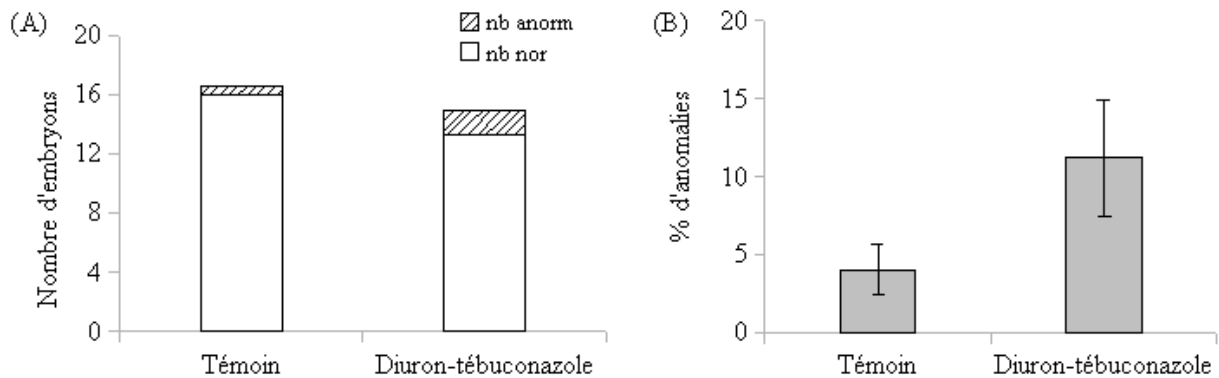


Figure 3 : Effets de l'exposition des adultes sur le développement embryonnaire observé après 21 jours de développement en milieu non contaminé à 12°C. Dénombrement des embryons par femelle (N=10) (A) et pourcentage moyen d'anomalies par condition ± SEM (N=10) (B).

Il existe une corrélation entre les dommages à l'ADN mesurés sur les spermatozoïdes et une augmentation des anomalies chez la descendance. Comme il a été souligné dans le chapitre III.2, un transfert d'anomalies est possible des gamètes à la génération suivante et il y a dans ce cas pérennisation du message toxique. L'augmentation non significative du pourcentage d'anomalies dans la descendance des adultes exposés soulève l'idée d'un seuil d'effet, qui ne semble pas être atteint dans cette étude.

Conclusion

Il a été démontré que le mélange diuron-tébuconazole à des concentrations rencontrées dans le bassin versant viticole de l'Ardière présentait un risque génotoxique avéré pour l'amphipode d'eau douce *G.fossarum*, et pour le milieu aquatique plus généralement. Cette étude pourrait être complétée par une étude au laboratoire afin de discriminer l'implication de chacune des molécules individuellement vis-à-vis de la génotoxicité exprimée. L'essai Comet appliqué chez cette espèce est un outil pertinent et efficace pour évaluer le potentiel génotoxique d'un mélange de pesticides dans des conditions réalistes. Du fait de la possibilité d'interpréter les dommages observés au niveau des gonades en termes d'effet sur la reproduction, l'application dans le milieu naturel du biomarqueur de génotoxicité développé permettrait d'envisager une évaluation prédictive du risque environnemental engendré par une contamination aux pesticides.

Référence

- Andrade, V.M., de Freitas, T.R.O. and da Silva, J. (2004) Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 560(1), 57-67.
- Bony, S., Gillet, C., Bouchez, A., Margoum, C. and Devaux, A. (2008) Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. *Aquatic Toxicology* 89(3), 197-203.
- Bony, S., Gaillard, I. and Devaux, A. Genotoxicity assessment of two vineyard pesticides in zebrafish. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 90(3-6), 421-418.
- Buchanan, I., Liang, H.C., Khan, W., Liu, Z., Singh, R., Ikehata, K. and Chelme-Ayala, P. (2009) Pesticides and herbicides. *Water Environment Research* 81(10), 1731-1816.
- Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P. and Rossi, C. (2003) Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 537(1), 81-92.
- Clements, C., Ralph, S. and Petras, M. (1997) Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29(3), 277-288.
- Connors, D.E. and Black, M.C. (2004) Evaluation of Lethality and Genotoxicity in the Freshwater Mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) Exposed Singly and in Combination to Chemicals Used in Lawn Care. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46(3), 362-371.
- Lockwood, L.A., Sharbel, T.F., Bonin, J., Ouellet, M., Rodrigue, J., Desgranges, J.-L. (1997) Flow cytometric assay for in vivo genotoxic effects of pesticides in Green frogs (*Rana clamitans*). *Aquatic Toxicology* 38(4), 241-255.
- Montuelle, B., Dorigo, U., Bérard, A., Volat, B., Bouchez, A., Tlili, A., Gouy, V. and Pesce, S. (2010) The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the ArdiÃres-Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia*, 1-19.

- Rimet, F. and Bouchez, A. (2010) Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: Lotic mesocosm approaches. *Ecological Indicators*. doi:10.1016/j.ecolind.2010.07.004, *in press*.
- Whitehead, A., Kuivila, K.M., Orlando, J.L., Kotelevtsev, S. and Anderson, S.L. (2004) Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(12), 2868-2877.

4.2.2. Publication 4 : DNA damage in caged amphipods *Gammarus fossarum*: a tool for freshwater quality assessment

Résumé

Le but de cette étude est de proposer un nouvel outil pour l'évaluation de la qualité biologique des hydrosystèmes d'eau douce, en évaluant la réponse génotoxique de *Gammarus fossarum*, une espèce d'intérêt écologique majeur. Pour cela, la sensibilité et la pertinence d'un biomarqueur de génotoxicité ont été déterminés sur des organismes encagés. Les dommages primaires à l'ADN ont été mesurés par le test Comet, appliqué sur des organismes exposés à deux contextes de contamination contrastés. Dans une première partie, des gammarus ont été encagés à l'amont et à l'aval de rejets de stations d'épuration. La sensibilité de la réponse des hémocytes, des ovocytes et des spermatozoïdes a été comparée pour choisir le type cellulaire le plus intégrateur et donc l'approche la plus à même de permettre l'évaluation de la qualité du milieu. Les spermatozoïdes sont le type cellulaire le plus sensible, le plus fiable et le plus pertinent pour évaluer un risque génotoxique en milieu naturel. Dans une deuxième partie, l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes d'organismes encagés le long d'un gradient de contamination métallique a été suivie pendant deux ans, afin d'évaluer à long terme les conséquences d'une telle contamination.

Mots clés

Gammarus fossarum ; génotoxicité ; encagement ; effluent de station d'épuration ; contamination métallique

Article soumis à Environmental Pollution

DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: a tool for freshwater quality assessment

Emilie Lacaze^{a,b}, Alain Devaux^a, Raphaël Mons^b, Sylvie Bony^a, Jeanne Garric^b, Alain Geffard^c, Olivier Geffard^b

^a Université de Lyon, INRA-ENTPE, Laboratoire des Sciences de l'Environnement, rue Maurice Audin, Vaulx en Velin, F-69518, France

^b Cemagref, MALY, Laboratoire d'Ecotoxicologie, 3 bis quai Chauveau, 69336 Lyon, Cedex 9, France.

^c EA 2069 URVVC-SE, Laboratoire d'Eco-Toxicologie, UFR Sciences, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

Abstract

The aim of this study was to propose a novel tool for biological freshwater quality assessment using genotoxicity assessment in *Gammarus fossarum*, a high ecologically relevant species. For this, the sensitivity and the relevancy of a genotoxicity biomarker were determined on caged gammarids. Primary DNA damages were measured using the Comet assay in gammarids exposed to two different contamination contexts. In a first part, gammarids were caged downstream waste water treatment plant effluent output. The sensitivity of the genotoxic response of hemocytes, oocytes and spermatozoa was compared in order to propose the most relevant approach for environmental survey. *G. fossarum* mature spermatozoa appeared to be the most sensitive, suitable and relevant cell type for freshwater genotoxicity risk assessment. In a second part, the genotoxic response of sperm from caged *G. fossarum* exposed to a polymetallic contamination was followed to take into account the long term ecological effects of pollutants.

Keywords: *Gammarus fossarum*; genotoxicity; caging; waste water treatment plant effluent; metallic contamination.

1. Introduction

Although a reduction in the emission of pollutants has been recorded, the management of freshwater ecosystems need relevant tools to be developed and validated so as to properly assess water quality. During the past 25 years, biological parameters have been proposed to complement the information given by chemical analyses and in particular substantial work has been devoted to developing and applying biomarkers for use in ecotoxicology and ecological risk assessment (Flammarion et al. (2002); Forbes et al. (2006)).

Many xenobiotics and newly developed substances released into the environment have been found to be genotoxic for living organisms, and many surface waters have been reported to be contaminated with genotoxic substances. Genotoxic agents may produce a cascade of adverse changes from the cellular to the individual levels and are suspected of driving adverse effects at the population level by altering the reproductive success of individuals (Jha (2008)). However, the most critical sources of genotoxicants remain to be identified. The wastewater treatment plant (WWTP) effluents discharged into surface waters is one of the significant sources even though wastewaters are treated through various processes (Ohe et al. (2004)). A second important source of genotoxicity in water results from metallic pollution because of the increasing amount of metals being released into the environment in relation with the development of industry.

A number of tests have been developed to assess the genotoxic potency of water samples using aquatic animals, mainly fish species and more rarely invertebrates such as mussels. Field experiments have included sampling of native fish populations (Devaux et al. (1998), Brown and Steinert (2004)) and cage exposure *in situ* (Winter et al. (2004), Klobučar et al. (2010)). The use of caged mussels has been demonstrated to be a useful strategy for biomonitoring genotoxic pollution through the analysis of biomarker responses ((Nigro et al. (2006), Rank et al. (2007)).

Whereas invertebrates constitute the major part of the aquatic biomass and play an essential role in ecosystems, there is a critical lack of genotoxicity biomarkers in aquatic species such as crustaceans, particularly in freshwater ecosystems. Recently, genotoxicity assessment using the Comet assay has been carried out in an ecologically relevant species, *Gammarus fossarum*, in three cell types: haemocytes, oocytes and spermatozoa (Lacaze et al. (2010)). Haemocytes are fluent and easily collected somatic cells often chosen for genotoxicity assessment using the Comet assay on invertebrates. Genotoxic effects on germ cells can be passed on to future generations because of their critical biological function of propagating the DNA used for the

development of the next generation. Among the potential test organisms, gammarids are currently used in ecotoxicological studies. They have a high ecological relevance since they are widespread in European freshwater hydrosystems and it is well known that they play a major role in leaf litter breakdown and occupy key ecological niches (Kunz et al. (2010)).

The aim of this study was to assess the sensitivity and the relevancy of the selected genotoxicity biomarker in the field using the Comet assay on caged *G. fossarum*, as a tool for freshwater quality assessment. Genotoxicity assessment was carried out in two different contamination contexts.

In the first part of this study, gammarids were caged upstream and downstream from a WWTP effluent output, in order to evaluate the feasibility of the protocol previously developed in our laboratory (Lacaze et al. (2010)).

The second part of the study was funded by a national research project (RESYST) studying the biological quality of the Riou Mort watershed, a tributary of the Lot River, impacted by a polymetallic contamination. Our involvement in this project was to assess the genotoxic impact of the polymetallic contamination on caged *Gammarus fossarum*. The polymetallic pollution gradient results from the industrial basin of Decazeville where a zinc ore factory has produced ores for over a century. Despite remediation efforts undertaken at the former smelting site, the Riou Mort was severely impacted by Cd and Zn inputs in 2004 (Audry et al. (2004)) and recently it was proved that the Riou Mort watershed remains highly contaminated (Gust et al. (2010)). In this context, we decided to study five sites along the polymetallic contamination gradient over 2 years using caged gammarids. Taking into account the results of the first part of this study showing that spermatozoa were the most relevant cell type for the assessment of genotoxicity, experiments were carried out only on this cell type in the second part of this study.

2. Materials and methods

2.1 Animal collection and maintenance

Amphipods were collected from La Tour du Pin, a known unpolluted upstream part of the Bourbre River (France). Sexually mature *G. fossarum* were collected using a hand-held net and were sieved (2–2.5 mm). They were quickly brought to the laboratory where they were kept 15 days at $12 \pm 0.5^\circ\text{C}$, using a 16/8 h light/dark cycle, continuously supplied with aerated

uncontaminated groundwater before being used for experiments. They were fed *ad libitum* on alder leaves (*Alnus glutinosa*).

2.2 WWTP experiments

Three WWTPs were selected. The WWTP effluent outputs were discharged in Rhône-Alpes rivers (eastern France): the Ardière, the Bourbre and the Saône Rivers. These rivers flow in highly contrasted watersheds, as shown by the major physico-chemical data (Table 1). Cages were placed at the WWTP effluent output and upstream and downstream from the WWTP effluent output. The upstream site, assumed to have a low pollution level, was chosen to exhibit similar physico-chemical characteristics to the downstream site. The effluent sites were located very close to the effluent input.

2.3 Lot River study sites

The field experiment was conducted over 2 years along a polymetallic contamination gradient surrounding the confluence between the Lot River and the Riou Mort watershed. Experiments were conducted in the four seasons. The largest source of cadmium is located in the former zinc ore treatment area, in the Riou Mort. It is through this stream that the majority of metal inputs arrive from the industrial site (Morin et al., 2008). Five sites were selected along the metallic pollution gradient (see Figure 1). The upstream station (Up.Lot) is located on the Lot River, at the Boisse-Penhot dam, above the confluence with the Riou Mort River. The site is considered a reference site because of the relatively low metal concentrations in the water column (Andrès et al, 1999). A site called Decazeville, located on the Riou Mort River, upstream from the industrial site, is considered a supplementary cadmium-free reference and is located in an industrial and urban area. The Riou Viou River is a tributary of the Riou Mort River. The Riou Viou site is located upstream from the factory and a smelting waste discharge. The Joany site, downstream from the industrial site on the Riou Mort River, directly receives the smelting waste leachates and the former ore treatment site wastes. The fifth site (Dn.Lot) is located on the Lot River, downstream from the confluence of the Riou Mort River and the Lot River where waters from the two rivers are considered to be totally mixed.

2.4 Caging procedure

Amphipods were caged in polypropylene cylinders (length, 10 cm; diameter, 5.5 cm) capped at its ends with pieces of net (mesh: 1 mm) to guarantee free circulation of water. The cylinders were protected by a rigid plastic container weighted with rocks. In each container, temperature monitoring probes were fixed. Adult gammarids with an average body length of 9 ± 1 mm were selected so that mature and same age-ranked gammarids would be exposed. During the tests, the gammarids were fed with alder leaves (*A. glutinosa*) (Dedourge-Geffard et al., 2009). For the WWTP experiment, caged amphipods were exposed for 15 days at the stations previously described in Part 2.2 in June 2008 (Ardière and Saône River experiments) and in September 2008 (Bourbre River experiment). Seven adult male gammarids and seven adult female gammarids per cylinder were caged and three cages per site were deployed.

For the field transplantation in the Lot River, only males were transplanted. Ten adult male gammarids per cylinder and three cylinders per site were transplanted. To measure metal bioaccumulation, 20 adult male gammarids were placed in a cylinder and four cylinders per site were deployed. All cages were held in the same container. The containers were sampled after 7 days in autumn, winter and spring and after 7 and 15 days in summer to study the genotoxicity kinetics and bioaccumulation responses. At the end of the experiments, the gammarids were collected, counted for the survival rate assessment, and brought to the laboratory where they were sacrificed for metal analysis and genotoxicity assessment.

2.5 Metal analysis

The metal content in gammarids was assessed as previously described by Dedourge-Geffard et al. (2009) (described also in the supplementary data).

2.6 Genotoxicity assessment: Comet assay procedure

At the end of the exposure, the gammarids were sacrificed for the Comet assay procedure as previously described (Lacaze et al. (2010)) (described also in supplementary data). Haemocytes, spermatozoa and oocytes were collected from mature gammarids in precopula. All cell samples

were checked for cell viability prior to use. Only cell suspensions exhibiting viability greater than 90% were used.

The alkaline version of this technique (pH > 13) was applied. After staining with 0.05 mM ethidium bromide, five slides per condition were observed and 50 cells per slide were analysed with the Comet IV image analysis system (Perspective Instruments Ltd, UK). The percentage of DNA in the comet tail (% tail DNA) was chosen as the most reliable and meaningful comet measurement.

2.7 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistica 8.0 software (StatSoft Inc). Since the distribution of DNA damage measured by the Comet assay did not follow a Gaussian distribution, both Kruskal-Wallis and Mann-Whitney non-parametric tests were used for data analysis. For the metal analysis statistical treatment, the differences between groups of gammarids were evaluated using a variance analysis (ANOVA) and post-hoc comparisons.

3. Results

3.1 WWTP study

After 15 days of caging upstream and downstream from the WWTP effluent discharge, the gammarid survival rate remained high (Table 2).

Genotoxicity measurements on gammarid haemocytes, oocytes and spermatozoa, expressed as the percentage of tail intensity (% tail DNA), are shown in Figure 2. In gammarids caged at upstream sites, the level of DNA damage in haemocytes and spermatozoa remained low. DNA damage in haemocytes and spermatozoa varied in the low range of 2.2–4.8% and 3.4–3.8%, respectively. However, DNA damage in oocytes from gammarids caged at upstream sites exhibited a higher level than DNA damage than the two other cell types. A significant genotoxic impact was observed in gammarids exposed to the effluent output and downstream the effluent output compared with gammarid responses from the upstream site. Only spermatozoa exhibited a significant increase in DNA damage for all of the hydrosystems. The genotoxic response level in

spermatozoa reached the maximum value of $14.0 \pm 3.4\%$ in gammarids caged at the effluent output on the Bourbre River. On the Saône River, the induction ratio of DNA damage measured in spermatozoa from gammarids caged on the effluent site to DNA damage from the upstream site was 3.5. A fourfold increase in DNA damage was observed between the effluent site and the upstream site of the Bourbre and the Ardière rivers. It must be highlighted that spermatozoa appeared to be more susceptible to accumulating DNA damage than haemocytes and oocytes.

3.2 *In situ* exposure along a polymetallic contamination gradient

Due to the high Cd concentration in the Riou Mort water, a mortality rate at Joany higher than 50% was frequently observed. Metal analysis and genotoxicity assessment in gammarids were not performed in this case except in February 2009 and March 2009. The mean survival rate based on the results of the other sites was $90.5 \pm 9.0\%$ (Table 3).

3.2.1 Metal body burden analysis in gammarids

Concerning Zn, no difference in metal body burden between sites was observed, except for Joany, throughout the experiment (Figure 3.A). At this site, gammarids displayed a mean Zn concentration four times higher than the concentration at the four other sites. The pattern was different for Cd. The Cd concentration in gammarids caged at Upstream Lot and Decazeville was low ($0.04\text{--}0.4 \mu\text{g Cd/g}$ dry weight). The gammarids exposed at Downstream Lot, Riou Viou and Joany always exhibited a high concentration of Cd, with significant variations between the sampling dates. A general trend at these three sites was observed: the Joany site often exhibited a higher concentration of Cd in gammarids than Riou Viou and Downstream Lot. The following bioaccumulation gradient, over all sampling dates, was found for Cd: Upstream Lot \approx Decazeville \ll Downstream Lot $<$ Riou Viou $<$ Joany, with a maximum accumulation in June 2009 (67 and 75 times higher than the Upstream Lot value for the Downstream Lot site and the Riou Viou site, respectively). After 2 weeks of exposure in June 2009 and in June 2010, the Cd concentration was 1.75 times higher than the value recorded after 1 week of exposure.

3.2.2 Genotoxicity assessment

Figure 4 shows the level of DNA damage in gammarid spermatozoa (expressed as % tail DNA). During the 2-year experiment, gammarids caged at the upstream site on the Lot River, chosen as a reference site, always exhibited a low level of sperm DNA damage (1.4–4.0%). In the same way, a low level of DNA damage was generally observed in gammarids exposed to the downstream site on the Lot River. Caged gammarids at Joany showed a genotoxic adverse effect when the survival rate was high enough to allow genotoxicity assessment, in February and April 2009. A 2.1- and 2.5-fold increased value compared to the upstream site was reached in February and March, respectively. Among the five sites, two appeared to generate a genotoxic response in spermatozoa throughout the 2-year experiment: the Riou Viou and the cadmium-free station of Decazeville (see the induction ratio in Table 5). The maximum value of DNA damage was measured in November 2009 at Decazeville ($10.5 \pm 5.3\%$). A decreasing trend for DNA damage was observed between 2009 and 2010 in gammarids caged at Riou Viou and Decazeville, whereas no modifications of the physico-chemical characteristics could be observed (Table 4). Finally, exposure at the three Riou Viou, Decazeville and Joany sites always led to a genotoxic response in male gammarids. In June 2009 and 2010, kinetics experiments were conducted and revealed that the increase in exposure duration was correlated with an increase in the level of DNA damage in genotoxic sites but not in control sites. Accordingly, 9.5% DNA damage was measured in the Riou Viou site after 1 week and 18.6% after 2 weeks of exposure. In 2010, an increase in DNA damage from 5.2% (1 week of exposure) to 14.4% (2 weeks of exposure) was measured at the Decazeville site.

3.3 Variability of the base level of DNA damage at upstream sites

Figure 5 shows the DNA damage level measured in adult male gammarids caged at all upstream sites. The value of the base level of DNA damage for all experiments varied in the low range of 1.4–4.1% with a mean value of 3.1% (95% confidence interval, 2.7–3.6% tail DNA). In addition to the lack of spatial variations of the DNA damage level at the control site, no significant temporal variability was observed whatever the season and the temperature, which varied from 4.6 to 22°C. Moreover, no relationship between DNA integrity and the duration of exposure at the control site was found (15 days for the WWTP experiments and 7 days for the

Lot River experiments). The majority of the upstream site values remained within the reference range (95% confidence interval) except for the lower value in February 2010 and the higher value in March 2009, both measured at the Upstream Lot site.

4. Discussion

The translocation of sentinel species from a reference site or from the laboratory to a field area under study has been demonstrated to be a useful strategy for the evaluation of water quality, in particular through genotoxicity assessment. Among the aquatic species caged in polluted sites, mainly fish species have been used for this purpose. In freshwater hydrosystems, carp, chub and minnow have been the most frequently studied caged species (Whitehead et al. (2004), Winter et al. (2004), Klobučar et al. (2010)). Invertebrates have also been used in caging systems but genotoxicity tests were only applied to molluscs such as mussels. For example, the Comet assay has been performed in caged *Mytilus galloprovincialis*, *Unio pictorum* and *Dreissena polymorpha* (Nigro et al. (2006), Štambuk et al. (2009), Bocchetti et al. (2008), Klobučar et al. (2003)), with haemocytes and gill cells the most frequently used cell types.

4.1 WWTP genotoxicity

According to White and Rasmussen (1998), domestic wastewaters are a greater genotoxic hazard to aquatic systems than industrial wastewaters. Although the genotoxic activity of wastewater effluents has been reported by several authors, the majority of the studies were conducted *in vitro* with bacterial tests (Mathur et al. (2007)) or using cell-line culture (Žegura et al. (2009)). In the first part of this study, the genotoxic potential of WWTP effluent discharge was studied *in situ*, in caged amphipods using the Comet assay on three cell types in order to choose the most sensitive cell type for further genotoxicity experiments.

A general increase in DNA strand-break formation was noted, related to the discharge of effluents into the rivers. After 15 days of caging downstream from the WWTP effluent output, the increase in DNA damage was significant. However, among the three cell types studied, only spermatozoa allowed us to discriminate between the different genotoxic pressures of the sampling sites.

Because of the inherent capabilities of different cell types to integrate DNA damage, the assessment of genotoxic stress can be improved when studying the response of different cell types. Lewis and Galloway (2008) found that eleocytes were more sensitive to genotoxic damage than amoebocytes in the two Nereid species investigated (*Nereis virens* and *Nereis diversicolor*), and spermatozoa were less sensitive to genotoxic damage than coelomocytes in *Arenicola marina*. In our study, spermatozoa always exhibited the highest genotoxic response among the three cell types studied, whatever the contamination profile of the hydrosystem investigated. This cell type appeared to have a greater capacity to integrate DNA damage from chronic and low-dose exposures to environmental genotoxins than oocytes and haemocytes, as previously shown in laboratory experiments (Lacaze et al. (2010)). Low biotransformation capacity, a low defence system and a lack of efficient protection in spermatozoa, and so an inability to repair DNA compared to oocytes have already been demonstrated (Cordelli et al. (2007)). Moreover, genotoxicity assessment using sperm may provide relevant information because of its direct contribution to the genetic make-up of the next generation, as has been demonstrated in other invertebrate species for which paternal DNA damage was linked to damaged reproductive success (Lewis and Galloway (2009)). Thus, *G. fossarum* spermatozoa were identified as the most sensitive, suitable and relevant cell type for biomonitoring freshwater genotoxicity using the Comet assay, as illustrated in the second part of our study.

4.2 Lot River metal contamination

This study was a part of a national program that aimed to evaluate the water quality of the Lot River and its tributaries. Experiments were conducted over 2 years. This field study was carried out using gammarids transplanted into five stations that exhibited a Cd and Zn pollution gradient. Cd accumulation in the whole body of the exposed gammarids was a good reflection of the contamination gradient (Riou Mort > Riou Viou > Downstream Lot). Indeed, this gradient corresponded to metal concentrations in the water that were reported in previous geochemical studies (Andrès et al. (1999), Audry et al. (2004)) and to the metal gradient measured in caged *Potamopyrgus antipodarum* at the same sites (Gust et al. (2010)).

The mean cadmium concentration in gammarids exposed to Upstream Lot and Decazeville was close to that observed in gammarids from the upstream part of the Bourbre River, which has good water quality (Geffard et al. (2007)). Metal concentrations measured in gammarids exposed

at the other three sites were in accordance with the presence of bioavailable metals in water. In the present study, Cd concentrations in *G. fossarum* caged at Joany, Riou Viou and Dn.Lot were higher than those measured in *G. fossarum* exposed to the Amous River, characterised by a high metal contamination (Dedourge-Geffard et al. (2009)). Gammarids exposed to the Amous River accumulated cadmium up to a maximum concentration of 3.9 µg/g dry body weight after 7 days of exposure. According to the authors, this could lead to a disturbance of homeostasis as well as negative effects on digestive enzyme activities and the feeding rate.

Concerning genotoxicity assessment, organisms caged in Lot River sites (Up.Lot and Dn.Lot sites) exhibited a low level of DNA strand breaks, except in April 2009 after 1 week of exposure and in June 2009 after 2 weeks of exposure at the downstream Lot site. A significant increase in DNA damage was observed in the three Joany, Riou Viou and Decazeville sites for almost every sampling date. The mean induction ratio for the Riou Viou and Decazeville sites is 2.9 compared to Upstream Lot site. This result is comparable with those of Klobučar et al. (2010) who found a 3.5-fold increase in DNA damage after 3 weeks of caged carp exposure at polluted sites (11–18% tail DNA). This induction was considered a pollution-related genotoxic effect. Štambuk et al. (2009) noted a similar increase in the amount of DNA damage in mussels (*Unio pictorum*) caged at a polluted site compared to a reference location. Metal discharge (cadmium, lead, copper, nickel and chromium) in Extremoz Lake (Brazil) was linked to significant alterations in the levels of DNA breaks of *Oreochromis niloticus* peripheral blood erythrocytes (Barbosa et al. (2010)).

Genotoxicity could not be assessed for every sampling date in Joany because of the high mortality rate. This mortality could be related to a high concentration of cadmium. Indeed the average of dissolved Cd concentration at this site measured every 24 days in 2004 and 2005 was 26.2 µg/L (Morin et al. (2008)). In *Gammarus pulex*, Felten et al. (2008) reported that LC50_{7days} was around 20 µg/L of cadmium. This mortality level could be related to the high sensitivity of gammarids to cadmium, which can strongly impact the osmolality, ventilation, feeding rate and locomotor activity.

For Joany, Riou Viou and Decazeville, a decrease in the DNA damage level was recorded between 2009 and 2010. Differences in experimental conditions such as flow rates could have accounted for a difference between the two years. The mean flow rates in 2009 were globally higher than in 2010. The mean monthly flow rate of the Dourdou River, a Lot River tributary near the Riou Viou and Riou Mort rivers, was always higher in 2009 than in 2010 (February: 19

vs 14 m³/s, April: 15 vs 6 m³/s, June: 2.3 vs 1.3 m³/s, in 2009 and 2010, respectively), just as the mean pluviometry also decreased (240 mm in 2009 and 190 mm in 2010) (data from the Banque Hydro website).

It should be highlighted that even if the concentration of cadmium measured in gammarids could have detrimental effects at the individual level (Felten et al. (2008)), the sources of genotoxicity could be more complex than those related to the leachates released by the smelting facility. All the sites impacted by cadmium (Joany, Riou Viou and Downstream Lot) exhibited an increase in spermatozoa DNA damage compared to Upstream Lot. However, the increase in DNA damage was not always significant. At the Downstream Lot site, similar cadmium concentrations to those measured at Riou Viou did not induce such substantial DNA damage. No dose–response relationship between the level of cadmium content in the gammarids and genotoxicity could be established. A low level of cadmium genotoxicity has already been described in other aquatic organisms: Pruski and Dixon (2002) found that cadmium was not genotoxic in mussel gill cells under acute and chronic exposure conditions (0.2 mg/L CdCl₂ for 4 weeks). Similarly, cadmium at the concentration of 0.1 mg/L did not lead to DNA damage in gilthead sea-bream erythrocytes after 4 and 11 days of exposure (Isani et al. (2009)). In a previous study, no DNA damage was measured in *G. fossarum* exposed at a 1.5-μg Cd/L concentration (Lacaze et al. (2010)).

Genotoxicity revealed by the Comet assay on spermatozoa was not due exclusively to cadmium contamination. Indeed, one of the lowest cadmium-contaminated sites (Decazeville) exhibited DNA damage on *G. fossarum* as high as the damage recorded in organisms caged at Joany, the most highly metal-impacted site. The genotoxic stress generated in gammarids caged at Decazeville or at Riou Viou could be explained by other contaminants than cadmium. Decazeville is characterised by an urban and industrial environment where industrial discharges are frequent (high concentrations of Mg²⁺ and SO₄²⁻, characteristic of industrial discharges, were 70 times higher at Decazeville than at the Upstream Lot site). The Riou Viou site is surrounded by an agricultural area and concentrations of NO₃⁻ twice as high as at the Upstream and Downstream Lot sites have been measured. The hypothesis of the presence of genotoxicants that stem from urban, industrial and agricultural activities cannot be ruled out.

Although measurements of DNA damage using the Comet assay can discriminate the stations in term of their genotoxicity, using several genotoxic endpoints simultaneously would

probably reveal contrasted responses because they reveal different DNA damage types (Mouchet et al. (2007)).

4.3 Variability of the DNA damage base level in upstream sites

G. fossarum caging appeared to have no detrimental effect on the base level of DNA damage. The lack of a detrimental effect of caging has been also shown in transplanted mussels at a reference site which demonstrated no increase in DNA damage even after 13 weeks of caging (Shaw et al. (2002)).

Biomarkers for chemical environmental biomonitoring should ideally be affected only by contaminants. Actually, biomarkers are frequently influenced by variables related to hypoxia, malnutrition and temperature stress (Buschini et al. (2003), Wiklund and Sundelin (2004)) and by biotic factors such as reproductive status, inter-individual variability and age (Akcha et al. (2004)). To distinguish the effects of contaminants from natural background variability, caging upstream from the pollution input is the practical procedure adopted in most studies. The caging procedure also allowed to choose standard organisms with similar physiological features. Knowledge of the natural variability response of a biomarker distinguished the influence of environmental factors (such as temperature, flow rate, conductivity) from the contaminant exposure. In this study, DNA damage in reference sites remained at a low level for all experiments (mean % tail DNA, 3.1%; 95% confidence interval, 2.7–3.6% tail DNA). This extremely reduced variability of the control DNA damage level suggests that there was no impact of watershed physico-chemical characteristics on this parameter. Indeed, the level of control DNA damage remained low for conductivity, varying from 110 to 550 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Ardière River and Bourbre River, respectively).

No seasonal effect was observed as revealed by DNA damage in gammarids caged at the upstream Lot site. As no seasonal and no temporal variability was observed even though watershed physico-chemical characteristics were highly contrasted (see Tables 1 and 4), the mean value of 3.1% could be considered an average control value in gammarids caged in sites chosen as a reference site.

This is not the first report of low variability of the control DNA damage level. A low variability of the levels of DNA damage measured by the Comet assay in carp caged at a reference site for several years was observed (reference DNA damage ranged from 5 to 7% tail

DNA for all the years tested) (Klobučar et al. (2010)). Moreover, Winter et al. (2004) found that there was no difference in DNA damage detected between fish caged during summer and during winter in each of the rivers studied, reflecting an absence of a pronounced seasonal effect on DNA damage. In the present study, the low variability of the DNA damage control level increased the discriminating power of the biomarker in *G. fossarum*.

4.4 Meaningful interpretation of DNA damage measurements

The objective of a biomarker is to reveal that organisms have been exposed to chemicals and to indicate that they are suffering from these effects, leading to future impairment of ecological relevance.

The biomarker used in this field study provided a significant discrimination of the stations studied depending on their potential genotoxicity. In a previous study, measurements of DNA strand breaks in *G. fossarum* spermatozoa obtained by the Comet assay were related to an effect on reproduction (unpublished data). A threshold of 20% tail intensity in spermatozoa DNA damage led to a significant detrimental effect on embryonic development. In the present study, during the 2-week experiments in the Lot River, DNA damage reached values of 18% and 15%. These levels of DNA strand breaks in sperm could produce consecutive abnormalities in embryos, i.e. individual level consequences. The novelty of the approach we propose, focusing on sperm, is that it can contribute to evaluate the consequences of the contamination on cells involved in the reproduction success. Due to the direct contribution of sperm to the genetic make-up of the next generation, DNA integrity assessment in this cell type should allow to facilitate the understanding of the long term consequences of genotoxicity at higher biological levels and their implications for the health of natural populations.

5. Conclusion

The transplantation method using an *in situ* cage study presents a number of advantages. Caged gammarids can be used to investigate water quality in areas where native gammarids are absent, reducing inter-individual variability (life history, genetic background and developmental stages) and limiting the influence of seasonal variability because geographical and temporal conditions are controlled. The first part of the present study has allowed us to choose a relevant

cell type to assess genotoxicity in the field. DNA damage in spermatozoa exhibited a low basal level and low variability in the reference site, so significant differences between sites could be reported. Since DNA damage in spermatozoa could potentially affect reproduction success, this facilitates the understanding of the long-term consequences of DNA damage measured by the Comet assay. In the present example of polymetallic contamination, the results illustrate the potential of the genotoxicity biomarker developed on *G. fossarum* for environmental risk assessment. Combining biomarker responses with analytical chemistry to investigate the toxicity of different types of contamination towards freshwater ecosystems provides unexpected but rich ecotoxicological information.

Acknowledgment

This study was funded by the National Research Project ANR 08-CES-014 RESYST and by the Recherche Environnement Cluster of the Rhône-Alpes Region. Marion Gust, Véronique Duflo and Claire Noël are gratefully acknowledged for their help in the field experiments. The authors would like to thank Gérard Laprat from ABC laboratory (Viviez, Aveyron, France), and Mr. Soares and Mr. Magniette from the hydraulic energy society SHEM. The authors also wish to thank Mrs. Linda Northrup for her very helpful critical reading of the English of the manuscript.

References

- Akcha, F., Leday, G. and Pfohl-Leszkowicz, A., 2004. Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: Effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 552(1-2), 197-207.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B. and Metayer, C., 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 106(1), 73-89.
- Andrès, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C. and Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18(11), 2462-2471.
- Barbosa, J.S., Cabral, T.M., Ferreira, D.N., Agnez-Lima, L.F. and Batistuzzo de Medeiros, S.R., 2010. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73(3), 320-325.
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D. and Regoli, F., 2008. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicology*. 89(4), 257-266.
- Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P. and Rossi, C., 2003. Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 537(1), 81-92.
- Brown, J.S. and Steinert, S.A., 2004. DNA damage and biliary PAH metabolites in flatfish from Southern California bays and harbors, and the Channel Islands. *Ecological Indicators*. 3(4), 263-274.
- Cordelli, E., Fresegna, A.M., D'Alessio, A., Eleuteri, P., SpanÃ², M., Pacchierotti, F. and Villani, P., 2007. ReProComet: A new in vitro method to assess DNA damage in Mammalian sperm. *Toxicological Sciences*. 99(2), 545-552.

- Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagiante-Risbourg, S., Geffard, O. and Geffard, A., 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An in situ experiment. *Chemosphere*. 77(11), 1569-1576.
- Devaux, A., Flammarion, P., Bernardon, V., Garric, J. and 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*). *Marine Environmental Research*. 46(1-5), 257-262.
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J. and Geffard, O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*. 86(3), 413-425.
- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P. and Garric, J., 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 51(2), 145-153.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A. and Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25(1), 272-280.
- Geffard, A., Quéau, H., Dedourge, O., Biagiante-Risbourg, S. and Geffard, O., 2007. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 145(4), 632-640.
- Gust, M., Buronfosse, T., Geffard, O., Coquery, M., Mons, R., Abbacia, K., Giamberini, L. and Garric, J., 2010. Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Aquatic Toxicology*. DOI 10.1016/j.aquatox.2010.09.007
- Isani, G., Andreani, G., Cocchioni, F., Fedeli, D., Carpeni, E. and Falcioni, G., 2009. Cadmium accumulation and biochemical responses in *Sparus aurata* following sub-lethal Cd exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72(1), 224-230.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*. 23(3), 207-221.
- Klobučar, G.O.I.V., Pavlica, M., Erben, R. and Papeš, D., 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*. 64(1), 15-23.

- Klobučar, G.I.V., Štambuk, A., Pavlica, M., Sertić Perić, M., Kutuzovic Hackenberger, B. and Hylland, K., 2010. Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology*. 19(1), 77-84.
- Kunz, P.Y., Kienle, C. and Gerhardt, A., 2010. *Gammarus* spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: Toward integrated multilevel tests, pp. 1-76.
- Audry, S., SchÄœfer, J., Blanc, G. and Jouanneau, J.M. (2004) Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). *Environmental Pollution*. 132(3), 413-426.
- Lacaze, E., Geffard, O., Bony, S. and Devaux, A., 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 700(1-2), 32-38.
- Lewis, C. and Galloway, T., 2008. Genotoxic damage in polychaetes: A study of species and cell-type sensitivities. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 654(1), 69-75.
- Lewis, C. and Galloway, T., 2009. Reproductive consequences of paternal genotoxin exposure in marine invertebrates. *Environmental Science and Technology*. 43(3), 928-933.
- Morin, S., Duong, T.T., Dabrin, A., Coynel, A., Herlory, O., Baudrimont, M., Delmas, F., Durrieu, G., Schäfer, J., Winterton, P., Blanc, G. and Coste, M., 2008. Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France. *Environmental Pollution*. 151(3), 532-542.
- Mouchet, F., Gauthier, L., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Mailhes, C., Ferrier, V. and Devaux, A., 2007. Comparative evaluation of the toxicity and genotoxicity of cadmium in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the comet assay and the micronucleus test. *Environmental Toxicology*. 22(4), 422-435.
- Nigro, M., Falleni, A., Barga, I.D., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F. and Frenzilli, G., 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology*. 77(4), 339-347.
- Ohe, T., Watanabe, T. and Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. 567(2-3 SPEC. ISS.), 109-149.
- Pruski, A.M. and Dixon, D.R., 2002. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquatic Toxicology*. 57(3), 127-137.

- Rank, J., Lehtonen, K.K., Strand, J. and Laursen, M., 2007. DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology*. 84(1), 50-61.
- Shaw, J.P., Large, A.T., Livingstone, D.R., Doyotte, A., Renger, J., Chipman, J.K. and Peters, L.D., 2002. Elevation of cytochrome P450-immunopositive protein and DNA damage in mussels (*Mytilus edulis*) transplanted to a contaminated site. *Marine Environmental Research*. 54(3-5), 505-509.
- Štambuk, A., Pavlica, M., Vignjević, G., Bolarić, B. and Klobučar, G.I.V., 2009. Assessment of genotoxicity in polluted freshwaters using caged painter's mussel, *unio pictorum*. *Ecotoxicology*. 18(4), 430-439.
- White, P.A. and Rasmussen, J.B. (1998) The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 410(3), 223-236.
- Mathur, N., Bhatnagar, P., Mohan, K., Bakre, P., Nagar, P. and Bijarnia, M., 2007. Mutagenicity evaluation of industrial sludge from common effluent treatment plant. *Chemosphere*. 67(6), 1229-1235.
- Whitehead, A., Kuivila, K.M., Orlando, J.L., Kotelevtsev, S. and Anderson, S.L., 2004. Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(12), 2868-2877.
- Wiklund, A.K.E. and Sundelin, B., 2004. Biomarker sensitivity to temperature and hypoxia - A seven year field study. *Marine Ecology Progress Series*. 274, 209-214.
- Winter, M.J., Day, N., Hayes, R.A., Taylor, E.W., Butler, P.J. and Chipman, J.K., 2004. DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 552(1-2), 163-175.
- Žegura, B., Heath, E., Černoša, A. and Filipič, M., 2009. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere*. 75(11), 1453-1460.

Tables and Figures

Table 1: Ardère, Bourbre and Saône Rivers: mean physico-chemical parameters and watershed characteristics

	Ardère River			Bourbre River			Saône River		
	Upstream	Effluent	Down stream	Upstream	Effluent	Down stream	Upstream	Effluent	Down stream
Mean T°C	15.0±2.4	15.5±2.2	15.3±2.4	15.7±1.1	16.1±1.4	15.8±1.5	19.1±0.5	18.6±0.1	18.8±0.4
Min T°C	10.5	12	11.1	13.3	13.2	12.7	18.0	17.5	17.7
Max T°C	20.5	20.7	20.8	18.6	18.7	18.6	22	21.8	22.4
C µS/cm	113	125	137	546	773	671	481	478	484
pH	7.6	8.0	7.9	7.9	7.8	7.9	8	7.9	8.1
Mean river flow (m ³ /s)		0.55			2.87			232	
Major source of contaminants	Vineyard pesticides			Industrial (heavy metals) Urban			Urban		

Table 2: Survival rate in caged gammarids upstream and downstream from WWTP effluent output after 7 days and 15 days of exposure (mean value ± standard error).

		Upstream	Effluent	Downstream
Ardère River	7 days	92.8 ± 5.8	93.0 ± 0	97.6 ± 3.4
	15 days	88.1 ± 6.7	81.0 ± 6.7	83.3 ± 12.1
Bourbre River	7 days	98.0 ± 3.4	93.0 ± 1.3	98.2 ± 3.4
	15 days	95.1 ± 6.7	62.1 ± 23.6	79.0 ± 10.1
Saône River	7 days	70.5 ± 20.4	98.0 ± 3.4	88.7 ± 16.8
	15 days	67.0 ± 22.1	93.6 ± 5.8	75.6 ± 17.8

Table 3: Survival rate in caged adult male gammarids in five sites surrounding the Lot River along a polymetallic contamination gradient after 7 days of exposure (mean value ± standard error).

- lost cage due to overflow.

	Feb 09	April 09	June 09	June 09 2 weeks	Nov 09	Feb 10	April 10	June 10	June 10 2 weeks
Upstream Lot	94.2 ± 3.4	100	93.3 ± 5.5	81.3 ± 4.1	83.3 ± 6.1	100	99.2 ± 2.0	87.5 ± 11.3	75.0 ± 6.1
Downstream Lot	99.2 ± 1.9	100	94.2 ± 3.4	71.7 ± 10.3	85.0 ± 11.7	95.1 ± 1.2	95.0 ± 4.5	89.2 ± 8.6	73.8 ± 8.2
Riou Viou	98.3 ± 2.4	100	94.2 ± 5.3	90.0 ± 3.5	86.7 ± 4.1	100	94.2 ± 4.9	80.8 ± 12.8	76.3 ± 11.4
Decazeville	99.2 ± 1.8	96.7 ± 3.7	91.7 ± 6.8	-	98.3 ± 2.6	100	89.2 ± 6.6	75.0 ± 9.5	76.3 ± 7.4
Joany	92.5 ± 8.5	65.0 ± 12.9	17.5 ± 11.5	0	13.3 ± 7.5	45.0 ± 8.2	1.7 ± 2.6	0	0

Table 4: Mean physico-chemical characteristics from February 2009 to June 2010 measured at five sites located on the Lot River and its tributaries along a polymetallic pollution gradient (- not measured).

		Feb 09	April 09	June 09	Nov-09	Feb 10	April 10	June 10
T°C	Up,Lot	4.6	7.5	14.7	10.7	6.4	12.1	14.9
	Dn,Lot	4.8	7.5	15.1	10.6	6.2	12.2	15.2
	Riou Viou	3.7	7.9	14.4	9.2	7.7	12.1	15.6
	Decazeville	5.2	9.6	15.7	11.1	8.2	15.8	17.4
	Joany	5.6	9.7	16.2	10.8	8.3	15.5	16.6
C µS/cm	Up,Lot	178	112	127.5	145	162	135	135
	Dn,Lot	220	130	180	157.5	180	177	155
	Riou Viou	210	193	220	270	215	255	207.5
	Decazeville	842	1160	1177	1180	717	1072	1530
	Joany	678	905	890	1552	535	522	1035
NO ₃ ⁻ mg/L	Up,Lot	-	-	4.1	4.8	5.8	3.8	3.6
	Dn,Lot	-	-	5.1	2.4	6.1	5.5	3.9
	Riou Viou	-	-	7.6	9.2	11.5	5.7	6.3
	Decazeville	-	-	6.2	42.4	6.5	25.5	5.2
	Joany	-	-	12.6	14.2	15.5	19.5	8.6
Mg ²⁺ mg/L	Up,Lot	-	-	4.7	4.5	5.4	3.9	4.45
	Dn,Lot	-	-	6.9	5.6	6.65	6.3	6
	Riou Viou	-	-	9.35	10.1	9.15	53.15	8.6
	Decazeville	-	-	94.25	33.1	47.8	66.55	134.6
	Joany	-	-	58.9	78.5	28.6	26.4	64.7
SO ₄ ²⁻ mg/L	Up,Lot	-	-	5	6	6.5	4.5	5
	Dn,Lot	-	-	23	8.5	15	20.5	16.5
	Riou Viou	-	-	22.5	23.5	16.5	273.5	21
	Decazeville	-	-	501.5	149	217	380	672.5
	Joany	-	-	294.5	187	145.5	146	372.5

Figure 1: Location of the Lot River and the five caging sites along a polymetallic contamination gradient. Metal discharge originates from a zinc ore treatment factory. The red star represents the smelting facility, the grey circles, the smelting waste storage areas, the white circle, the town of Decazeville and the black arrows the caging sites.

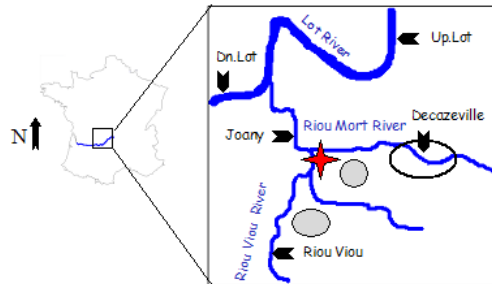


Figure 2: DNA damage in haemocytes, oocytes and spermatozoa from gammarids caged upstream, in the vicinity and downstream a WWTP effluent output in the Ardière River (A), the Bourbre River (B) and the Saône River (C). Each block is the mean % tail DNA from five replicates \pm standard error (error bars). * Significantly different from upstream site value ($p < 0.05$).

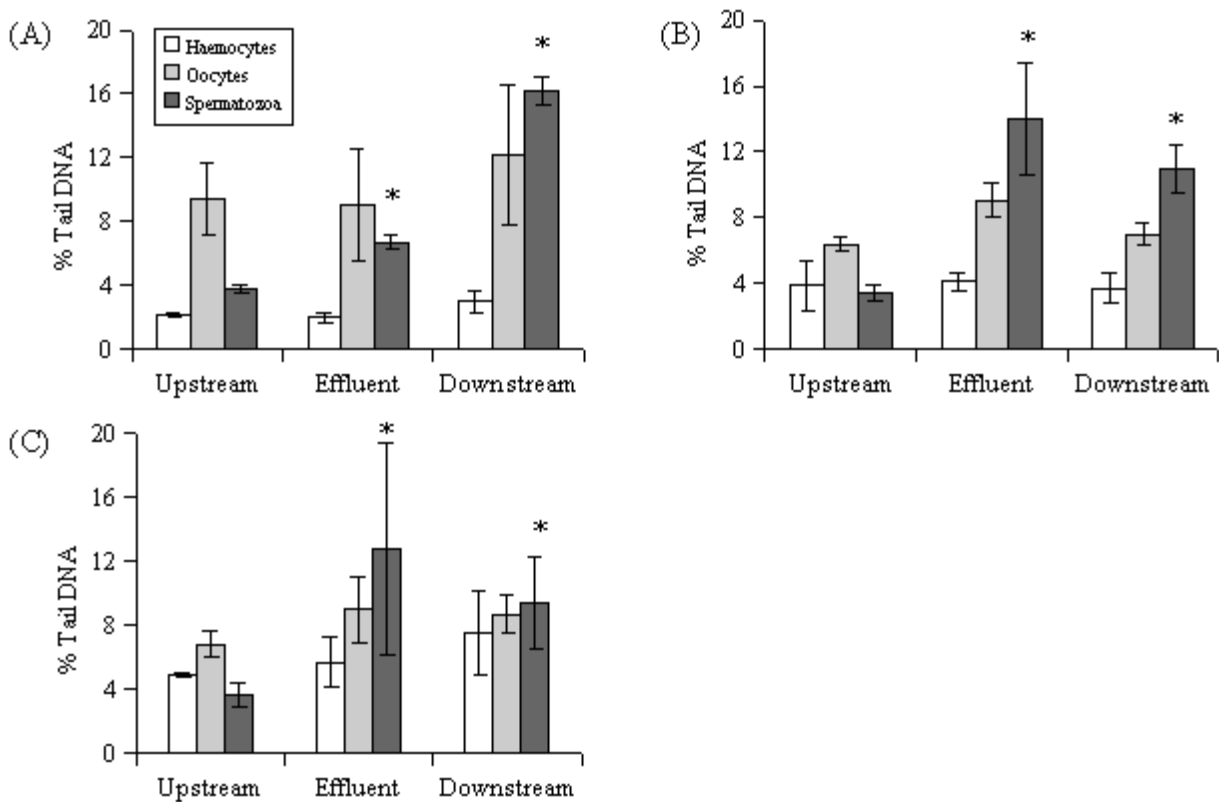


Figure 3: Metal bioaccumulation of Zn (A) and Cd (B) in gammarids at the five studied sites after 7 days of exposure and 2 weeks in June during 2009 and 2010.

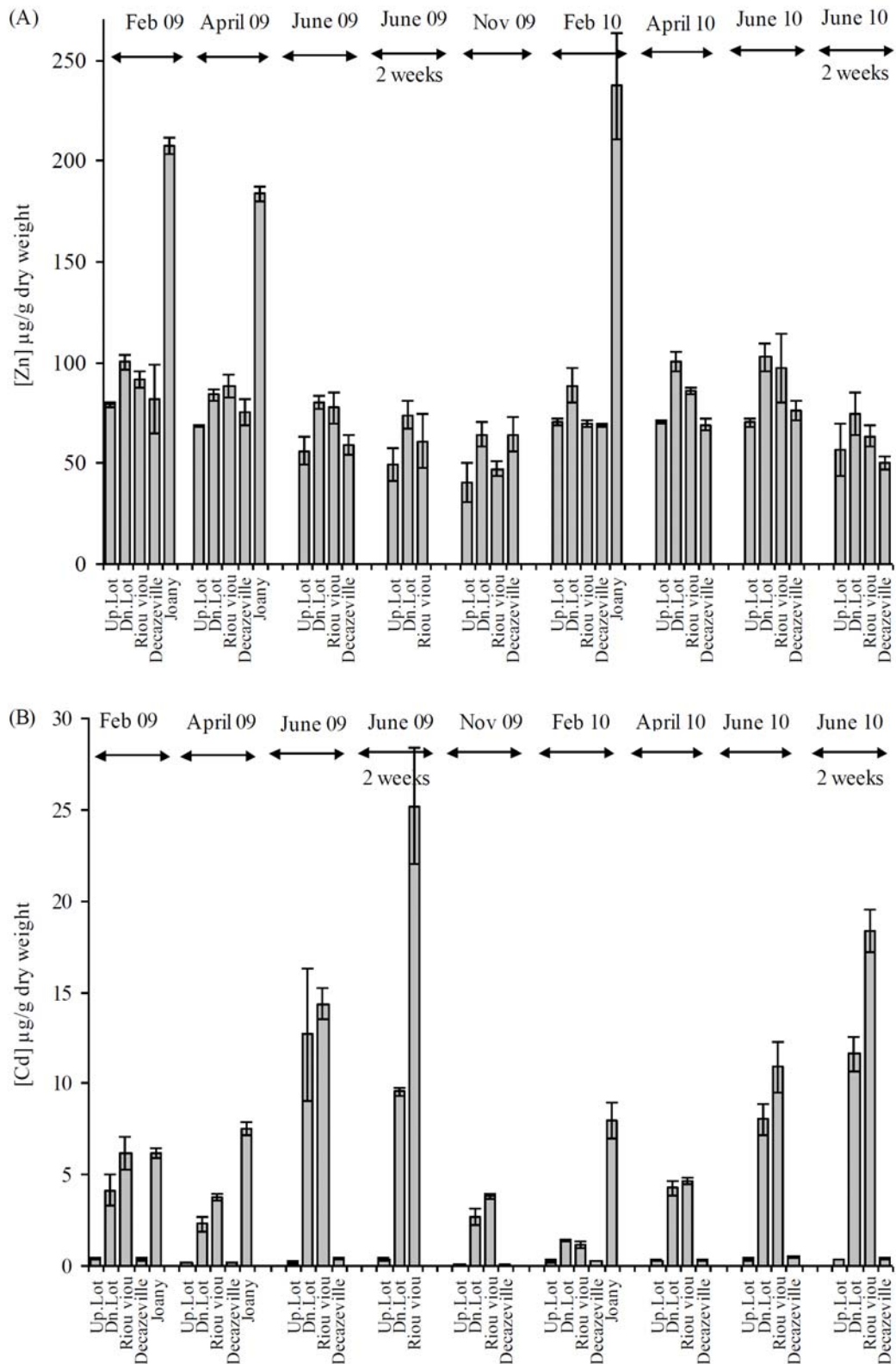


Figure 4: DNA damage in spermatozoa from gammarids caged at five sites surrounding the Lot River after 7 days of exposure and 2 weeks in June 2009 and 2010. Each mark is the mean % tail DNA from five replicates \pm standard error (error bars). * significantly different from upstream site value ($p < 0.05$).

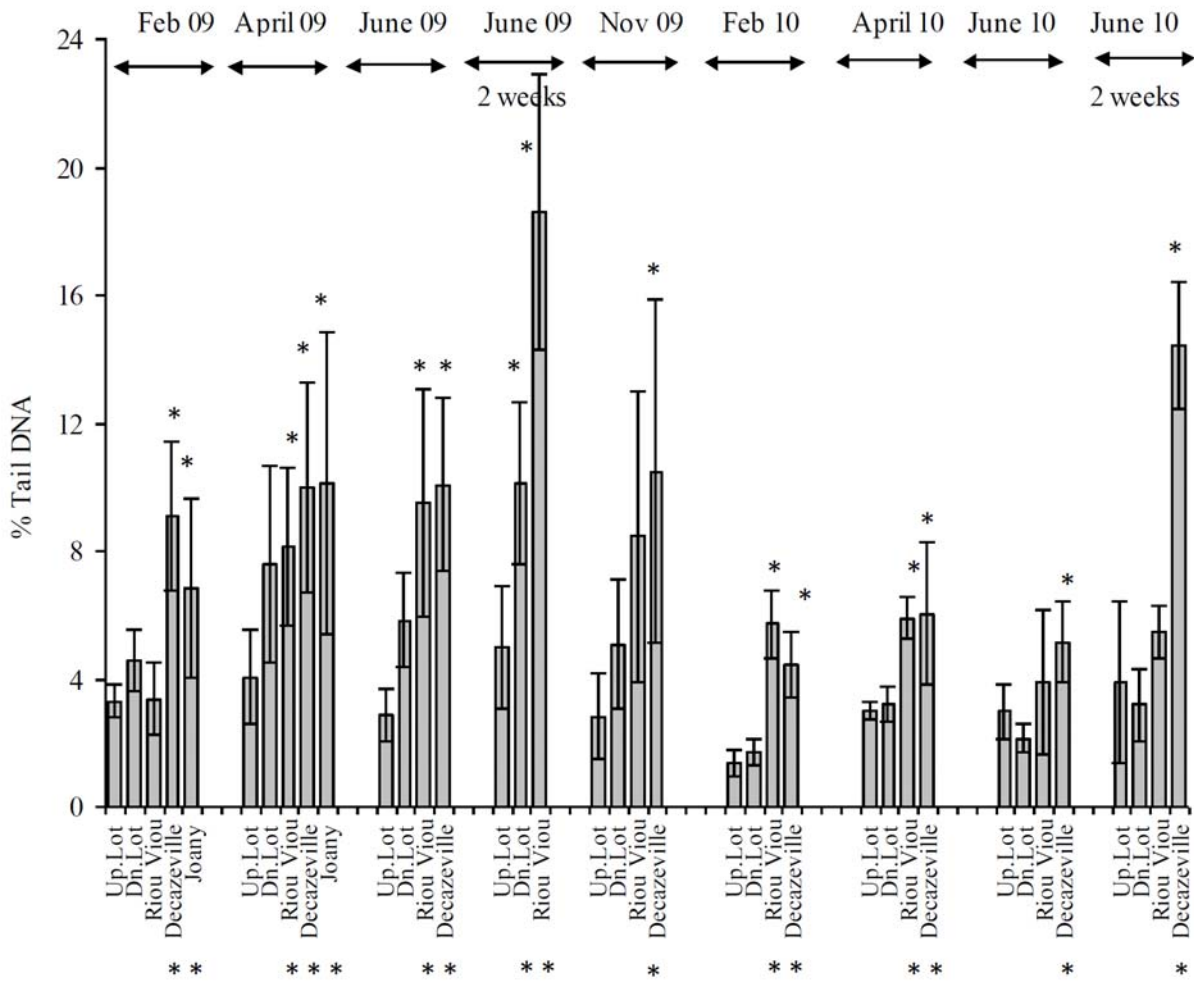
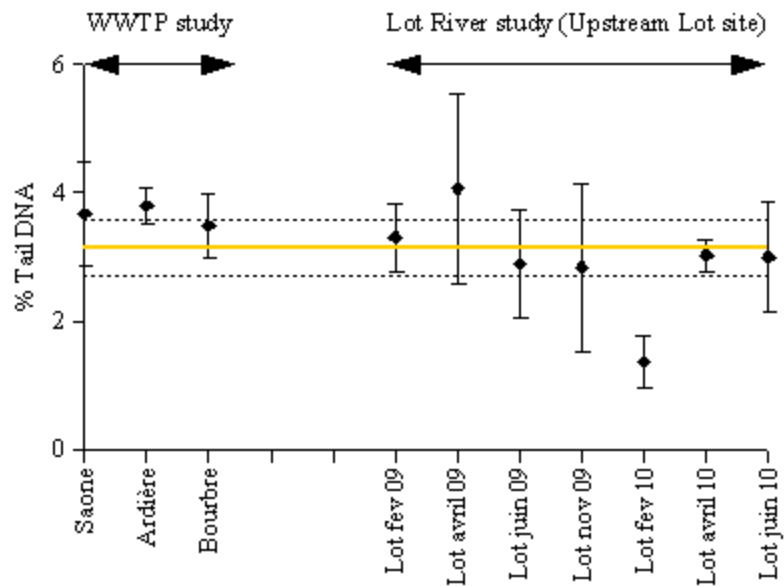


Figure 5: Variation of DNA damage level measured in male *G. fossarum* caged at upstream sites of the Ardère, Bourbre and Saône Rivers and of the Lot River. Data are reported as mean \pm standard deviation ($n=5$). The continuous line represents the mean DNA damage and dotted lines represent the 95% confidence interval (2.7–3.6%).



Chapitre V

5. Synthèse et discussion générale

Le chapitre V est une synthèse concise des principaux résultats obtenus au cours de cette thèse enrichie d'une discussion générale qui résume les travaux détaillés dans les publications issues de ce travail. Pour faciliter la lecture et la compréhension de ce chapitre, nous avons choisi de reprendre certaines illustrations des résultats principaux, extraites des articles correspondants.

L'étude de biomarqueurs en lien direct avec des éléments de la fitness des organismes (croissance, métabolisme, défense et reproduction) dits biomarqueur à vocation écologique (Amiard et Amiard-Triquet, 2008) retient aujourd'hui l'attention des écotoxicologues. En effet, ils peuvent contribuer à une démarche pronostique de l'évaluation de la qualité biologique des milieux aquatiques par le lien fort avec des éléments structurant la population.

Les biomarqueurs de génotoxicité permettent l'évaluation d'un impact des contaminants sur l'intégrité structurelle de l'ADN. En reliant le niveau d'atteinte résultant d'un impact génotoxique à sa signification fonctionnelle, une projection des effets de la contamination à un niveau supérieur d'organisation biologique, la population, peut être envisagée. Le constat actuel est la faiblesse des outils d'évaluation génotoxique disponibles chez les invertébrés (Lee et al., 2003 ; Frenzilli et al., 2009 ; Jha, 2004), alors qu'ils constituent plus de 90 % des espèces vivantes, et jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement et la santé des écosystèmes aquatiques.

Dans ce contexte, le but de ce travail de thèse était d'établir une démarche scientifique permettant de proposer un biomarqueur de génotoxicité, pouvant s'intégrer aux programmes de surveillance des milieux, ainsi qu'aux études d'évaluation du risque environnemental. Cette démarche scientifique s'appuie sur la réalisation de quatre objectifs. Nous proposons ici de résumer et de discuter les résultats des expérimentations mises en œuvre pour tenter de répondre à ces quatre objectifs, listés synthétiquement ci-après :

- 5.1 **Développer le protocole** d'un biomarqueur de génotoxicité chez un invertébré d'eau douce, *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda).
- 5.2 **Valider un protocole standard** permettant de limiter la variabilité naturelle induite par des facteurs biotiques et méthodologiques et établir un niveau de référence tenant compte de l'influence des facteurs abiotiques environnementaux, au delà duquel l'induction de dommages peut être attribuée à un stress de nature chimique.
- 5.3 **Comprendre la signification** de la réponse du biomarqueur en terme d'effet sur la reproduction, fonction clé de la conservation de la population.
- 5.4 **Appliquer le biomarqueur** dans des situations contrastées, pour évaluer sa pertinence comme outil de diagnostic d'un effet génotoxique au laboratoire et dans le milieu naturel.

5.1. Développement d'un biomarqueur de génotoxicité : le test Comet appliqué à trois types cellulaires de gammare

Le premier objectif était d'établir un protocole applicable pour des expérimentations en laboratoire et sur le terrain, par l'acquisition de relations dose-réponse pour les trois types cellulaires sélectionnés exposés à un génotoxique modèle, puis d'évaluer les réponses de chaque type cellulaire pour finalement sélectionner le plus sensible et le plus discriminant.

5.1.1. Choix du modèle biologique

L'espèce *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) a été retenue pour de nombreuses raisons. C'est un bon indicateur de la qualité des écosystèmes aquatiques, utilisé notamment pour le calcul de l'Indice Biologique Global Normalisé (IBGN) (Rinderhagen et al., 2000). Cette espèce est étudiée par de nombreux laboratoires d'écotoxicologie, dans divers scénarios contrastés (*in situ*, *in vivo*, *in vitro*, exposition aux sédiments, par pulse,...) (Kunz et al., 2010). Elle joue un rôle structurel et fonctionnel important au sein de l'écosystème de par sa position clé dans le réseau trophique (action de décomposition et de redistribution de la matière organique) (MacNeil et al., 1997 et 2002). Elle présente également une large répartition géographique (Barnard et Barnard, 1983). Facile à identifier et à échantillonner, elle est présente toute l'année dans de nombreux hydrosystèmes en Europe. Une bonne connaissance de son cycle de reproduction facilite son utilisation.

Au bilan, le gammare *Gammarus fossarum* répond aux critères de sélection d'une espèce **sentinelle** listés dans le chapitre I.1.2.2.

5.1.2. Choix des types cellulaires étudiés

Outre l'originalité de développer un biomarqueur de génotoxicité chez un invertébré d'eau douce, c'est également le choix des types cellulaires étudiés qui renforce l'intérêt scientifique de

ce travail. **Trois types cellulaires ont été sélectionnés : les cellules hémolympatiques, les ovocytes et les spermatozoïdes.**

Les cellules hémolympatiques sont un type cellulaire de choix pour évaluer l'impact d'une pression génotoxique chez les invertébrés. En contact immédiat avec le milieu extérieur, c'est un bon indicateur de l'état physiologique général de l'animal. D'un point de vue technique, l'échantillonnage de l'hémolymphe est aisé et peut être non invasif. Les spermatozoïdes et les ovocytes, dont la réponse à un génotoxique est bien plus rarement étudiée (hormis en toxicologie génétique), ont été choisis pour leur importance cruciale dans la fonction de reproduction. A notre connaissance, seules deux études ont évalué la réponse de cellules germinales femelles d'invertébrés suite à un stress génotoxique : chez le pétoncle *Chlamys farreri* par la méthode d'éluion alcaline (Jing-Jing et al., 2009) et sur les œufs non fécondés d'oursins (*Paracentrotus lividus* et *Sphaerechinus granularis*) par le test Comet (Nahon et al., 2008). Quelques études sont disponibles pour les spermatozoïdes (ou les gonades mâles) de l'huître *Crassostrea gigas* (Gwo, 2003), de moules *Mytilus edulis* et *Perna viridis* (Steinert et al., 1998 ; Nagarajappa et al, 2006 ; Lewis et Galloway, 2009), de l'oursin *Sphaerechinus granularis* (Pruski et al., 2009), et du polychète *Arenicola marina* (Lewis et Galloway, 2008). Toutefois, seule l'étude de Lewis et Galloway (2009) s'est intéressée à coupler les dommages à l'ADN des cellules germinales à d'éventuels effets sur la reproduction. Cette approche, tout à fait novatrice chez les invertébrés et les vertébrés aquatiques est pourtant essentielle pour comprendre la pertinence écologique de la mesure de l'intégrité génétique.

5.1.3. Choix du test d'évaluation de la génotoxicité : le test Comet

Le test Comet en conditions alcalines repose sur une microélectrophorèse de noyaux de cellules isolées, en gel d'agarose sur microlames. C'est un essai applicable à de nombreux types cellulaires, qui ne nécessite qu'un faible nombre de cellules. Le test Comet apparaît aujourd'hui comme une technique efficace et sensible pour l'étude des dommages primaires à l'ADN, dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique (Jha, 2008 ; Dhawan et al., 2009). Le test Comet, bien que fréquemment utilisé sur d'autres invertébrés tels les bivalves, n'est que très peu exploré chez les crustacés (Lee, 2003) et n'a jamais été appliqué chez un crustacé d'eau douce d'intérêt écologique majeur. Bien que l'essai nécessite encore aujourd'hui une harmonisation des

protocoles et une calibration inter-laboratoire, il reste **un des tests les plus pratiques et les plus fiables pour évaluer une induction de lésions génétiques dans le milieu naturel** (Jha, 2008).

5.1.4. Choix du type cellulaire le plus sensible

Pour sélectionner le type cellulaire le plus sensible et le plus discriminant, trois approches ont été mises en œuvre : *in vitro*, *in vivo* et *in situ*. Les premiers essais ont été conduits d'une part sur les tissus cellulaires cibles, exposés à un génotoxique modèle : le méthylméthane sulfonate (MMS) et d'autre part, sur des organismes, exposés au laboratoire pendant 5 jours au MMS. Enfin, des expérimentations sur le terrain ont été menées, en encageant des gammares mâles et femelles, en amont et en aval de rejets de stations d'épuration situées dans trois hydrosystèmes aux caractéristiques physico-chimiques contrastées, et dont l'occupation du sol du bassin versant est différente. Il s'agit de l'Ardière, la Bourbre et la Saône. Les résultats de ces expériences sont présentés dans les publications 1 (expérimentations en laboratoire) et 4 (expérimentations sur le terrain). Dans la figure V-1, extraite de la publication 4, sont présentés les niveaux de dommages à l'ADN des organismes encagés sur l'Ardière, la Bourbre et la Saône.

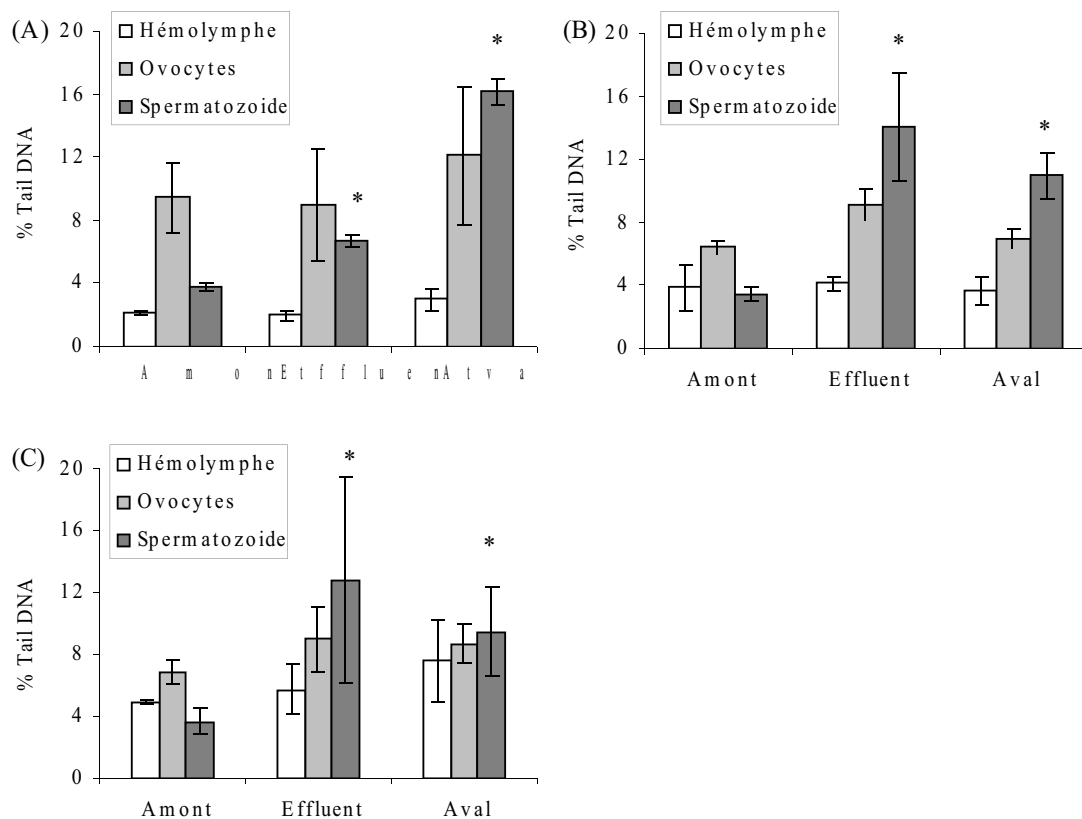


Figure V-1 : Dommages à l'ADN, exprimés en % tail DNA, dans les hémocytes, les ovocytes et les spermatozoïdes de *G. fossarum* engagés sur (A) l'Ardière (B) la Bourbre et (C) la Saône.

* significativement différent de l'amont.

Dans les tableaux V-1 et V-2, sont résumés les niveaux de base obtenus dans les conditions témoins au laboratoire ou pour les sites amont pour les trois types cellulaires d'une part, et les facteurs d'induction dans les conditions d'exposition les plus sévères d'autre part.

Tableau V-1 : Niveau d'endommagement de l'ADN dans les témoins au laboratoire ou obtenus après engagement sur les sites amont (% tail DNA).

	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>			
	Témoin PBS (1 h)	Milieu de stabulation (5 jours)	Témoin (15 jours)	Ardière (15 jours)	Bourbre (15 jours)	Saône (15 jours)
Spermatozoïdes	4,7 ± 2,3	2,8 ± 0,9	2,8 ± 0,9	3,8 ± 0,3	3,5 ± 0,5	3,7 ± 0,8
Ovocytes	9,5 ± 2,7	4,8 ± 2,1	4,8 ± 2,1	9,4 ± 2,3	6,4 ± 0,4	6,8 ± 0,8
Hémocytes	4,6 ± 0,7	2,8 ± 0,7	2,8 ± 0,7	2,2 ± 0,1	3,9 ± 1,5	4,9 ± 0,1

Tableau V-2 : Facteurs d'induction (% tail DNA obtenus pour la plus forte concentration en MMS et au niveau du rejet de STEP/ % tail DNA dans les témoins ou sites amont).

	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In situ</i>		
	10 mM MMS (1 h)	100 µM MMS (5 jours)	Ardière (15 jours)	Bourbre (15 jours)	Saône (15 jours)
Spermatozoïdes	10,8	24,8	4,3	4,0	3,5
Ovocytes	4,2	4,6	1,3	1,4	1,3
Hémocytes	8,9	10,8	1,4	1,1	1,2

Suite à ces expériences *in vitro* et *in vivo*, une relation dose-effet significative, après exposition au MMS, pour les trois types cellulaires étudiés a permis de valider le protocole mis en œuvre. De plus, pour toutes les expérimentations, la bonne répétabilité des mesures pour tous les types cellulaires et le faible endommagement de l'ADN dans les témoins signe la qualité du prélèvement des cellules. Pour les expérimentations *in situ*, il a été possible de discriminer les stations en fonction de leur potentiel génotoxique. Malgré la bonne répétabilité obtenue avec chaque type cellulaire, seuls les spermatozoïdes ont permis une discrimination significative des stations impactées de chaque rivière. Pour la Bourbre et la Saône, le rejet a induit le niveau de dommages à l'ADN le plus élevé. A l'aval, la dilution des intrants s'est traduite par une diminution de l'atteinte génotoxique. Le profil de dommages n'est pas similaire à ceux observés sur la Saône et la Bourbre. La station aval a engendré des taux de dommages à l'ADN 2,5 fois supérieur à ceux mesurés au niveau du rejet (Figure V-1). Cette génotoxicité plus élevée pourrait être expliquée par la présence supplémentaire de produits phytosanitaires viticoles, apportés par le lessivage des sols viticoles, dont la génotoxicité a déjà été démontrée *in situ* sur larves de truite *Salmo trutta fario* encagées au niveau de la Morcille, un affluent de l'Ardière (Bony et al., 2008).

Les cellules cibles étant différentes aussi bien du point de vue fonctionnel que structural, les réponses à un même contaminant sont susceptibles d'être différentes, ce que confirme notre travail. On observe un endommagement maximal pour les spermatozoïdes puis dans l'ordre, pour les ovocytes et pour les cellules hémolympatiques. Cette différence de réponse peut s'expliquer par la possibilité ou non pour la cellule de mettre en place un système de réparation, par sa capacité de métabolisation du toxique, par la vascularisation du tissu cellulaire, et par la structure même de la cellule, qui conditionnent la fréquence et l'intensité du contact entre le toxique et la cellule elle-même.

5.1.5. Conclusion

Ces expériences ont validé la faisabilité du test Comet chez un invertébré d'eau douce d'intérêt écologique, l'amphipode *Gammarus fossarum*. Le test a été développé avec succès, *ex vivo* et *in vivo*, sur trois types cellulaires impliqués dans des fonctions biologiques majeures. Ces expériences ont également mis en lumière la variabilité des réponses inter-cellulaires. Le niveau basal de dommages à l'ADN des spermatozoïdes est plus bas que les niveaux de dommages à l'ADN des hémocytes et des ovocytes dans les témoins. Les spermatozoïdes sont également plus discriminants d'un événement stressant comme en témoignent les facteurs d'induction plus élevés que ceux des ovocytes et des cellules hémolympatiques. Le test Comet sur spermatozoïdes est applicable *in situ* pour l'évaluation du potentiel génotoxique d'un site naturel dans des scénarios d'expositions réalistes. Au bilan, **les spermatozoïdes ont été choisis comme type cellulaire modèle pour révéler un impact génotoxique, au laboratoire ou sur le terrain par des méthodes d'encagement.**

5.2. Validation d'un protocole standard : variabilité naturelle et niveau de base du biomarqueur

La méthode d'encagement des organismes mâles a été choisie pour évaluer la génotoxicité dans le milieu naturel. Il est possible, par cette approche, d'étudier des sites où les organismes sont absents, de maîtriser les traits d'histoire de vie des organismes exposés, et de s'affranchir de l'influence de l'habitat. L'évaluation de la génotoxicité sur différentes espèces de poissons, par des méthodes d'encagement, en milieu marin et dulçaquicole a été réalisée avec succès par de nombreux auteurs depuis près de 20 ans (De Flora et al., 1993 ; Theodorakis et al., 1999 ; Winter et al., 2004 ; Bony et al., 2008 ; Barbee et al., 2008 ; Klobučar et al., 2010). En revanche, les études ayant recours à l'encagement d'invertébrés pour évaluer la génotoxicité d'un milieu naturel ont porté exclusivement sur des mollusques (bivalves essentiellement) marins et très rarement dulçaquicoles (Bolognesi et al., 2004 ; Nigro et al., 2006 ; Rank et al., 2007 ; Štambuck et al., 2009 ; Guidi et al., 2010).

La première étape indispensable à la validation du biomarqueur sur le terrain est de pouvoir interpréter sans ambiguïté sa réponse. Pour limiter la variabilité de la réponse, un protocole standard d'encagement a été déterminé, d'une part en sélectionnant un état de maturation standard de l'organisme, et d'autre part en évaluant l'influence des conditions d'exposition au laboratoire et sur le terrain. Dans un deuxième temps, l'influence de facteurs environnementaux sur la réponse du biomarqueur a été évaluée en laboratoire et sur le terrain. Enfin, un niveau de référence et une valeur seuil, au delà de laquelle il est possible de confirmer que l'origine des dommages à l'ADN est bien liée à la présence de contaminants dans le milieu, ont été définis.

5.2.1. Choix de l'état de maturation du gammare et d'un protocole standard : influence des facteurs biotiques et méthodologiques

Dans la Note 2 du chapitre IV.1, la spermatogenèse a été brièvement décrite. Il a été montré que les mâles en précopula contenaient un maximum de spermatozoïdes. Cette étude a également confirmé que la morphologie des spermatozoïdes était une caractéristique intrinsèque de leur état de maturité et qu'il était ainsi possible de s'adresser exclusivement à ce type cellulaire. Nous avons ainsi distingué deux statuts reproducteurs différents : des mâles matures, en précopula et dont la quantité de spermatozoïdes est maximale, et des mâles en cours de spermatogenèse.

- **Facteur biotique : influence du statut reproducteur**

Le statut reproducteur et la période de gamétogenèse peuvent influencer la susceptibilité d'un organisme vis-à-vis d'un stress génotoxique, et engendrer une réponse différente. Akcha et al. (2004) ont montré que pendant la période de ponte, le niveau de dommages à l'ADN des érythrocytes de limande permettait une discrimination significative des sites naturels étudiés, alors que pendant la vitellogenèse, aucune différence significative entre les niveaux de dommages à l'ADN n'était observée pour les différents sites. Gorbi et al. (2008) ont suggéré qu'une augmentation de la fréquence des micronoyaux mesurée sur des moules encagées, sur des sites contaminés et des sites témoins, était associée à la période de ponte, période pendant laquelle l'activité métabolique de l'organisme est maximale. Afin d'étudier la réponse de notre biomarqueur en fonction du statut reproducteur du gammare, des mâles en cours de

spermatogénèse et des mâles matures ont été exposés au MMS pendant 7 jours, le temps de couvrir la durée de la spermatogénèse. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure V-2, extraite de la publication 3.

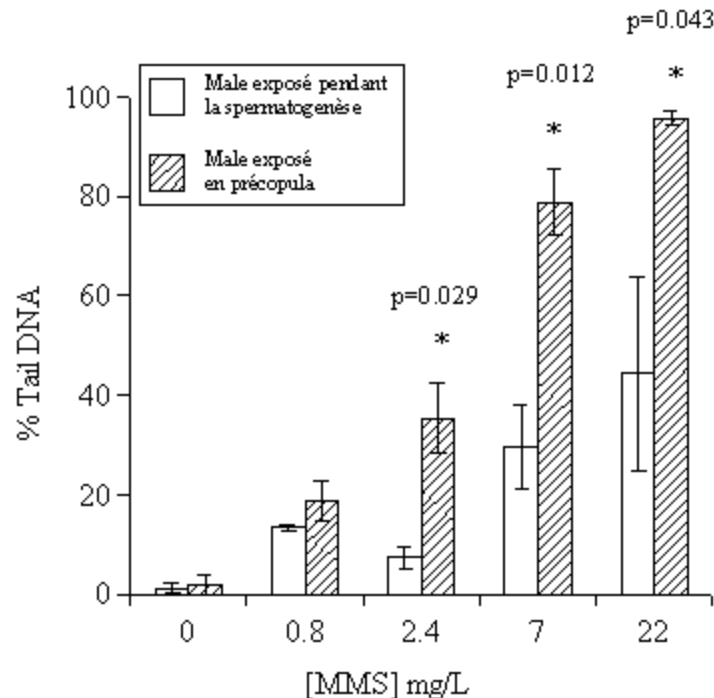


Figure V-2 : Dommages à l'ADN des spermatozoïdes de *G.fossarum* exposés au MMS, au cours de la spermatogénèse et en précopula (matures) (significativement différent du témoin pour $p < 0,05$).

Les mâles matures présentent des niveaux de dommages à l'ADN de 2 à 4,5 fois supérieurs aux mâles exposés au cours de la spermatogénèse, excepté pour les conditions témoins. De plus, la variabilité de la réponse est moindre avec des mâles exposés matures. Cette différence peut être due au fait que les spermatozoïdes de mâles exposés au cours de la spermatogénèse sont exposés moins longtemps au MMS que les spermatozoïdes de mâles matures. Il y aurait ainsi un effet de dilution chez les mâles en cours de la spermatogénèse, la production de spermatozoïdes étant continue. Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus lors du suivi de la cinétique de dommages, validant le fait qu'il y a un effet significatif du temps d'exposition sur la réponse des spermatozoïdes en terme de dommages à l'ADN (publication 3).

La mesure des dommages à l'ADN est donc optimisée lorsque c'est un mâle mature, c'est à dire en précopula, qui est exposé, puisque sa réponse à un stress génotoxique est plus intégratrice et moins variable. De plus, le précopula est un critère très simple de sélection. C'est en outre un critère de sélection non limitant puisque contrairement aux bivalves et à la plupart des poissons,

le cycle de reproduction de *G. fossarum* couvre toute l'année ou presque (Roux, 1970), avec toutefois deux optimums de reproduction de Décembre à Mai et d'Août à Novembre (Hynes, 1955 ; Adam, 2008 ; § I.3.3.2). Cela permet de disposer d'organismes tests quelle que soit la saison. **L'état de maturation standard qui a été choisi est donc celui d'un mâle en précopula.**

- **Facteur méthodologique**

La réponse à un stress génotoxique est également fonction des conditions d'exposition. L'évaluation des conditions de maintien en laboratoire et d'exposition est une étape importante de la validation d'un protocole standard, permettant de limiter la variabilité et d'améliorer la fiabilité de l'interprétation du biomarqueur (voir § I.1.2.4). En effet, Torres de Lemos et al. (2001) ont constaté que le maintien du vairon et les conditions d'exposition en laboratoire entraînaient un stress, responsable d'une augmentation significative des micronoyaux dans les érythrocytes d'organismes témoins. Des effets néfastes des conditions de maintien et d'exposition en laboratoire sur la réponse de plusieurs biomarqueurs ont également été mis en évidence chez la crevette grise *Crangon crangon* L. (Menezes et al., 2006). Le tableau V-3 suivant présente les niveaux de dommages à l'ADN mesurés dans les gammars témoins au laboratoire et sur le terrain, au niveau des sites amont, pour des durées de maintien ou des temps d'exposition croissants.

Tableau V-3 : Niveaux de base dans les conditions témoins et aux sites amont en fonction du temps d'exposition (% tail DNA).

Laboratoire (condition témoin)		Terrain (encagement au site amont)	
Durée d'exposition	% tail DNA	Durée d'exposition	% tail DNA
2 jours 4 jours 7 jours 15 jours 21 jours	2,6 ± 2,5 2,3 ± 1,6 2,2 ± 1,1 1,9 ± 1,1 1,2 ± 1,0	Bourbre	15 jours 6,1 ± 2,9
		amont	21 jours 4,1 ± 1,0
		Lot amont	7 jours 2,9 ± 0,8
		(Juin 2009)	15 jours 5,0 ± 1,9
		Lot amont	7 jours 3,0 ± 0,8
		(Juin 2010)	15 jours 3,9 ± 2,5

Au laboratoire, il est intéressant de constater que les niveaux de dommages dans les témoins sont très bas (moins de 3 % tail DNA) et que ce niveau de base ne souffre d'aucune dérive, ce

qui assure que les conditions de maintien et d'exposition des organismes n'engendrent pas de stress additionnel. Lors des expérimentations *in situ*, malgré une variabilité des résultats plus importante qu'au laboratoire, les niveaux de dommages restent bas et aucun effet significatif du temps d'exposition n'est constaté.

Aucun effet artéfactuel des conditions de maintien ou d'exposition sur la réponse du biomarqueur n'a été observé au cours de ce travail. Le niveau de dommages à l'ADN est inférieur à 3% tail DNA quel que soit la durée de maintien au laboratoire, et reste proche de cette valeur sur le terrain, validant des conditions optimales d'exposition pour les expérimentations ultérieures.

5.2.2. Variabilité naturelle de la réponse du biomarqueur et établissement d'un niveau de référence

L'une des principales limites d'utilisation des biomarqueurs est la variabilité inhérente de toute réponse biologique à des facteurs non toxiques. Il a été montré que de nombreux facteurs environnementaux pouvaient influencer cette réponse, comme les variations saisonnières, la température, la salinité, le pH, la teneur en oxygène dissous. Si les biomarqueurs de génotoxicité peuvent être considérés comme des outils intégrateurs et pertinents dans le cadre d'expérimentations sur le terrain, leur développement nécessite une connaissance approfondie de leur variabilité naturelle. En effet, les dommages à l'ADN ne sont pas exclusivement liés à une exposition à des contaminants d'origine anthropique, mais peuvent être engendrés par des facteurs physiques ou chimiques environnementaux (Dixon et al., 2002). Dans ce travail, la variabilité naturelle de la réponse du biomarqueur a été appréhendée par une double approche, laboratoire-terrain. La première, en laboratoire, a consisté à évaluer l'influence de deux facteurs abiotiques que sont la température et la conductivité de l'eau, la deuxième dans le milieu naturel, a permis d'évaluer l'influence des variations saisonnières par le suivi mensuel de deux populations autochtones. Enfin, il a été possible d'établir un niveau de base, accepté comme une valeur de référence, permettant dans le cadre d'expérimentations dans le milieu naturel, de passer outre l'approche classique amont-aval, pour laquelle il n'est pas toujours aisé de choisir une référence amont, aux caractéristiques physico-chimiques semblables aux autres sites étudiés, et dont la contamination est faible (Flammarion et Garric, 1997).

5.2.2.1. Influence de facteurs abiotiques sur la variabilité de la réponse

L'influence de la température et de la conductivité a été évaluée sur le niveau de base des dommages à l'ADN des spermatozoïdes de *G. fossarum*. La gamme de température a été choisie en fonction des températures moyennes, minimales et maximales rencontrées sur la Bourbre et l'Ardière et plus généralement, dans la majorité des hydrosystèmes Rhône-alpins hébergeant des populations de gammares (de 6 à 24°C). Dans une démarche similaire, deux conductivités ont été testées : 300 et 600 µS/cm. Après 15 jours d'exposition dans ces conditions, **aucun effet de la température ni de la conductivité sur le niveau de base des dommages à l'ADN n'a été observé au laboratoire, celui-ci restant proche de 3% tail DNA.**

L'influence de la variation saisonnière sur la réponse des biomarqueurs de génotoxicité a été démontrée chez les invertébrés par plusieurs auteurs, s'intéressant principalement aux dommages à l'ADN chez les bivalves. Un effet saison pour les sites contaminés, bien que peu marqué, a été montré chez *Mytilus edulis*, tandis que cette saisonnalité ne se traduit pas par une variabilité du niveau de base sur les sites de référence (Rank et al., 2005). Les auteurs ont toutefois établi des corrélations entre le pH, la teneur en oxygène dissous et la température avec le niveau de dommages à l'ADN mesurés sur les sites de référence. Un effet de la saison et d'autres facteurs abiotiques environnementaux sur l'intégrité de l'ADN a également été enregistré chez d'autres espèces de bivalves (*Tapes philippinarum*, *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus edulis*), prélevés dans des sites de référence (Bocchetti et al., 2008 ; Shaw et al., 2000).

Afin de déterminer la variabilité des niveaux de dommages à l'ADN des spermatozoïdes en fonction de la saison, deux populations de *G. fossarum* provenant de deux sites de référence aux caractéristiques physico-chimiques contrastées ont été choisies, comme il a été récemment recommandé par Hanson et al. (2010). Les résultats de la mesure mensuelle de l'intégrité génétique des spermatozoïdes de mâles matures sont présentés dans la figure V-3, extraite de la publication 3. Aucun effet du bassin versant n'a été observé puisque les valeurs mesurées sur la Bourbre et l'Ardière sont similaires. De plus, aucun effet saison n'a été constaté sur le niveau de dommages à l'ADN.

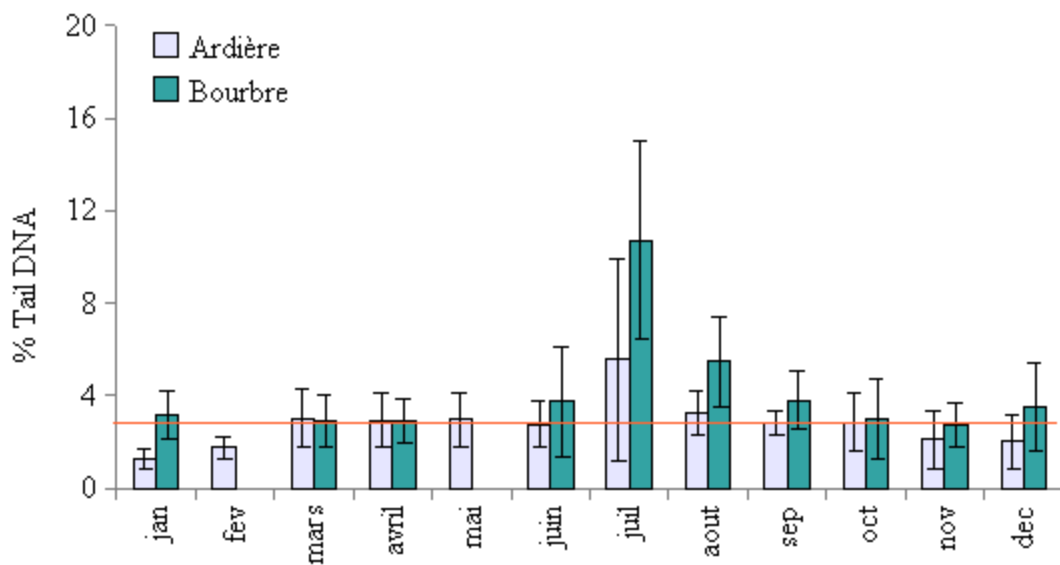


Figure V-3 : Suivi mensuel des dommages à l'ADN sur spermatozoïdes de *G. fossarum* prélevés dans deux sites de référence (N=15). La ligne orange représente la moyenne annuelle calculée à partir des résultats des deux sites, hormis la valeur de juillet sur la Bourbre. * significativement différent de la valeur moyenne.

Il convient toutefois de souligner une augmentation significative des dommages au mois de Juillet, qui atteignent une valeur trois fois supérieure à la moyenne annuelle. Cette augmentation estivale du niveau de dommages correspond à une période d'étiage sévère et à des températures extrêmes, proches des températures létales pour le gammare (température de 24°C en Juillet sur la Bourbre). De récentes études menées en parallèle ont montré une diminution significative de la population adulte de *Gammarus fossarum* sur cette même station suite à cette période d'étiage sévère (thèse de R. Coulaud, en cours). Toutefois, pour les deux sites étudiés, aucune relation significative n'a été établie entre l'intégrité génétique et les principaux facteurs physicochimiques, à savoir la température, le débit, la conductivité et le pH. Au bilan, il s'agit plus d'un stress global que d'un effet de la température seule.

5.2.2.2. Établissement d'un niveau de base

Comme aucune variabilité saisonnière significative n'a été constatée, il a été possible d'établir un niveau de référence calculé sur la moyenne des valeurs des deux sites pendant les 12 mois, exceptée l'unique valeur significativement différente obtenue en Juillet pour la Bourbre. Nous avons ainsi pu proposer une **valeur de référence** et une **valeur seuil**, correspondant à

l'intervalle de confiance à 95 %, au-delà de laquelle, le niveau de dommages à l'ADN révèle une exposition à un stress génotoxique, pour des conditions compatibles avec la biologie du gammare. **Le niveau de référence de notre biomarqueur de génotoxicité est de 3% et la valeur seuil est de 3,5% (valeur exprimée en % tail intensity).**

L'intérêt d'utiliser ce modèle biologique et ce type cellulaire pour l'évaluation de la génotoxicité dans le milieu naturel est renforcé par cette valeur de référence très basse et sa très faible variabilité, qu'il n'est pas possible d'obtenir pour toutes les espèces. Par exemple, chez *Mytilus edulis*, l'un des invertébrés les plus couramment adopté pour réaliser le test Comet, une forte variabilité du niveau de base et les valeurs parfois élevées de celui-ci ont été rapportées par plusieurs auteurs (Tableau V-4). Cette variabilité a été attribuée à de nombreux facteurs tels que l'hétérogénéité des sites de prélèvements, (ou des conditions de maintien en aquaculture), les conditions d'acclimatation et d'exposition en laboratoire ou encore le transport des organismes.

Tableau V-4 : Niveaux de base dans les conditions témoins et aux sites amont en fonction du temps d'exposition (% tail DNA).

Collection	Temps d'acclimatation au laboratoire	Durée de l'exposition	Niveau de dommages à l'ADN dans les témoins (% tail DNA)	Reference
Site non contaminé	-	5 semaines	8%	Taban et al., 2004
Site non contaminé	7 jours	4 jours	4-9%	Jha et al., 2005
Site non contaminé	15 jours	7 jours	6%	Hagger et al., 2005
Site non contaminé	10 jours	7 jours	10%	Mamaca et al., 2005
Site non contaminé	15 jours	3 jours	9.8%	Tran et al., 2007
Aquaculture	-	10 jours	10-15%	Emmanouil et al., 2007

5.2.3. Conclusion

L'utilisation appropriée d'un biomarqueur nécessite d'une part, une bonne connaissance de la variabilité naturelle de sa réponse liée aux facteurs environnementaux biotiques et abiotiques, et d'autre part, la définition de valeurs de référence. Nous avons d'abord proposé un stade de maturité sexuelle pour l'organisme et un protocole standard pour lesquels la variabilité de la réponse est minimale. Aucune variabilité relative à la saison ou aux caractéristiques physico-

chimiques des sites de référence n'a été montrée. De même, au laboratoire, aucun effet de la température ni de la conductivité n'a été révélé sur le niveau de base des dommages à l'ADN. Toutefois, il aurait été intéressant de tester au laboratoire l'influence de facteurs abiotiques supplémentaires tels que l'oxygène, afin de comprendre le rôle de ce paramètre qui, couplé au paramètre température pourrait permettre d'expliquer l'augmentation des dommages à l'ADN pendant les mois estivaux.

Suite à ces résultats, un niveau de référence a été établi, en tenant compte de la variabilité spatio-temporelle de la réponse du biomarqueur. Au delà de la valeur de référence de 3,5 % (% tail DNA), il est possible d'attribuer les dommages à l'ADN à un stress chimique de nature anthropique, permettant ainsi de limiter les risques d'une interprétation erronée de la réponse du biomarqueur.

5.3. Signification de la réponse du biomarqueur : lien entre dommages à l'ADN des spermatozoïdes et effet sur la reproduction

5.3.1. Interprétation de la réponse du biomarqueur en terme d'effet sur la reproduction : expérimentations au laboratoire

Dans le but de relier les réponses observées au niveau sub-individuel à un trait de vie, la relation pouvant exister entre l'atteinte génotoxique des spermatozoïdes et une altération de la reproduction a été étudiée. Bien que plusieurs études se soient intéressées à évaluer l'intégrité génétique du sperme chez plusieurs organismes aquatiques vertébrés et invertébrés, peu d'entre elles ont relié ces dommages à l'ADN à un effet direct sur la reproduction.

Dans ce travail, des gammares matures ont été exposés à deux génotoxiques modèles, le MMS et le dichromate de potassium, puis transférés en milieu non contaminé juste avant la fécondation. Après 21 jours en milieu non contaminé, plusieurs critères quantitatifs et qualitatifs permettant d'évaluer un effet sur la reproduction ont été observés. La fécondité, les anomalies

embryonnaires sévères et non viables et le stade de développement des embryons ont été évalués. Un retard sévère de développement de l'embryon a été comptabilisé comme une anomalie.

Après avoir sélectionné le pourcentage d'anomalies embryonnaires par femelle comme le paramètre reflétant le mieux un effet sur la reproduction, nous avons démontré que plus l'intégrité génétique des spermatozoïdes est altérée, plus le taux d'anomalies embryonnaires est élevé, quel que soit le contaminant (Figure V-4, extraite de la publication 2). **Les résultats de ces expériences ont montré qu'une pérennisation du message toxique existe.**

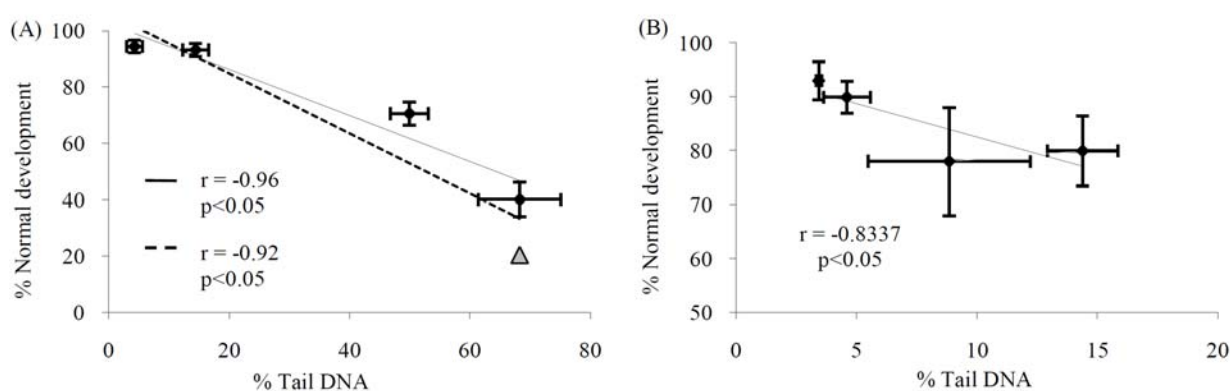


Figure V-4 : Lien entre dommages à l'ADN des spermatozoïdes et le pourcentage d'anomalies sur les embryons issus de parents exposés au MMS (A) et au $K_2Cr_2O_7$ (B). Le triangle gris représente le pourcentage d'embryons anormaux recalculé par rapport au nombre d'embryons dans le contrôle

Il convient de souligner que le lien établi entre les dommages à l'ADN des spermatozoïdes et le taux d'anomalies embryonnaires est différent en fonction du type de contaminant génotoxique. Dans le cas du MMS, aucune anomalie embryonnaire n'est détectée pour des dommages à l'ADN des spermatozoïdes inférieurs à 20 % tail DNA, alors que dans le cas du $K_2Cr_2O_7$, les anomalies sont significatives dès une valeur de dommages de 10 % tail DNA. Il est envisageable que le mode d'action du contaminant entraîne des réponses cellulaires génétiques mais aussi physiologiques (détoxification, réparation) différentes, se traduisant par le transfert d'un message toxique différent.

En parallèle à ces travaux, nous avons étudié la cinétique de dommages à l'ADN des spermatozoïdes et des ovocytes, après transfert des organismes en milieu non contaminé, comme étant le reflet des capacités de réparation. Les résultats de ces expériences sont présentés dans les figures V-5 et V-6, extraites de la publication 2.

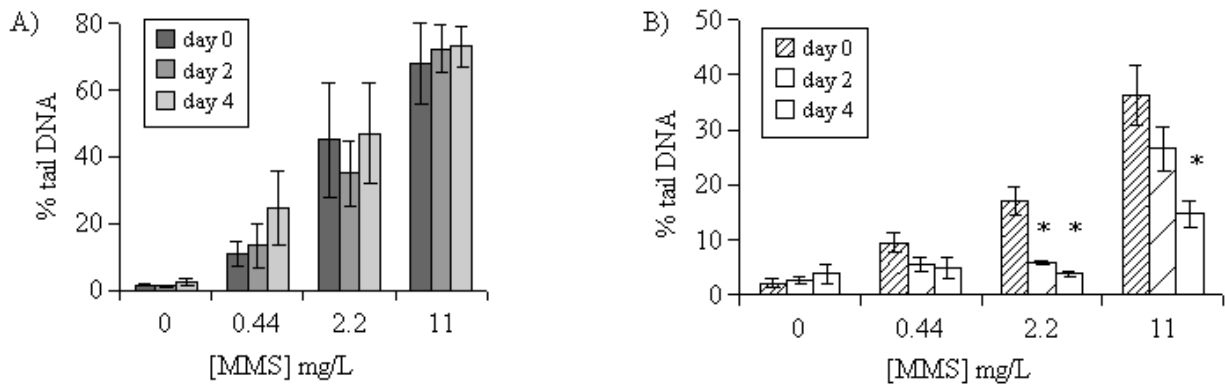


Figure V-5 : Niveau de dommages à l'ADN après 5 jours d'exposition au MMS (Jour 0), suivis de 2 jours et 4 jours de récupération en milieu non contaminé (Jour 2 et Jour 4) dans les spermatozoïdes (A) et les ovocytes (B). (*) significativement différent du Jour 0.

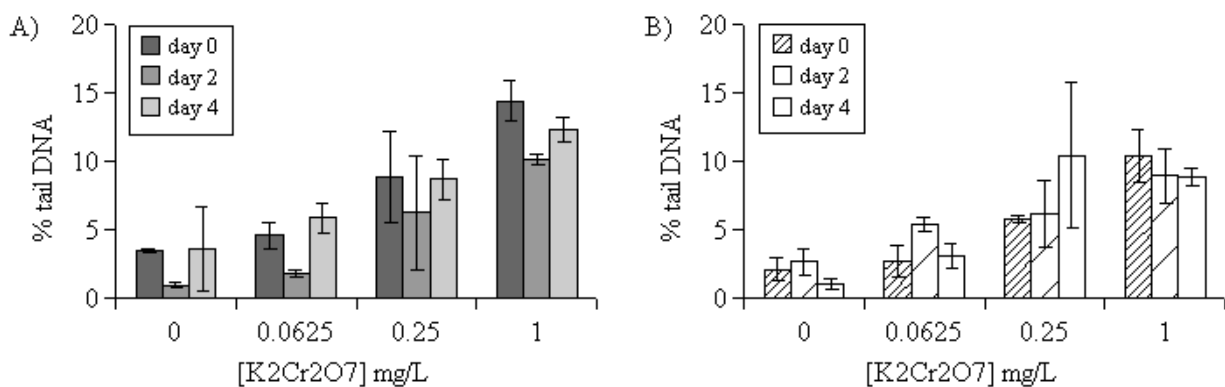


Figure V-6 : Niveau de dommages à l'ADN après 5 jours d'exposition au K₂Cr₂O₇ (Jour 0), suivis de 2 jours et 4 jours de récupération en milieu non contaminé (Jour 2 et Jour 4) dans les spermatozoïdes (A) et les ovocytes (B). * significativement différent du Jour 0.

Aucune réparation des lésions génétiques pour les spermatozoïdes n'a été observée, tandis qu'une diminution des dommages de l'ovocyte, observée dans le cas du MMS, suggère de fortes capacités de réparation, comme indiqué par Palmqvist et al. (2003). Ces résultats sont en accord avec ceux d'Aitken et De Iuliis (2007) qui ont montré que les spermatozoïdes de mammifères possédaient des capacités restreintes de réparation de l'ADN. De plus, nos résultats renforcent l'idée d'un transfert de dommages d'origine paternel, plutôt que maternel, comme souligné dans

les recherches de Hales et al. (2005), qui ont montré que la majorité des mutations dans les embryons murins étaient d'origine paternelle. Dans le cas du dichromate de potassium, l'effet génotoxique mesuré dans les ovocytes d'organismes transférés en milieu non contaminé est vraisemblablement imputable à l'action de ce composé sur les enzymes de réparation de l'ADN, qui ont pu être bloquées. Il a été montré chez l'homme et certains mollusques la faculté d'inhibition des systèmes de réparation du chrome (Hodges and Chipman, 2002, Emmanouil et al., 2007). Ainsi, l'inactivation des systèmes de réparation présents habituellement dans les ovocytes pourrait être l'une des causes de l'augmentation des malformations embryonnaires pour des niveaux d'endommagement paternels inférieurs au seuil de 20% tail DNA, préalablement observé dans le cas du MMS. Il a en effet été démontré que l'ovocyte fécondé a la capacité de réparer un ADN paternel endommagé jusqu'à un certain niveau de dommages (Ahmadi et Ng, 1999).

Suite à ces expérimentations, nous avons pu établir un lien direct de cause (dommages du matériel génétique induits par une exposition à deux génotoxiques ayant un mode d'action différent) à effet (altération du développement embryonnaire et du succès de la reproduction).

5.3.2. Interprétation de la réponse du biomarqueur en terme d'effet sur la reproduction : expérimentations en mésocosme et sur le terrain

Des expérimentations complémentaires ont été menées en exposant les organismes à des conditions plus réalistes de contamination, en mésocosme (dans les canaux expérimentaux de l'INRA de Thonon-les-Bains) et dans le milieu naturel, sur des sites précédemment caractérisés pour leur potentiel génotoxique (la STEP de Bourgoin sur la Bourbre). Les principaux résultats de ces expériences sont présentés dans les figures V-7 et V-8 (Note 3 et publication 2).

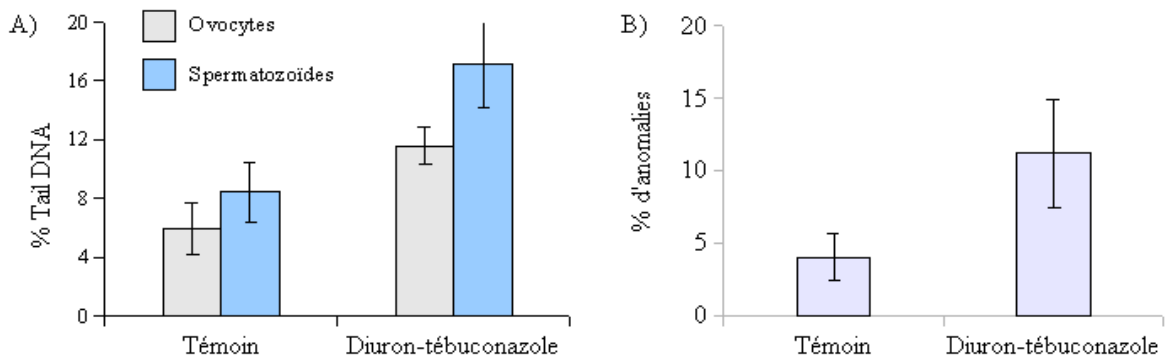


Figure V-7 : (A) Dommages à l'ADN des spermatozoïdes et des ovocytes après exposition à un mélange diuron-tébuconazole et (B) pourcentage d'anomalies des embryons issus de parents exposés à ces pesticides. * significativement différent du témoin.

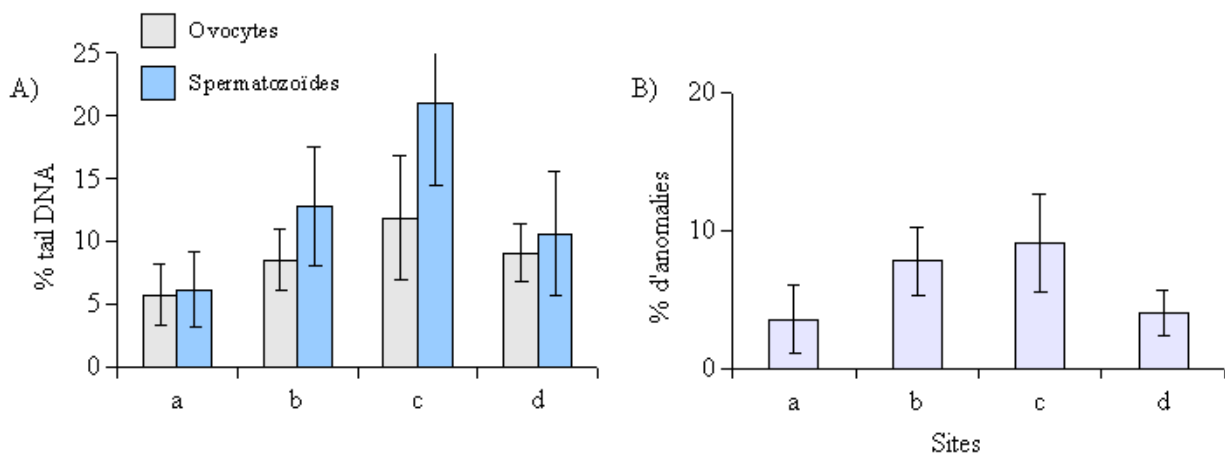


Figure V-8 : (A) Dommages à l'ADN des spermatozoïdes et des ovocytes après exposition *in situ* sur 4 sites de la Bourbre, dont le rejet de STEP (station c) et (B) pourcentage d'anomalies des embryons issus de parents exposés à ces sites. * significativement différent de la station amont a.

Des niveaux de dommages à l'ADN de près de 20% tail DNA ont été mesurés sur les spermatozoïdes pour les deux scénarios d'exposition, se traduisant par une induction du taux d'anomalies embryonnaires, sans toutefois que cet effet ne soit significatif. Ces résultats restent cohérents avec ceux obtenus lors d'une exposition au MMS, donnant du poids au seuil d'effet proposé de 20 % tail DNA, dans la limite du mode d'action investigué. L'absence d'anomalies sur des embryons issus de gamètes mâles dont le niveau de dommages est d'environ 20 % tail DNA pourrait être due à la réparation de ces dommages par l'ovocyte, comme précédemment

évoqué. Pour éprouver la robustesse de ce seuil d'effet, il faudrait réaliser d'autres expériences similaires avec des contaminants aux modes d'action différents.

5.3.3. Conclusion

Nous avons démontré qu'un transfert d'anomalies est possible des gamètes à la génération suivante. Il s'agit de la première étude permettant d'établir un lien quantitatif entre lésions génétiques paternelles et anomalies embryonnaires non viables chez un invertébré dulçaquicole. Du fait du rôle des populations de gammares sur la structure des communautés au sein d'un cours d'eau, un impact sur la reproduction de cette espèce pourrait être qualifié d'effet d'importance écologique, renforçant d'autant plus la pertinence de ce biomarqueur. Nous attirons toutefois l'attention sur le fait que la diminution de la qualité génétique des gamètes ne conduit pas nécessairement à des effets sur la population, car d'autres traits de la fitness des organismes sont à prendre en considération pour étudier le maintien de la population. Au bilan, **il est possible de traduire la réponse sub-individuelle de ce biomarqueur en terme d'effet sur la reproduction**, et de mieux comprendre la signification fonctionnelle de la mesure de l'intégrité génétique des spermatozoïdes. **L'établissement de ce lien confère à ce biomarqueur de génotoxicité une signification écologique forte.**

5.4. Application du biomarqueur de génotoxicité au milieu naturel : vers un biomarqueur à vocation écologique

Afin de déterminer le potentiel de ce biomarqueur de génotoxicité pour évaluer *in situ* un risque environnemental, par le biais d'encagement, celui-ci a été appliqué à plusieurs scénarios de contamination réalistes (pressions urbaines et agricoles traitées dans les parties V.1.4 et V.3.2 et pression industrielle illustré ci-après avec l'exemple du bassin minier de Decazeville). Nous nous proposons de montrer comment ce biomarqueur de génotoxicité peut répondre aux critères de choix d'un biomarqueur dit à vocation écologique (défini p.24 de la synthèse bibliographique).

La sensibilité de l'outil a été évaluée sur le terrain et en mésocosme en exposant des organismes encagés à trois grands types de pression. Des expositions *in situ* ont été menées à l'occasion de la campagne d'évaluation de l'impact de rejets de STEP, sur des canaux artificiels soumis à un flux de deux pesticides viticoles en mélange ainsi que dans le bassin versant du Riou Mort, un affluent du Lot, sur le site d'un ancien bassin minier actuellement en cours de réhabilitation. Dans le cas du Lot, la répétition de ces encagements, environ tous les trois mois sur deux ans, nous a permis d'étudier les variations saisonnières et temporelles de la réponse du biomarqueur au regard des niveaux de contamination métallique, évalués par le dosage dans les organismes du zinc et du cadmium, deux métaux rencontrés majoritairement sur les sites contaminés. Les niveaux d'endommagement génétique des spermatozoïdes de gammarès encagés sur le bassin versant du Riou Mort, affluent du Lot, sont présentés dans la figure V-9, extraite de la publication 4.

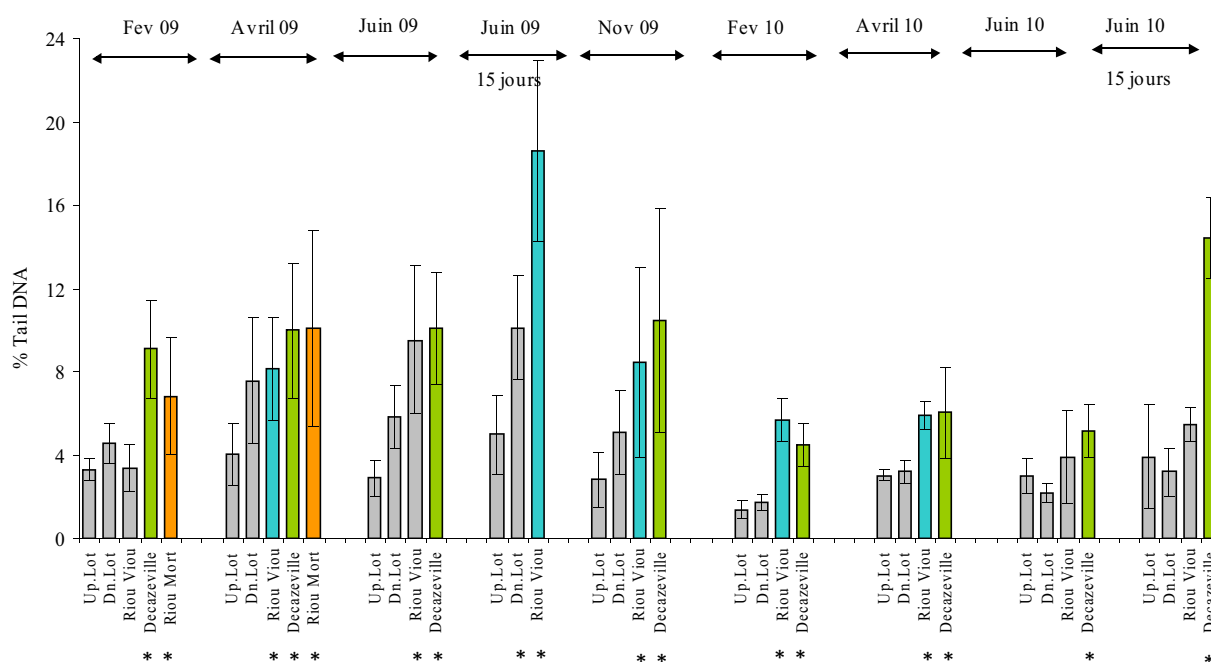


Figure V-9 : Dommages à l'ADN de spermatozoïdes de gammarès après 5 jours d'exposition (exprimés en % tail intensity). * significativement différent du témoin.

Quel que soit le type de contamination (rejets de STEP : Figure V-1 et V-6, pesticides : Figure V-7, métaux : Figure V-9), la sensibilité du biomarqueur de génotoxicité a permis de discriminer les stations entre elles, ceci en accord avec les pressions chimiques subies, et ainsi de caractériser l'effet biologique de cette contamination. Dans le bassin versant du Riou Mort, il a été possible de détecter un autre type de contamination que la contamination métallique pour le site de Decazeville, qui présente une très faible contamination en cadmium mais dont l'environnement est largement urbanisé et industrialisé, permettant alors de s'affranchir de l'approche spécifique par type de contaminant.

La pertinence environnementale d'un biomarqueur implique la connaissance et la compréhension de la variabilité naturelle de la réponse et de l'influence des facteurs confondants non toxique sur cette réponse, ainsi que l'établissement d'un niveau de référence, intégrant la variabilité spatio-temporelle du niveau de base du biomarqueur dans le milieu naturel. Nous avons proposé précédemment un niveau de référence de $3 \pm 0,5\%$ tail DNA. Pour évaluer la pertinence de notre valeur de référence, nous avons confronté cette valeur à celles obtenues sur les sites amont lors des campagnes d'encagement dans trois hydrosystèmes Rhône-alpins soumis à un rejet de STEP (Figure V-1) et dans le bassin versant du Riou Mort. Pour ces sites aux

caractéristiques physico-chimiques très différentes, le niveau de dommages à l'ADN est très faible et très proche de $3 \pm 0,5\%$ tail DNA (Figure V-10, publication 4). Les niveaux de dommages que ces sites amont, proposés comme contrôle, engendrent, renforcent la robustesse de la valeur de référence proposée puisqu'il est possible de l'extrapoler à des milieux très différents.

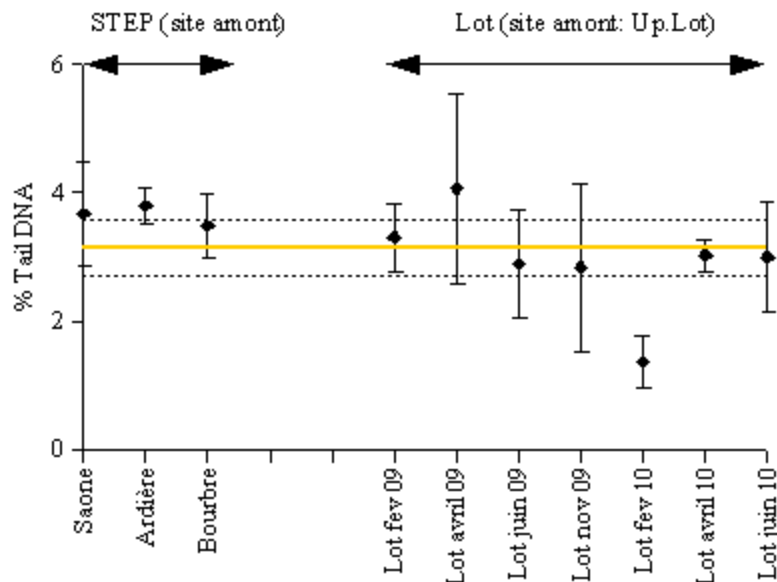


Figure V-10 : Dommages à l'ADN des spermatozoïdes de gammarès engagés sur les sites amonts de la Saône, de l'Ardière, de la Bourbre, et du Lot. La droite orange représente la valeur de référence, les lignes pointillées, l'intervalle de confiance à 95%.

La signification écologique d'un biomarqueur est atteinte lorsque celui-ci est à même de répondre à l'exposition à un contaminant dans le milieu naturel, et que cette réponse peut être interprétée en terme d'effet pour l'individu, pouvant entraîner des altérations futures d'intérêt au sens écologique. Au cours de ce travail, un lien significatif a été établi entre dommages à l'ADN des spermatozoïdes et une altération du succès reproducteur. Un seuil d'effet correspondant à 20 % tail DNA a été proposé. Lors des applications de notre biomarqueur sur le terrain, des niveaux de dommages à l'ADN proche de ce seuil ont été mesurés à plusieurs reprises. C'est le cas après l'exposition au mélange diuron-tébuconazole, après 15 jours d'encagement au niveau des rejets de STEP sur la Saône et sur la Bourbre (en 2008 et en 2009) et à la station aval de l'Ardière. **Ces niveaux de dommages obtenus pour des scénarios de contamination réalistes et contrastés peuvent être traduits en terme d'effet significatif au niveau de l'individu.**

La prédictivité du biomarqueur proposé a pu être établie grâce à l'étude novatrice des conséquences d'une contamination sur un type cellulaire directement impliqué dans le succès de la reproduction, les spermatozoïdes. De part leur contribution à la construction du patrimoine génétique de la génération suivante, l'évaluation de leur intégrité génétique est un marqueur direct d'un effet à un niveau d'organisation biologique supérieur, permettant un changement d'échelle sub-individu / individu. Ces travaux rendent possible la mise en place de méthodes de changement d'échelles par la modélisation, pour atteindre un niveau d'effet pertinent au plan écologique qu'est la population. Ce biomarqueur peut ainsi permettre la compréhension des conséquences de la génotoxicité à long terme, et son implication dans le maintien des populations, de part le lien établi avec la reproduction.

Suite à ces résultats obtenus sur le terrain, il paraît intéressant de proposer ce biomarqueur dans un cadre d'évaluation du risque environnemental en milieu dulçaquicole comme un biomarqueur à vocation écologique.

Conclusion générale

L'évaluation de l'état de santé du milieu aquatique, ainsi que la prédiction des risques encourus par l'écosystème suite à diverses pressions anthropiques, nécessitent d'utiliser des outils d'évaluation sensibles, fiables, significatifs et prédictifs. Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé, par une double approche laboratoire-terrain, un biomarqueur de génotoxicité chez un crustacé décomposeur d'eau douce, en tentant de répondre aux exigences requises pour proposer ce biomarqueur comme un biomarqueur à vocation écologique.

La figure i suivante résume les quatre objectifs et les démarches mises en œuvre pour répondre à la question de ce travail de thèse, ainsi que les conclusions majeures auxquelles ont abouti nos expérimentations et les perspectives de recherche qui s'en dégagent.

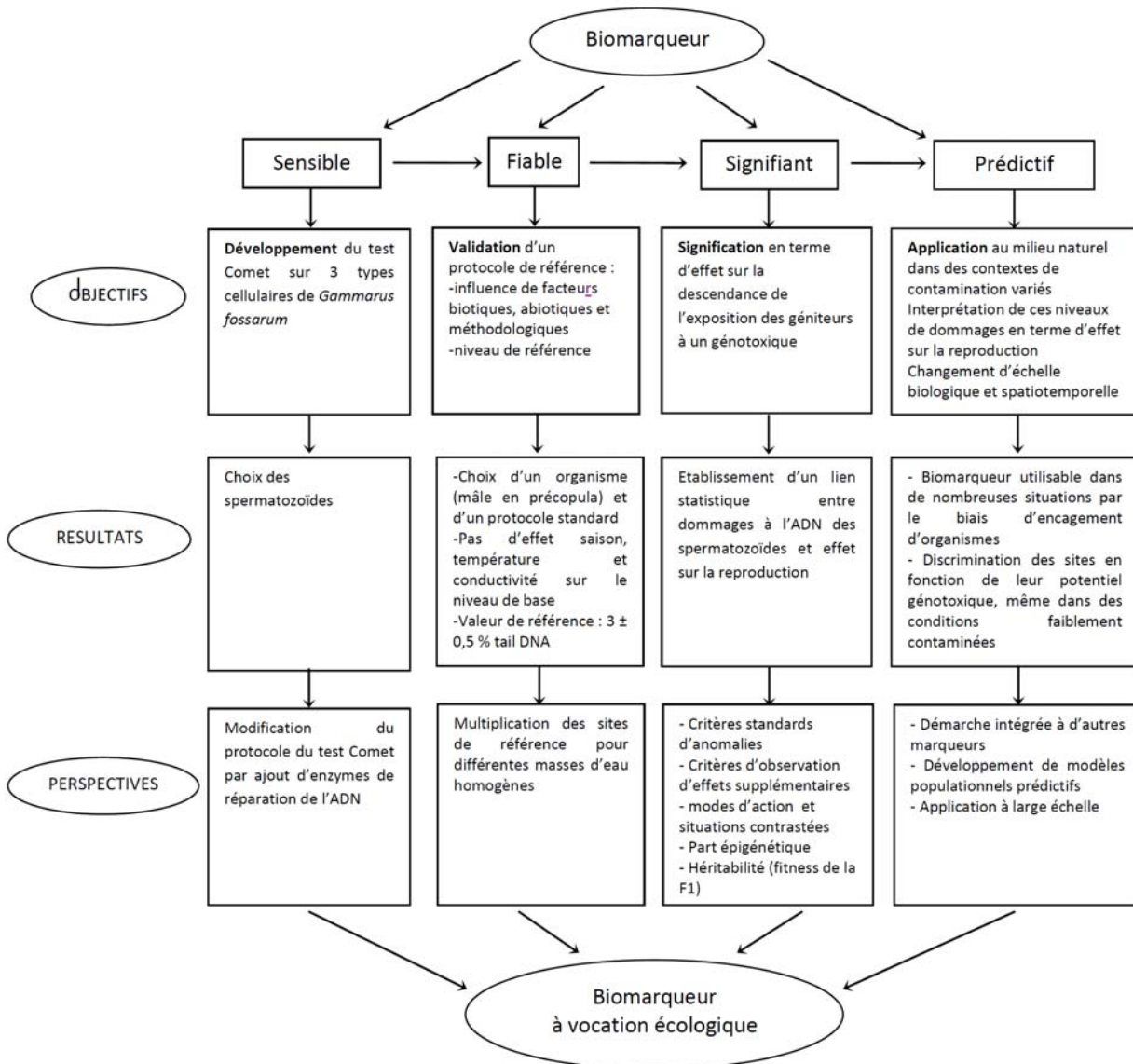


Figure i : Développement d'un biomarqueur de génotoxicité chez le gammare *Gammarus fossarum* : objectifs, résultats et perspectives.

Dans un premier temps, le test Comet a été utilisé avec succès sur trois types cellulaires d'intérêt : les cellules hémolymphatiques, les ovocytes et les spermatozoïdes. Quel que soit le scénario d'exposition des cellules ou des organismes (*in vitro*, *in vivo* ou *in situ*), **les spermatozoïdes sont les cellules les plus sensibles et les plus discriminantes d'un stress génotoxique**. L'hypothèse proposée pour expliquer la différence de réponse entre les types cellulaires est leur capacité différente de réparation des dommages à l'ADN. Nous avons montré,

en mesurant le niveau de dommages à l'ADN au cours du temps, après transfert des organismes en milieu non contaminé, que les spermatozoïdes n'étaient probablement pas dotés de systèmes de réparation, contrairement aux ovocytes pour lesquels une diminution du nombre de cassures à l'ADN est observé. Toutefois, la diminution du nombre de cassures ne peut pas être considérée comme une évaluation directe des capacités de réparation de la cellule. *Pour augmenter la sensibilité de l'essai et affiner la compréhension du mode d'action du contaminant, il serait possible de modifier le protocole du test Comet par l'ajout d'une étape de digestion enzymatique (par exemple, par les glycosylases spécifiques de certains dommages à l'ADN).*

Dans un deuxième temps, un protocole standard a été validé sur les spermatozoïdes, ceci afin de limiter la variabilité de la réponse du biomarqueur, que ce soit dans le cadre d'expositions en laboratoire, ou sur le terrain par des méthodes d'encagement. Dans le milieu naturel, aucun effet saison significatif, ni aucun effet des caractéristiques physicochimiques des sites de référence étudiés n'a été observé. **Une valeur de référence a pu être proposée** tenant compte de la variabilité spatio-temporelle naturelle des sites. Celle-ci a été évaluée à $3 \pm 0,5$ % Tail DNA. Au-delà de cette référence, les dommages à l'ADN peuvent être attribués à une exposition à un contaminant. *Pour augmenter la fiabilité de ce niveau de référence, il conviendrait d'évaluer la variabilité spatio-temporelle de la réponse du biomarqueur dans de plus nombreuses situations, en milieu naturel dans des sites supposés de référence, permettant également une analyse statistique plus robuste.*

Afin d'interpréter la réponse de notre biomarqueur en terme de signification fonctionnelle pour l'individu, une relation quantitative a été établie entre les lésions génétiques des spermatozoïdes et le taux d'anomalies embryonnaires. Bien que la seule mesure de l'intégrité génétique des spermatozoïdes ne permette pas de prédire des effets au niveau populationnel, l'établissement de ce lien confère à notre biomarqueur un aspect prédictif, puisqu'il permet un changement d'échelle biologique en s'intéressant à une fonction clé de la dynamique de population. Un effet sur la reproduction est d'autant plus intéressant à évaluer chez cette espèce étant donné son rôle écologique majeur en tant que décomposeur et proie. **Il a été possible d'établir un seuil de dommages au delà duquel des effets significatifs sur la descendance peuvent être attendus.** *Toutefois, pour améliorer la robustesse de notre seuil d'effet, sa généralisation à différents types de contamination, et l'amélioration de la sensibilité de la*

mesure devraient être étudiés. Pour cela, il conviendrait de multiplier les expérimentations, en utilisant des contaminants aux modes d'action différents. De plus, pour déterminer de manière plus sensible, voire plus précoce un effet sur la descendance, il serait intéressant de proposer des critères d'anomalies standardisés. Des marqueurs additionnels pourraient également être mis en place comme le temps à l'éclosion et le suivi de la croissance des juvéniles de la F1 non exposée (mais issue de géniteurs exposés), qui peuvent entraîner, dans le cas de retard, une diminution des performances de reproduction et de survie. Pour étudier l'héritabilité des effets d'un stress génotoxique et pour appréhender les conséquences à long terme pour une population exposée, le succès reproducteur de la F1 non exposée devrait également être considéré, sans occulter le fait que cela générerait des contraintes expérimentales lourdes. Enfin, d'un point de vue mécanistique, il serait intéressant d'évaluer la part épigénétique lors d'une exposition à un génotoxique, car il est probable que les deux mécanismes (génotoxique et épigénétique) soient impliqués dans le processus reprotoxique.

Pour évaluer un stress génotoxique dans le milieu naturel, nous avons eu recours à des méthodes d'encagement d'organismes stabulés au laboratoire. **Nous avons ainsi pu démontrer, dans le milieu, un effet génotoxique causé par différents types de polluants urbains, industriels et agricoles.** Concernant l'application de notre biomarqueur, plusieurs perspectives se dégagent. L'application couplée de notre biomarqueur à d'autres outils d'évaluation de la génotoxicité, spécifiques d'un type de dommage, comme la mesure des bases oxydées, pourrait fournir des informations complémentaires concernant l'identification des polluants en fonction de leur mode d'action génotoxique. Utiliser ce biomarqueur dans une approche mettant en œuvre une batterie complémentaire de biomarqueurs permettrait d'améliorer la caractérisation des relations entre les concentrations en polluants dans le milieu, les lésions à l'ADN et les effets sur la santé des organismes, et participerait ainsi à l'interprétation de l'évaluation du risque écotoxicologique. Enfin, il pourrait être envisagé d'intégrer la réponse de notre biomarqueur, extrapolable en terme d'effet individuel (effet sur la fécondité) comme paramètre d'entrée dans un modèle de dynamique de population avec d'autres caractéristiques individuelles plusieurs telles, entre autres la survie et la croissance, utilisable pour prédire un effet populationnel, signifiant au niveau écosystémique.

Enfin, d'un point de vue plus global, trois autres perspectives se dégagent de ce travail, l'une revêt un aspect mécanistique, la seconde un aspect écologique et la dernière un aspect pratique vis-à-vis des exigences de la Directive Cadre Européenne. Nous avons souligné le fait qu'une diminution du nombre de cassures à l'ADN ne pouvait pas être considérée comme une évaluation directe des capacités de réparation de la cellule. Or, très peu d'études sont disponibles concernant les capacités de réparation de l'ADN chez les invertébrés. Il serait intéressant pour comprendre le mode d'action des contaminants et définir le caractère transitoire ou définitif des dommages, d'étudier précisément les systèmes de réparation, par des approches mettant en œuvre des inhibiteurs spécifiques de la réparation ou par la mesure du potentiel de réparation par l'essai des comètes modifié BERCC ou NERC qui pourrait représenter en tant que tel un nouveau biomarqueur de génotoxicité.

Concernant son utilisation à large échelle, le développement du test Comet sur des espèces phylogénétiquement proches de *Gammarus fossarum* comme *G. pulex*, *G. wautteri* et *G. orinos* permettrait, dans le cas où la réponse de chaque espèce est comparable, de suivre le biomarqueur d'intérêt sur plusieurs populations naturelles et élargirait ainsi l'échelle géographique de l'étude. Dans un deuxième temps, cela permettrait d'apporter des connaissances relatives à la sensibilité de chacune des espèces et de comprendre leur distribution dans le milieu naturel.

Finalement, une étude à très large échelle, sur différents hydrosystèmes européens, en intégrant ce biomarqueur à diverses réponses prises aux différents niveaux d'organisation biologique, comme proposé récemment lors du dernier « Gammarus Day (Séville-Espagne, Septembre 2010) », contribuerait à apporter des éléments de réflexion quant à la mise en place d'un système européen de surveillance de la qualité du milieu dulçaquicole et permettrait d'établir une référence biologique par masse d'eau homogène.

Références

- Abel, P.D. (1980) Toxicity of γ -hexachlorocyclohexane (Lindane) to *Gammarus pulex*: Mortality in relation to concentration and duration of exposure. *Freshwater Biology* 10(3), 251-259.
- Accomando, R., Viarengo, A., Bordone, R., Taningher, M., Canesi, L. and Orunesu, M. (1991) A rapid method for detecting DNA strand breaks in *Mytilus galloprovincialis* Lam. induced by genotoxic xenobiotic chemicals. *International Journal of Biochemistry* 23(2), 227-229.
- Adam, O. (2008) Impact des produits du bois sur les amphipodes *Gammarus pulex* (L.) et *Gammarus fossarum* (K.) : approches chimique, hydro-écologique et écotoxicologique, Université de Bourgogne.
- Adams, S.M., Bevelhimer, M.S., Greeley Jr, M.S., Levine, D.A. and Teh, S.J. (1999) Ecological risk assessment in a large river-reservoir: 6. Bioindicators of fish population health. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(4), 628-640.
- Ahmadi, A. and Ng, S.C. (1999) Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology* 284(6), 696-704.
- Aina, R., Berra, E., Marino, G., Sgorbati, S. and Citterio, S. (2008) Impact of different agricultural practices on soil genotoxicity. *Fresenius Environmental Bulletin* 17(8 B), 1190-1194.
- Aitken, R.J. and De Iuliis, G.N. (2007) Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproductive BioMedicine Online* 14(6), 727-733.
- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T. and Narbonne, J.F. (2000a) Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 49(4), 269-287.
- Akcha, F., Burgeot, T., Budzinski, H., Pfohl-Leskowicz, A. and Narbonne, J.F. (2000b) Induction and elimination of bulky benzo[a]pyrene-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed in vivo to B[a]P-contaminated feed. *Marine Ecology Progress Series* 205, 195-206.

- Akcha, F., Vincent Hubert, F. and Pfohl-Leszkwicz, A. (2003) Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534(1-2), 21-32.
- Akcha, F., Leday, G. and Pfohl-Leszkwicz, A. (2004) Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: Effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552(1-2), 197-207.
- Aleem, A. and Malik, A. (2003) Genotoxic hazards of long-term application of wastewater on agricultural soil. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 538(1-2), 145-154.
- Alink, G.M., Quik, J.T.K., Penders, E.J.M., Spenkelink, A., Rotteveel, S.G.P., Maas, J.L. and Hoogenboezem, W. (2007) Genotoxic effects in the Eastern mudminnow (*Umbra pygmaea* L.) after exposure to Rhine water, as assessed by use of the SCE and Comet assays: A comparison between 1978 and 2005. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 631(2), 93-100.
- Allen, I.J. and Moore, M.N. (2004) Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Marine Environmental Research* 58(2-5), 227-232.
- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Loureiro, A.P.M., Medeiros, M.H.G. and Di Mascio, P. (2003) DNA and lipid damage in the brown mussel *Perna perna* from a contaminated site. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71(2), 270-275.
- Aloisio Torres, M., Pires Testa, C., GÃ¡speri, C., Beatriz Masutti, M., Maria Neves Panitz, C., Curi-Pedrosa, R., Alves De Almeida, E., Di Mascio, P. and Wilhelm Filho, D. (2002) Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 44(9), 923-932.
- Anderson, S., Sadinski, W., Shugart, L., Brussard, P., Depledge, M., Ford, T., Hose, J., Stegeman, J., Suk, W., Wirgin, I. and Wogan, G. (1994) Genetic and molecular ecotoxicology: A research framework. *Environmental Health Perspectives* 102(12), 3-8.

-
- Anderson, S.L. and Wild, G.C. (1994) Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives* 102(12), 9-12.
- Andrade, V.M., de Freitas, T.R.O. and da Silva, J. (2004) Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 560(1), 57-67.
- Andrès, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C. and Boudou, A. (1999) Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(11), 2462-2471.
- Archaimbault, V. (2003) Réponses bio-écologiques des macroinvertébrés benthiques aux perturbations : la base d'un outil diagnostique fonctionnel des écosystèmes d'eaux courantes, thèse en Hydrobiologie animale, Université de Metz.
- Atienzar, F.A. and Jha, A.N. (2006) The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 613(2-3), 76-102.
- Attrill, M.J. and Depledge, M.H. (1997) Community and population indicators of ecosystem health: Targeting links between levels of biological organisation. *Aquatic Toxicology* 38(1-3), 183-197.
- Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G. and Jouanneau, J.M. (2004) Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). *Environmental Pollution* 132(3), 413-426.
- Avery, E.L., Dunstan, R.H. and Nell, J.A. (1996) The detection of pollutant impact in marine environments: Condition index, oxidative DNA damage, and their associations with metal bioaccumulation in the Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31(2), 192-198.
- Baird, D.J., Brown, S.S., Lagadic, L., Liess, M., Maltby, L., Moreira-Santos, M., Schulz, R. and Scott, G.I. (2007) In situ-based effects measures: determining the ecological relevance of

- measured responses. *Integrated environmental assessment and management* 3(2), 259-267.
- Barbee, G.C., Barich, J., Duncan, B., Bickham, J.W., Matson, C.W., Hintze, C.J., Autenrieth, R.L., Zhou, G.D., McDonald, T.J., Cizmas, L., Norton, D. and Donnelly, K.C. (2008) In situ biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(2), 454-464.
- Barnard, J.L., and Barnard, C.M. (1983) *Freshwater Amphipoda of the world- I. Evolutionary patterns*. Virginia: Hayfield associates (ed.), 357.
- Baudrimont, M., Andrès, S., Metivaud, J., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C. and Boudou, A. (1999) Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(11), 2472-2477.
- Baumann, P.C. (1998) Epizootics of cancer in fish associated with genotoxins in sediment and water. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 411(3), 227-233.
- Beliaeff, B. and Burgeot, T. (2002) Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(6), 1316-1322.
- Belpaeme, K., Cooreman, K. and 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.
- Bertin, G. and Averbeck, D. (2006) Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88(11), 1549-1559.
- Bihari, N. and Fafandel, M. (2004) Interspecies differences in DNA single strand breaks caused by benzo(a)pyrene and marine environment. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552(1-2), 209-217.
- Bihari, N., Batel, R. and Zahn, R.K. (1990) DNA damage determination by the alkaline elution technique in the haemolymph of mussel *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo[a]pyrene and 4-nitroquinoline-N-oxide. *Aquatic Toxicology* 18(1), 13-22.

- Bihari, N., Batel, R. and Zahn, R.K. (1992) Fractionation of DNA from marine invertebrate (*Maja crispata*, *Mytilus galloprovincialis*) haemolymph by alkaline elution. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 102(2), 419-424.
- Binelli, A., Riva, C., Cogni, D. and Provini, A. (2008) Assessment of the genotoxic potential of benzo(a)pyrene and pp'-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 649(1-2), 135-145.
- Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C. and Provini, A. (2009) Cytotoxic and genotoxic effects of in vitro exposure to Triclosan and Trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 150(1), 50-56.
- Bjornstad, A., Larsen, B.K., Skadsheim, A., Jones, M.B. and Andersen, O.K. (2006) The potential of ecotoxicoproteomics in environmental monitoring: Biomarker profiling in mussel plasma using proteinchip array technology. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 69(1-2), 77-96.
- Black, M.C., Ferrell, J.R., Horning, R.C. and Martin Jr, L.K. (1996) DNA strand breakage in freshwater mussels (*Anodonta grandis*) exposed to lead in the laboratory and field. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(5), 802-808.
- Blandin, P. (1986) Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bull. Ecol.* 17(4), 215-307.
- Bloor, M.C., Banks, C.J. and Krivtsov, V. (2005) Acute and sublethal toxicity tests to monitor the impact of leachate on an aquatic environment. *Environment International* 31(2), 269-273.
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D. and Regoli, F. (2008) Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicology* 89(4), 257-266.
- Bocquené, G., Chantereau, S., Clérendeau, C., Beausir, E., Ménard, D., Raffin, B., Minier, C., Burgeot, T., Leszkowicz, A.P. and Narbonne, J.F. (2004) Biological effects of the "Erika"

- oil spill on the common mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources* 17(3 SPEC. ISS.), 309-316.
- Bodin, N., Burgeot, T., Stanisière, J.Y., Bocquené, G., Menard, D., Minier, C., Boutet, I., Amat, A., Cherel, Y. and Budzinski, H. (2004) Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 138(4), 411-427.
- Bollache, L. (2003) Trois espèces d'amphipodes épigés nouvelles pour la Saône bourguignonne. *Bulletin Scientifique de Bourgogne* 51, 3-11.
- Bollache, L. and Cezilly, F. (2004) State-dependent pairing behaviour in male *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea, Amphipoda): Effects of time left to moult and prior pairing status. *Behavioural Processes* 66(2), 131-137.
- Bolognesi, C., Rabboni, R. and Roggieri, P. (1996) Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 113(2), 319-323.
- Bolognesi, C., Buschini, A., Branchi, E., Carboni, P., Furlini, M., Martino, A., Monteverde, M., Poli, P. and Rossi, C. (2004) Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Science of the Total Environment* 333(1-3), 127-136.
- Bombail, V., Aw, D., Gordon, E. and Batty, J. (2001) Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere* 44(3), 383-392.
- Bony, S., Gillet, C., Bouchez, A., Margoum, C. and Devaux, A. (2008) Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. *Aquatic Toxicology* 89(3), 197-203.
- Bony, S., Gaillard, I. and Devaux, A. (2010) Genotoxicity assessment of two vineyard pesticides in zebrafish. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 90(3-6), 421-418.

-
- Borowsky, B. (1991) Patterns of reproduction of some amphipod crustacean and insights into the nature of their stimuli. In "Crustacean sexual biology" Bauer, R.T. and Martin, J.W. (eds.), Columbia university press, New York, 33-49.
- Boxall, A.B.A. and Maltby, L. (1995) The characterization and toxicity of sediment contaminated with road runoff. *Water Research* 29(9), 2043-2050.
- Brown, A.F. and Pascoe, D. (1989) Parasitism and host sensitivity to cadmium: an acanthocephalan infection of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Journal of Applied Ecology* 26(2), 473-487.
- Brown, K.H., Schultz, I.R. and Nagler, J.J. (2007) Reduced embryonic survival in rainbow trout resulting from paternal exposure to the environmental estrogen 17 α -ethynylestradiol during late sexual maturation. *Reproduction* 134(5), 659-666.
- Bundschuh, M., Hahn, T., Gessner, M.O. and Schulz, R. (2009) Antibiotics as a chemical stressor affecting an aquatic decomposer-detritivore system. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(1), 197-203.
- Burgeot, T., His, E. and Galgani, F. (1995) The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutation Research - Genetic Toxicology* 342(3-4), 125-140.
- Burlinson, B., Tice, R.R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S.Y., Collins, A.R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T.S., Nakajima, M., Sasaki, Y.F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M. and Hartmann, A. (2007) Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 627(1), 31-35.
- Bus, J.S. and Gibson, J.E. (1984) Paraquat: Model for oxidant-initiated toxicity. *Environmental Health Perspectives* 55, 37-46.
- Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P. and Rossi, C. (2003) Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 537(1), 81-92.
-

- Buschini, A., Giordani, F., Pellacani, C., Rossi, C. and Poli, P. (2008) Cytotoxic and genotoxic potential of drinking water: A comparison between two different concentration methods. *Water Research* 42(8-9), 1999-2006.
- Cachot, J., Couteau, J., FrÃ©bourg, T., Leboulenger, F. and Flaman, J.M. (2004) Functional analysis of chemically-induced mutations at the flounder TP53 locus, the FACIM assay. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552(1-2), 51-60.
- Caffetti, J.D., Mantovani, M.S., Pastori, M.C. and Fernocchio, A.S. (2008) First genotoxicity study of Paraná River water from Argentina using cells from the clam *Corbicula fluminea* (veneroida corbiculidae) and Chinese hamster (*Cricetulus griseus* Rodentia, Cricetidae) K1 cells in the comet assay. *Genetics and Molecular Biology* 31(2), 561-565.
- Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S. and Forget-Leray, J. (2007) Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 147(4), 841-849.
- Cairns Jr, J. and Pratt, J.R. (1993) Trends in ecotoxicology. *Science of the Total Environment* (SUPPL. Part 1), 7-22.
- Cajaraville, M.P., Cancio, I., Ibabe, A. and Orbea, A. (2003) Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Microscopy Research and Technique* 61(2), 191-202.
- Canova, S., Degan, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., Voltan, R. and Venier, P. (1998) Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399(1), 17-30.
- Caquet, T., Thybaud, E., Le Bras, S., Jonot, O. and Ramade, F. (1992) Fate and biological effects of lindane and deltamethrin in freshwater mesocosms. *Aquatic Toxicology* 23(3-4), 261-278.
- Caquet, T., Lagadic, L. and Sheffield, S.R. (2000) Mesocosms in ecotoxicology (1): Outdoor aquatic systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 165, 1-38.

-
- Chapman, R.F. (1998) The insects: Structure and function, Cambridge University Press, Cambridge, 4th edition, 770 p.
- Charissou, A.M., Cossu-Leguille, C. and Vasseur, P. (2004) Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Science of the Total Environment 322(1-3), 109-122.
- Charniaux-Cotton, H. (1985) Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. American Zoologist 25, 197-206.
- Chevreaux, E. and Fage, L. (eds) (1970) Faune de France, Tome 9 : Amphipodes, Nendeln (Lichtenstein).
- Christl, T.J., Pennington, P., DeLorenzo, M., Karnaky Jr, K.J. and Scott, G.I. (2004) Effect of multiple atrazine exposure profiles on hemocyte DNA integrity in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 73(2), 404-410.
- Claxton, L.D., Houk, V.S. and Hughes, T.J. (1998) Genotoxicity of industrial wastes and effluents. Mutation Research - Reviews in Mutation Research 410(3), 237-243.
- Claxton, L.D. and Woodall Jr, G.M. (2007) A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. Mutation Research - Reviews in Mutation Research 636(1-3), 36-94.
- Clément, B., Devaux, A., Perrodin, Y., Danjean, M. and Ghidini-Fatus, M. (2004) Assessment of sediment ecotoxicity and genotoxicity in freshwater laboratory microcosms. Ecotoxicology 13(4), 323-333.
- Clements, W.H. (2000) Integrating effects of contaminants across levels of biological organization: An overview. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 7(2), 113-116.
- Cold, A. and Forbes, V.E. (2004) Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. Aquatic Toxicology 67(3), 287-299.
- Collins, A. (2000) Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative DNA damage. Free Radical Research 32(4), 333-341.
-

- Collins, A.R., Dobson, V.L., Dušinská, M., Kennedy, G. and Štětina, R. (1997) The comet assay: What can it really tell us? *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 375(2), 183-193.
- Collins, A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology* 26(3), 249-261.
- Connors, D.E. and Black, M.C. (2004) Evaluation of Lethality and Genotoxicity in the Freshwater Mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) Exposed Singly and in Combination to Chemicals Used in Lawn Care. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46(3), 362-371.
- Correia, A.D., Costa, M.H., Luis, O.J. and Livingstone, D.R. (2003) Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 289(1), 83-101.
- Costa, F.O., Correia, A.D. and Costa, M.H. (1998) Acute marine sediment toxicity: A potential new test with the amphipod *Gammarus locusta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40(1-2), 81-87.
- Costa, F.O., Neuparth, T., Costa, M.H., Theodorakis, C.W. and Shugart, L.R. (2002) Detection of DNA strand breakage in a marine amphipod by agarose gel electrophoresis: Exposure to X-rays and copper. *Biomarkers* 7(6), 451-463.
- Cotelle, S. and Féraud, J.F. (1999) Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34(4), 246-255.
- Crowe, T.P., Smith, E.L., Donkin, P., Barnaby, D.L. and Rowland, S.J. (2004) Measurements of sublethal effects on individual organisms indicate community-level impacts of pollution. *Journal of Applied Ecology* 41(1), 114-123.
- Dangles, O.J. and Guérol, F.A. (2000) Structural and functional responses of benthic macroinvertebrates to acid precipitation in two forested headwater streams (Vosges Mountains, northeastern France). *Hydrobiologia* 418(1-3), 25-31.

-
- De Boeck, M. and Kirsch-Volders, M. (1997) *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) is not an adequate sentinel species to assess the genotoxic risk (Comet assay) of PAH exposure to the environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30(1), 82-90.
- De Flora, S., Vigano, L., D'Agostini, F., Camoirano, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C., Melodia, F. and Arillo, A. (1993) Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Research - Genetic Toxicology Testing and Biomonitoring of Environmental or Occupational Exposure* 319(3), 167-177.
- De La Sienna, E., Armienta, M.A. and Gonsebatt, M.E. (2003) Potassium dichromate increases the micronucleus frequency in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Environmental Pollution* 126(3), 367-370.
- De Lange, H.J., Noordoven, W., Murk, A.J., Lüring, M. and Peeters, E.T.H.M. (2006) Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 78(3), 209-216.
- De Lemos, C.T., Rödel, P.M., Terra, N.R. and Erdtmann, B. (2001) Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(6), 1320-1324.
- Dearfield, K.L., Cimino, M.C., McCarroll, N.E., Mauer, I. and Valcovic, L.R. (2002) Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 521(1-2), 121-135.
- Denslow, N.D., Kocerha, J., Sepulveda, M.S., Gross, T. and Holm, S.E. (2004) Gene expression fingerprints of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to pulp and paper mill effluents. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552(1-2), 19-34.
- Depledge, M.H. and Fossi, M.C. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment. (2) Invertebrates. *Ecotoxicology* 3(3), 161-172.
- Depledge, M.H. (1998) The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399(1), 109-122.
- Depledge, M.H. and Galloway, T.S. (2005) Healthy animals, healthy ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 3(5), 251-258.
-

- Devaux, A., Pesonen, M. and Monod, G. (1997) Alkaline comet-assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicology in Vitro* 11(1-2), 71-79.
- Devaux, A., Flammarion, P., Bernardon, V., Garric, J. and 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*). *Marine Environmental Research* 46(1-5), 257-262.
- Deventer, K. (1996) Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56(6), 911-918.
- Dhawan, A., Bajpayee, M. and Parmar, D. (2009) Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology* 25(1), 5-32.
- Dixon, D.R., Jones, I.M. and Harrison, F.L. (1985) Cytogenetic evidence of inducible processes linked with metabolism of a xenobiotic chemical in adult and larval *Mytilus edulis*. *Science of the Total Environment* VVOL. 46, 1-8.
- Dixon, D.R., Pruski, A.M. and Dixon, L.R.J. (2004) The effects of hydrostatic pressure change on DNA integrity in the hydrothermal-vent mussel *Bathymodiolus azoricus*: Implications for future deep-sea mutagenicity studies. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552(1-2), 235-246.
- Dixon, D.R., Pruski, A.M., Dixon, L.R.J. and Jha, A.N. (2002) Marine invertebrate ecogenotoxicology: A methodological overview. *Mutagenesis* 17(6), 495-507.
- Ducrot, V. (2005) Compréhension et modélisation des relations entre les caractéristiques biologiques et écologiques et la sensibilité aux contaminants des communautés d'invertébrés benthiques : perspectives pour l'évaluation des effets des substances chimiques, Université de Metz.
- Dunn, A.M., Andrews, T., Ingrey, H., Riley, J. and Wedell, N. (2006) Strategic sperm allocation under parasitic sex-ratio distortion. *Biology Letters* 2(1), 78-80.
- Eastman, A. and Barry, M.A. (1992) The origins of DNA breaks: A consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? *Cancer Investigation* 10(3), 229-240.

-
- Edge, S.E., Morgan, M.B., Gleason, D.F. and Snell, T.W. (2005) Development of a coral cDNA array to examine gene expression profiles in *Montastraea faveolata* exposed to environmental stress. *Marine Pollution Bulletin* 51(5-7), 507-523.
- Emmanouil, C., Sheehan, T.M.T. and Chipman, J.K. (2007) Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (*Mytilus edulis* L.) gill following exposure to Cd and Cr(VI). *Aquatic Toxicology* 82(1), 27-35.
- Emmanouil, C. and Chipman, J.K. (2008) Excision of an oxidative DNA lesion (8-oxo-deoxyguanosine) in *Mytilus edulis* populations from two sites in the eastern Irish Sea. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 43(14), 1586-1591.
- Ericson, G., Skarphédinsdóttir, H., Zuanna, L.D. and Svavarsson, J. (2002) DNA adducts as indicators of genotoxic exposure in indigenous and transplanted mussels, *Mytilus edulis* L. from Icelandic coastal sites. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 516(1-2), 91-99.
- Everaarts, J.M. (1997) DNA integrity in *Asterias rubens*: A biomarker reflecting the pollution of the North Sea? *Journal of Sea Research* 37(1-2), 123-129.
- Evrard, E., Marchand, J., Theron, M., Pichavant-Rafini, K., Durand, G., Quiniou, L. and Laroche, J. (2010) Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 152(3), 321-331.
- Felten, V. and Guerold, F. (2001) Hyperventilation and loss of hemolymph Na^+ and Cl^- in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* exposed to acid stress: A preliminary study. *Diseases of Aquatic Organisms* 45(1), 77-80.
- Felten, V. (2003) Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophysologie de *Gammarus fossarum* Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda) : Approche intégrée à différents niveaux d'organisation, thèse en Physiologie et biologie des organismes, populations, interactions, Université de Metz.
- Felten, V. and Guerold, F. (2004) Haemolymph $[\text{Na}^+]$ and $[\text{Cl}^-]$ loss in *Gammarus fossarum* exposed in situ to a wide range of acidic streams. *Diseases of Aquatic Organisms* 61(1-2), 113-121.
-

- Felten, V. and Guérold, F. (2006) Short-term physiological responses to a severe acid stress in three macroinvertebrate species: A comparative study. *Chemosphere* 63(9), 1427-1435.
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J. and Geffard, O. (2008) Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 86(3), 413-425.
- Flammarion, P. and Garric, J. (1997) Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers : A relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker? *Chemosphere* 35(10), 2375-2388.
- Flammarion, P. (2002) Biological parameters in aquatic ecotoxicology: pros and cons. *Environnement, Risques et Santé* 1(5-6), 289-298.
- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P. and Garric, J. (2002) Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51(2), 145-153.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A. and Bach, L. (2006) The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(1), 272-280.
- Frankenberg-Schwager, M. (1990) Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells. *Radiation Environmental Biophysics* 29, 273-292.
- Frelon, S. (2001) Influence de métaux de transition sur la dégradation radicalaire de l'ADN, thèse en Chimie, Université de Grenoble I.
- Frenzilli, G., Nigro, M. and Lyons, B.P. (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681(1), 80-92.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., Ellenberger, T. (2006) DNA repair and Mutagenesis, 2^d edition.
- Gabbianelli, R., Moretti, M., Carpená, E. and Falcioni, G. (2006) Effect of different organotins on DNA of mollusk (*Scapharca inaequivalvis*) erythrocytes assessed by the comet assay. *Science of the Total Environment* 367(1), 163-169.

-
- Gagné, F. and Blaise, C. (1995) Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. *Environmental Toxicology and Water Quality* 10(3), 217-229.
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B. and Depledge, M.H. (2004) Ecosystem management bioindicators: The ECOMAN project - A multi-biomarker approach to ecosystem management. *Marine Environmental Research* 58(2-5), 233-237.
- Gandini, L., Lombardo, F., Lenzi, A., Spano, M. and Dondero, F. (2006) Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell and Tissue Banking* 7(2), 91-98.
- Gardner, G.R., Yevich, P.P., Harshbarger, J.C. and Malcolm, A.R. (1991) Carcinogenicity of Black Rock Harbor sediment to the eastern oyster and trophic transfer of Black Rock Harbor carcinogens from the blue mussel to the winter flounder. *Environmental Health Perspectives* 90, 53-66.
- Garman, G.D., Anderson, S.L. and Cherr, G.N. (1997) Developmental abnormalities and DNA-protein crosslinks in sea urchin embryos exposed to three metals. *Aquatic Toxicology* 39(3-4), 247-265.
- Geffard, O., Chaumot, A., Ferrari, B. and Montuelle, B. (2010, a) Les expérimentations in situ : principes et perspectives. *Sciences Eaux et Territoires* 1, 20-25.
- Geffard, O., Xuereb B., Chaumot A., Geffard A., Biagianti S., Noël C., Abbaci K., Garric J., Charmantier G., Charmantier-Daures M. (2010, b) Ovarian Cycle and Embryonic Development in *Gammarus fossarum*: Application for Reproductive Toxicity Assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*.
- Gerhardt, A., Carlsson, A., Ressemann, C. and Stich, K.P. (1998) New online biomonitoring system for *Gammarus pulex* (L) (Crustacea): In situ test below a copper effluent in South Sweden. *Environmental Science and Technology* 32(1), 150-156.
- Gielazyn, M.L., Ringwood, A.H., Piegorsch, W.W. and Stanczyk, S.E. (2003) Detection of oxidative DNA damage in isolated marine bivalve hemocytes using the comet assay and formamidopyrimidine glycosylase (Fpg). *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 542(1-2), 15-22.

- Girling, A.E., Pascoe, D., Janssen, C.R., Peither, A., Wenzel, A., Schäfer, H., Neumeier, B., Mitchell, G.C., Taylor, E.J., Maund, S.J., Lay, J.P., Jüttner, I., Crossland, N.O., Stephenson, R.R. and Persoone, G. (2000) Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45(2), 148-176.
- Goodale, B.C., Walter, R., Pelsue, S.R., Thompson, W.D., Wise, S.S., Winn, R.N., Mitani, H. and Wise Sr, J.P. (2008) The cytotoxicity and genotoxicity of hexavalent chromium in medaka (*Oryzias latipes*) cells. *Aquatic Toxicology* 87(1), 60-67.
- Gorbi, S., Virno Lamberti, C., Notti, A., Benedetti, M., Fattorini, D., Moltedo, G. and Regoli, F. (2008) An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea. *Marine Environmental Research* 65(1), 34-49.
- Grazeffe, V.S., Tallarico, L.d.F., Pinheiro, A.d.S., Kawano, T., Suzuki, M.F., Okazaki, K., Pereira, C.A.d.B. and Nakano, E. (2008) Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 654(1), 58-63.
- Gross, M.Y., Maycock, D.S., Thorndyke, M.C., Morritt, D. and Crane, M. (2001) Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(8), 1792-1797.
- Gross-Sorokin, M.Y., Grist, E.P.M., Cooke, M. and Crane, M. (2003) Uptake and depuration of 4-nonylphenol by the benthic invertebrate *Gammarus pulex*: How important is feeding rate? *Environmental Science and Technology* 37(10), 2236-2241.
- Guengerich, F.P. (2000) metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 21, 345-351.
- Guidi, P., Frenzilli, G., Benedetti, M., Bernardeschi, M., Falleni, A., Fattorini, D., Regoli, F., Scarcelli, V. and Nigro, M. (2010) Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (*Unio pictorum*) transplanted in a metal polluted river basin. *Aquatic Toxicology*.
- Gwo, J.C., Wu, C.Y., Chang, W.S.P. and Cheng, H.Y. (2003) Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay. *Cryo-Letters* 24(3), 171-180.

-
- Hagger, J.A., Depledge, M.H. and Galloway, T.S. (2005) Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin* 51(8-12), 811-816.
- Hagger, J.A., Lowe, D., Dissanayake, A., Jones, M.B. and Galloway, T.S. (2010) The influence of seasonality on biomarker responses in *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology* 19(5), 953-962.
- Hales, B.F., Aguilar-Mahecha, A. and Robaire, B. (2005) The stress response in gametes and embryos after paternal chemical exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 207(2 SUPPL.).
- Ham, K.D., Adams, S.M. and Peterson, M.J. (1997) Application of multiple bioindicators to differentiate spatial and temporal variability from the effects of contaminant exposure on fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37(1), 53-61.
- Hamoutene, D., Payne, J.F., Rahimtula, A. and Lee, K. (2002) Use of the Comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 54(3-5), 471-474.
- Hanson, N., Förlin, L. and Larsson, Å. (2010) Spatial and annual variation to define the normal range of biological endpoints: An example with biomarkers in perch. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(11), 2616-2624.
- Harrouk, W., Codrington, A., Vinson, R., Robaire, B. and Hales, B.F. (2000) Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo. *Mutation Research - DNA Repair* 461(3), 229-241.
- Hartl, M.G.J., Coughlan, B.M., Sheehan, D., Mothersill, C., Van Pelt, F.N.A.M., O'Reilly, S.J., Heffron, J.J.A., O'Halloran, J. and O'Brien, N.M. (2004) Implications of seasonal priming and reproductive activity on the interpretation of Comet assay data derived from the clam, *Tapes semidecussatus* Reeves 1864, exposed to contaminated sediments. *Marine Environmental Research* 57(4), 295-310.
- Hartmann, A., Plappert, U., Poetter, F. and Suter, W. (2003) Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 536(1-2), 27-38.
- Harvey, J.S. and Parry, J.M. (1997) The detection of genotoxin-induced DNA adducts in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mutagenesis* 12(3), 153-158.
-

- Hodges, N.J. and Chipman, J.K. (2002) Down-regulation of the DNA-repair endonuclease 8-oxo-guanine DNA glycosylase 1 (hOGG1) by sodium dichromate in cultured human A549 lung carcinoma cells. *Carcinogenesis* 23(1), 55-60.
- Holt, M.S. (2000) Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. *Food and Chemical Toxicology* 38(SUPPL.1).
- Hook, S.E. and Lee, R.F. (2004) Genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late developmental stages of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* embryo as measured by the comet assay. *Aquatic Toxicology* 66(1), 1-14.
- Horvat, T., Kalafatic, M., Kopjar, N. and Kovacevic, G. (2005) Toxicity testing of herbicide norflurazon on an aquatic bioindicator species - the planarian *Polycelis felina* (Daly.). *Aquatic Toxicology* 73(4), 342-352.
- Hose, J.E. (1994) Large-scale genotoxicity assessments in the marine environment. *Environmental Health Perspectives* 102(SUPPL. 12), 29-32.
- Houk, V.S. (1992) The genotoxicity of industrial wastes and effluents: A review. *Mutation Research - Reviews in Genetic Toxicology* 277(2), 91-138.
- Houtgraaf, J.H., Versmissen, J. and van der Giessen, W.J. (2006) A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular Revascularization Medicine* 7(3), 165-172.
- Huet, M. (1949) Aperçu de la relation entre la pente et les populations piscicoles des eaux courantes. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie* 11, 332-351.
- Hynes, H.B.N. (1955) The reproductive cycle of some british freshwater gammaridae. *Journal of Animal Ecology* 24, 352-387.
- Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T. and Sepčić, K. (2010) Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environmental Science and Pollution Research* 17(3), 571-581.
- Jha, A.N., Hutchinson, T.H., Mackay, J.M., Elliott, B.M. and Dixon, D.R. (1996) Development of an in vivo genotoxicity assay using the marine worm *Platynereis dumerilii*

-
- (Polychaeta: Nereidae). *Mutation Research - Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 359(2), 141-150.
- Jha, A.N., Hagger, J.A. and Hill, S.J. (2000) Tributyltin induces cytogenetic damage in the early life stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35(4), 343-350.
- Jha, A.N. (2004) Genotoxicological studies in aquatic organisms: An overview. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552(1-2), 1-17.
- Jha, A.N., Dogra, Y., Turner, A. and Millward, G.E. (2005) Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 586(1), 47-57.
- Jha, A.N. (2008) Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23(3), 207-221.
- Jing-jing, M., Lu-qing, P., Jing, L. and Lin, Z. (2009) Effects of benzo[a]pyrene on DNA damage and histological alterations in gonad of scallop *Chlamys farreri*. *Marine Environmental Research* 67(1), 47-52.
- Johnson, B.T. (1992) Potential genotoxicity of sediments from the Great Lakes. *Environmental Toxicology and Water Quality* 7(4), 373-390.
- Jolibois, B. and Guerbet, M. (2006) Hospital wastewater genotoxicity. *Annals of Occupational Hygiene* 50(2), 189-196.
- Juhel, G., O'Halloran, J., Culloty, S.C., O'Riordan, R.M., Davenport, J., O'Brien, N.M., James, K.F., Furey, A. and Allis, O. (2007) In vivo exposure to microcystins induces DNA damage in the haemocytes of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, as measured with the comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48(1), 22-29.
- Kedwards, T.J., Blockwell, S.J., Taylor, E.J. and Pascoe, D. (1996) Design of an electronically operated flow-through respirometer and its use to investigate the effects of copper on the respiration rate of the amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57(4), 610-616.
-

- Kim, I.Y. and Hyun, C.K. (2006) Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64(3), 288-297.
- Kirkland, D., Kasper, P., Müller, L., Corvi, R. and Speit, G. (2008) Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: A follow-up to an ECVAM workshop. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 653(1-2), 99-108.
- Klobučar, G.I.V., Štambuk, A., Pavlica, M., Sertić Perić, M., Kutuzovic Hackenberger, B. and Hylland, K. (2010) Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology* 19(1), 77-84.
- Klobučar, G.O.I.V., Pavlica, M., Erben, R. and Papeš, D. (2003) Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology* 64(1), 15-23.
- Knakiewicz, T. and Ferreira, H.B. (2008) Evaluation of copper effects upon *Girardia tigrina* freshwater planarians based on a set of biomarkers. *Chemosphere* 71(3), 419-428.
- Kocan, R.M., Landolt, M.L. and Sabo, K.M. (1979) In vitro toxicity of eight mutagens/carcinogens for three fish cell lines. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 23(1-2), 269-274.
- Kohn, K.W. and Grimek Ewig, R.A. (1973) Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single strand interruptions in cells. *Cancer Research* 33(8), 1849-1853.
- Kopeika, J., Kopeika, E., Zhang, T., Rawson, D.M. and Holt, W.V. (2003) Detrimental effects of cryopreservation of loach (*Misgurnus fossilis*) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilised eggs in caffeine. *Cryobiology* 46(1), 43-52.
- Kosmehl, T., Krebs, F., Manz, W., Erdinger, L., Braunbeck, T. and Hollert, H. (2004) Comparative genotoxicity testing of Rhine river sediment extracts using the comet assay with permanent fish cell lines (RTG-2 and RTL-W1) and the Ames test. *Journal of Soils and Sediments* 4(2), 84-94.
- Kumaravel, T.S. and Bristow, R.G. (2005) Detection of genetic instability at HER-2/neu and p53 loci in breast cancer cells using Comet-FISH. *Breast Cancer Research and Treatment* 91(1), 89-93.

-
- Kumaravel, T.S. and Jha, A.N. (2006) Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 605(1-2), 7-16.
- Kunz, P.Y., Kienle, C. and Gerhardt, A. (2010) *Gammarus* spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: Toward integrated multilevel tests, pp. 1-76.
- Kuzmick, D.M., Mitchelmore, C.L., Hopkins, W.A. and Rowe, C.L. (2007) Effects of coal combustion residues on survival, antioxidant potential, and genotoxicity resulting from full-lifecycle exposure of grass shrimp (*Palaemonetes pugio* Holthius). *Science of the Total Environment* 373(1), 420-430.
- Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A. and Maise, G. (2001) Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development* 60(3), 397-404.
- Labieniec, M. and Gabryelak, T. (2004) Response of DNA, proteins and membrane bilayer in the digestive gland cells of freshwater mussel *Unio tumidus* to tannins exposure. *Toxicology in Vitro* 18(6), 773-781.
- Ladewig, V., Jungmann, D., Köhler, H.R., Schirling, M., Triebkorn, R. and Nagel, R. (2006) Population structure and dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) upstream and downstream from effluents of sewage treatment plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50(3), 370-383.
- Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F. and Amiard, J.C. (eds) (1997) *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*, Masson edition, Paris, 419 p.
- Large, A.T., Shaw, J.P., Peters, L.D., McIntosh, A.D., Webster, L., Mally, A. and Chipman, J.K. (2002) Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 54(3-5), 493-497.
- Larno, V., Laroche, J., Launey, S., Flammarion, P. and Devaux, A. (2001) Responses of chub (*Leuciscus cephalus*) populations to chemical stress, assessed by genetic markers, DNA damage and cytochrome P4501A induction. *Ecotoxicology* 10(3), 145-158.
-

- Larno, V. (2004) Réponses génétiques et physiologiques de populations de chevaine (*Leuciscus cephalus*) à la contamination chimique dans le bassin du Rhône, thèse en Toxicologie de l'Environnement, Université de Lyon 1.
- Lauridsen, R.B. and Friberg, N. (2005) Stream macroinvertebrate drift response to pulsed exposure of the synthetic pyrethroid lambda-cyhalothrin. *Environmental Toxicology* 20(5), 513-521.
- Lawley, P.D. and Phillips, D.H. (1996) DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 355(1-2), 13-40.
- Lawrence, A.J. and Poulter, C. (1998) Development of a sub-lethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus Duebeni*. *Water Research* 32(3), 569-578.
- Le Goff, J., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M.H., Budzinski, H., Pottier, D., Andrès, V. and Cachot, J. (2006) DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas. Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. *Aquatic Toxicology* 79(1), 55-64.
- Lee, R.F., Steinert, S.A., Nakayama, K. and Oshima, Y. (1999) Use of DNA strand damage (Comet assay) and embryo hatching effects to assess contaminant exposure in blue crab (*Callinectes sapidus*) embryos, pp. 341-349.
- Lee, R., Kim, G.B., Maruya, K.A., Steinert, S.A. and Oshima, Y. (2000) DNA strand breaks (comet assay) and embryo development effects in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryos after exposure to genotoxicants. *Marine Environmental Research* 50(1-5), 553-557.
- Lee, R.F. and Steinert, S. (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 544(1), 43-64.
- Lemaire, P. and Livingstone, D.R. (1997) Aromatic Hydrocarbon Quinone-mediated Reactive Oxygen Species Production in Hepatic Microsomes of the Flounder (*Platichthys flesus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 117(2), 131-139.

-
- Lemaître, J.-F., Rigaud, T., Cornet, S. and Bollache, L. (2009) Sperm depletion, male mating behaviour and reproductive 'time-out' in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda). *Animal Behaviour* 77(1), 49-54.
- Lemiere, S., Cossu-Leguille, C., Charissou, A.M. and Vasseur, P. (2005) DNA damage (comet assay) and 8-oxodGuo (HPLC-EC) in relation to oxidative stress in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Biomarkers* 10(1), 41-57.
- Leroy, D., Haubruge, E., De Pauw, E., Thomé, J.P. and Francis, F. (2010) Development of ecotoxicoproteomics on the freshwater amphipod *Gammarus pulex*: Identification of PCB biomarkers in glycolysis and glutamate pathways. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(3), 343-352.
- Lewis, C. and Galloway, T. (2008) Genotoxic damage in polychaetes: A study of species and cell-type sensitivities. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 654(1), 69-75.
- Lewis, C. and Galloway, T. (2009) Reproductive consequences of paternal genotoxin exposure in marine invertebrates. *Environmental Science and Technology* 43(3), 928-933.
- Livingstone, D.R. (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42(8), 656-666.
- Love J.D., Nguyen, H.T., Or, A.,Attri, A.K., Minton, K.W. (1986) UV-induced interstrand cross-linking of d(GT)_n d(CA)_n is facilitated by a structural transition. *Journal of biological Chemistry* 261, 10051-10057.
- Macneil, C., Dick, J.T.A. and Elwood, R.W. (1997) The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda): Problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 72(3), 349-364.
- MacNeil, C., Elwood, R.W. and Dick, J.T.A. (2000) Factors influencing the importance of *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda) in riverine salmonid diets. *Archiv fur Hydrobiologie* 149(1), 87-107.
-

- MacNeil, C., Dick, J.T.A., Bigsby, E., Elwood, R.W., Ian Montgomery, W., Gibbins, C.N. and Kelly, D.W. (2002) The validity of the *Gammarus* : *Asellus* ratio as an index of organic pollution: abiotic and biotic influences. *Water Research* 36(1), 75-84.
- Magni, P., De Falco, G., Falugi, C., Franzoni, M., Monteverde, M., Perrone, E., Sgro, M. and Bolognesi, C. (2006) Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). *Environmental Pollution* 142(1), 65-72.
- Maitland, P.S. (ed) (1966) *Studies on Loch Lomond 2. The Fauna of the River Endrick.*, Blackie and Son, Glasgow.
- Malev, O., Šrut, M., Maguire, I., Štambuk, A., Ferrero, E.A., Lorenzon, S. and Klobučar, G.I.V. (2010) Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 152(4), 433-443.
- Maltby, L. (1995) Sensitivity of the Crustaceans *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) to short-term exposure to hypoxia and unionized ammonia: Observations and possible mechanisms. *Water Research* 29(3), 781-787.
- Maltby, L. and Crane, M. (1994) Responses of *Gammarus pulex* (Amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution* 84(1), 45-52.
- Maltby, L. and Naylor, C. (1990) Preliminary observations on the ecological relevance of the *Gammarus* 'scope for growth' assay: effect of zinc on reproduction. *Functional Ecology* 4(3), 393-397.
- Maltby, L., Clayton, S.A., Wood, R.M. and McLoughlin, N. (2002) Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(2), 361-368.
- Mamaca, E., Bechmann, R.K., Torgrimsen, S., Aas, E., Bjornstad, A., Baussant, T. and Floch, S.L. (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), 191-201.

-
- Manas, F., Peralta, L., Raviolo, J., Garcia Ovando, H., Weyers, A., Ugnia, L., Gonzalez Cid, M., Larripa, I. and Gorla, N. (2009) Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(3), 834-837.
- Martin, J.W. and Davis, G.E. (eds) (2001) An updated classification of the recent Crustacea, Natural History Museum of Los Angeles Country, Los Angeles.
- Maund, S.J., Taylor, E.J. and Pascoe, D. (1992) Population responses of the freshwater amphipod crustacean *Gammarus pulex* (L.) to copper. *Freshwater Biology* 28(1), 29-36.
- McCarthy, J.F. and Shugart, L.R. (eds) (1990) Biomarkers of environmental contamination, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA.
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R.M. and Yu, H. (2000) Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(8), 2085-2092.
- Menezes, S., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L. and R. Peck, M. (2006) Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: Temperature, salinity and handling stress effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 335(1), 114-122.
- Mersch, J. and Beauvais, M.N. (1997) The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 393(1-2), 141-149.
- Miller, D.H., Jensen, K.M., Villeneuve, D.L., Kahl, M.D., Makynen, E.A., Durhan, E.J. and Ankley, G.T. (2007) Linkage of biochemical responses to population-level effects: A case study with vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(3), 521-527.
- Milowska, K., Gabryelak, T., Dudala, J., Labieniec, M. and Slobozhanina, E. (2003) Biological Activity of Pentachlorophenol on the Digestive Gland Cells of the Freshwater Mussel *Unio tumidus*. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 58(11-12), 867-872.
-

- Mitchelmore, C.L. and Chipman, J.K. (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.
- Mitchelmore, C.L. and Hyatt, S. (2004) Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay. *Marine Environmental Research* 58(2-5), 707-711.
- Miyamae, Y., Iwasaki, K., Kinoshita, N., Tsuda, S., Murakami, M., Tanaka, M. and Sasaki, Y.F. (1997) Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 393(1-2), 107-113.
- Morin, S., Duong, T.T., Dabrin, A., Coynel, A., Herlory, O., Baudrimont, M., Delmas, F., Durrieu, G., Schäfer, J., Winterton, P., Blanc, G. and Coste, M. (2008) Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France. *Environmental Pollution* 151(3), 532-542.
- Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrier, V. and Devaux, A. (2005) Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: Establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environmental Toxicology* 20(1), 74-84.
- Mouchet, F., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Cuenot, Y., Bourdineaud, J.P., Boudou, A. and Gauthier, L. (2006) Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. *Aquatic Toxicology* 78(2), 157-166.
- Moustacchi, E. (2000) DNA damage and repair: Consequences on dose-responses. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 464(1), 35-40.
- Nacci, D. and Nelson, S. (1992) Application of the DNA alkaline unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves. *Marine Environmental Research* 33, 83-100.
- Nacci, D., Nelson, S., Nelson, W. and Jackim, E. (1992) Application of the DNA alkaline unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves. *Marine Environmental Research* 33(2), 83-100.
- Nacci, D.E., Cayula, S. and Jackim, E. (1996) Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology* 35(3-4), 197-210.

-
- Nagarajappa, Ganguly, A. and Goswami, U. (2006) DNA damage in male gonad cells of Green mussel (*Perna viridis*) upon exposure to tobacco products. *Ecotoxicology* 15(4), 365-369.
- Nahon, S., Charles, F. and Pruski, A.M. (2008) Improved comet assay for the assessment of UV genotoxicity in Mediterranean sea urchin eggs. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49(5), 351-359.
- Narbonne, J.F., Aarab, N., Clérandeau, C., Daubèze, M., Narbonne, J., Champeau, O. and Garrigues, P. (2005) Scale of classification based on biochemical markers in mussels: Application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. *Biomarkers* 10(1), 58-71.
- Newman, M.C. and Clements, W.H. (eds) (2008) *Ecotoxicology: a comprehensive treatment*, CRC Press.
- Nigro, M., Falleni, A., Barga, I.D., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F. and Frenzilli, G. (2006) Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology* 77(4), 339-347.
- Oakes, K.D., McMaster, M.E., Pryce, A.C., Munkittrick, K.R., Portt, C.B., Hewitt, L.M., MacLean, D.D. and Van Der Kraak, G.J. (2003) Oxidative stress and bioindicators of reproductive function in pulp and paper mill effluent exposed white sucker. *Toxicological Sciences* 74(1), 51-65.
- Ohe, T., Watanabe, T. and Wakabayashi, K. (2004) Mutagens in surface waters: A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 567(2-3 SPEC. ISS.), 109-149.
- Olsen, T., Ellerbeck, L., Fisher, T., Callaghan, A. and Crane, M. (2001) Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius* Meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(8), 1725-1732.
- Osman, A.M., Rotteveel, S., den Besten, P.J. and van Noort, P.C.M. (2004) In vivo exposure of *Dreissena polymorpha* mussels to the quinones menadione and lawsone: Menadione is more toxic to mussels than lawsone. *Journal of Applied Toxicology* 24(2), 135-141.
-

- Ostling, O. and Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123(1), 291-298.
- Pagano, G., De Biase, A., Deeva, I.B., Degan, P., Doronin, Y.K., Iaccarino, M., Oral, R., Trieff, N.M., Warnau, M. and Korkina, L.G. (2001) The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. *Life Sciences* 68(15), 1735-1749.
- Palmqvist, A., Selck, H., Rasmussen, L.J. and Forbes, V.E. (2003) Biotransformation and genotoxicity of fluoranthene in the deposit-feeding polychaete *Capitella* sp. I. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(12), 2977-2985.
- Pampanin, D.M., Viarengo, A., Garrigues, P. and Andersen, O.K. (2006) Background for the BEEP Stavanger workshops: Biological effects on marine organisms in two common, large, laboratory experiments and in a field study. Comparison of the value (sensitivity, specificity, etc.) of core and new biomarkers. *Aquatic Toxicology* 78(SUPPL.).
- Pantani, C., Pannunzio, G., De Cristofaro, M., Novelli, A.A. and Salvatori, M. (1997) Comparative acute toxicity of some pesticides, metals, and surfactants to *Gammarus italicus* Goedm. and *Echinogammarus tibaldii* Pink. and Stock (Crustacea: Amphipoda). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59(6), 963-967.
- Park, S.Y. and Choi, J. (2009) Genotoxic Effects of Nonylphenol and Bisphenol A Exposure in Aquatic Biomonitoring Species: Freshwater Crustacean, *Daphnia magna*, and Aquatic Midge, *Chironomus riparius*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1-6.
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D. and Provini, A. (2010) Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 79(5), 489-498.
- Pasantes, J.J., Martinez-Expósito, M.J., Torreiro, A. and Mendez, J. (1996) The sister chromatid exchange test as an indicator of marine pollution: Some factors affecting SCE frequencies in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series* 143(1-3), 113-119.

-
- Pavlica, M., Klobučar, G.I.V., Mojač, N., Erben, R. and Papeć, D. (2001) Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 490(2), 209-214.
- Pavlica, M., Klobučar, G.I.V., Vetma, N., Erben, R. and Papeć, D. (2000) Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 465(1-2), 145-150.
- Peakall, D.B. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment. (1) Introduction. *Ecotoxicology* 3(3), 157-160.
- Pellacani, C., Buschini, A., Furlini, M., Poli, P. and Rossi, C. (2006) A battery of in vivo and in vitro tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. *Aquatic Toxicology* 77(1), 1-10.
- Peluso, M., Munnia, A., Bolognesi, C. and Parodi, S. (1998) ³²P-Postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 31(1), 55-59.
- Pesch, G.G., Pesch, C.E. and Malcolm, A.R. (1981) *Neanthes arenaceodentata*, a cytogenetic model for marine genetic toxicology. *Aquatic Toxicology* 1(5-6), 301-311.
- Picado, A., Bebianno, M.J., Costa, M.H., Ferreira, A. and Vale, C. (2007) Biomarkers: A strategic tool in the assessment of environmental quality of coastal waters. *Hydrobiologia* 587(1), 79-87.
- Pisoni, M., Cogotzi, L., Frigeri, A., Corsi, I., Bonacci, S., Iacocca, A., Lancini, L., Mastrototaro, F., Focardi, S. and Svelto, M. (2004) DNA adducts, benzo(a)pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilus galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy). *Environmental Research* 96(2), 163-175.
- Pochon-Masson, J. (1994) Les gamétogenèses. In: *Traité de zoologie, Crustacés*, J.Forest (ed).
- Pöckl, M. and Humpesch, U.H. (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.
-

- Potter, D., Clarius, T.M., Wright, A.S. and Watson, W.P. (1994) Molecular dosimetry of DNA adducts in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to benzo(a)pyrene by different routes. *Archives of Toxicology* 69(1), 1-7.
- Pra, D., Lau, A.H., Knakiewicz, T., Carneiro, F.R. and Erdtmann, B. (2005) Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 585(1-2), 79-85.
- Pruski, A.M. and Dixon, D.R. (2002) Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquatic Toxicology* 57(3), 127-137.
- Pruski, A.M., Nahon, S., Escande, M.L. and Charles, F. (2009) Ultraviolet radiation induces structural and chromatin damage in Mediterranean sea-urchin spermatozoa. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 673(1), 67-73.
- Rajaguru, P., Vidya, L., Baskarathupathi, B., Kumar, P.A., Palanivel, M. and Kalaiselvi, K. (2002) Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 517(1-2), 29-37.
- Rank, J. and Jensen, K. (2003) Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54(3), 323-329.
- Rank, J., Lehtonen, K.K., Strand, J. and Laursen, M. (2007) DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology* 84(1), 50-61.
- 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.
- Reger, J.F., Itaya, P.W. and Fitzgerald, M.A. (1979) A thin section and freeze-fracture study on membrane specializations in spermatozoa of the isopod, *Armadillidium vulgare*. *Journal of Ultrastructure Research* 67(2), 180-193.
- Reynaud, S. and Deschaux, P. (2006) The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquatic Toxicology* 77(2), 229-238.

-
- Ribas, G., Frenzilli, G., Barale, R. and Marcos, R. (1995) Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology* 344(1-2), 41-54.
- Rinbio (2002).
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J. and Zauke, G.-P. (2000) Crustaceans as Bioindicators. In "Biomonitoring of Polluted Water - Reviews on Actual Topics, Environmental Research Forum", A. Gerhardt (Ed.), Trans Tech Publications - Scitech Publications, Zurich.
- Riva, C., Binelli, A., Cogni, D. and Provini, A. (2007) Evaluation of DNA damage induced by decabromodiphenyl ether (BDE-209) in hemocytes of *Dreissena polymorpha* using the comet and micronucleus assays. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48(9), 735-743.
- Rivière, J.L. (1993) Les animaux sentinelles. *Courrier de l'environnement* 20, 59-68.
- Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M.H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., Budzinski, H., Pottier, D., Andrée, V., Lebailly, P. and Cachot, J. (2006) Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquatic Toxicology* 79(1), 65-77.
- Rose, W.L., Nisbet, R.M., Green, P.G., Norris, S., Fan, T., Smith, E.H., Cherr, G.N. and Anderson, S.L. (2006) Using an integrated approach to link biomarker responses and physiological stress to growth impairment of cadmium-exposed larval topsmelt. *Aquatic Toxicology* 80(3), 298-308.
- Rosenberg, D.M. and Resh, V.H. (eds) (1993) *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates.*, Chapman & Hall., New York.
- Roux, L.A. (1970) Les gammarés du groupe *pulex*. Essai de systématique biologique-Etude Morphologique et Morphométrique. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* 111, 313-356.
- Russell, W.M.S. and Burch, R.L. (1959) *The removal of inhumanity : The Three R's. The Principles of Humane Experimental Technique.*
-

- Rydberg, B. and Johanson, K.J. (1978) Estimation of single strand break in single mammalian cells. In "DNA Repair mechanisms", Hanawalt P.C., Friedberg E.C., Fox C.F. (eds). Academic Press, New York, 465-468.
- Sanchez, W. and Porcher, J.M. (2009) Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 28(2), 150-158.
- Sanchez, W., Piccini, B., Ditché, J.-M. and Porcher, J.-M. (2008) Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Environment International* 34(6), 791-798.
- Sasaki, Y.F., Izumiyama, F., Nishidate, E., Ishibashi, S., Tsuda, S., Matsusaka, N., Asano, N., Saotome, K., Sofuni, T. and Hayashi, M. (1997) Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: A preliminary study. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 393(1-2), 133-139.
- Sastre, M.P., Collado, E., Collazo, G., Lebrón, S., Mena, L., Morales, S., Muller, R., Pérez, L., Rivera, P. and Vélez, Y. (2005) DNA damage in the Caribbean mussel *Brachiodontes exustus*: A comet assay evaluation. *Bulletin of Marine Science* 77(1), 73-81.
- Schilderman, P.A.E.L., Moonen, E.J.C., Maas, L.M., Welle, I. and Kleinjans, J.C.S. (1999) Use of crayfish in biomonitoring studies of environmental pollution of the river Meuse. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44(3), 241-252.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebkorn, R. and Köhler, H.R. (2005) Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49(1), 53-61.
- Schlenk, D., Perkins, E.J., Hamilton, G., Zhang, Y.S. and Layher, W. (1996) Correlation of hepatic biomarkers with whole animal and population-community metrics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53(10), 2299-2309.
- Schmitz, E.H. (1992) Amphipoda. In " Microscopic Anatomy of invertebrates" Harrison, F.W. and Humes, A.G. (eds), John Wiley and Son, New York.

-
- Schröder, H.C., Hassanein, H.M.A., Lauenroth, S., Koziol, C., Mohamed, T.A.A.A., Lacorn, M., Steinhart, H., Batel, R. and Müller, W.E.G. (1999) Induction of DNA strand breaks and expression of HSP70 and GRP78 homolog by cadmium in the marine sponge *Suberites domuncula*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 36(1), 47-55.
- Shaw, J.P., Large, A.T., Chipman, J.K., Livingstone, D.R. and Peters, L.D. (2000) Seasonal variation in mussel *Mytilus edulis* digestive gland cytochrome P4501A- and 2E-immunoidentified protein levels and DNA strand breaks (Comet assay). Marine Environmental Research 50(1-5), 405-409.
- Shaw, J.P., Large, A.T., Livingstone, D.R., Doyotte, A., Renger, J., Chipman, J.K. and Peters, L.D. (2002) Elevation of cytochrome P450-immunopositive protein and DNA damage in mussels (*Mytilus edulis*) transplanted to a contaminated site. Marine Environmental Research 54(3-5), 505-509.
- Shugart, L. (1988) An alkaline unwinding assay for the detection of DNA damage in aquatic organisms. Marine Environmental Research 24(1-4), 321-325.
- Shugart, L.R. (1990) DNA damage as an indicator of pollutant-induced genotoxicity, pp. 348-355.
- Shugart, L.R. and Theodorakis, C. (1996) Genetic ecotoxicology: The genotypic diversity approach. Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology 113(2), 273-276.
- Simon, R., Jubeaux, G., Chaumot, A., Lemoine, J., Geffard, O. and Salvador, A. Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*). Journal of Chromatography A 1217(31), 5109-5115.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175(1), 184-191.
- Singh, N.P. (2000) Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 455(1-2), 111-127.
-

- Siu, S.Y.M., Lam, P.K.S., Martin, M., Caldwell, C.W. and Richardson, B.J. (2008) The use of selected genotoxicity assays in green-lipped mussels (*Perna viridis*): A validation study in Hong Kong coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 57(6-12), 479-492.
- Smolarz, K. and Berger, A. (2009) Long-term toxicity of hexabromocyclododecane (HBCDD) to the benthic clam *Macoma balthica* (L.) from the Baltic Sea. *Aquatic Toxicology* 95(3), 239-247.
- Soetaert, A., Moens, L.N., Van Der Ven, K., Van Leemput, K., Naudts, B., Blust, R. and De Coen, W.M. (2006) Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 142(1-2), 66-76.
- Solé, M., Porte, C., Biosca, X., Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., Livingstone, D.R. and Albaigés, J. (1996) Effects of the "Aegean Sea" oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 113(2), 257-265.
- Sreekumar, S. and Adiyodi, G. (1983) Role of eyestalk principle(s) in spermatogenesis of the freshwater shrimp, *Macrobrachium idella*. *First International Biennial Conference of Warm Water Aquaculture*, 15-16.
- Štambuk, A., Pavlica, M., Malovi, L. and Klobučar, G.I.V. (2008) Persistence of DNA damage in the freshwater mussel *Unio pictorum* upon exposure to ethyl methanesulphonate and hydrogen peroxide. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49(3), 217-225.
- Štambuk, A., Pavlica, M., Vignjević, G., Bolarić, B. and Klobučar, G.I.V. (2009) Assessment of genotoxicity in polluted freshwaters using caged painter's mussel, *Unio pictorum*. *Ecotoxicology* 18(4), 430-439.
- Sumathi, M., Kalaiselvi, K., Palanivel, M. and Rajaguru, P. (2001) Genotoxicity of textile dye effluent on fish (*Cyprinus carpio*) measured using the comet assay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66(3), 407-414.
- Sutcliffe, D.W. (1993) Reproduction in *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda): female strategies. *Freshwater Forum* 3, 26-64.

-
- Sutcliffe, D.W. and Hildrew, A.G. (1989) Invertebrate communities in acid streams. Acid toxicity and aquatic animals, 13-29.
- Taban, I.C. and Bacchetta, R. (2004) Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Marine Environmental Research* 58(2-5), 701-705.
- Taban, I.C., Bechmann, R.K., Torgrimsen, S., Sundt, R., Bjornstad, A., Larsen, B.K. and Andersen, O.K. (2008) DNA damage in mussels following exposure to three potential endocrine disruptors using the comet assay and the alkaline unwinding assay. *Marine Environmental Research* 66(1), 65.
- Tachet, H., Bournaud, M., Richoux, P. and Usseglio-Polaterra. (2000) *Invertébrés d'eau douce : Systématiques, biologie, écologie*, CNRS édition, Paris, 588 p.
- Taylor, E.J., Jones, D.P., Maund, S.J. and Pascoe, D. (1993) A new method for measuring the feeding activity of *Gammarus pulex* (L). *Chemosphere* 26(7), 1375-1381.
- Taylor, E.J., Maund, S.J. and Pascoe, D. (1991) Toxicity of four common pollutants to the freshwater macroinvertebrates *Chironomus riparius* Meigen (insecta:diptera) and *Gammarus pulex* (L.) (crustacea:amphipoda). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21(3), 371-376.
- Theodorakis, C.W., D'Surney, S.J. and Shugart, L.R. (1994) Detection of genotoxic insult as DNA strand breaks in fish blood cells by agarose gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13(7), 1023-1031.
- Theodorakis, C.W. and Shugart, L.R. (1998) Genetic ecotoxicology III: The relationship between DNA strand breaks and genotype in mosquito fish exposed to radiation. *Ecotoxicology* 7(4), 227-236.
- Theodorakis, C.W. (2003) Establishing causality between population genetic alterations and environmental contamination in aquatic organisms. *Human and Ecological Risk Assessment* 9(1), 37-58.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35(3), 206-221.
-

- Timbrell, J.A. (1998) Biomarkers in toxicology. *Toxicology* 129(1), 1-12.
- Tran, D., Moody, A.J., Fisher, A.S., Foulkes, M.E. and Jha, A.N. (2007) Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. *Aquatic Toxicology* 84(1), 11-18.
- Van Beneden, R.J. (1994) Molecular analysis of bivalve tumors: Models for environmental/genetic interactions. *Environmental Health Perspectives* 102(SUPPL. 12), 81-83.
- Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N.P.E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(2), 57-149.
- Vasseur, P. and Cossu-Leguille, C. (2003) Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International* 28(8), 711-717.
- Venier, P. and Zampieron, C. (2005) Evidence of genetic damage in grass gobies and mussels from the Venice lagoon. *Environment International* 31(7 SPEC. ISS.), 1053-1064.
- Venier, P., Pallavicini, A., De Nardi, B. and Lanfranchi, G. (2003) Towards a catalogue of genes transcribed in multiple tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Gene* 314(1-2), 29-40.
- Villela, I.V., de Oliveira, I.M., Silveira, J.C., Dias, J.F., Henriques, J.A.P. and da Silva, J. (2007) Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 628(2), 76-86.
- Vincent-Hubert, F. (2000) cDNA cloning and expression of two Ki-ras genes in the flounder, *Platichthys flesus*, and analysis of hepatic neoplasms. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 126(1), 17-27.
- Waldmann, P., Pivcevic, B., Muller, W.E.G., Zahn, R.K. and Kurelec, B. (1995) Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: Studies with the fresh water clam *Corbicula fluminea*. *Mutation Research - Genetic Toxicology* 342(3-4), 113-123.

-
- Watts, M.M., Pascoe, D. and Carroll, K. (2001) Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens. *Water Research* 35(10), 2347-2352.
- Watts, M.M., Pascoe, D. and Carroll, K. (2002) Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 β -ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(2), 445-450.
- Welton, J.S. and Clarke, R.T. (1980) Laboratory studies on the reproduction and growth of the amphipods, *Gammarus pulex* (L.). *Animal Ecology* 49, 581-592.
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F. and Akcha, F. (2007) Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology* 85(2), 133-142.
- White, P.A. and Claxton, L.D. (2004) Mutagens in contaminated soil: A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 567(2-3 SPEC. ISS.), 227-345.
- White, P.A. and Rasmussen, J.B. (1998) The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 410(3), 223-236.
- Wijnhoven, S., Van Riel, M.C. and Van Der Velde, G. (2003) Exotic and indigenous freshwater gammarid species: Physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water. *Aquatic Ecology* 37(2), 151-158.
- Wiklund, A.K.E. and Sundelin, B. (2004) Biomarker sensitivity to temperature and hypoxia - A seven year field study. *Marine Ecology Progress Series* 274, 209-214.
- Wilson, J.T., Pascoe, P.L., Parry, J.M. and Dixon, D.R. (1998) Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399(1), 87-95.
- Winter, M.J., Day, N., Hayes, R.A., Taylor, E.W., Butler, P.J. and Chipman, J.K. (2004) DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552(1-2), 163-175.
-

- Wurgler, F.E. and Kramers, P.G.N. (1992) Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology). *Mutagenesis* 7(5), 321-327.
- Xu, L., Zheng, G.J., Lam, P.K.S. and Richardson, B.J. (1999) Relationship between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA adducts in green-lipped mussels (*Perna viridis*). *Ecotoxicology* 8(2), 73-82.
- Xuereb, B., Noury, P., Felten, V., Garric, J. and Geffard, O. (2007) Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos. *Toxicology* 236(3), 178-189.
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J. and Geffard, O. (2009) Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology* 94(2), 114-122.
- Xuereb, B. (2009) Développement de marqueurs de neurotoxicité et de perturbations endocrines chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*, thèse en Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz.
- Yin, X.H., Li, S.N., Zhang, L., Zhu, G.N. and Zhuang, H.S. (2008) Evaluation of DNA damage in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) after in vivo exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the comet assay. *Ecotoxicology* 17(4), 280-286.
- Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C. and Vilella, S. (2003) Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology* 47(3), 227-235.
- Živić, I. and Marković, Z. (2007) Distribution of the species *Gammarus balcanicus* and *Gammarus fossarum* on the territory of Serbia (Central part of the Balkan peninsula). *Crustaceana* 80(1), 67-76.

ANNEXE I

Modifications de l'étape de lyse lors de l'application du test Comet aux **spermatozoïdes** de différentes vertébrés (mammifère, poisson et amphibien).

Espèce	Stress	Essai	Etape de lyse	Déroulement	Electrophorèse	Paramètre observé	Référence
MAMMIFERE							
Homme	Mutagène alimentaire	Alcalin	A/ 1h, 4°C B/ 0,05 µg/ml proteinase K , 18h, 37°C	20 min	10 min 25 V 300 mA	TM, head intensity	Andersson, 1997
Homme	Irradiation au Cobalt-60	Alcalin	A/ 1% SLS, 1 h, température ambiante B/ 0,2 mg proteinase K , 20 h, 37°C	30 min	30 min 125 mV 125 mA	Comet score	Aravindan et al., 1997
Homme	Rayons X	Alcalin	A/ 1h, 4°C B/ Proteinase K (100 µg/ml), 20h, 37°C	20 min	10 min 0,7 V.cm ⁻¹ 300 mA	Head intensity	Hughes et al., 1997
Homme	Styrène	Alcalin	A/ 1h, 4°C B/ 100 µg/ml Proteinase K , 16h, 37°C	20 min	10 min 25 V 300 mA	TI OTM	Migliore et al., 2002
Homme	Dioxine	Neutre	A/ 40 mmol/l dithiothreitol , 100 µg/ml proteinase K , 3h	20 min	20 min 0,8 V.cm ⁻¹ 100 mA	TI OTM	Oh et al., 2005
Homme	Age	Alcalin	A/ 2 h, 4°C B/ 10 mM dithiothreitol , 30 min, 4°C	-	20 min 24 V	TI	Schmid et al., 2007
Rat	H ₂ O ₂ , bleu de méthylène, B[a]P, N-Nitrosomorpholine	Alcalin	1 h, 4°C	40 min	30 min 25 V 300 mA	TI	Lazarova et al., 2006
Rat	Traitement au bleomycine, etoposide, and cisplatinum	Alcalin	A/ 40 mM dithiothreitol , 1h, 4°C B/ 0,1 mg/mL Proteinase K , 3h, 37°C	45 min 4°C	10 min 0,7 V.cm ⁻¹	TL, TI, TM	Delbes et al., 2007
Singe	Cryopreservation	Alcalin	1% SLS, 1h, 37°C proteinase K (200µg/ml), 20 h	20 min	15 min 20 V 160-180mA	% de comète	Li et al., 2007
Verrat	Procédure de collection	Neutre	A/ 1% SLS, 2h B/ RNase A (pH 7.4), 4 h C/ Proteinase K , 20 h	15 min	1 h 12V 120 mA	TL, TM	Fraser et Strzezek, 2007
Verrat	Lipoprotéine de basse densité	Neutre	A/ 2.5% dithiothreitol , 1h, 4°C B/ 1% SLS, 2h, 4°C C/ 20 µg/ml RNase-A , 4 h D/ proteinase K , 20h, 37°C	20 min	1 h 12V 100mA	Comet score TL, TI, TM	Jiang et al., 2007
Dinde	Stockage pendant 24 et 48h à 4°C	Neutre	A/ 1% SLS B / 40 mM dithiothreitol , 0.1 mg/ml proteinase K , 3 h, 37°C	15 min	10 min 20 V 5 W	HI, TL, OTM	Kotlowska et al., 2007
Souris	Bentazon pendant 100 jours	Alcalin	A/ 1% SLS, 1h B/ proteinase K , 20h, 37°C	60 min	20 min 25 V 300 mA	Comet score	Garagna et al., 2005

Souris	Rayons X indium-114m	Neutre	A/ 4mM DDT , 1h B/ 100 µg/ml protéinase K , 3h	-	20 min 25 V 0.01 A	TL, TI, TM DNA migration	Haines et al., 2001
Souris	Température	Alcalin	A/ 0,75 % SDS, 1% SLS, 3h, 37 °C	20 min	10 min 25 V 300 mA	TI, TM, head intensity	Banks et al., 2005
Souris	Deficience en protamines	Alcalin	A/ 1 h, 4°C B/ 10 mM dithiothreitol , 30 min, 4°C C/ 4 mM lithium diiodosalicylate , 90 min, T°C ambiante	-	10 min 25 V	Comet score	Cho et al., 2003
Taureau	Procédure de collection	Neutre	A/ 40 mM dithiothreitol B/ 10 µg/ml Proteinase K , 1 h, T°C ambiante C/ 2h30, 37 °C	20 min	20 min 25 V 0.01 A	TL, TM, TI, head intensity	Boe-Hansen et al., 2004
POISSON							
Tuite arc-en-ciel	Cryopreservation	Alcalin	A/ 1% SLS, 1h, 4°C B/ 10 mM dithiothreitol , 30 min C/ 4 mM lithium diiodosalicylate 90 min, T°C ambiante	20 min	10 min 25 V 300 mA	TI, OTM	Cabrita et al., 2004
Tuite arc-en-ciel	Cryopreservation	Alcalin	A/ 1h, température ambiante	20 min	24 min 20 V	TM, Comet score	Labbe et al., 2001
Tuite arc-en-ciel	UV, H ₂ O ₂	Alcalin	A/ 1% SLS, 1h, 4°C	60 min	30 min 25 V 300 mA	TI, OTM	Dietrich et al., 2005
Lamproie	UV, H ₂ O ₂ , Bisazir, 4 jours de stockage à 4°C	Alcalin	A/ 1% SLS, 1h, 4°C	60 min	30 min 25 V 300 mA	Comet score, head intensity	Cierszko et al., 2005
Carpe	Duroquinone	Alcalin	A/ 1h, 4°C	45 min	30 min 1 V.cm ⁻¹ 300 mA	Tail intensity Olive Tail moment	Zhou et al., 2006
Bar	Cryopreservation	Alcalin	A/ 1% SLS, 1h, 4°C B/ 10 mM dithiothreitol , 90 min, température ambiante	20 min	10 min 25 V	TI, TM	Zilli et al., 2003
AMPHIBIEN							
Xénope	Temposide	Alcalin	A/ 1% SLS, toute la nuit, 4°C B/ 20-30 min, 2,5 M NaOH	20 min	10 min 20 V	% de comète	Morse-Gaudio and Risley, 1994

ANNEXE II

Dosage des métaux dans les organismes

Le dosage des métaux dans les organismes est réalisé au laboratoire d'écotoxicologie de l'unité de recherche sur la vigne et le vin de Champagne-Stress et Environnement, Université de Reims-Champagne Ardennes.

Après récupération des organismes, ils sont séchés sur du papier absorbant, pesés et congelés immédiatement à -80°C . Un pool de plusieurs gammars est nécessaire pour effectuer un dosage précis. Ainsi, 3 réplicats de 5 gammars sont pesés. Ils sont digérés dans de l'acide nitrique Suprapur pendant 12h. Le volume des échantillons est ajusté à 2 mL avec de l'eau ultra-pure (Dedourge-Geffard et al., 2009).

Les métaux sont dosés dans cette solution par spectrométrie d'absorption atomique pour le Cd et par absorption atomique de flamme pour le Zn, en appliquant le procédé Zeeman, pour corriger les absorptions non spécifiques dues à de fines particules solides ou liquides non décomposées et ayant pour effet de diffuser la lumière incidente (Pinta et al., 1982). Ce phénomène est surtout observé en flamme (Amiard et al., 1987).

La validité de la méthode est éprouvée par une analyse des métaux d'intérêt dans des standards d'hépatopancréas de homard (TORT-2, NRC) (n=6).

Résumé

Les substances génotoxiques, issues de nombreux rejets industriels, domestiques, hospitaliers et agricoles représentent un risque majeur pour l'environnement et pour le milieu aquatique en particulier. Ces substances ont la capacité d'altérer l'intégrité de l'ADN, support biochimique de l'hérédité et présentent un risque mutagène et tumorigène avéré pour de nombreuses espèces. Dans le milieu aquatique, les invertébrés sont d'une importance capitale pour le bon fonctionnement de l'écosystème, mais très peu d'outils sont disponibles pour évaluer la génotoxicité chez ces espèces. Les nouvelles obligations réglementaires telles que la Directive Cadre sur l'Eau (2000) qui concerne l'évaluation de la qualité des milieux et l'atteinte du bon état écologique pour toutes les masses d'eau européennes, nécessitent le développement d'outils sensibles, fiables et précoces pour un diagnostic robuste de la qualité biologique des écosystèmes. Dans ce contexte, ce travail a porté sur le développement, la validation, l'interprétation et l'application au milieu naturel d'un biomarqueur de génotoxicité chez une espèce sentinelle d'invertébré du milieu dulçaquicole, le gammarus *Gammarus fossarum*.

Ces travaux sont à notre connaissance la première évaluation de la génotoxicité chez un crustacé d'eau douce d'intérêt écologique, par l'application du test Comet sur trois types cellulaires. L'aspect novateur de ce travail repose sur la mise en évidence d'une relation entre endommagement de l'ADN des spermatozoïdes et succès reproducteur. Après la mise au point d'un protocole standard, nous avons établi une valeur basale de référence tenant compte de la variabilité spatio-temporelle de la réponse du biomarqueur, ainsi qu'un seuil de dommages à l'ADN au delà duquel des effets significatifs sur la descendance sont observés. Enfin, l'intérêt d'utiliser ce biomarqueur à vocation écologique dans un cadre d'évaluation du risque environnemental est confirmé par les résultats obtenus sur le terrain par des méthodes d'encagement.

Mots clés : Génotoxicité, test Comet, invertébré, milieu dulçaquicole, *Gammarus fossarum*, spermatozoïdes, succès reproducteur, effet sur la descendance.

Summary

Genotoxic compounds, released from industrial, domestic, hospital and agricultural activities can have adverse effects in particular on aquatic ecosystems. Genotoxicants can induce deleterious changes in DNA, the biochemical carrier of inheritance. The presence of genotoxicants is correlated to the occurrence of mutations and tumors in many aquatic organisms. However, aquatic invertebrates such as crustaceans still lack genotoxicity biomarkers, although these species play an essential role in ecosystems and are currently used as sentinel species in ecotoxicological studies. European countries that agreed the European Water Directive Policy (2000) have to assess marine and freshwater quality in order to promote sustainable water use and improve the status of aquatic ecosystems. To this end, one approach is to develop and validate early warning tools (i.e. biomarkers) in ecologically relevant species. In this perspective, the objectives of the present work were to develop, to validate, to study the ecological significance of a genotoxicity biomarker in the freshwater gammarid species *Gammarus fossarum* and finally to assess it in the field.

This is to our knowledge the first genotoxicity assessment in an ecologically relevant freshwater crustacean, here using the Comet assay on three cell-types. The novelty of our approach was to evaluate the consequences of the sperm DNA damage on reproduction, a crucial biological function. Taking into account biotic, abiotic and methodological factors, a robust reference value in *Gammarus fossarum* spermatozoa DNA damage has been established. Then, a relationship bridging the biomarker response measured in spermatozoa and its consequences on reproduction has been shown, enabling the establishment of a DNA damage threshold level leading to significant consequences for the reproduction and possibly subsequent population dynamics. Our work clearly demonstrated that DNA damage in *Gammarus fossarum* spermatozoa is an accurate and relevant biomarker for environmental risk assessment.

Keywords: Genotoxicity, Comet assay, invertebrate, freshwater environment, *Gammarus fossarum*, spermatozoa, reproductive success, impact on offspring.