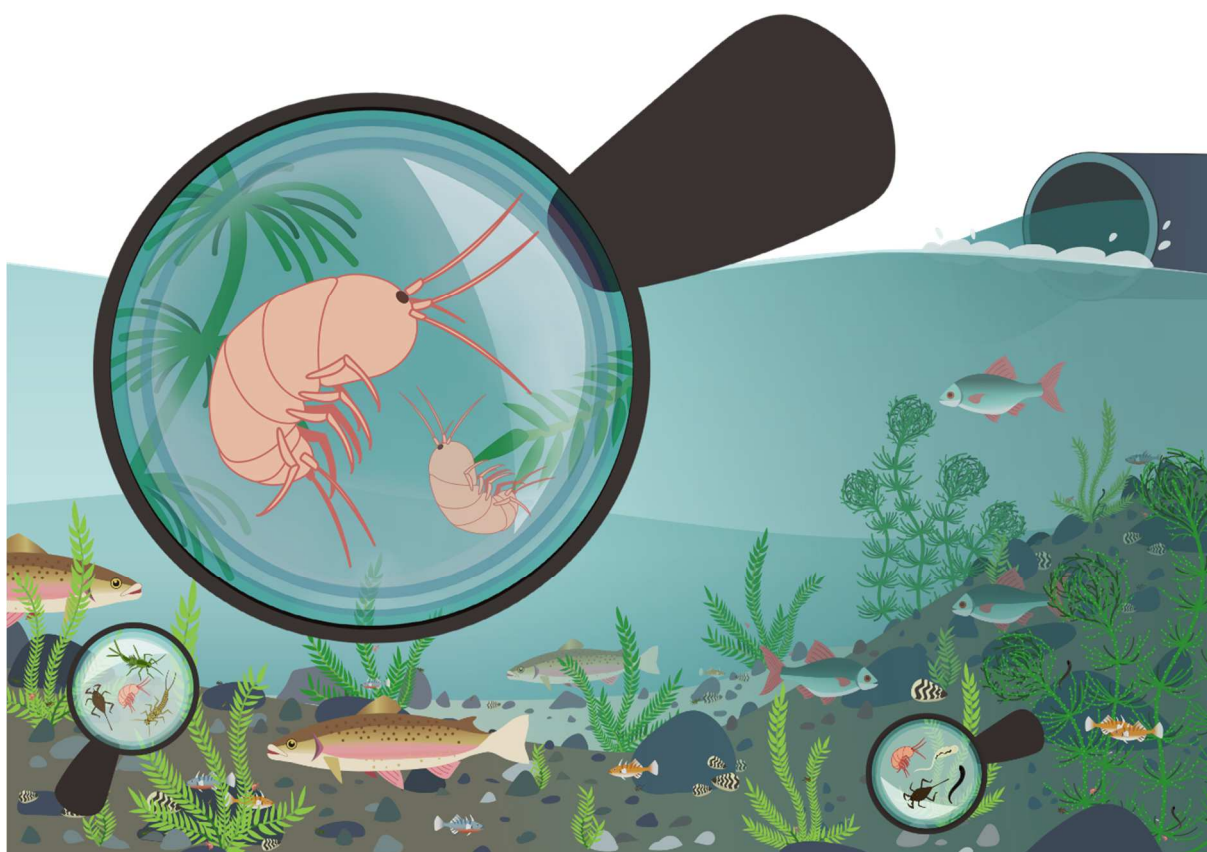


Guide des gestionnaires

Méthodologie d'évaluation de la qualité des masses d'eau à l'aide du gammare encagé (*Gammarus fossarum*)

Avec le soutien du Fonds Européen pour le Développement Régional (FEDER) et de la Wallonie via la Direction générale de l'Agriculture, des Ressources naturelles et de l'Environnement (DGO3)



Avant-propos

Le développement de ce guide méthodologique visant l'évaluation de la qualité des masses d'eau à l'aide d'un amphipode d'eau douce, *Gammarus fossarum*, et selon une méthodologie active d'encagement a été réalisé dans le cadre du projet INTERREG FWVL DIADeM.

Le guide présente les méthodologies pour i) l'encagement des gammars dans les milieux aquatiques et ii) la mesure de marqueurs de toxicité pour évaluer la qualité des milieux testés. L'organisation et la rédaction de ce guide ont été réalisées par Olivier GEFARD du laboratoire d'écotoxicologie de INRAE Lyon. Ce guide a également bénéficié de la contribution de plusieurs membres du laboratoire d'écotoxicologie : Arnaud CHAUMOT, Patrice NOURY et Nicolas DELORME.

Table des matières

1	Origine des gammares et conditions de stabulation	- 4 -
1.1	Site de prélèvement.....	- 4 -
1.2	Condition de stabulation.....	- 4 -
2	Méthodologie d'encagement	- 5 -
2.1	Cage et caisse d'encagement.....	- 5 -
2.2	Déploiement sur le terrain.....	- 6 -
2.2.1	Préparation des cages.....	- 6 -
2.2.2	Transplantation des organismes d'essai	- 6 -
2.2.3	Récupération des organismes et conditionnement.....	- 6 -
3	Fiches protocoles pour les différentes mesures.....	- 7 -
3.1	Mesure du taux d'alimentation	- 7 -
3.1.1	Contexte :.....	- 7 -
3.1.2	Organismes tests :.....	- 7 -
3.1.3	Préparation de la nourriture :.....	- 8 -
3.1.4	Mise en place du test :.....	- 8 -
3.2	Mesure des activités enzymatiques.....	- 9 -
3.2.1	Organismes tests.....	- 9 -
3.2.2	Mode opératoire pour la mesure des activités enzymatiques	- 9 -
3.3	Mesure des marqueurs de reproduction.....	- 10 -
3.3.1	Principe de la méthode	- 10 -
3.3.2	Organismes tests.....	- 11 -
3.4	Mesure des marqueurs de reproduction.....	- 12 -
3.4.1	Taille de la femelle	- 12 -
3.4.2	Détermination du stade de mue.....	- 12 -
3.4.3	Détermination du nombre d'ovocytes et d'embryons	- 13 -

1 Origine des gammares et conditions de stabulation

1.1 Site de prélèvement

Les organismes utilisés dans ces travaux ont été prélevés sur une ancienne cressonnière, dans le département de l'Ain sur la commune du Bugey à Saint-Maurice-de-Rémens (longitude : 5°15'42.0"E, latitude :45°57'16.8"N). La densité des populations présentes sur ce site est élevée quelle que soit la saison. Les canaux, dont l'eau provient d'un tronçon non-pollué du cours d'eau Pollon, sont riches en *Gammarus fossarum* et permettent un approvisionnement en organismes quelle que soit la saison. Les gammares se trouvent dans le gravier fin, les racines, au niveau de débris végétaux, ou dans des briques installés sur le site pour faciliter la capture d'organismes (Figure 1). La technique de prélèvement consiste à déloger les gammares en remuant le substrat avec le pied ou en déplaçant les briques, puis de les récupérer en plaçant un troubleau (aire rectangulaire : 25 X 18 cm, maille 630 µm) en aval de la zone investiguée. Le contenu du troubleau est ensuite trié à l'aide d'une colonne constituée de tamis de 10 mm (dégrilleur), 2,5 mm et 2 mm. Cette colonne est placée dans un peu d'eau et les organismes sont rincés avec l'eau du site afin de permettre leur descente. Les organismes présents dans le tamis de 2 mm, correspondant à des organismes adultes, sont récupérés et placés dans des seaux remplis d'eau du site. Pour empêcher l'anoxie, le nombre d'organismes dans un même seau est limité. Les variations de température, auxquelles les gammares sont sensibles, sont évitées grâce au stockage des seaux dans des glacières.



Figure 1 : Site de prélèvement de gammares à la cressonnière de St-Maurice-de-Rémens.

1.2 Condition de stabulation

Au laboratoire, le contenu des seaux est trié pour enlever le maximum de matière organique. Les gammares sont répartis dans des aquariums de 20 L (environ 4000 organismes par aquarium) placés dans un bain-marie thermorégulé à $12 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ contenant de l'eau du site de prélèvement. Cette eau est par la suite remplacée progressivement par l'eau disponibles au laboratoire (eau de forage) à un débit de 4L/h, dont le pH est compris entre 7 et 8 et la conductivité entre 400 et 500 µS/cm. Un bullage en continu est placé dans chaque aquarium. La photopériode est de 16h de jour et de 8h de nuit avec une intensité lumineuse comprise entre 500 et 1000 lux. Les organismes sont nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*). Ces feuilles sont récoltées en automne dans une région peu anthropisée sur la localité des Ardillats (Rhône), mises à sécher et stockées au laboratoire. Avant leur utilisation, les feuilles sont conditionnées pendant au moins une semaine dans de l'eau de forage oxygénée et renouvelée en continu (*i.e* leachées) pour permettre leur réhydratation et le développement d'un biofilm pour améliorer leur appétence. Cela permet également d'éliminer le tanin qui est très toxique pour les gammares. Une fois

tous les deux jours, des oligochètes lyophilisés (*Tubifex tubifex*) sont ajoutés comme complément alimentaire.

Si les stations d'expérimentation présentent une conductivité inférieure ou égale à $100 \mu\text{s}.\text{cm}^{-1}$, il convient d'acclimater les gammares entre $100 \mu\text{s}.\text{cm}^{-1}$ et $300 \mu\text{s}.\text{cm}^{-1}$ pendant au moins 12 h. Les niveaux de conductivité peuvent, par exemple, être ajustés à l'aide d'une installation d'eau qui produit de l'eau de forage ou de l'eau de ville déchlorée ainsi que de l'eau osmosée ou de l'eau déminéralisée. Le mélange des deux eaux permet d'ajuster le niveau de conductivité souhaité.

2 Méthodologie d'encagement

2.1 Cage et caisse d'encagement

L'exposition *in situ* des organismes d'essai est réalisée à l'aide de cages en polypropylène. Une cage d'environ 6 cm de diamètre et de 10 cm de hauteur (volume : 180 mL) est utilisée pour encager 20 individus (Figure 2). La cage est ajourée pour permettre les échanges d'eau avec le milieu, à l'aide d'orifices de 1 mm de diamètre pour maximiser les échanges avec le milieu, l'oxygénation et d'éviter que les organismes s'échappent.

Sur la station expérimentée, les cages sont installées à l'intérieur d'un système d'exposition ajouré qui permet de les protéger des chocs mécaniques avec les éléments solides présents dans le cours d'eau, tout en permettant des échanges d'eau avec le milieu. Le choix du type de système d'exposition dépend du type de cours d'eau : une caisse quand les cours d'eau sont peu profonds, facilement accessibles à pied (moins d'un mètre de profondeur) (Figure 3) ou un fût suspendu dans la colonne d'eau lorsque le cours d'eau est plus profond (plus d'un mètre de profondeur).



Figure 2 : Cage pour l'encagement de gammares

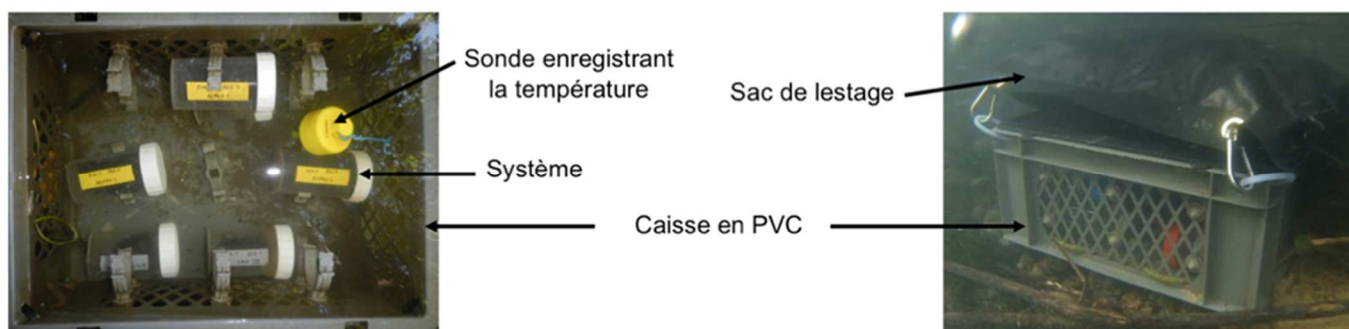


Figure 3 : Caisse d'encagement. Source : Ecotox-Inrae

Lors de chaque sortie sur les sites d'encagement, des mesures physico-chimiques de base, à savoir pH, conductivité et température, sont effectuées à l'aide d'une sonde multimètre. Une sonde programmable, enregistrant la température toutes les heures, est placée en permanence à l'intérieur de la caisse.

2.2 Déploiement sur le terrain

2.2.1 Préparation des cages

Dans chacune des cages sont placés des organismes préalablement sélectionnés. Pour le test d'alimentation et la mesure des marqueurs biochimiques, les organismes exposés sont des mâles de taille homogène au nombre de 20 par cage et de 4 cages par station étudiée. Pour la mesure des marqueurs sur la reproduction, ce sont des femelles en début de cycle de reproduction qui sont utilisées, c'est-à-dire juste après une ponte. Elles sont exposées au nombre de 7 individus par cage et 3 cages par station expérimentée. Les organismes sont placés dans les cages au laboratoire avec de la nourriture *ad libitum* (feuille d'aulne). Les cages sont transportées vers la station de mesure dans un fût contenant de l'eau ayant servi à la stabulation des organismes, sous aération constante, à une température comprise entre 6 °C et 14 °C et à une conductivité en adéquation avec le niveau attendu sur la station de mesure. Les organismes peuvent être maintenus dans ces conditions au maximum pendant 24 h avant leur mise en place dans les milieux

2.2.2 Transplantation des organismes d'essai

L'exposition *in situ* doit être mise en place au maximum le lendemain de la mise en cage des organismes d'essai. Le lieu d'encagement doit remplir les critères suivants, par ordre de priorité :

- zone facilement accessible pour encager les gammarès ;
- zone restant accessible en cas de crue pour récupérer les gammarès sans que l'opérateur soit exposé à un risque de noyade ;
- zone suffisamment profonde pour limiter le risque d'exondation ou de vandalisme ;
- zone où il y a le plus de courant ;
- zone à faible sédimentation (vase, sable) afin de limiter le colmatage des systèmes d'exposition ;

Dans un premier temps la température, la conductivité, l'oxygène dissous et le pH de l'eau de la rivière au point d'encagement sont mesurés afin de valider qu'elles sont conformes aux conditions de vie du gammarès. Les organismes sont ensuite acclimatés à l'eau du milieu en mélangeant progressivement l'eau du seau avec de l'eau de la rivière. Le système d'exposition est ensuite positionné sur le lieu d'encagement et attaché par un cordage à la berge (pilier, arbre, rocher, etc.). Enfin, les cages contenant les organismes sont fixées à l'intérieur du système d'exposition à l'aide de colliers de fixation, dans lequel est également ajouté un enregistreur de température avant d'être refermé. Les coordonnées GPS du point d'encagement sont également relevées.

2.2.3 Récupération des organismes et conditionnement

Suite à l'exposition (7 jours pour le test d'alimentation et la mesure des marqueurs biochimiques et entre 14 et 21 jours pour le test de reproduction, selon la température du milieu). La température, la conductivité, le taux d'oxygène dans l'eau et le pH sont mesurés et consignés. Les cages sont retirées des caisses d'encagement et placées dans des seaux remplis avec de l'eau du site, puis placées dans une glacière avec des accumulateurs de froids pour leur transport jusqu'au laboratoire.

Une fois au laboratoire, les organismes de chaque cage sont récupérés et dénombrés pour déterminer le taux de survie pour chaque station expérimentée, ceci aussi bien pour les mâles et les femelles.

Pour le taux d'alimentation, mesuré chez les mâles exposés, les restes de nourriture sont récupérés et stockés en tubes contenant de l'eau avant leur analyse. Pour la mesure des marqueurs biochimiques, les organismes mâles sont conditionnés par pool de 5 individus, pesés et directement congelés à l'azote liquide puis stockés à -80°C avant analyse. Enfin, la mesure des marqueurs liés à la reproduction chez les femelles se fait sur organismes vivants.

3 Fiches protocoles pour les différentes mesures

3.1 Mesure du taux d'alimentation

3.1.1 Contexte :

Depuis les années 1990, plusieurs études au laboratoire et sur le terrain ont montré que le taux d'alimentation chez plusieurs espèces d'amphipodes, et particulièrement les gammares, est inhibé par une large gamme de contaminants tels que des métaux lourds, des insecticides, des fongicides, des herbicides, des médicaments et d'autres composés organiques¹. L'inhibition du taux d'alimentation est l'une des premières réponses observées lors d'une exposition à un stress toxique et constitue donc un marqueur très sensible^{2,3}. Etudier les effets des contaminants sur le comportement alimentaire est pertinent car il existe un lien mécaniste entre le taux d'alimentation et des traits de vie tels que la croissance, la survie ou la reproduction^{4,5}.

La méthode proposée par notre laboratoire est celle qui a ensuite été normalisée via l'Afnor sous l'impulsion de la jeune startup Biomaes

3.1.2 Organismes tests :

La méthode est applicable à diverses espèces de *Gammaridae* présentes dans les milieux aquatiques d'eau douce, telles que *Gammarus fossarum* et *Gammarus pulex*. Dans le cadre du projet DIADeM, l'espèce utilisée est *G. fossarum* sur laquelle le laboratoire d'écotoxicologie de Inrae a une expertise depuis de nombreuses années. La mesure du taux d'alimentation se fait à l'aide d'organismes mâles de taille homogène. Le dimorphisme sexuel chez cette espèce est facilement observable et identifiable à l'œil nu (Figure 4). De plus, cette espèce se caractérise par une reproduction continue permettant de sexer et séparer facilement les mâles et les femelles. Il est considéré comme mâle tout individu ne disposant pas d'embryons dans un marsupium ni de gonades visibles à l'œil nu dans la partie dorsale.

Le taux d'alimentation varie selon la taille des gammares¹, d'où l'importance de bien calibrer les organismes. Les gammares sont sélectionnés/triés à la main, sur une table lumineuse, pour obtenir un lot d'individus dont la taille doit être homogène. La taille moyenne du lot, définie sur 20 individus prélevés au hasard, doit être comprise entre 9,5 et 12,5 mm avec un coefficient de variation inférieur ou égal à 10%.



Figure 4 : A gauche, un couple de gammares avec une femelle en fin de cycle de reproduction qui se caractérise par la présence d'ovocytes très développés dans les ovaires situés au niveau dorsal et la présence de juvéniles dans le marsupium. A droite, une femelle en tout début de cycle de reproduction avec des embryons noirs dans la poche marsupiale, en début de développement.

¹Coulaud, R. (2012). Modélisation et changement d'échelles pour l'évaluation écotoxicologique : application à deux macroinvertébrés aquatiques, *Gammarus fossarum* (crustacé amphipode) et *Potamopyrgus antipodarum* (mollusque gastéropode). Thèse. Lyon, Université de Lyon 1.

²McLoughlin, N., Yin, D.Q., Maltby, L., et al., (2000). Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2085-2092

³Consolandi G., Ford A.T., Bloor M.C. (2019) Feeding behavioural studies with freshwater *Gammarus* spp.: the importance of a standardised methodology. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology (Continuation of Residue Reviews). Common Implementation Strategy (CIS) [Technical report on aquatic effect-based monitoring tools. Technical Report - 2014 – 077](#).

⁴Maltby, L., (1999). Studying stress: the importance of organism level responses. Ecological Applications 9 (2), 431e440.

⁵Xuereb B, Lefèvre E, Garric J, Geffard O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. Aquat Toxicol (Amst) 94:114–122.

3.1.3 Préparation de la nourriture :

La nourriture choisie est la feuille d'aulne (*Alnus sp*) qui est très appréciée par le gammare, *Gammarus fossarum*. Les feuilles sont récoltées dans des zones peu ou non anthropisées à la fin de l'automne, à la suite du phénomène d'abscission lorsque les feuilles sont dépourvues de chlorophylle et qu'elles tombent sur le sol. Elles sont ensuite séchées, stockées dans un contenant propre et à l'abri de la lumière et ainsi conservées plusieurs mois voire années.

Pour la réalisation du test d'alimentation, la nourriture est préparée sous forme de disques de diamètre précis. Pour ceci, les feuilles sèches sont préalablement plongées dans de l'eau pour une période de 7 à 9 jours, à température ambiante ($18\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) et avec au moins deux renouvellements complets. Elles sont ensuite découpées en disques de surface définie afin de connaître avec précision la quantité (surface) de nourriture donnée aux gammars. Les disques sont obtenus à l'aide d'un emporte-pièce de diamètre de 22mm (Figure 5). Les disques de feuilles doivent être parfaitement ronds, sans trous et parfaitement plats. Il est préférable de ne pas prendre la base du limbe. Avant leur utilisation, les disques sont maintenus en eau naturelle et stockés à 4°C au réfrigérateur pour une période maximale de 15 jours avant leur utilisation.



Figure 5 : A gauche, disque obtenu à partir d'une feuille d'aulne (*Alnus spp.*). A droite, poste de fabrication de disques

3.1.4 Mise en place du test :

Le protocole repose sur l'utilisation de 80 organismes mâles répartis en 4 cages (4 réplicats) d'exposition *in situ* auxquels sont également ajoutés 20 disques de feuilles prises au hasard à partir du lot précédemment préparé. L'ensemble est placé sur le terrain (voir fiche encagement) et la mesure d'alimentation se fait pour une période de 7 ± 1 jours. Un témoin, contenant uniquement de l'alimentation doit également être réalisé afin de mesurer la consommation associée à la présence de micro-organismes dans le milieu et donc non attribuable aux gammars engagés.

Les paramètres physico-chimiques et le champ d'application du test d'alimentation sur le terrain sont : température moyenne (de 7 °C à 20 °C), oxygène dissous (supérieur à 5 mg.L⁻¹), conductivité (de 100 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ à 1000 $\mu\text{S.cm}^{-1}$) et pH (de 6,3 à 8,9). De plus, pour comparer les mesures obtenues sur des sites présentant des températures différentes, il est nécessaire d'en tenir compte car c'est un facteur connu pour moduler le taux d'alimentation chez les gammars. Pour ceci, il est indispensable de connaître et définir la relation entre le taux d'alimentation et la température et de connaître la chronique de température au cours de l'exposition afin d'en évaluer la température moyenne et de l'utiliser pour normaliser et interpréter les résultats^{6,1}. Le suivi de la température est fait via une sonde autonome placée dans les cages d'encagement.

Suite aux 7 jours d'exposition et au retour des cages au laboratoire, le contenu de chaque cage est vidé dans un plat préalablement rempli d'eau naturelle utilisée pour la stabulation des organismes test au laboratoire. Les gammars vivants sont dénombrés pour évaluer le taux de survie, déposés sur du papier absorbant, puis répartis en tube de 2 mL par pool de 5, pesés, congelés à l'azote liquide et conservés au -80°C. Ils serviront pour l'analyse des marqueurs biochimiques (activités de l'acétylcholinestérase, de la glutathion-S-transférase, la carboxyl-estérase et la phénol-oxydase). A l'aide d'une pince, les restes de disques de feuilles de chaque cage sont récupérés, déposés sur un papier absorbant, puis immédiatement mis à plat sur une feuille plastique transparente au format A4 afin d'être

⁶ Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S. and Chaumot, A. (2011). "In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring." *Water Research* 45(19): 6417-6429.

numérisés à l'aide d'un scanner en noir et blanc (Figure 6). La surface restante de disques de feuilles est déterminée à l'aide d'un logiciel d'analyse et de traitement d'image pour définir la surface de feuille non consommée. Le taux d'alimentation moyen est déterminé à partir de la surface totale de disques consommée en mm² et du nombre moyen de gammares vivants. Le taux d'alimentation est exprimé en mm² consommés par individu et par jour (mm²/individu/jour).

$$\text{Taux d'alimentation} = \frac{(\text{Surface contrôle} - \text{Surface réplikat})}{\text{Nombre moyen de gammares vivants} * T}$$

Surface contrôle = Surface totale en mm² des disques de feuille dans le réplikat sans gammares, à la fin de la mesure.

Surface réplikat = Surface totale en mm² des disques de feuille présents à la fin de la mesure dans chaque réplikat contenant des gammares

T = Temps de contact en jours



Figure 6 : Illustration d'une image obtenue par numérisation des restes de feuilles à la suite d'une exposition de 7 jours sur le terrain avec des gammares par encagement.

3.2 Mesure des activités enzymatiques

3.2.1 Organismes tests

Seuls les gammares adultes mâles sont utilisés du fait de l'influence de l'état reproductif sur l'activité de certaines activités enzymatiques chez les femelles⁷. Un fort dimorphisme sexuel existe, visible à l'œil nu chez *G. fossarum* (voir protocole test alimentation), permet de sélectionner uniquement des organismes mâles. De la même façon, il est important de sélectionner des organismes avec une taille homogène car il s'agit d'un facteur connu pour moduler de nombreuses activités enzymatiques. Ainsi, 25 gammares mâles de taille homogène sont sélectionnés, séchés sur du papier absorbant et répartis en 5 réplicats de 5 individus. Le poids frais de chaque pool est mesuré, devant être compris entre 80 et 120 mg. Les organismes sont immédiatement congelés à l'aide d'azote liquide et stockés au congélateur à -80°C, pour une période maximale de 6 mois, en attendant la mesure des activités enzymatiques.

3.2.2 Mode opératoire pour la mesure des activités enzymatiques

Extraction : Dans chaque tube contenant les 5 individus, un volume de tampon de broyage est ajouté selon le ratio suivant : 10 µL de tampon de broyage par milligramme de poids frais, ainsi que des billes de broyage (une bille inox de 2 mm de diamètre et 4 à 6 billes de verre d'un diamètre de 1 mm). Les tubes sont ensuite placés dans un homogénéisateur pour broyer les gammares. Le broyage se fait à la température de 4 °C, via deux séries d'une durée de 20 secondes chacune et à une vitesse de 4,5 m.s⁻¹. Les échantillons sont placés dans de la glace pendant au moins 5 minutes entre chaque série de broyage. Suite au broyage, le surnageant (fraction S9) est récupéré à l'aide d'une pipette, transféré dans un nouveau tube et placé dans de la glace pilée. La mesure des activités enzymatiques doit être réalisée dans l'heure.

Dosage des protéines : pour chaque fraction S9, le dosage de protéines est réalisé selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) à l'aide d'une solution d'albumine de sérum bovin pour réaliser la droite d'étalonnage. Les concentrations en protéines sont déterminées en triplicat de mesure. Ces dosages sont réalisées en microplaques 96 puits. Il convient de s'assurer que le coefficient de variation entre les trois

⁷ Xuereb, B. (2009). Développement de marqueurs de neurotoxicité et de perturbations endocrines chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. Thèse. Université de Metz: 348p.

réplicats soit inférieur ou égal à 20 %. La teneur en protéines de chaque échantillon est utilisée pour normaliser l'activités des différentes enzymes mesurées.

Activité acétylcholinestérase (Ache) : cette mesure permet de diagnostiquer l'exposition des organismes aquatiques à des inhibiteurs tels que les pesticides neurotoxiques (organophosphorés et les carbamates). La méthode utilisée est basée sur le dosage colorimétrique en cuve de Ellman *et al*⁸ (1961) adaptée sur microplaque. Elle mesure, la capacité de l'Ache à dégrader l'acétylthiocoline en Thiocholine qui réagit avec l'ion dithiobisnitrobenzoate pour former un complexe de coloration jaune. L'intensité de la coloration est mesurée au spectrophotomètre à 405 nm, toutes les 20 à 30 secondes à partir du début de la réaction.

Activité Carboxylestérase (CE) : Les carboxylestérases réagissent en tant que première barrière de défense vis-à-vis de certains xénobiotiques. Ces enzymes dégradent le groupement ester en alcool et en acide. Les trois grand groupes d'insecticides (carbamates, organophosphorés et pyréthrinoides de synthèse) étant des esters, les carboxylestérases jouent un grand rôle dans leur métabolisation. La mesure de l'activité CE se base sur les travaux Ljungquist⁹ et utilise comme substrat le 4 Nitrophényl-acétate. La carboxylestérase conduit à la formation de nitrophénol de couleur jaune dont l'absorbance est lue à 405 nm et à 20°C toutes les 30 secondes, durant 3 minutes.

Activité Glutathion-s-transférase (GST) : l'activité GST entre dans le processus de détoxification de phase II des xénobiotiques hydrophobes (HAP, pesticide, PCB). Le protocole, adapté pour la microplaque, est inspiré de la méthode Habig¹⁰. Au cours du dosage, on mesure l'activité de conjugaison du glutathion réduit et d'un substrat, le 1 chloro 2,4 dinitrobenzene via la Glutathion-S-Tranférase contenu dans un échantillon. La cinétique est déterminée par lecture de l'absorbance à 340 nm pendant 3 minutes.

Activité Phénol oxydase (PO) : La mesure de l'activité phénol oxydase peut être utilisée en tant que marqueur biochimique du système immunitaire chez les invertébrés. Elle est révélatrice d'une activité de défense cellulaire, qui conduit par une cascade de réactions protéiques à la synthèse de mélanine dont le rôle est d'encapsuler les agents pathogènes afin de faciliter leur élimination. Basé sur la méthode de Janssens and Stoks¹¹, le dosage mesure la réaction de la PO avec le 3,4-Dihydroxy-L-Phénylalanine qui conduit à la formation de dopachrome de couleur rouge dont l'absorbance est lue à 490 nm et à 30°C toutes les 30 secondes. L'addition préalable de chymotrypsine au milieu réactionnel permet de convertir la part de pro-enzyme de l'échantillon en enzyme active et ainsi doser la PO totale.

3.3 Mesure des marqueurs de reproduction

3.3.1 Principe de la méthode

Cette méthode s'applique sur des organismes femelles prélevées directement dans le milieu, encagées ou exposées en conditions de laboratoire. La méthode proposée a été initialement décrite par Xuereb (2009)⁷ et Geffard et al (2010)¹². Le protocole décrit la méthode pour mesurer des marqueurs individuels liés à la reproduction chez des gammares femelles calibrés en taille et à des stades de mue bien spécifiques. Chaque réponse peut être analysée indépendamment les unes des autres, donnant une information complémentaire, non redondante. Le test de reproduction consiste à sélectionner des

⁸ Ellman *et al* *Biochemical Pharmacology*, (1961) *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, Vol. 7, pp 88-95. Pergamon Press Ltd., Printed in Great Britain

⁹ Ljungquist, Å., Augustinsson, K., 1971. *Purification and properties of two carboxylesterases from rat-liver microsomes*. *European Journal of Biochemistry* 23, 303–3113.

¹⁰ Habig, W. H., *et al.* (1976). "Glutathione S-transferase AA from rat liver." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 175(2): 710-716.

¹¹ Janssens, L. and R. Stoks (2014). "Non-pathogenic aquatic bacteria activate the immune system and increase predation risk in damselfly larvae." *Freshwater Biology* 59(2): 417-426.

¹² Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M. (2010). "Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment." *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(10): 2249-2259.

femelles en tout début de cycle de reproduction (stade de mue AB), de les encager sur les sites d'intérêt pour une période comprise entre 2 et 4 semaines selon la température du milieu. Suite à cette exposition et en condition normale (non contaminée) les femelles ont atteint *a minima* le stade de mue C2, voire D1 et sont utilisées pour réaliser les mesures suivantes :

- Le stade de mue – il permet de valider que les femelles ont bien atteint le stade voulu (stade C2 ou D1). Si ce n'est pas le cas, cela met en évidence que le milieu impacte la mue et perturbe son déroulement normal, conduisant à un retard
- Le nombre total d'embryons – il permet d'évaluer l'impact du milieu sur le développement des embryons. En effet lorsqu'un milieu perturbe le développement d'embryons, ces derniers se développent de façon anormale, se dégradent et disparaissent du marsupium
- Le nombre total d'ovocytes - Il permet d'évaluer la capacité de reproduction d'une femelle et l'impact éventuel du milieu à perturber la production d'ovocyte et par conséquent le nombre d'embryons pour le cycle suivant

La relation entre la température et le déroulement du cycle de mue est disponible dans les papiers de Chaumot et al. (2020)¹³ et Lopes et al. (2020)¹⁴ qui vous permettront, en fonction de la température des milieux testés, de définir quelle période d'exposition est nécessaire pour obtenir des femelles en stade de mue C2, ou D1, qui sont les stades clés sur lesquels la mesure des marqueurs de reproduction peut être faite.

3.3.2 Organismes tests

La méthode est applicable aux espèces de Gammaridae, marines et d'eau douce. Il est recommandé d'utiliser une espèce chez laquelle le sexe est facilement identifiable pour distinguer les mâles des femelles. Dans le cadre du projet Diadem, c'est l'espèce *Gammarus fossarum* qui a été utilisé, qui est l'espèce sentinelle utilisée par le laboratoire d'écotoxicologie de Inrae Lyon depuis plusieurs années.

Seuls des gammares femelles en tout début de cycle de reproduction sont sélectionnées et utilisées pour réaliser le test de reproduction et la mesure des marqueurs associés. Pour obtenir les femelles, deux-trois jours avant le démarrage du test, des couples, facilement identifiable (Figure 7), sont isolés dans un aquarium rempli d'eau naturelle, aérée et thermorégulée à 12°C. Suite à cette stabulation, les organismes sont placés dans un plat en verre, sur une table lumineuse et observés pour ne récupérer que les femelles qui viennent de pondre et par conséquent sont en tout début d'un nouveau cycle de reproduction. Ces femelles, en tout début de cycle de reproduction, sont très facilement identifiable (Figure 7), elles sont seules (plus d'amplexus), n'ont plus d'ovocytes visibles dans les ovaires (située au niveau dorsal) et ont des œufs juste fécondés dans le marsupium, reconnaissables à leur couleur très noir. Un pool de femelles de taille homogène (fait à l'œil nu) est constitué, en nombre suffisant en fonction du nombre de stations à expérimenter, et utilisé le jour même.



¹³ Chaumot, A., Adam, O., Coulaud, R., Lopes, C., Quéau, H., Geffard O. 2020. *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 1 - gauging the confounding influence of non-toxic environmental factors. *Environmental Toxicology and Chemistry* 39(3), pp. 667-677

¹⁴ Lopes, C., Chaumot, A., Xuereb, B., Coulaud, R., Jubeaux, G., Quéau, H., François, A., Geffard, O. 2020. *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 2 – evaluating the relevance of using a molt cycle temperature-dependent model as reference to assess toxicity in freshwater monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry* 39(3), pp. 678-691.

Figure 7 : A gauche, couple de gammare en amplexus. A droite femelle juste après sa mue et la ponte des œufs dans le marsupium qui vont démarrer un nouveau cycle de reproduction.

3.4 Mesure des marqueurs de reproduction

3.4.1 Taille de la femelle

La mesure de la taille de la femelle sur laquelle seront réalisés les marqueurs de reproduction, notamment le nombre d'ovocytes et d'embryons, est très important. Il est clairement connu dans la littérature qu'il existe un lien direct entre la taille de l'organisme et le nombre d'ovocytes produits, ainsi que le nombre d'embryons⁷. La mesure de la taille est indispensable et sera utilisée pour normaliser les données et permettre de les comparer de façon fiable.

Pour ceci, la femelle est positionnée en position latérale dans une goutte d'eau sur une lame en verre et photographiée à l'aide d'un microscope stéréoscopique équipé d'une caméra. La photo est ensuite traitée à l'aide d'un logiciel d'analyse et de traitement d'image afin de déterminer la distance cumulée au niveau dorsal, des antennules jusqu'à la jonction entre le troisième segment du metasoma et le premier segment de l'urosoma.

3.4.2 Détermination du stade de mue

La mue peut être définie par l'observation au microscope stéréoscopique de l'extrémité des 3^{èmes} et 4^{èmes} paires de périopodes. Chez les amphipodes, le tégument se modifie progressivement à l'extrémité des périopodes lors du cycle d'intermue. L'épiderme se décolle de la cuticule, s'invagine progressivement, puis se recouvre d'une nouvelle et fine couche de cuticule¹⁵.

Pour récupérer les périopodes (Figure 8), la femelle est placée sous un microscope, sur la face dorsale et maintenue allongée à l'aide d'une paire de pince. Les extrémités des périopodes sont ainsi facilement accessibles et sont sectionnées au niveau du carpopodite à l'aide d'une paire de ciseaux de Wecker, puis déposées dans une goutte d'eau sur une lame en verre et recouvert d'une lamelle. Le montage est ensuite observé sous un microscope optique, à un grossissement de 500 minimum et le stade de mue est déterminé selon les critères décrits par Geffard et al. (2010)¹² et illustrés dans la Figure 9. Les stades se caractérisent de la façon suivante :

- **Stade AB** est caractérisé par l'absence de décollement entre l'épiderme du dactylopodite et la cuticule.
- **Stade C1** est caractérisé par la rétractation de l'épiderme du dactylopodite.
- **Stade C2** est caractérisé par la formation de fentes circulaires sur l'épiderme du dactylopodite causée par son invagination.
- **Stade D1** est caractérisé par la formation d'une cuticule sur le dactylopodite néoformé.
- **Stade D2** est caractérisé par la formation d'une cuticule sur les soies néoformées du protopodite.

Comme présenté précédemment, le test de reproduction chez *G. fossarum* consiste à exposer les femelles sur une période suivante pour qu'elles puissent atteindre le stade C2, voire D1. A ce stade, la vitellogénèse est installée et par conséquent le nombre d'ovocytes dans les gonades est définitif.

Ainsi, dans le cadre du test de reproduction tel que proposé dans le cadre du projet Diadem, le stade D2 ne doit jamais être observé et l'observation des stades AB et C1 indique un impact du milieu sur la mue avec un retard du processus.

¹⁵ Charniaux-Cotton, H., (1965). In : Dehaan, R.L., Ursprung, H. (Eds.), Hormonal control of sex differentiation in invertebrates. Organogenesis. Holt, Rinehart, and Winston, New York, pp. 701-740

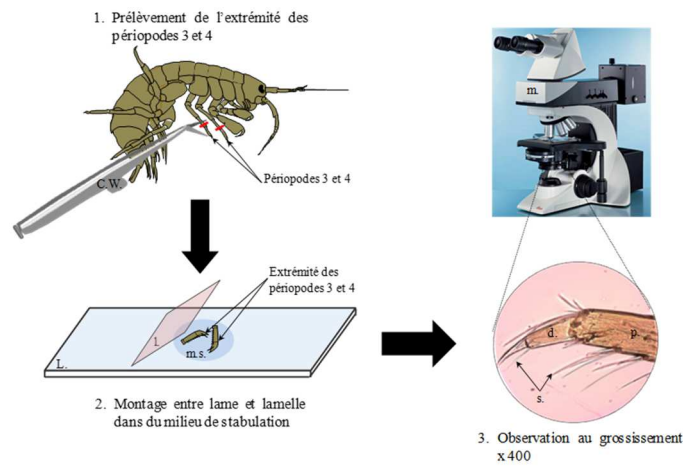


Figure 8 : Schéma de la procédure pour déterminer le stade de mue chez une femelle *Gammarus fossarum*. c.w. : ciseaux de Wecker ; d. : dactylopodite (Erreur ! Source du renvoi introuvable.) ; L. : lame ; l. : lamelle ; m. : microscope ; m.s. : milieu de stabulation ; p. : protopodite (Erreur ! Source du renvoi introuvable.) ; s. : soie.

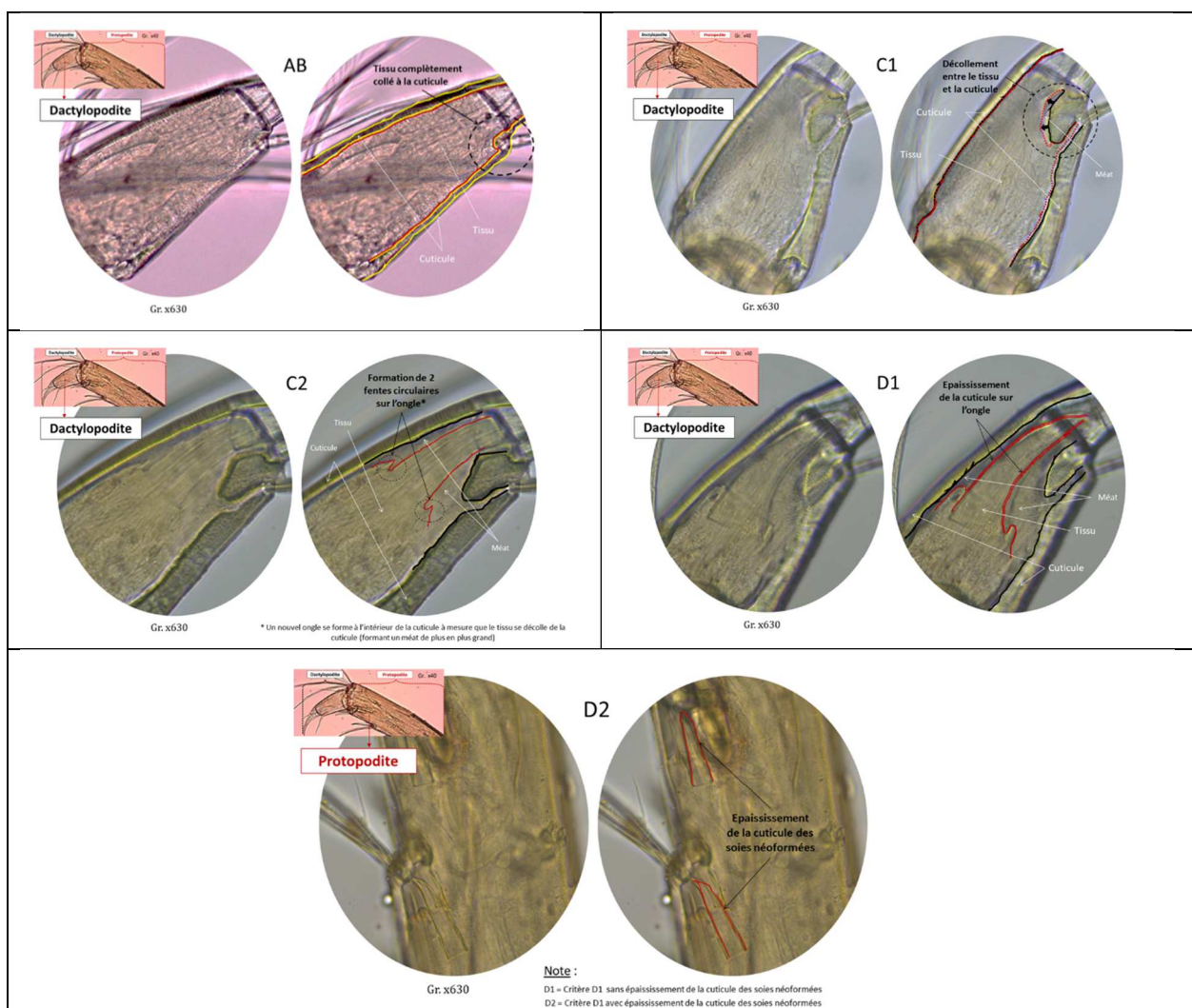


Figure 9 : Stades de mue chez *Gammarus fossarum*

3.4.3 Détermination du nombre d'ovocytes et d'embryons

Le nombre d'ovocytes est déterminé directement par observation de la face dorsale de la femelle à l'aide d'un microscope stéréoscopique. Ceci nécessite de manipuler la femelle à l'aide d'une pince de manière à pouvoir la placer en position ventro-latérale de façon à ce que les ovocytes puissent être facilement visibles et dénombrables (Figure 10). La mesure du nombre d'ovocytes est applicable pour des femelles en stade de mue C2 et D1, mais pas pour les stades AB et C1 où le nombre d'ovocyte présents à ces stades n'est pas définitif. En effet et de façon naturelle, certains ovocytes se résorbent entre le stade

C1 et C2¹². Ainsi, chez les femelles bloquées au stade AB ou C1, suite à un retard de mue lié à la contamination du milieu expérimenté, il n'est pas possible d'utiliser le nombre d'ovocytes comme un indicateur de la fertilité.

Pour déterminer le nombre d'embryons, la femelle est placée sous un microscope stéréoscopique et maintenue sur le dos à l'aide d'une pince. A l'aide d'une seconde pince, les embryons sont extraits délicatement du marsupium, placés sur une lame de verre dans une goutte d'eau et dénombrés. Cette mesure de fécondité est applicable pour des femelles en stade de mue C1, C2 ou D1. Le comptage d'embryons pour les femelles aux stades AB et D2 n'est pas recommandé. Au stade AB, les embryons sont très fragiles, sont facile à endommager lors de leur prélèvement, rendant difficile une mesure fiable. Au stade D2, les embryons ont éclos, ce sont des juvéniles pouvant sortir librement de la poche embryonnaire¹².

Comme indiqué précédemment, la fertilité et la fécondité chez les amphipodes sont directement reliées à la taille de l'organisme. Ainsi, une normalisation du nombre d'ovocytes et d'embryons par la taille est nécessaire si le lot de femelles présente une hétérogénéité de tailles.

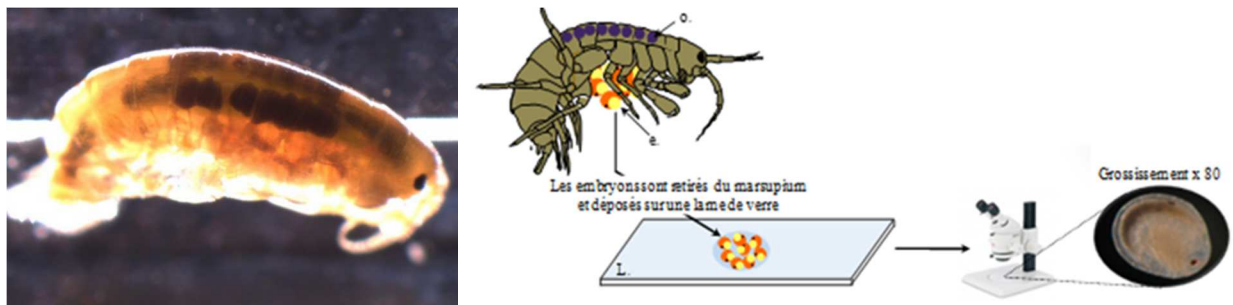


Figure 10 : A gauche : vue d'une femelle en position ventro-latérale. A droite : illustration sur la méthode pour dénombrer le nombre d'embryons chez une femelle *G. fossarum*.