

# DÉVELOPPEMENT D'UN BIOMARQUEUR DE QUALITÉ SPERMATIQUE CHEZ LES CREVETTES PALÉMONIDÉS : ÉTAT DES LIEUX EN BAIE DE SEINE

Alexandre Erraud, Marc Bonnard, Arnaud Chaumot, Joëlle Forget-Leray, Alain Geffard, Olivier Geffard, et Benoit Xuereb

## 1.1. La qualité spermatique : un intérêt majeur

### Les biomarqueurs de reproduction

- Aspect prédictif (population)
- Pertinence écologique



Human Reproduction, Vol 28, No 3, pp 467-470, 2013  
Aquatic Toxicology 88 (2008) 81-87



### Problemes de fertilité chez le mâle

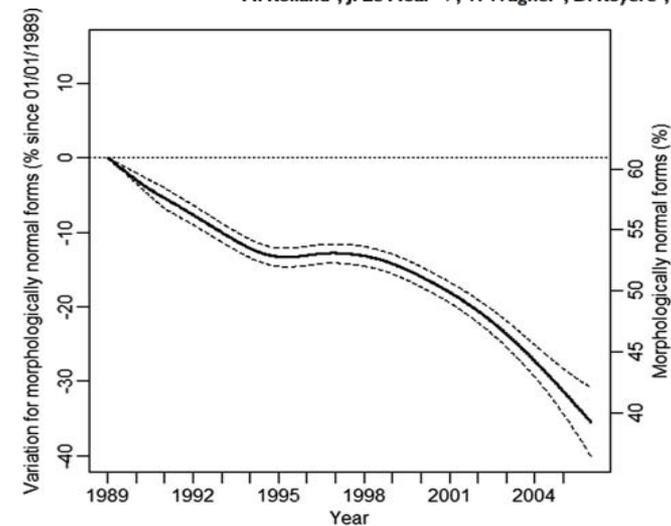
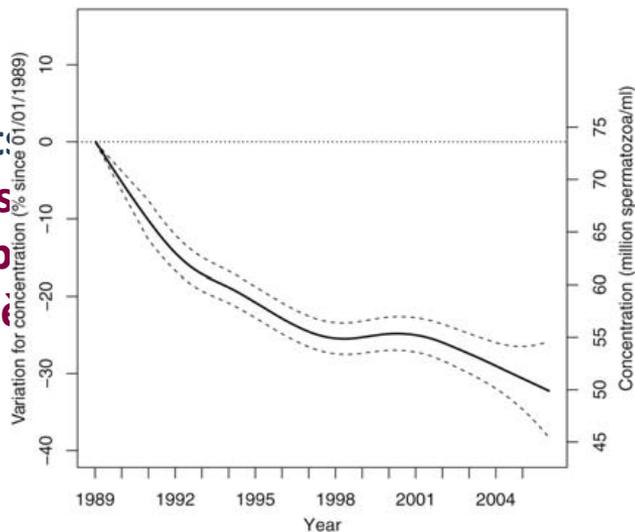
- Chez l'humain ces 50 dernières années
- Moins étudié chez la faune sauvage

Infertility in a marine crustacean: Have we been ignoring pollution impacts on male invertebrates?

Gongda Yang<sup>a</sup>, Peter Kille<sup>b</sup>, Alex T. Ford<sup>a,\*</sup>

### Interêt:

- Pas de réputation
- Intérêt croissant

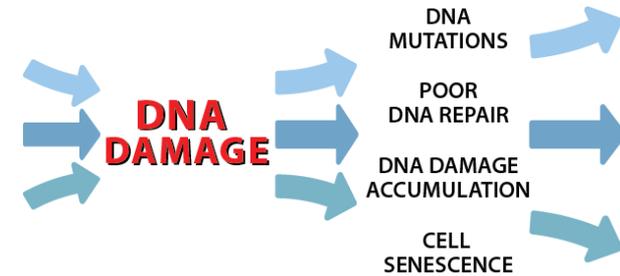


## 1.2. Objectifs de l'étude



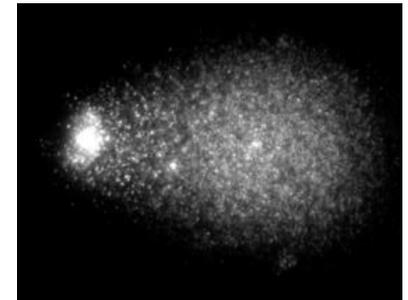
### Quel biomarqueur de qualité spermatique?

- Intégrité de l'ADN = Outil intégrateur
- 1/3 des composés anthropiques relâchés dans l'environnement marin ont été décrit comme potentiellement génotoxique
- Peut contribuer à des défauts héréditaires



### Pourquoi le test Comet?

- Outil sensible et fiable
- L'un des outils les plus communément utilisé pour détecter des cassures de l'ADN
- Recommandé dans de nombreuses reviews pour le biomonitoring



**Développer le test Comet pour évaluer la qualité spermatique de crevettes Palaemonidae en baie et estuaire de Seine**

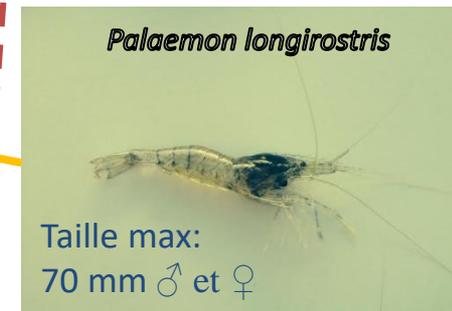
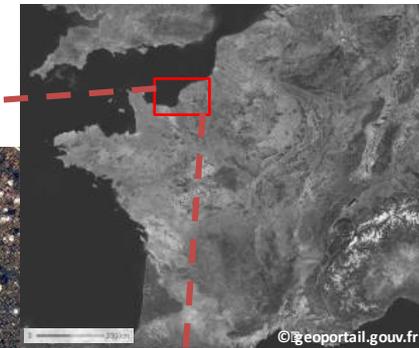
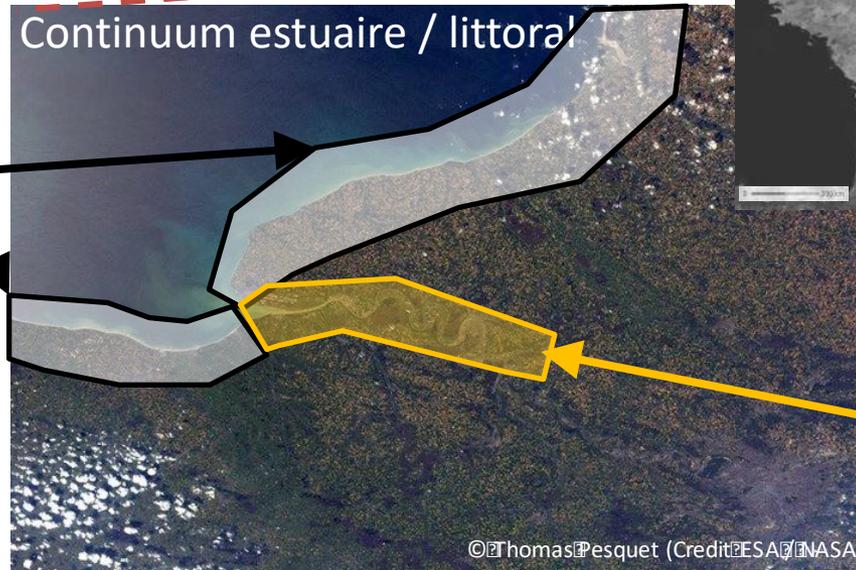
## 1.3. Modèles biologiques: *Palaemon sp.*

### Espèces écologiquement pertinentes:

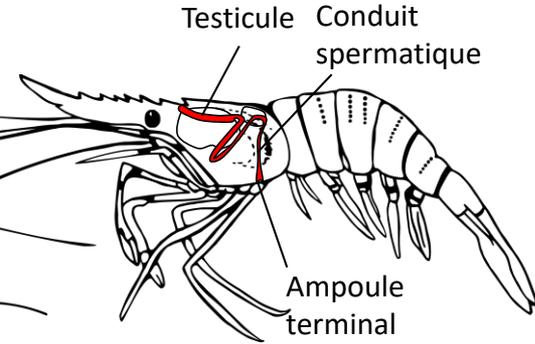
- Répandues et communes sur les côtes et estuaire de l'Europe de l'Ouest
- Rôle majeur dans le processus de dégradation des détritiques consommateur primaire et secondaire
- Représente une ressource importante de nourriture pour d'autres macro-invertébrés, poissons

### Logistiquement intéressantes

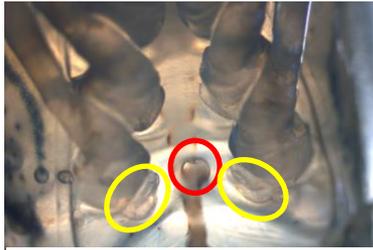
- Echantillonnage toute l'année
- Identification simple
- Bon maintien en laboratoire et bonne manipulation



# 1.4. De l'organisme aux spermatozoïdes



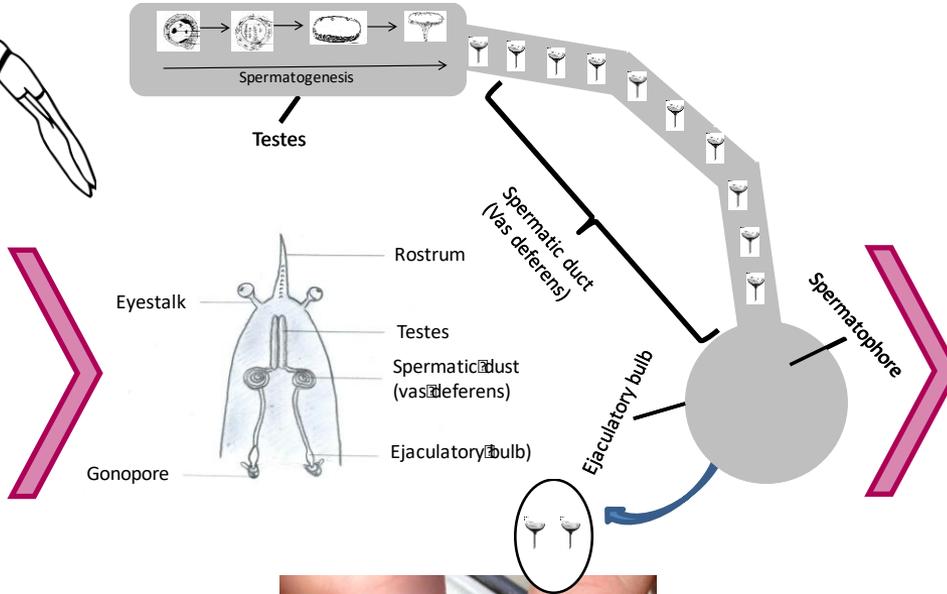
♂ *Palaemon serratus*



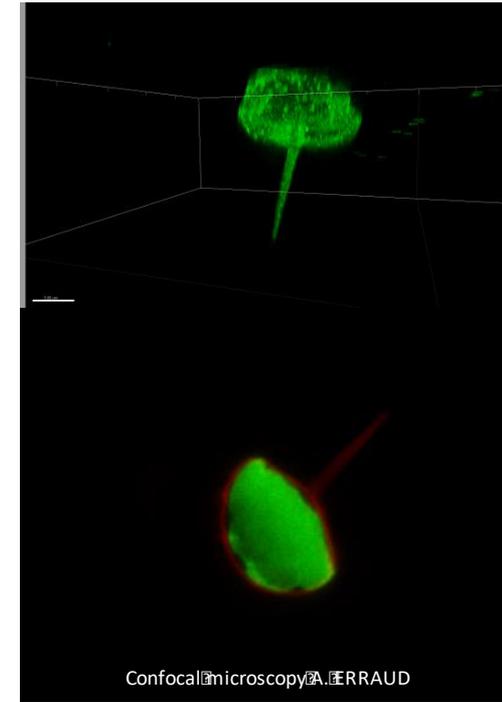
♂ *Palaemon longirostris*



Sexe



Spermatozoïdes → Spermatophores



Population cellulaire homogène de spermatozoïdes mature

## 2. Double approche Laboratoire / terrain

### Développer et optimiser le test Comet

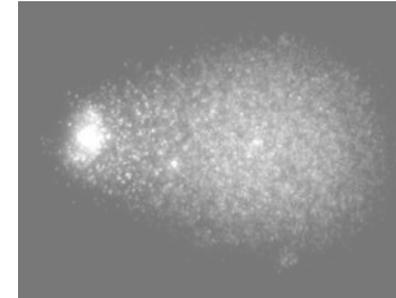
Environ Sci Pollut Res  
DOI 10.1007/s11356-017-8754-6



AQUATIC ORGANISMS AND BIOLOGICAL RESPONSES TO ASSESS WATER CONTAMINATION AND ECOTOXICITY

Assessment of sperm quality in palaemonid prawns using Comet assay: methodological optimization

Alexandre Erraud<sup>1</sup> & Marc Bonnard<sup>2</sup> & Aurélie Dufflot<sup>1</sup> & Alain Geffard<sup>2</sup> & Jean-Michel Danger<sup>1</sup> & Joëlle Forget-Leray<sup>1</sup> & Benoît Xuerob<sup>1</sup>



### Signification du biomarqueur ( conditions contrôlées)

- Sensibilité à des génotoxiques modèles
- Persistance des dommages à l'ADN
- Lien avec le succès de reproduction



### Déploiement *in situ*

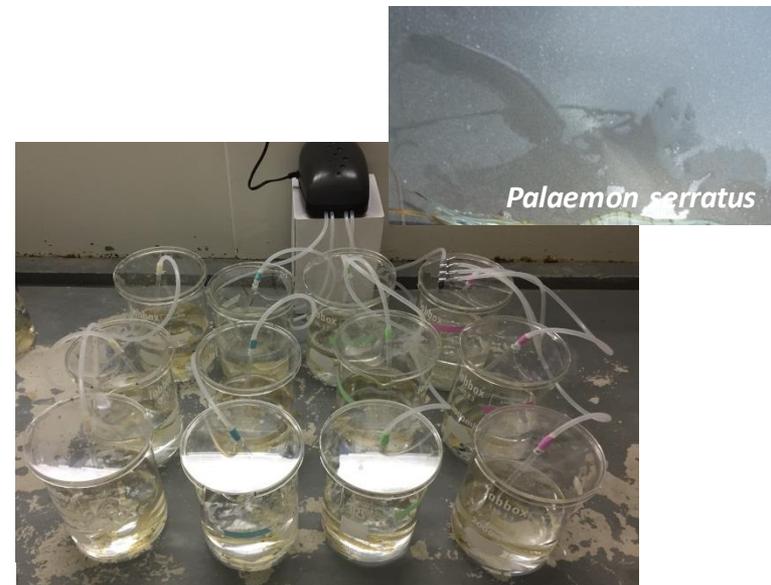
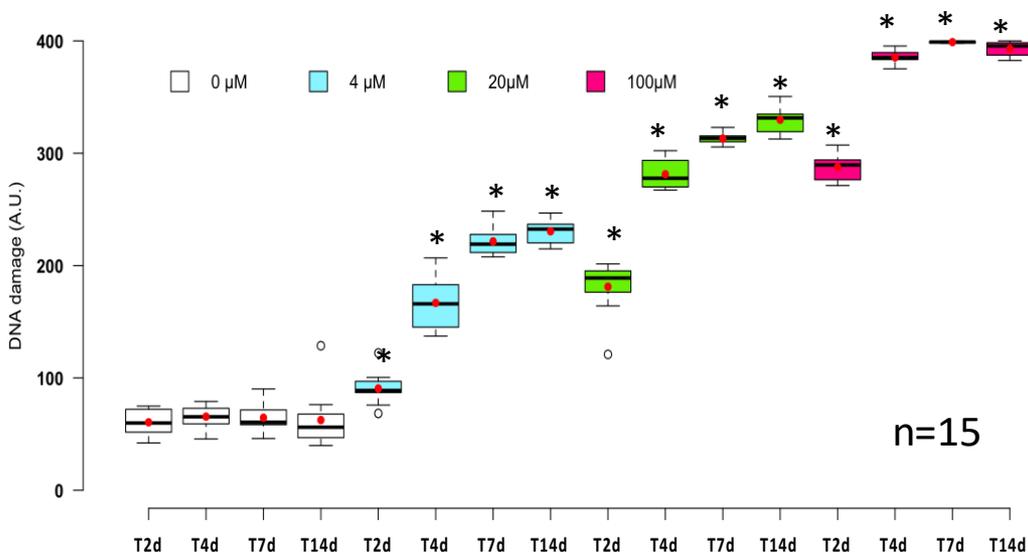
- Variabilité naturelle et niveau basale (site de référence)
- Application en biomonitoring passifs (sites différemment impactés)

## 3.1. Cinétique de réponse

### Méthode

-  Exposition semi-statique (renouvellement journalier)
-  4 concentrations de MMS (0, 4, 20 and 100 $\mu$ M)
-  4 temps d'expositions (2, 4, 7 and 14 jours)
-  3 béciers avec 5 crevettes/ condition

### Résultats



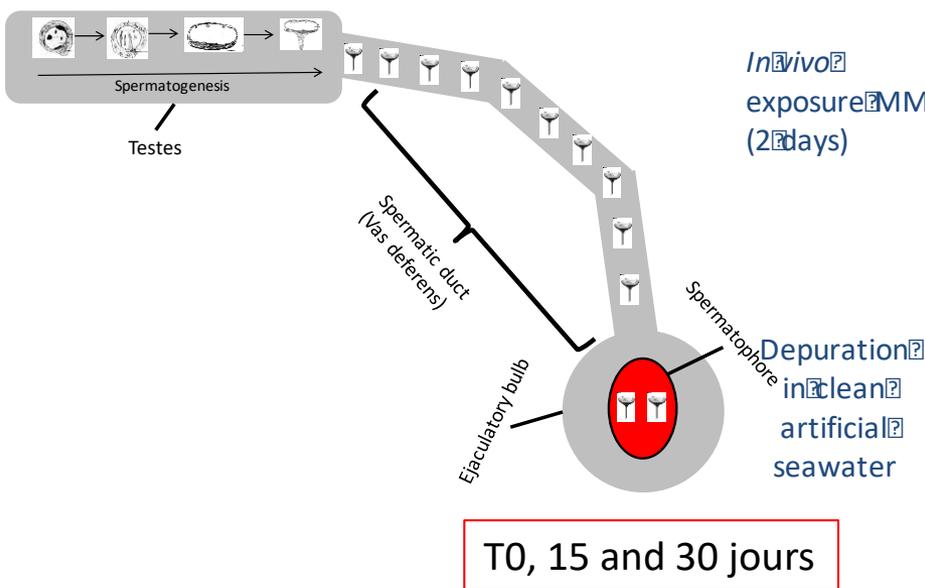
✓ Sperme de crevettes sensible en dépit de leurs spécificités

### 3.2. Persistance des dommages à l'ADN (spermatophore)? (1)

#### Méthode



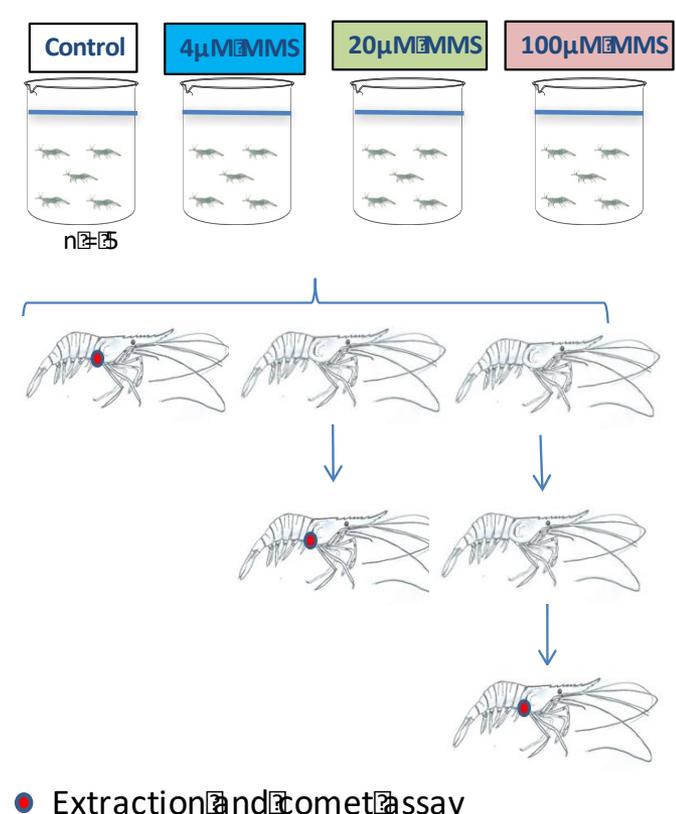
#### Période de reproduction



*In vivo* exposure (2 days)

Depuration in clean artificial seawater

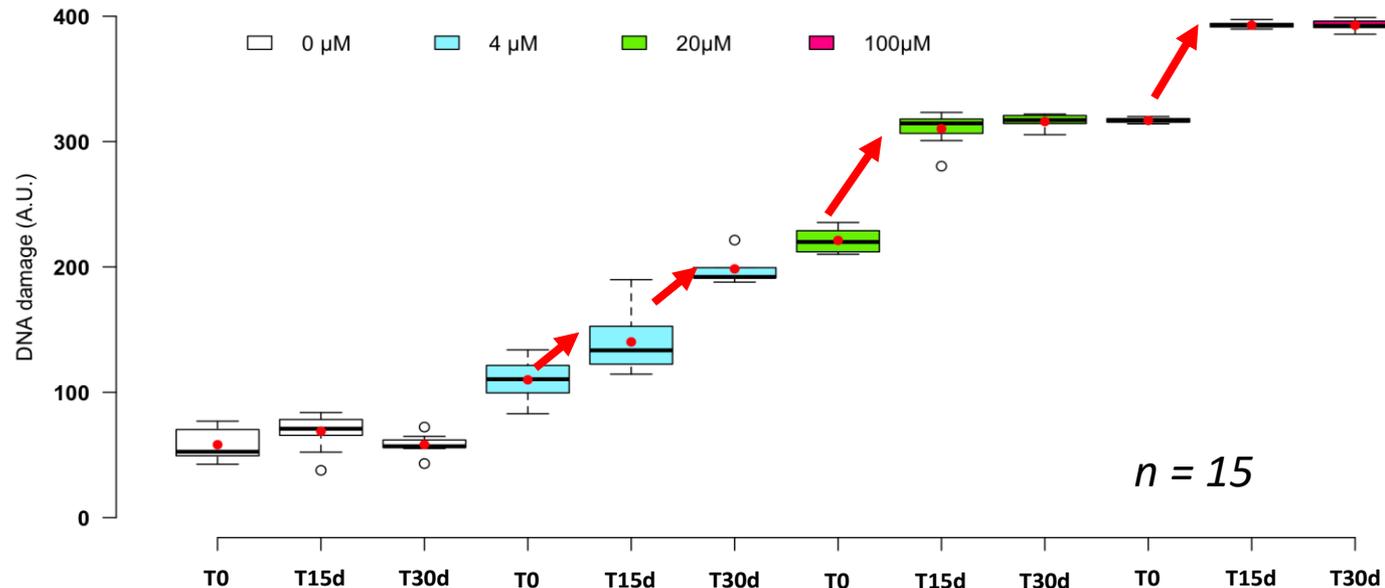
T20 days  
T0  
T15 days  
T30 days



● Extraction and comet assay

## 3.2. Persistance des dommages à l'ADN (spermatophore)? (2)

### Résultats



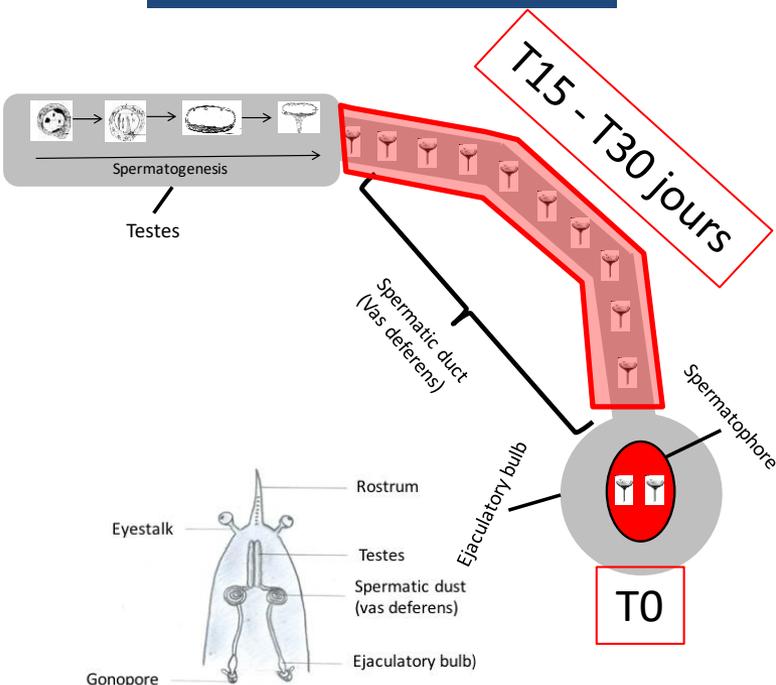
✓ Pas de capacités de réparation

### 3.3. Persistance des dommages à l'ADN (tractus reproducteur)? (1)

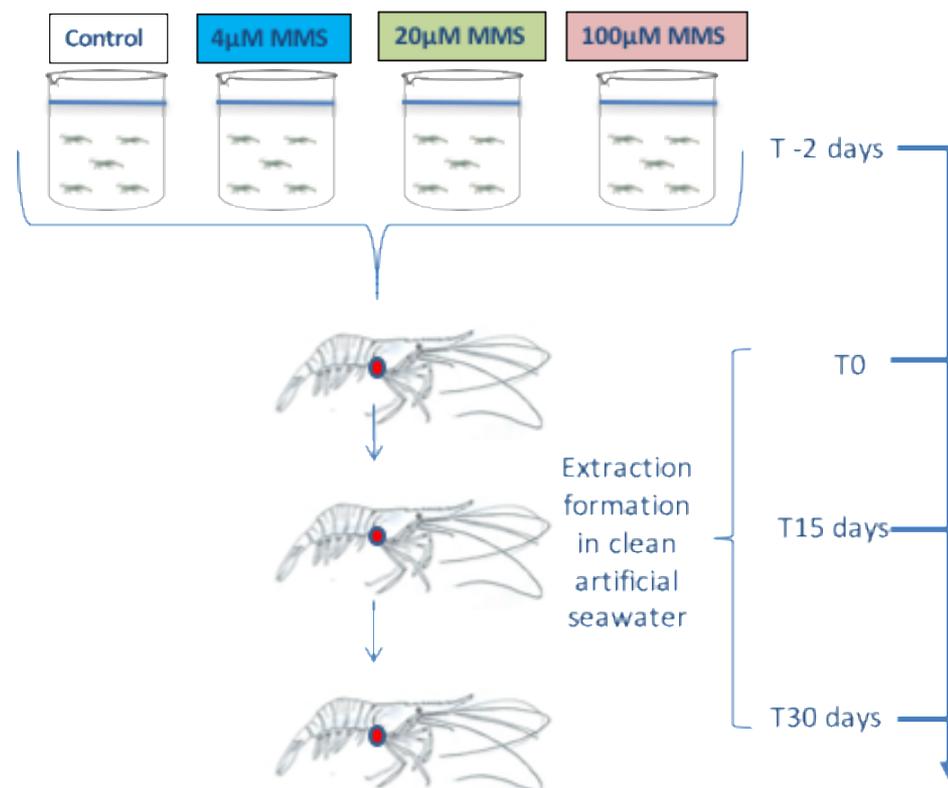
#### Méthodes



#### Période de reproduction



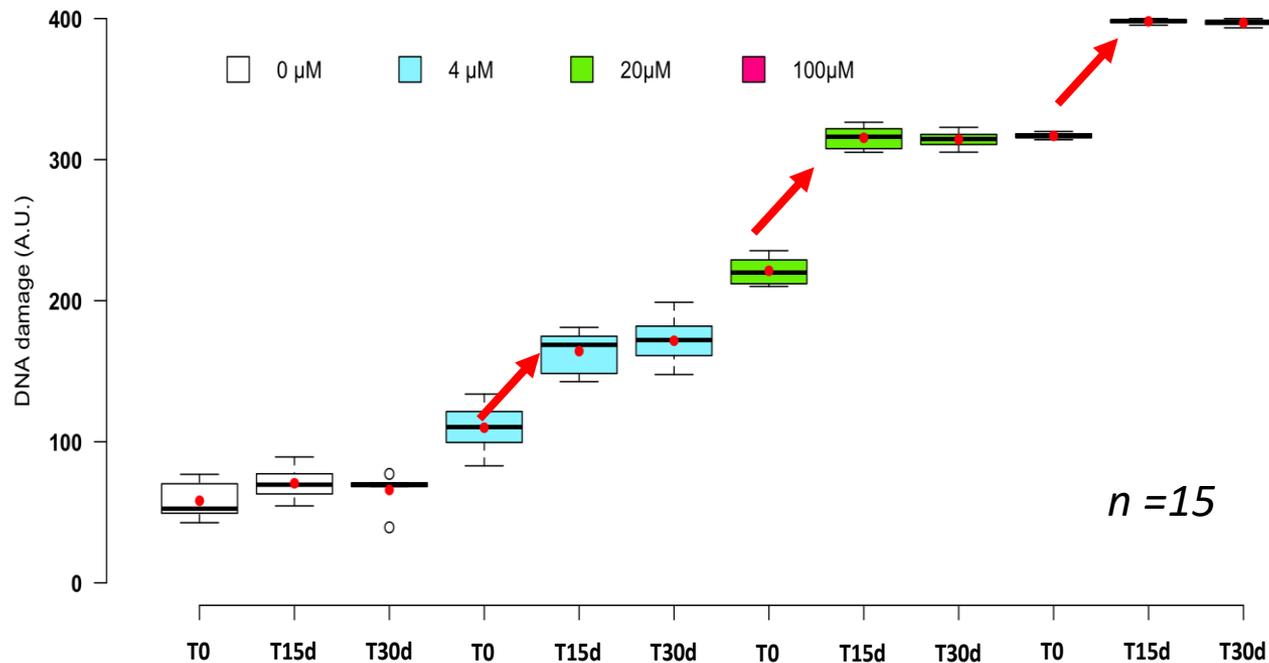
*In vivo* exposure MMS (2 days)



● Extraction et test Comet

### 3.3. Persistance des dommages à l'ADN (tractus reproducteur)? (1)

#### Résultats



- Cellules provenant du tractus reproducteur ont la même signature génotoxique que si elles avaient été encapsulé dans un spermatozoïde

## 3.4. Transfert à la descendance

## Méthode &amp; résultats

Exposition *in vivo* MMS (2 jours)

T0 = fécondation

T24 -48 h

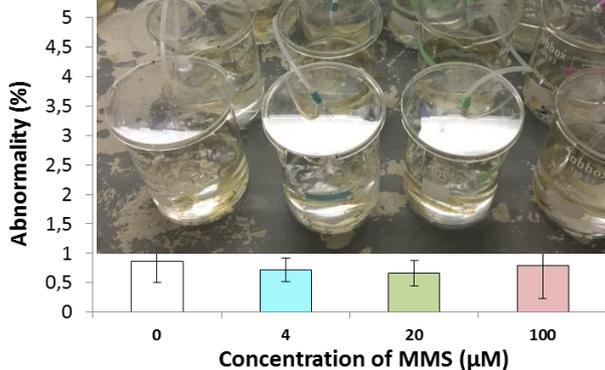
Class 4

15°C

Reproductive  
cycle

T45 jours

Anomalies



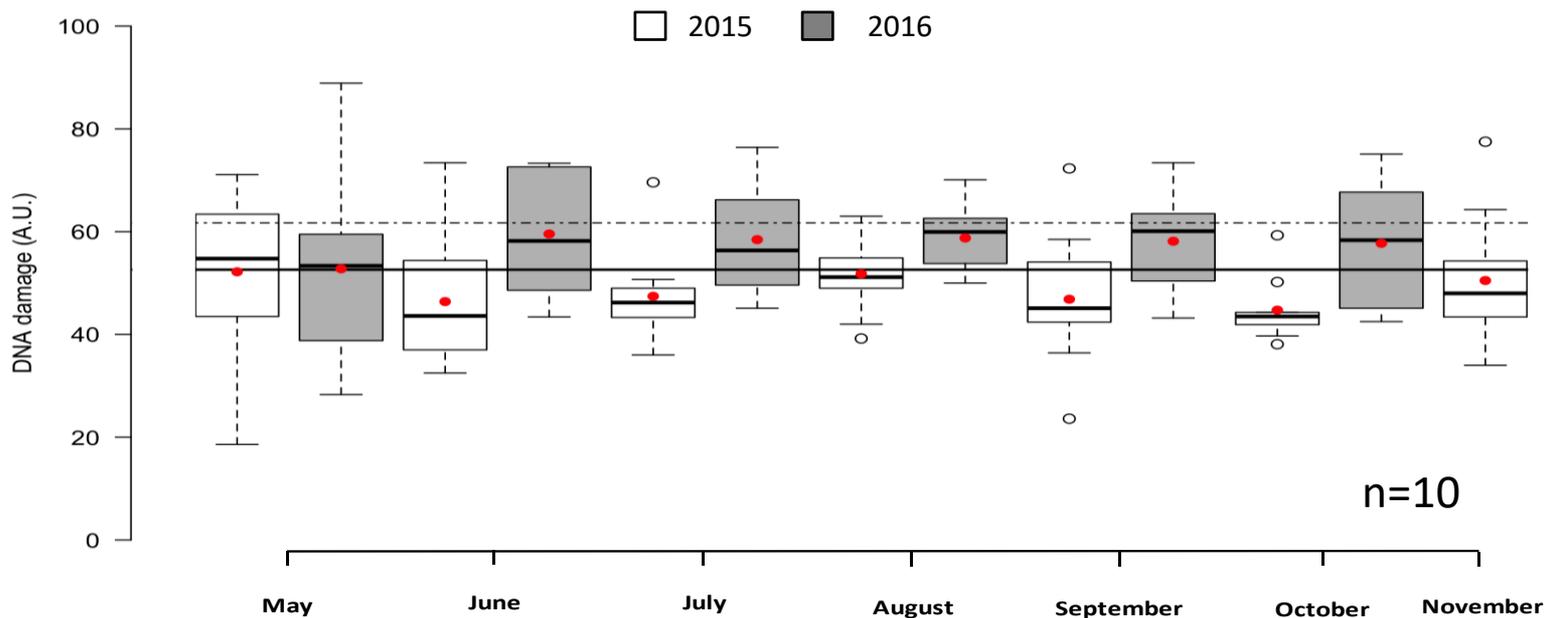
✓ Classe 4 → fonctionnels

✓ Pas d'effet sur le succès de fécondation et sur le développement embryo-larvaire post-éclosion

## 4.1. Approche *In situ* : variabilité naturelle (site de réf)

### Résultats

 7 mois 2015-2016 ( mai à novembre)

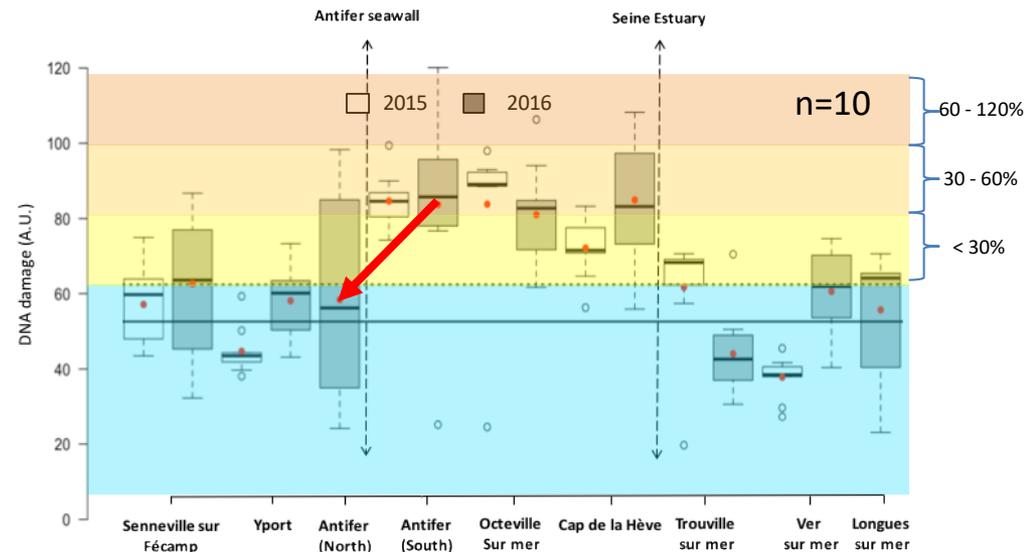
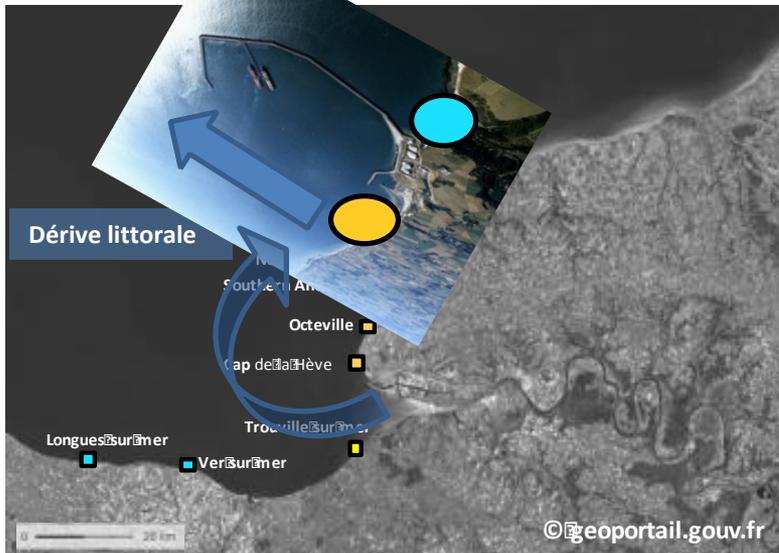


- Variabilité naturelle résiduelle
- ✓ Définition d'une distribution de référence avec un seuil maximal (IC 95%)

## 4.2. Approche *in situ*: biomonitoring passif chez l'espèce côtières

### Méthode & résultats

7 – 9 sites de la baie de Seine (October 2015 -2016)

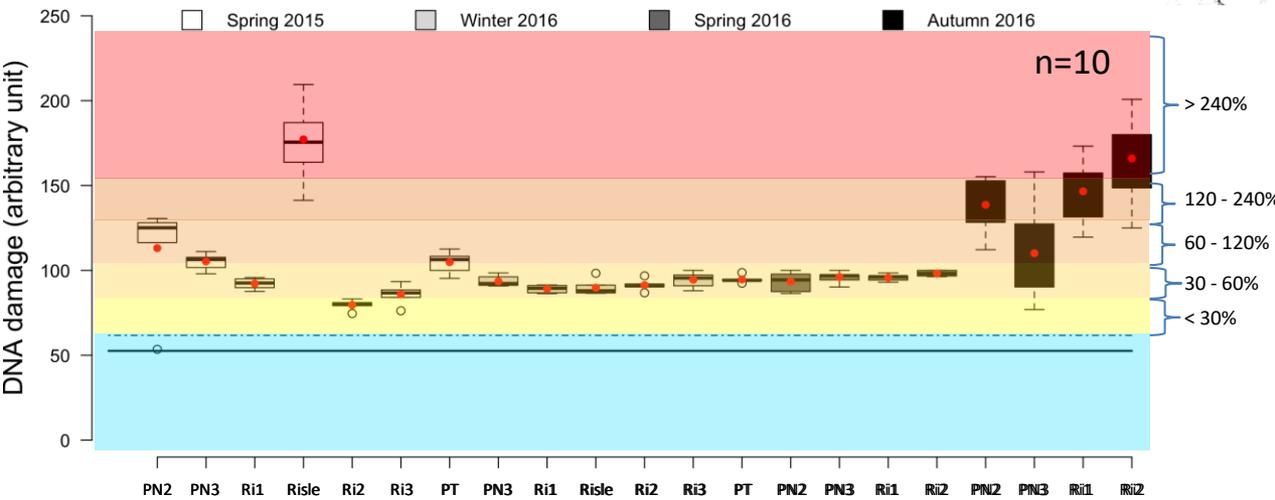
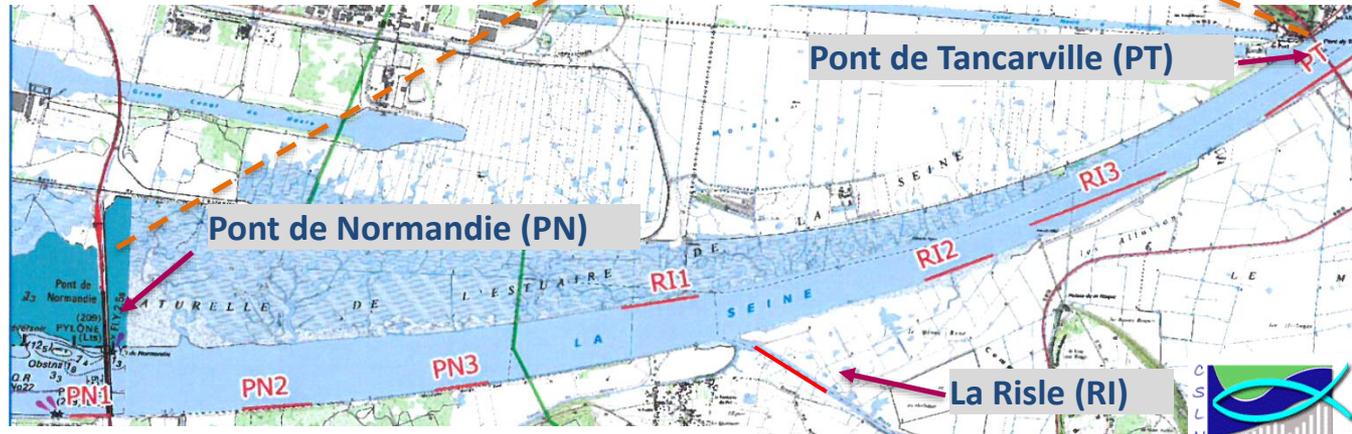
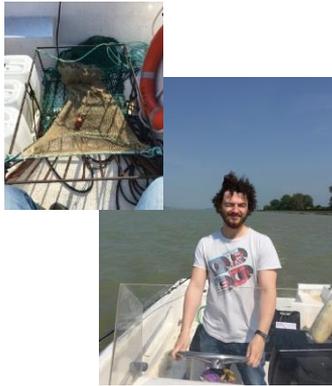


- Niveaux de dommage à l'ADN en dessous du seuil maximal (stations à l'extrémité de la baie)
- Inversement, les stations les plus proches de l'estuaire présentent les niveaux de dommages à l'AND les plus importants
- ✓ **Les plus hauts niveaux : presque 2 fois plus importants à Antifer Sud, Octeville et Cap de la Hève comparé au seuil maximal**

### 4.3. Approche *in situ*: biomonitoring passif chez l'espèce estuarienne

#### Méthode & résultats

7 stations sur l'estuaire de Seine (PN→PT)

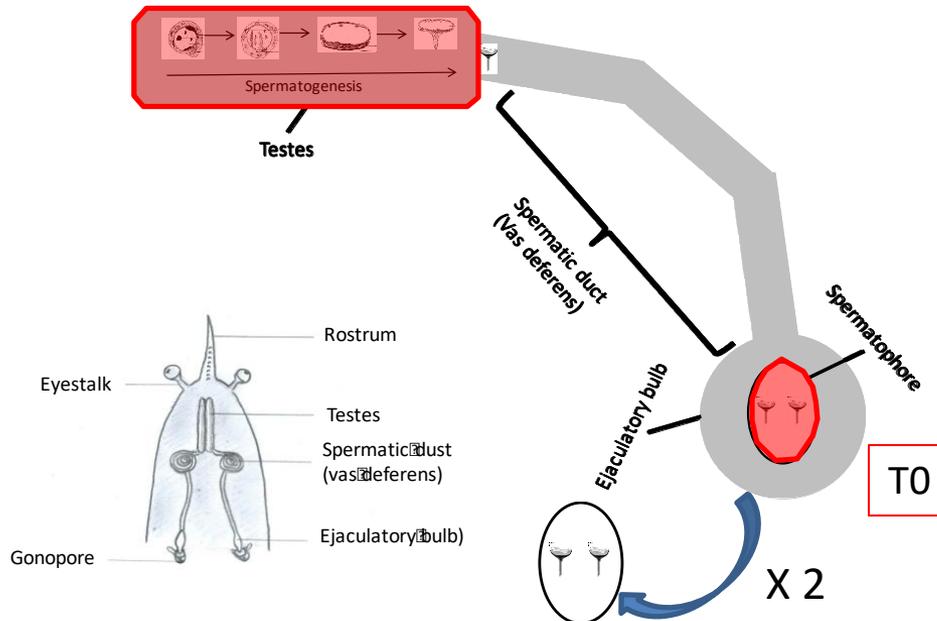


✓ Niveaux de dommages à l'ADN plus hauts comparés à la distribution de référence (Yport)

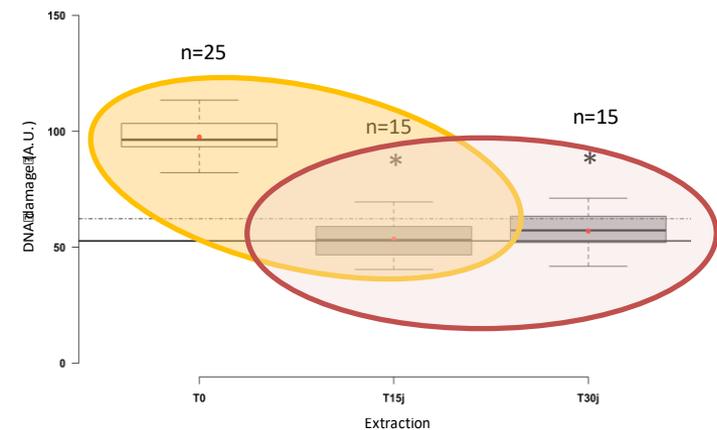
## 4.4. Approche *in situ* : valeur seuil avec expérimentation en laboratoire

Période de repos sexuel

T15 - T30 jours



Seine 25/10/2016



- Diminution significative des dommages à l'AND après reformation d'un nouveau spermatozoaire (10-15 jours)
- Stabilisation des dommages à l'AND des spermatozoïdes de *Palaemon longirostris*
- ✓ **Atteintes d'un niveau basal en dessous du seuil maximal et autour de la distribution de référence**

## 4.5. Approche *in situ* : continuum estuaire / littoral



## Conclusions

-  **Outil Robuste, sensible et intégrateur**
-  **1 mâle peut se reproduire avec au moins 3 femelles avec la même signature génotoxique**
-  **Les spermatozoïdes sont capable de féconder même avec un niveau maximal de dommage à l'ADN**
-  ***Définition d'une méthodologie basée sur l'utilisation d'une distribution de référence permettant de discriminer des sites présentant une contaminations contrastée***
-  ***Application de la distribution de référence en comparaisons inter-espèce comparaison le long du continuum estuaire / littoral de la Seine***

## Perspectives

-  **Succès de reproduction**
  - Stades plus tardifs du développement larvaire jusqu'au stade juvénile
-  **Application *in situ***
  - Tester la distribution sur une échelle plus large

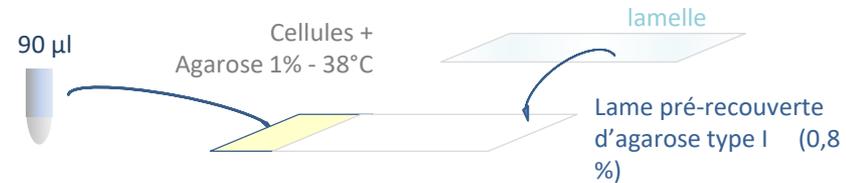
# Merci pour attention !!!!



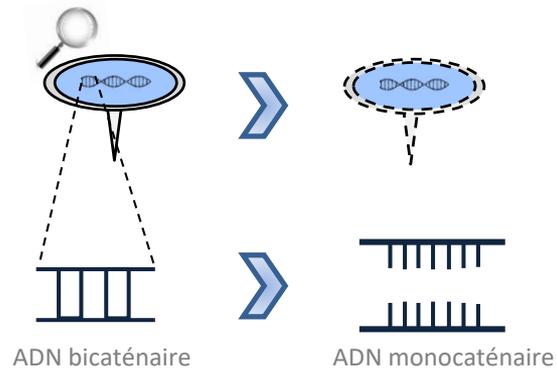
Cette étude est portée par le projet ECOTONES fondé par le programme Seine-Aval V ( Seine Aval d'intérêt public), la fédération de recherche CNRS 3730 SCALE et la région Normandie

## Principe du test Comet et ses différentes étapes

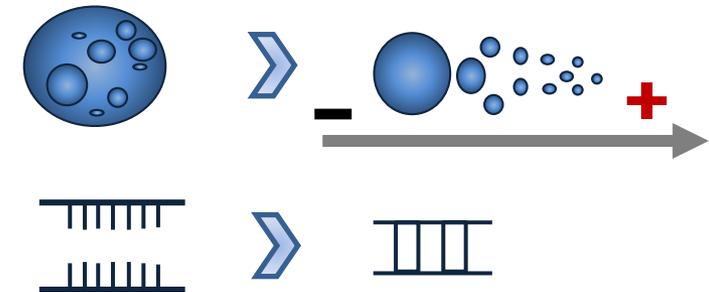
1. Inclusion des cellules dans du gel d'Agarose sur lames microscopiques



2. Lyse des membranes plasmiques et nucléaires (pH=10)



3. Dénaturation (pH>13)



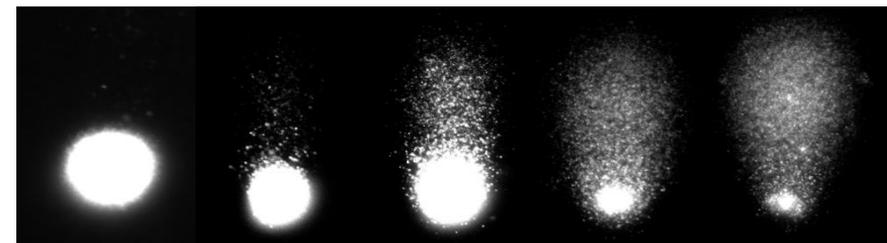
4. Electrophorèse (pH>13)  
20V ; 300mA ; 24 min

5. Neutralisation de la migration (pH=7,5)

6. Marquage des noyaux au DAPI et scoring visuel

$$AU = \frac{N0 \times 0 + N1 \times 1 + N2 \times 2 + N3 \times 3 + N4 \times 4}{\Sigma \text{ comet}} \times 100$$

N indique le nb de cellules comptées dans chaque classe de dommage à l'ADN



Class 0

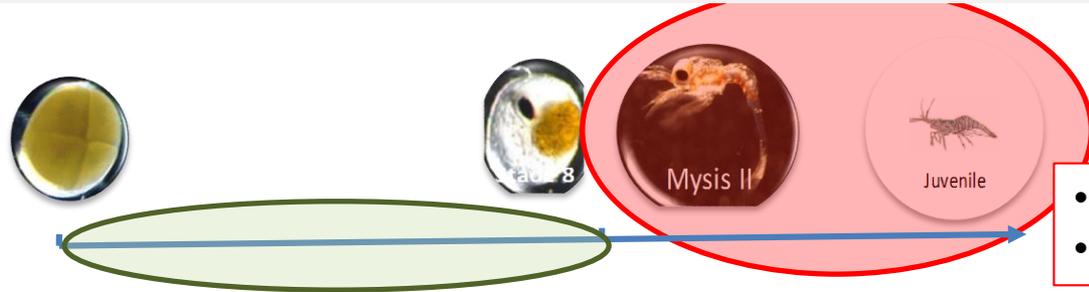
Class 1

Class 2

Class 3

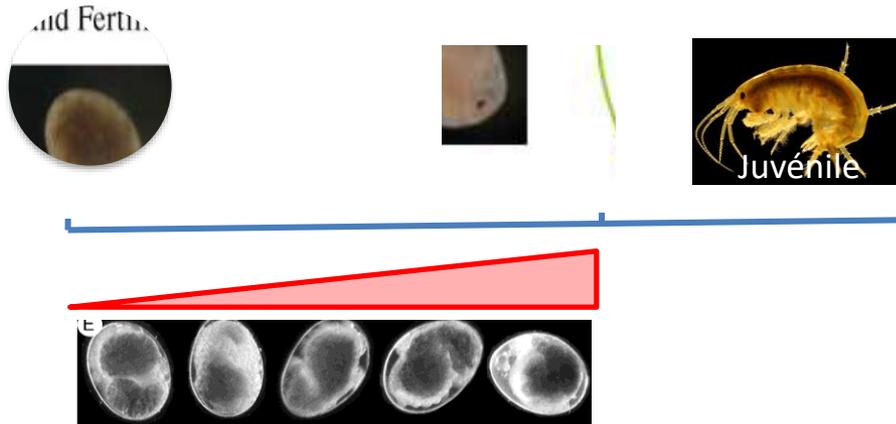
Class 4

### 3.4. Transfert à la descendance



- Eclosion larvaire
- Stratégie R

Lacaze et al. 2011

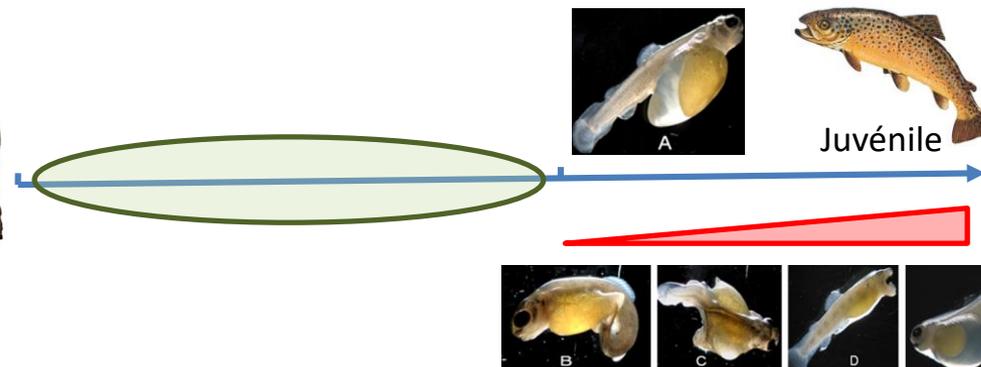


- Eclosion juvénile
- Stratégie K

Devaux et al. 2011



*Salmo trutta trutta*



- Eclosion larvaire
- Stratégie R