

# Évaluation de la qualité spermatique chez la dreissène pour le diagnostic de l'écotoxicité de substances chimiques et masses d'eaux continentales : Application au bassin de l'Orgeval

Marc Bonnard<sup>1\*</sup>, Tristan Lovergne<sup>1</sup>, Isabelle Bonnard<sup>1</sup>, Léo Persat<sup>2</sup>, Jérémie D. Lebrun<sup>2</sup>,  
Hocine Henine<sup>2</sup>, Cédric Chaumont<sup>2</sup>, Alain Geffard<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA), UMR-I 02 SEBIO, Reims

<sup>2</sup> INRAE, UR HYCAR, Équipe Artemhys, Antony

\* marc.bonnard@univ-reims.fr

## Résumé

*Au cours du premier semestre 2025, trois campagnes successives de terrain ont été réalisées au niveau de six stations instrumentées du bassin versant de l'Orgeval, avec pour objectif de caractériser et étudier les relations entre i) les conditions hydromorphologiques et physico-chimiques du milieu aquatique, ii) le profil et l'intensité de la pression chimique qui s'exerce sur les masses d'eaux, principalement par les pesticides en lien avec les pratiques agricoles et iii) les effets écotoxiques qui s'exercent sur le biote (gammare, dreissène). Des préleveurs automatiques disposés sur six stations d'études pendant une période de 18-19 jours ont permis la collecte d'échantillons d'eaux composites asservis au temps. À l'issue de chaque campagne, un échantillon d'eau composite global a été reconstitué, reflétant ainsi la dynamique de la pression chimique qui s'exerce sur le milieu. L'écotoxicité des échantillons d'eau composite a été évaluée en laboratoire via la mesure de la qualité spermatique de la dreissène. La cinétique d'inhibition de la viabilité a été mesurée par cytométrie en flux après 1 h, 2 h et 4 h d'exposition directe (ex vivo) des spermatozoïdes aux échantillons d'eau. Le rapport i) présente des éléments de méthodologie mettant en avant l'intérêt des spermatozoïdes de la dreissène comme modèle cellulaire pour la mesure de la cinétique de viabilité et le diagnostic de la cytotoxicité de substances chimiques ; et ii) montre la sensibilité des spermatozoïdes de la dreissène à l'écotoxicité de masses d'eaux contaminées principalement en pesticides ; via une méthodologie d'exposition directe des gamètes qui reste réaliste vis-à-vis de leurs conditions d'exposition dans l'environnement. La méthodologie de reconstitution, à partir de préleveurs automatiques, d'un échantillon d'eau composite qui soit caractéristique des pressions qui s'exercent sur la masse d'eau pendant une période déterminée est une stratégie alternative au déploiement de la dreissène par encagement et permet ainsi d'élargir son emploi pour la surveillance de la qualité écotoxicologique de masses d'eau de plus faible envergure (ru, tête de bassin...).*

## Points clefs

- ✓ Mise au point de la mesure de la viabilité spermatique chez une espèce sentinelle en écotoxicologie aquatique
- ✓ Intérêt des spermatozoïdes de la dreissène pour le diagnostic de l'écotoxicité/cytotoxicité des substances chimiques et des masses d'eaux continentales.
- ✓ Variabilité spatiale (sites) et temporelle (campagnes) de l'écotoxicité d'échantillons d'eau composite vis-à-vis de la viabilité spermatique

## **Abstract**

*During the first half of 2025, three successive field campaigns were carried out at six instrumented stations within the Orgeval watershed. The objective was to characterize and study the relationships between i) the hydromorphological and physico-chemical conditions of the aquatic environment, ii) the profile and intensity of the chemical pressure exerted on water bodies, mainly from pesticides linked to agricultural practices, and iii) the ecotoxic effects exerted on biota (gammarids, dreissenids). Automatic samplers installed at six study stations over a 18-19-day period enabled the collection of water composite samples at precise time. At the end of each campaign, a total composite water sample was reconstituted, thus reflecting the dynamics of the chemical pressure exerted on the environment. The ecotoxicity of the composite water samples was evaluated in the laboratory by measuring the sperm quality of the dreissenid mussel. The kinetics of viability inhibition were measured by flow cytometry after 1, 2, and 4 hours of direct (ex vivo) exposure of spermatozoa to the water samples. The report i) first presents methodological aspects highlighting the relevance of dreissenid spermatozoa as a cellular model for measuring viability kinetics and diagnosing the cytotoxicity of chemical substances; and ii) then demonstrates the sensitivity of dreissenid spermatozoa to the ecotoxicity of water bodies contaminated mainly by pesticides, using a direct gamete exposure method that realistically reflects their environmental exposure conditions. The methodology of reconstituting a composite water sample from automatic samplers—representative of the pressures acting on a water body over a given period—offers an alternative to in situ caging of dreissenids. This approach thus broadens the use of this model for monitoring the ecotoxicological quality of smaller water bodies (streams, headwaters, etc.).*

## **Key points**

- ✓ Optimization of Sperm Viability Measurement in a Sentinel Species for Aquatic Ecotoxicology*
- ✓ Use of Dreissenid Spermatozoa as a Cellular Model for Assessing the Ecotoxicity and Cytotoxicity of Chemicals and Freshwater Systems*
- ✓ Spatial (sites) and temporal (campaign) variability of the ecotoxicity of composite water samples with respect to sperm viability*

## Introduction

Les masses d'eau continentales servant de supports à de nombreuses activités anthropiques constituent le réceptacle ultime des contaminants déversés dans l'environnement, que ce soit par les retombées atmosphériques, les relargages (in)directs des activités humaines et/ou le lessivage/transfert des contaminants entre les écosystèmes (*i.e.* sols/eaux). Les organismes aquatiques vont donc être exposés à un cocktail de substances chimiques au cours de leur vie, qui seront susceptibles d'affecter l'état de santé des individus et de menacer la dynamique et la pérennité des populations au sein de ces écosystèmes.

Parmi les substances chimiques déversées dans l'environnement aquatique, un tiers d'entre elles sont suspectés d'être génotoxiques, c'est-à-dire, de pouvoir interagir de façon directe ou indirecte avec la molécule d'ADN [1,2] et dont certaines, reconnues comme étant cancérigènes mutagènes et reprotoxiques (CMR) pour l'Homme, sont inscrites comme substances polluantes prioritaires dans la Directive Cadre européenne sur l'Eau [3]. Parmi ces substances génotoxiques/cancérigènes sont retrouvés des composés tels que des hydrocarbures aromatiques polycycliques – HAP (benzo[a]pyrène, fluoranthène...), des éléments traces métalliques - ETM (cadmium, cuivre) ou certains pesticides (chlorpyrifos, diuron). La génotoxicité de ces composés a été largement étudiée chez de nombreuses espèces aquatiques, vertébrées (poissons) et invertébrées (mollusques, crustacés) par la mesure de l'intégrité de l'ADN à l'aide du test des comètes ou du test des micronoyaux [4,5]. Cependant, notre interprétation des conséquences des atteintes génotoxiques sur la physiologie des organismes et des effets à plus long terme pour les populations exposées reste encore à approfondir chez ces espèces sauvages [6,7]. L'évaluation de la génotoxicité environnementale est réalisée le plus souvent au niveau de cellules somatiques (hémocytes des mollusques bivalves, érythrocytes nucléés des poissons, etc.) qui présentent l'avantage d'être disponibles tout au long de l'année, mais dont l'interprétation des conséquences du stress génotoxique se limite à la *fitness* individuelle.

Parmi les cellules reproductrices, les spermatozoïdes s'avèrent être les plus vulnérables à l'action génotoxique des substances chimiques en raison de mécanismes de réparation des dommages à l'ADN et de défenses antioxydantes le plus souvent absentes ou limitées [8]. Les spermatozoïdes représentent ainsi des modèles cellulaires de choix pour la mesure de la génotoxicité environnementale, puisqu'ils vont ainsi retranscrire l'ensemble des atteintes génotoxiques au cours de leur exposition. Malgré une disponibilité restreinte aux périodes de maturité sexuelle des organismes, les spermatozoïdes sont issus du développement de cellules germinales au sein du tissu reproducteur qui peuvent être impactées par l'action toxique des contaminants chimiques pendant la période de gamétogénèse. Pour les espèces se reproduisant par fertilisation externe des gamètes (ex. des mollusques bivalves), les spermatozoïdes doivent également faire face aux substances chimiques lors de leur émission dans le milieu. Si une relation a pu être mise en évidence pour certaines espèces sauvages entre les atteintes génotoxiques aux gamètes mâles et des anomalies de développement embryonnaire/larvaire de la descendance (tératogénicité) [9-11], ce lien n'est pas toujours clairement établi pour d'autres espèces, notamment les invertébrés comme les crustacés [12]; ceci pouvant s'expliquer par l'implication d'autres facteurs biologiques du gamète. En conséquence et au regard de nos connaissances actuelles, il apparaît donc nécessaire de mieux appréhender l'impact des contaminants chimiques sur la fonctionnalité des gamètes mâles en intégrant de nouvelles cibles biologiques autres que l'ADN, qui puissent mieux refléter la qualité des gamètes.

La structure et la fonctionnalité des spermatozoïdes offrent l'avantage de pouvoir être analysées par des marqueurs communs chez un grand nombre d'espèces. Sur cette base, différents indicateurs/critères de qualité spermatique ont été définis. La qualité spermatique se définit comme étant la capacité d'un spermatozoïde à fertiliser avec succès un ovocyte et permettre le développement de l'embryon [13]. La qualité spermatique dépend de multiples critères cellulaires comme la morphologie, la viabilité, la motilité, le pH intracellulaire (*pHi*), l'intégrité de la membrane plasmique et de l'ADN, l'activité mitochondriale ou le statut anti-oxydant des spermatozoïdes [13,14]. La majorité de nos connaissances scientifiques sur la définition des critères de qualité spermatique en lien avec la toxicité des substances chimiques reposent sur des études cliniques en santé humaine; dont l'examen de critères de qualité spermatique est depuis longtemps utilisé pour le diagnostic de l'infertilité masculine. Chez les espèces sentinelles utilisées en écotoxicologie aquatique, la prise en compte de marqueurs de qualité spermatique est en voie de développement depuis ces dernières années. En complément de l'intégrité de l'ADN spermatique, les études mettent en avant d'autres critères comme la densité, la viabilité/mortalité ou la motilité spermatique en raison de leur sensibilité à l'écotoxicité des substances chimiques [15-18] qui pourraient être considérés comme des *proxy* du succès de fertilisation

[19,20]. Trapp et ses collaborateurs [21] ont par exemple montré chez des gammares mâles exposés à différentes molécules perturbatrices endocriniennes (cadmium, methoxyfenozone, pyriproxyfen) une altération de la qualité spermatique associée à des modifications protéiques au niveau testiculaire en lien avec leurs différents modes d'action [22]. Chez d'autres invertébrés d'eau douce, la prise en compte des marqueurs de qualité spermatique est beaucoup plus anecdotique, comme chez la moule zébrée ou dreissène (*Pallas, 1771*) alors qu'il s'agit d'une espèce reconnue en écotoxicologie aquatique et en biosurveillance [23,24]. Les études chez la dreissène mettent surtout en avant des perturbations du cycle reproducteur à travers l'analyse histologique des gonades [25-27], ou via la mesure d'un indice de maturité sexuelle (IMS) en cytométrie de flux qui a souligné un retard de la spermatogénèse chez des dreissènes exposées en condition écosystémique (mésocosmes ou rivières artificielles) à la carbamazépine [28]. De façon complémentaire, nous avons mis en évidence la génotoxicité de trois résidus de substances médicamenteuses (carbamazépine, furosémide, propranolol) sur des spermatozoïdes de dreissènes exposées en condition *ex vivo* à des doses environnementales (0,1 ; 1 et 10 µg/L ; données internes). A notre connaissance, les autres études en lien avec la qualité spermatique chez la dreissène ont porté principalement sur i) la caractérisation de la morphologie et/ou de l'ultrastructure des spermatozoïdes, ii) des critères de mesure des marqueurs de viabilité/mortalité ou de motilité spermatique, ou iii) des techniques pour l'obtention et/ou la cryo-conservation des gamètes [29-31]. Au regard de ces éléments, il apparaît nécessaire de mieux caractériser l'écotoxicité des composés chimiques et des masses d'eaux multicontaminées sur la qualité des spermatozoïdes de la dreissène. L'étude de la fonctionnalité des gamètes mâles chez la dreissène via l'emploi de marqueurs de qualité spermatique est une approche novatrice qui permettrait i) d'améliorer les connaissances sur la capacité de reproduction d'une espèce sauvage et de caractériser la reprotoxicité de molécules chimiques, notamment à de faibles doses présentes dans leur milieu ; et ii) de considérer les retombées utiles pour les gestionnaires de l'environnement vis-à-vis d'une espèce sentinelle pour l'amélioration de la caractérisation de la toxicité des masses d'eaux contaminées.

Ce rapport d'activité PIREN-Seine structuré en deux parties, mettra l'accent i) sur des éléments méthodologiques de la mesure de la viabilité/mortalité spermatique par cytométrie en flux, ii) sur la réponse et la sensibilité des spermatozoïdes de la dreissène vis-à-vis de la cytotoxicité de trois substances chimiques (cadmium, carbamazépine, tébuconazole) testées séparément et en conditions d'exposition *ex vivo* des gamètes, et iii) sur la sensibilité de ce biomarqueur de qualité spermatique dans l'évaluation de l'écotoxicité de molécules en mélange et de leurs fluctuations temporelles, représentées par les échantillons d'eaux composites collectés au cours du premier semestre 2025 sur les différentes stations du bassin versant de l'Orgeval. L'ensemble des données présentées dans ce rapport ont été acquises et traitées dans le cadre d'un stage de Master 1 (Gratification PIREN Seine, stage M. Tristan Lovergne, Master Risques & Environnement, parcours Biodiversité, Santé-Environnement, URCA).

## **Partie 1. Optimisation de la mesure de viabilité spermatique par double marquage *Sybr 14/IP* et analyse en cytométrie de flux**

### **1.1. Cinétique et établissement d'une carte de contrôle de la mesure de viabilité spermatique**

Pour l'ensemble des expérimentations décrites ci-dessous, les mesures de viabilité spermatique se sont déroulées entre les mois de juin et août 2025, correspondant à la période de maturité sexuelle du cycle de reproduction annuelle de la dreissène [28]. Les dreissènes provenant d'une population calibrée du Lac du Der (taille/âge) ont été stabulées en laboratoire avant leur utilisation. Le sexage des dreissènes s'est fait via un examen microscopique d'une ponction réalisée dans la gonade, permettant ainsi de constituer des lots d'individus mâles nécessaires aux expérimentations. L'injection de sérotonine (neuromédiateur) dans la cavité palléale des dreissènes favorise l'émission des gamètes dans le milieu de vie. À la suite de l'injection, les dreissènes sont laissées au repos individuellement dans des béciers (20 °C, obscurité). Après filtration de la suspension spermatique obtenue, la concentration et la viabilité initiale des spermatozoïdes sont déterminées par cytométrie en flux après un double marquage aux fluorochromes *Sybr 14/IP*. Le *Sybr 14* marque en vert les spermatozoïdes vivants (intégrité membranaire intacte) alors que l'iodure de propidium marque en rouge

les spermatozoïdes moribonds/morts (intégrité membranaire perméable) (Figure 1-A). Le travail de mise au point méthodologique a permis dans un premier temps de définir des régions d'intérêt du cytogramme permettant la caractérisation de trois sous-populations spermatisques (viables, moribonds/morts, désagrégées) (Figure 1-B), à la suite de l'exposition des spermatozoïdes de dreissène à un stress chimique et/ou thermique utilisés comme standards méthodologiques.

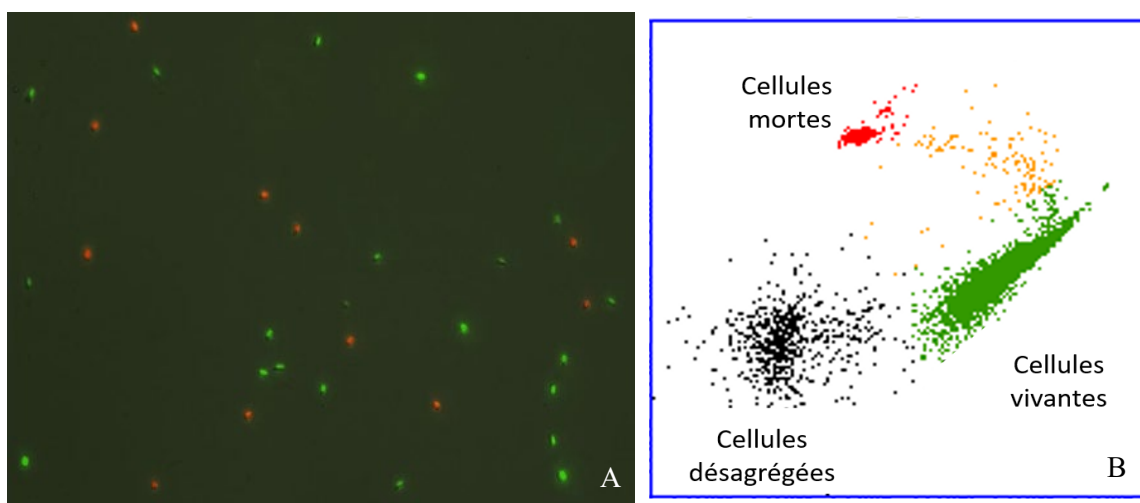


Figure 1 : Photographie sous microscopie à épifluorescence des spermatozoïdes viables (vert), moribonds/morts (rouge) après double marquage au *Sybr 14/IP* (A) et exemple d'un cytogramme d'un échantillon spermatisque permettant la distinction des trois sous-populations (B).

La figure 2–A montre la **cinétique de viabilité** sitôt la récupération des spermatozoïdes (0 h) et jusqu'à 24 h dans le milieu de suspension. La réponse mesurée correspond au nombre de spermatozoïdes de la sous-population « viable » (spermatozoïdes marqués uniquement au *Sybr 14*) sur 5 000 évènements analysés dans la région du cytogramme correspondant aux spermatozoïdes de dreissène (sur la base de leur taille-FSC (*Forward Scatter*) et de leur complexité cellulaire-SSC (*Side Scatter*)). Une analyse de variances à mesures répétées (facteur *temps de maintien*) n'a montré aucune perte de viabilité spermatisque (-11 % en moyenne) jusqu'à 2 h, avec des niveaux moyens aux alentours de 3 000 évènements. Une inhibition significative est observée à partir de 4 h (-24 %), avec des effets beaucoup plus marqués après 24 h (-52 %). Des modélisations menées *a posteriori* sur un plus grand nombre d'échantillons biologiques ont montré dans ces conditions expérimentales un temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) des spermatozoïdes de l'ordre de 32-35 h.

L'exposition des spermatozoïdes de dreissènes à des substances chimiques/eaux contaminées implique au préalable la définition de contrôles négatifs et positifs pour l'établissement d'une **carte de contrôle**, garantissant une bonne interprétation des mesures. La figure 2–B montre le nombre moyen de spermatozoïdes en tant que contrôle négatif (moyenne [IC95%]<sub>neg-C</sub> = 2702 [2516-2888]) et après 1 h d'exposition à 10 % de DMSO comme contrôle positif (moyenne [IC95%]<sub>pos-C</sub> = 1403 [1193-1613]). Le DMSO a été choisi en raison de son utilisation en tant que solvant organique pour la dissolution des substances chimiques (cf. partie 1.2), à une concentration finale (10 %, v/v) qui s'est avérée cytotoxique pour les spermatozoïdes de dreissènes (- 48 % par rapport aux témoins correspondants). L'établissement de la carte de contrôle verra ses valeurs de moyennes et intervalles de confiance se préciser au fur et à mesure de l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons biologiques (n = 39 dans cette étude) qui pourra à terme servir à définir des **valeurs basales et/ou seuils** de ce biomarqueur de qualité spermatique.

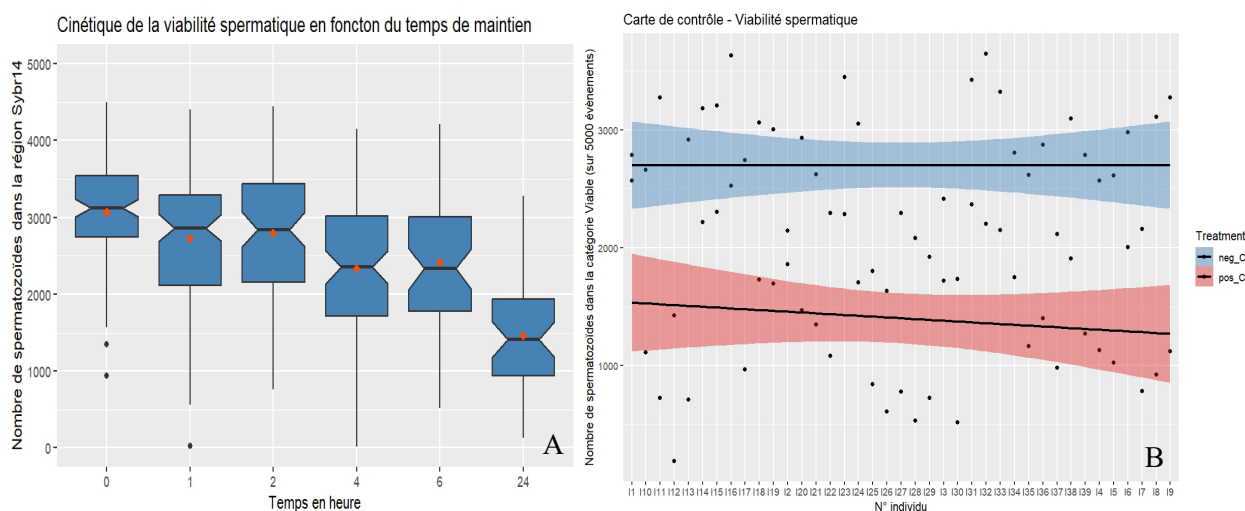


Figure 2 : Cinétique de viabilité des spermatozoïdes en fonction du temps de maintien dans leur milieu de suspension (A) - Carte de contrôle de la mesure de viabilité spermatique par cytométrie en flux ( $n = 39$  dreissènes) (B)

## 1.2. Écotoxicité de trois substances chimiques testées en condition d'exposition *ex vivo* des spermatozoïdes

Sur la base des résultats obtenus précédemment, la seconde étape de ces travaux d'optimisation a consisté à étudier la sensibilité et la réponse des spermatozoïdes de dreissène à l'écotoxicité de trois substances chimiques, testées en conditions d'exposition *ex vivo* des spermatozoïdes. Le choix des composés suivants (cadmium : métal lourd ; carbamazépine : agent antiépileptique ; tébuconazole : fongicide) est guidé principalement par i) la littérature existante au regard de leur caractéristique cyto(géno)toxique vis-à-vis de la dreissène ou d'autres mollusques bivalves [1,2,4-6,28], et ii) par leur problématique environnementale, ancienne ou actuelle, en lien avec leur occurrence et leur teneur dans le milieu aquatique et/ou leur capacité de bioaccumulation par la dreissène [32]. Pour chacun de ces composés, trois concentrations exprimées en molaire ont été testées ( $10^{-3}$  ou  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-9}$  M). La gamme de concentrations a été établie avec un facteur de x1000 entre les concentrations, sauf contrainte de solubilité de la substance chimique dans le solvant organique nous obligeant à tester une concentration maximale de  $10^{-4}$  M pour la carbamazépine. Pour chaque substance, la teneur maximale est de 1 % DMSO dans le milieu d'exposition, qui n'a pas démontré d'effet significatif sur la viabilité des spermatozoïdes. La plus faible concentration testée de chaque substance ( $10^{-9}$  M) est proche de la médiane environnementale ou valeur guide environnementale (VGE) préconisée par la DCE/INERIS dans les eaux de surface (voir la correspondance en concentration massique - Tableau I), alors que la concentration de  $10^{-6}$  M représente une teneur environnementale élevée. La plus forte concentration testée ( $10^{-3}$  ou  $10^{-4}$  M) n'est pas retrouvée dans l'environnement aquatique, mais est proche des valeurs de  $CL_{50}/CI_{50}$  issues des bioessais d'écotoxicité aquatique normalisés (crustacés, poissons). Pour chaque substance/concentration, différents paramètres physico-chimiques (pH, conductivité...) du milieu de suspension ont été contrôlés en amont afin de garantir que ces facteurs n'aient pas d'incidence sur les spermatozoïdes.

Le tableau I exprime les données d'écotoxicité en termes de pourcentage d'inhibition de la viabilité des spermatozoïdes exposés après 1 h, 2 h et 4 h par rapport au contrôle négatif correspondant (= aliquot non exposé). De façon globale, le cadmium à la teneur environnementale ( $10^{-9}$  M) n'a pas entraîné d'effet significatif sur la viabilité des spermatozoïdes, quel que soit le temps d'exposition. Des effets cytotoxiques dépendants du temps d'exposition ont en revanche été mesurés aux deux plus fortes concentrations testées,  $10^{-6}$  M et  $10^{-3}$  M, en particulier à la concentration  $10^{-3}$  M. Pour cette concentration, les effets les plus marqués après 4 h d'exposition montrent une inhibition de plus de 75 % de la viabilité spermatique en comparaison des témoins correspondants. Pour la carbamazépine, les deux plus faibles concentrations testées ( $10^{-9}$  M et  $10^{-6}$  M) n'ont pas montré d'effet significatif sur la viabilité des spermatozoïdes, au contraire de la plus forte ( $10^{-4}$  M) qui a montré une inhibition de l'ordre de 20-30 %. Les résultats obtenus pour le tébuconazole montrent quant à eux une inhibition de la viabilité des spermatozoïdes exposés aux trois concentrations testées, avec des

pourcentages d'inhibition qui semblent supérieurs (-40 à 50 %) à la concentration intermédiaire de  $10^{-6}$  M. Des expérimentations supplémentaires devront être réalisées pour confirmer ces premiers résultats. Ces expérimentations démontrent néanmoins l'intérêt des spermatozoïdes comme **modèle cellulaire pour le diagnostic de l'écotoxicité** (cytotoxicité) de substances chimiques en condition d'exposition *ex vivo*, qui reste réaliste des voies d'exposition des gamètes dans le milieu naturel.

Tableau I : Inhibition de la viabilité spermatique (%) par rapport au témoin correspondant pour des spermatozoïdes de dreissènes exposés *ex vivo* dans leur milieu de suspension à une gamme de concentrations (exprimées en molaire) à trois substances chimiques : un métal lourd (cadmium), un médicament antiépileptique (carbamazépine) et un fongicide (tébuconazole).

Contaminant	Valeur environnementale	Concentrations testées (M)	Temps d'exposition		
			1 h	2 h	4 h
Cadmium	2.2 x 10 <sup>-9</sup> M (0.25 µg/L)	10 <sup>-9</sup>	-12 %	-6 %	-0,5 %
		10 <sup>-6</sup>	-20 %	-24 %	-27 %
		10 <sup>-3</sup>	-22 %	-59 %	-77 %
Carbamazépine	1.06 x 10 <sup>-9</sup> M (0.25 µg/L)	10 <sup>-9</sup>	-3 %	-3,5 %	-4 %
		10 <sup>-6</sup>	1 %	2,5 %	3 %
		10 <sup>-4</sup>	-22 %	-26 %	-30 %
Tébuconazole	0.32 x 10 <sup>-9</sup> M (0.1 µg/L)	10 <sup>-9</sup>	-12 %	-19 %	-20 %
		10 <sup>-6</sup>	-40 %	-50 %	-40 %
		10 <sup>-3</sup>	-28 %	-33 %	-25 %

*N.B. Valeurs environnementales (NQE-MA : Normes de Qualité Environnementale-moyennes annuelles pour les eaux de surface retenues par la DCE \* [33] ou Valeur Guide Environnementale- Norme de Qualité Environnementale préconisée par l'INERIS\*\* [34]). Cadmium : NQE-MA, DCE \* ; Carbamazépine : INERIS, VGE-NQE \*\* ; Tébuconazole : INERIS, VGE-NQE \*\**

## Partie 2. Écotoxicité d'échantillons d'eau composite provenant de trois campagnes réalisées sur le bassin de l'Orgeval.

### 2.1. Stations de mesure et instrumentation

Au cours du premier semestre 2025, trois campagnes successives de terrain ont été réalisées au niveau de six stations instrumentées du bassin versant de l'Orgeval afin d'évaluer de façon intégrée l'impact écotoxique de la saisonnalité de pressions chimiques. La participation à ces campagnes terrain a permis de constituer un premier jeu de données environnementales, via l'exposition en laboratoire des spermatozoïdes de dreissène à des échantillons d'eaux multicontaminés.

Le site d'étude fait partie de l'observatoire ORACLE situé sur le bassin versant de l'Orgeval (Seine-et-Marne, 77) et concerne sa partie Est composée de l'axe du Rognon (ru du Fossé Rognon aux Avenelles) et de ses affluents (ru de l'étang et ru de la Loge) (Figure 3). Le bassin de l'Orgeval, par son instrumentation, permet un suivi hydrologique depuis 1962 et une évaluation de la qualité des masses d'eau depuis 1975. Ce bassin versant principalement agricole à 81 % est représentatif des grandes cultures céréalières (blé) en cours sur le bassin de la Seine [35]. Ce bassin versant drainé à 80 % facilite le transfert rapide des pesticides vers les cours d'eau. Sur le bassin de l'Orgeval, six stations (Figure 3) sont instrumentées, permettant le suivi en continu de la dynamique d'exposition des populations sauvages aux transferts des pesticides dans le milieu aquatique. Les six stations retenues sont les suivantes : E (48.86285087796384, 3.154176705933324), M (48.860805524572974, 3.1559212057851194) et leur confluent EM (48.859522943215, 3.151309263444447), L (48.849417996398046, 3.143982788347606), R (48.85178887849105, 3.147239379039687) et leur confluent LR (48.84252519934012, 3.143129301483754).

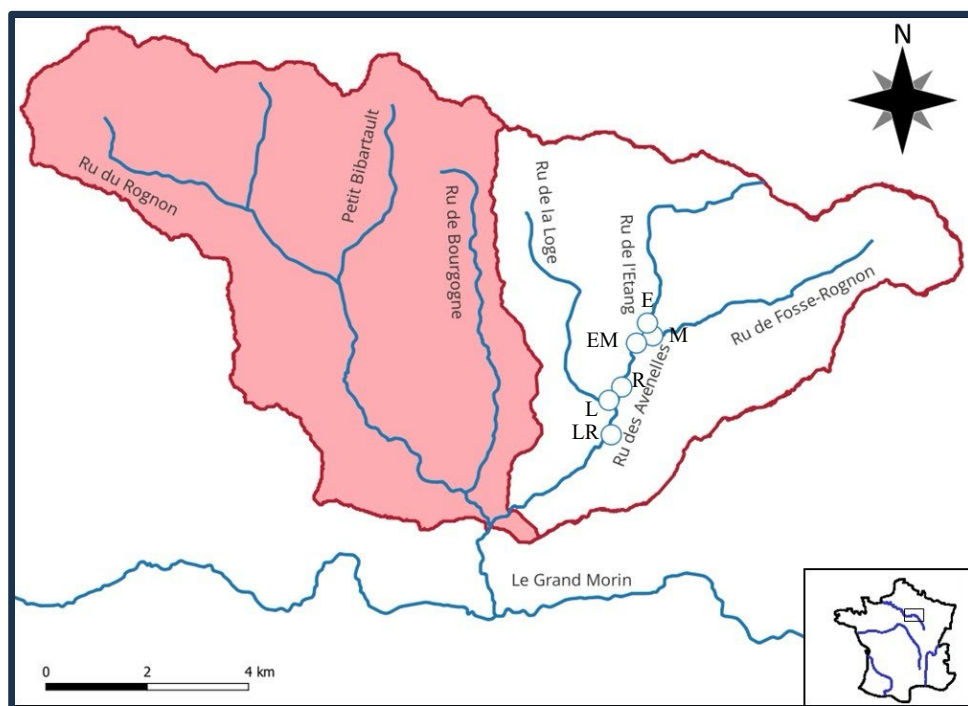


Figure 3 : Carte géographique du site et des stations d'études du bassin de l'Orgeval (Source : L. Persat)

Les trois campagnes terrain se sont déroulées conjointement aux encagements de gammars (descriptif dans le rapport PIREN-Seine de l'action EAU'listic [36]), soit du 02 au 22 avril (Campagne 1), du 24 avril au 13 mai (Campagne 2) et du 15 mai au 03 juin (Campagne 3) de l'année 2025. Des préleveurs automatiques disposés sur les six stations ont permis de collecter des échantillons d'eau toutes les trois heures (soit 8 échantillons par journée) et de réaliser à la fin de chaque campagne une **eau composite intégrant la variabilité temporelle de la pression chimique** qui s'exerce sur le milieu. L'eau composite obtenue a été aliquotée pour permettre i) l'analyse de la teneur en nitrate et d'environ 575 molécules de pesticides (métabolites compris) et ii) la mesure de marqueurs de qualité spermatique chez la dreissène (cf. partie 2.2). Parallèlement à ces préleveurs automatiques, des sondes multiparamétriques ont été déployées dans le milieu, permettant le suivi en continu et la caractérisation physico-chimique des différentes masses d'eau (*i.e.* température, conductivité, concentration en oxygène dissous). Des mesures ponctuelles des paramètres physico-chimiques des masses d'eaux ont été réalisées au début et à la fin de chaque campagne, correspondant au dépôt/retrait des cages de gammars dans le milieu (Tableau II). Une analyse en composantes principales (ACP) des mesures physico-chimiques ponctuelles et leur projection sur un plan à deux dimensions montrent une distinction des campagnes particulièrement marquée entre la campagne 1 et la campagne 3, ainsi que des stations à l'exception des stations R et LR (Figure 4).

Tableau II : Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques des masses d'eau mesurés de façon ponctuelle (dépôt/retrait) au niveau des six stations, suivies au cours des trois campagnes successives sur le bassin versant de l'Orgeval.

Sites	E		M		EM		L		R		LR		
	Dépôt	Retrait	Dépôt	Retrait	Dépôt	Retrait	Dépôt	Retrait	Dépôt	Retrait	Dépôt	Retrait	
S3-C1 AVRIL 2025	Date	02/04/2025	22/04/2025	02/04/2025	22/04/2025	02/04/2025	22/04/2025	02/04/2025	23/04/2025	02/04/2025	23/04/2025	02/04/2025	23/04/2025
	Heure	14h45	9h55	15h00	10h10	15h10	10h25	15h45	10h30	15h30	10h12	16h00	10h45
	pH	7,22	7,22	8,49	7,57	7,74	7,55	7,87	7,809	8,41	7,953	8,49	8,174
	Conduc	654	660	533	547	653	660	596	602	632	546	625	628
	T°C	13,7	11,3	12,4	11,1	13	11,1	12,4	10,7	11,5	10,9	11,3	10,8
	NO3												
	O2 (%)	133,8	98,7	167,1	84,4	126	65,7	106,7	85	121,9	88,3	123,9	88,5
	O2 (mg/L)	13,75	10,75	17,69	9,24	13,15	10,45	11,32	9,37	13,22	9,70	13,49	9,73
	Vitesse d'écoulement (m/s)	0,46 (20 cm)	0,56 (20 cm)	0,06 (30 cm)	0,03 (31 cm)	0,43 (19 cm)	0,20 (14 cm)	0,29 (23 cm)	0,35 (25 cm)	0,13 (37 cm)	0,11 (43 cm)	0,13 (39 cm)	0,10 (38 cm)
	S3-C2 AVRIL/MAI 2025	Date	24/04/2025	12/05/2025	24/04/2025	12/05/2025	24/04/2025	12/05/2025	24/04/2025	13/05/2025	24/04/2025	13/05/2025	24/04/2025
Heure		16h14	10h01	16h24	10h14	16h33	10h28	17h06	10h19	16h50	10h07	17h20	10h35
pH		7,21	7,16	7,69	7,48	7,60	7,53	7,667	7,72	7,983	7,95	8,051	8,05
Conduc		658	655	486	510	633	643	590	649	635	662	619	662
T°C		13,1	12	12,6	14,2	13,1	12,5	12,8		12,4	11,7	12,1	12,2
NO3													
O2 (%)		115,5	82,4	102,8	60,4	103,9	88,8	92,2	89,2	95,6	92,9	93,1	91,2
O2 (mg/L)		12,08	8,81	10,85	6,12	10,88	9,29	9,74	9,52	10,16	9,94	10	9,74
Vitesse d'écoulement (m/s)		0,45 (22 cm)	0,13 (17 cm)	0,03 (49 cm)	0,03 (26 cm)	0,12 (23 cm)	0,36 (21 cm)	0,15 (22 cm)	0,14 (25 cm)	0,12 (35 cm)	0,09 (33 cm)	0,18 (32 cm)	0,05 (36 cm)
S3-C3 MAI/JUIN 2025		Date	15/05/2025	02/06/2025	15/05/2025	02/06/2025	15/05/2025	02/06/2025	15/05/2025	03/06/2025	15/05/2025	03/06/2025	15/05/2025
	Heure	13h40	10h00	13h53	10h15	14h08	10h30	14h39	10h40	14h25	10h25	14h55	11h04
	pH	7,24	7,2	7,8	7,75	7,59	7,57	7,79	7,7	8,07	8	8,144	8,09
	Conduc	661	656	556	536	700	678	676	706	664	668	970	679
	T°C	12,6	12,2	13,7	15,1	13	13	13	13,1	11,9	12,3	12,4	13
	NO3												
	O2 (%)	108,8	94,3	98,5	85,8	102,1	102,6	89	89,5	94,5	92	92,8	92,8
	O2 (mg/L)	11,53	10,03	10,19	8,58	10,77	10,72	9,36	9,32	10,19	9,77	9,91	9,68
	Vitesse d'écoulement (m/s)	0,54 (16 cm)	0,23 (15 cm)	0,01 (22 cm)	0,02 (25 cm)	0,40 (10 cm)	0,26 (11 cm)	0,18 (19 cm)	0,06 (19 cm)	0,10 (32 cm)	0,02 (42 cm)	0,06 (33 cm)	0,07 (35 cm)

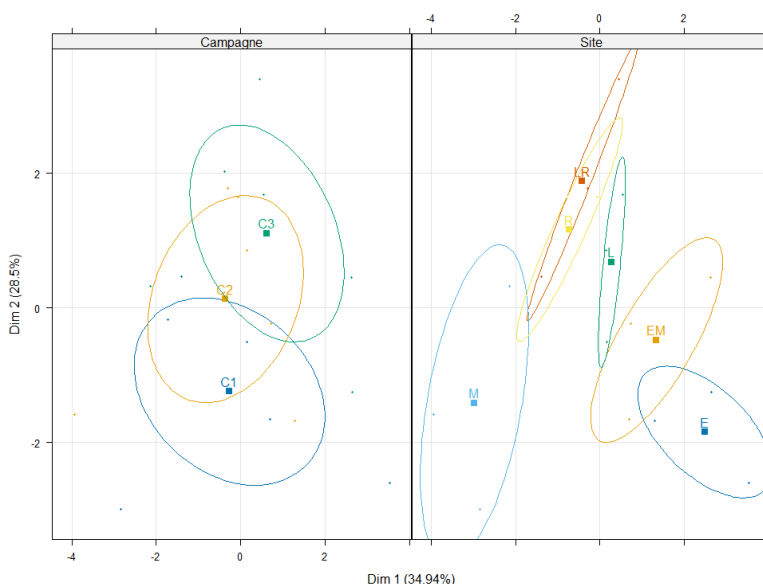


Figure 4 : Projection sur l'espace des deux premières composantes principales de l'ACP des variables quantitatives d'intérêt (paramètres physico-chimiques des eaux) en fonction de la campagne et des stations de mesure.

## 2.2. Mesure de la qualité spermatique après exposition des gamètes aux eaux composites multicontaminées.

Sitôt leur récupération sur le terrain, les échantillons d'eau composite ont été filtrés sur une membrane en polyester pour molécules polaire et apolaire (maille : 0,20 µm) et des aliquots ont été constitués pour chaque

eau composite, représentant un total de 18 échantillons pour l'ensemble des trois campagnes (6 stations x 3 campagnes). Ces échantillons d'eau composite ont été congelés et maintenus à - 20 °C en laboratoire jusqu'à leur utilisation. La mesure de la viabilité spermatique a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites en partie 1. Après rétablissement de la concentration cellulaire, la suspension spermatique (5 % vol./vol.) a été exposée pendant 1 h, 2 h et 4 h à un aliquot de l'échantillon d'eau composite maintenu à une température de 20 °C. Les spermatozoïdes d'une dreissène mâle permettent l'analyse des 6 stations d'études d'une même campagne. Un total de 9 réplicats biologiques (dreissène) a été constitué par campagne et station d'études. Pour chaque dreissène, l'échantillon de la suspension spermatique a également été maintenu aux mêmes pas de temps (1 h, 2 h, 4 h) dans le milieu initial de suspension, avec ajout possible de 10 % DMSO, constituant respectivement les contrôles négatifs et positifs aux expérimentations.

La figure 5 représente les résultats de viabilité spermatique (nombre de spermatozoïdes de la sous-population « viable ») à la suite de leurs expositions en condition *ex vivo* aux eaux composites issues des stations d'études pour les trois campagnes. De façon globale, la réponse des spermatozoïdes contrôles (Ss) est relativement similaire entre les trois campagnes, avec une diminution progressive de la viabilité des spermatozoïdes au cours du temps (1 h, 2 h, 4 h) ne dépassant pas 35 %. Les spermatozoïdes exposés ont montré des taux de viabilité beaucoup plus contrastés en fonction des campagnes et stations échantillonnées. Les effets les plus importants sur la viabilité spermatique ont été observés lors de la troisième campagne (C3), avec une perte de viabilité de plus de 90 % dès 1 h d'exposition pour l'ensemble des stations, à l'exception de la station LR (70 % de perte). Des effets similaires ont également été observés après 1 h d'exposition des spermatozoïdes aux eaux composites des stations L (campagne 1) et LR (campagne 2). Les résultats obtenus pour les campagnes 1 et 2 (Figure 5) montrent une inhibition moins marquée de la viabilité des spermatozoïdes, en comparaison de la campagne 3. Cette inhibition est le plus souvent dépendante du temps d'exposition (effets plus marqués après 4 h d'exposition qu'après 1 h). Les profils de diminution de la viabilité spermatique au cours du temps sont relativement différents entre les stations pour la campagne 1 et plutôt similaires pour la campagne 2, à l'exception de la station LR citée précédemment.

Les résultats obtenus dans le cadre des campagnes de terrain sur le bassin de l'Orgeval montrent l'intérêt de suivre la cinétique de diminution de viabilité des spermatozoïdes sur 4 h et de ne pas se limiter à un seul temps d'exposition (i.e. 1 h), car il apporte une information supplémentaire quant à la réponse/sensibilité des spermatozoïdes face à l'écotoxicité des échantillons d'eaux composites. Des travaux sont actuellement menés afin de modéliser la réponse des spermatozoïdes au cours du temps et définir des paramètres tels que le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ), qui permettrait de traduire et comparer plus facilement la cytotoxicité des échantillons d'eaux composites entre les stations. Les résultats mettent en avant une réponse des spermatozoïdes sur une même station qui est sensiblement différente en fonction des campagnes ; ceci pouvant être en lien avec des intensités et des profils variés de contamination de la masse d'eau selon les régimes hydriques et/ou les pratiques agricoles sur le bassin versant. Ces résultats doivent encore être interprétés avec précaution et l'acquisition des données de physico-chimie et des profils de contamination des échantillons d'eaux composites permettra en partie de déceler la responsabilité de ces facteurs dans la cytotoxicité observée vis-à-vis des spermatozoïdes de dreissène. Néanmoins, la mesure de ce biomarqueur de qualité spermatique semble prometteuse dans un contexte de surveillance de la qualité écotoxicologique des masses d'eaux continentales.

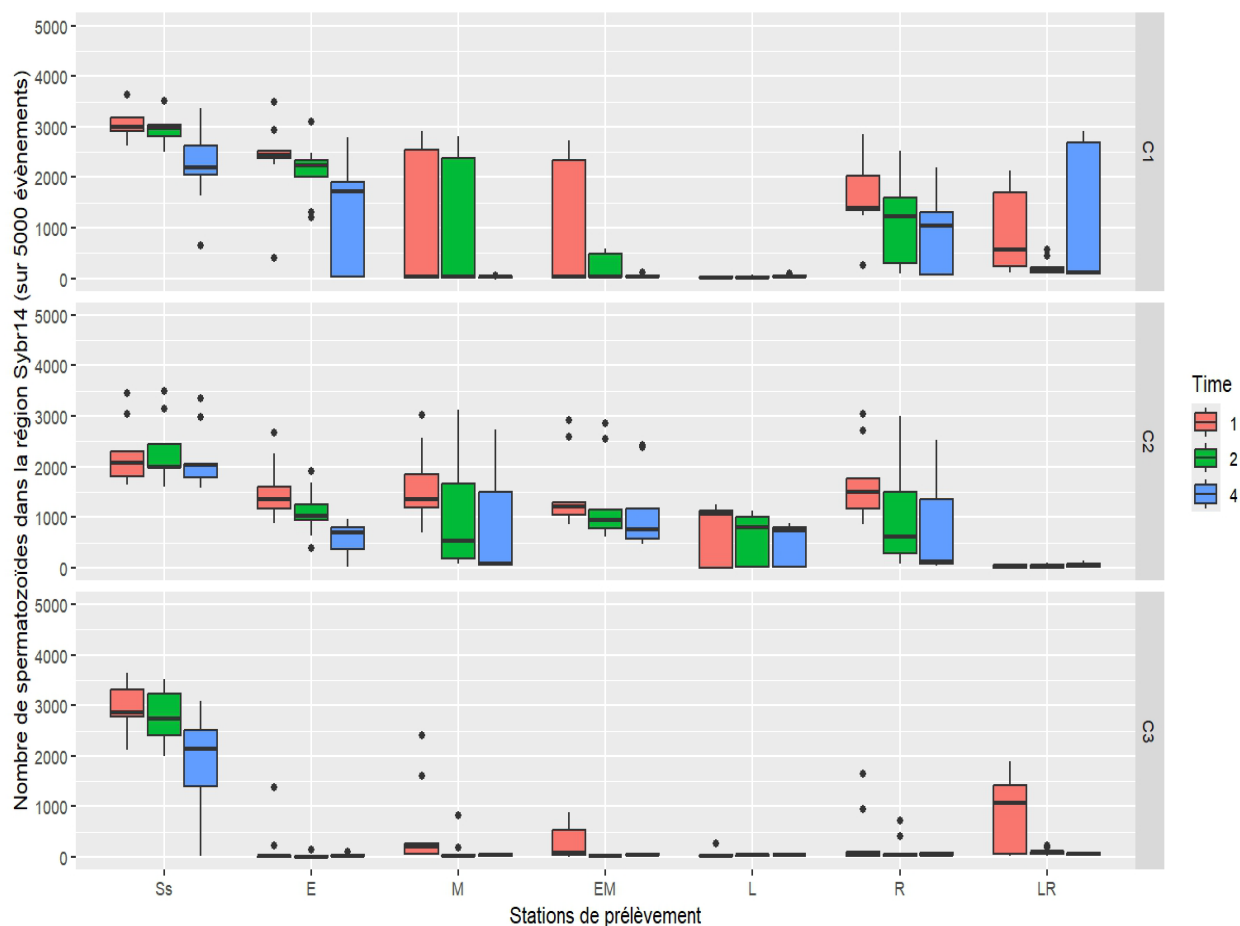


Figure 5 : Représentation du nombre de spermatozoïdes dans la région *Sybr 14* (sous-population « viable ») au cours du temps d'exposition (1 h-rouge, 2 h-vert et 4 h-bleu) aux eaux composites prélevées sur les 6 stations d'études (E, M, EM, L, R, LR, et Ss = milieu de suspension-contrôle négatif) lors des trois campagnes réalisées sur le bassin versant de l'Orgeval (C1, C2, C3) (n = 9 dreissènes/station/campagne).

## Bibliographie

- [1] Jha, A. N. 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat. Res. Fund. Molec. Mechan. Mutagen.*, 552, 1–17.
- [2] Ohe T., Watanabe T., Wakabayashi K., 2004. Mutagens in Surface Waters: A Review. *Mutat. Res.*, 567, 109-149.
- [3] Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau, Journal officiel de l'Union européenne, L 327, 22 décembre 2000. [Directive - 2000/60 - EN - EUR-Lex](#)
- [4] Bolognesi C., Cirillo S., 2014. Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Current Zoology*, 60(2), 273–284,
- [5] Depledge M.H., 1998. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mechan. Mutagen.*, 399, 109–122.
- [6] Jha A. N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagen.*, 2(23), 207–221.
- [7] Lewis C., Galloway T.S., 2009. Reproductive consequences of paternal genotoxin exposure in marine invertebrates. *Environ. Sci. Technol.*, 43(3), 928-33.
- [8] Aitken R.J., De Iulii G.N., 2007. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproductive BioMedicine Online*, 14(6), 727-733.
- [9] Barranger A., Akcha F., Rouxel J., *et al.*, 2014. Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: Evidence of vertical transmission of DNA damage. *Aquat. Toxicol.*, 146, 93-104.
- [10] Devaux A., Bony S., Plenet S., *et al.*, 2015. Field evidence of reproduction impairment through sperm DNA damage in the fish nase (*Chondrostoma nasus*) in anthropized hydrosystems. *Aquat. Toxicol.*, 169, 113-122.
- [11] Oliviero M., Schiavo S., Dumontet S., *et al.*, 2019. DNA damages and offspring quality in sea urchin *Paracentrotus lividus* sperms exposed to ZnO nanoparticles. *Sci. Total Environ.*, 651, 756-765.
- [12] Erraud A., Bonnard M., Geffard O., *et al.*, 2019. Signification of DNA integrity in sperm of *Palaemon serratus* (Pennant, 1777): Kinetic responses and reproduction impairment. *Mar. Environ. Res.*, 144, 130-140.
- [13] Bobe J., Labbé C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocr.*, 165, 535–548.
- [14] Cabrita E., Martínez-Páramo S., Gavaia P. J., *et al.*, 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, 432, 389–401.
- [15] Erraud A., Bonnard M., Cornet V., *et al.*, 2021. How age, captivity and cryopreservation affect sperm quality and reproductive efficiency in precocious Atlantic salmon (*Salmo salar* L. 1758). *Aquaculture*, 544, Article 737047.
- [16] Kime D., Van Look K., McAllister B., *et al.*, 2000. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.*, 130(4), 425-433.
- [17] Gallo A., Boni R., Tosti E., 2018. Sperm viability assessment in marine invertebrates by fluorescent staining and spectrofluorimetry: A promising tool for assessing marine pollution impact. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 147, 407-412.
- [18] Gallo A., Boni R., Tosti E., 2020. Gamete quality in a multistressor environment. *Environ. Int.*, 138, 105627.
- [19] Lewis C., Galloway T.S., 2010. Sperm toxicity and the reproductive ecology of marine invertebrates. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 6, 188-190.
- [20] Lewis C., Ford A.T., 2012. Infertility in male aquatic invertebrates: a review. *Aquat. Toxicol.*, 120-121, 79-89.
- [21] Trapp J., Armengaud J., Pible O., *et al.*, 2015. Proteomic investigation of male *Gammarus fossarum*, a freshwater crustacean, in response to endocrine disruptors. *J. Proteome Res.*, 14(1), 292-303.
- [22] Koenig N., Almunia C., Bonnal-Condouzorgues A., *et al.*, 2021. Co-expression network analysis identifies novel molecular pathways associated with cadmium and pyriproxyfen testicular toxicity in *Gammarus fossarum*. *Aquat. Toxicol.*, 235, 105816.
- [23] Binelli A., Della Torre C., Magni S., *et al.*, 2015. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environ. Pollut.*, 196, 386-403.
- [24] Palos-Ladeiro M., Barjhoux I., Bigot-Clivot A., *et al.*, 2017. Mussel as a Tool to Define Continental Watershed Quality. InTech.
- [25] Bacchetta R., Mantecchia P., 2009. DDT polluted meltwater affects reproduction in the mussel *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere*, 76, 1380–1385.
- [26] Binelli A., Bacchetta R., Vailati G., *et al.*, 2001. DDT contamination in Lake Maggiore and effects on zebra mussel spawning. *Chemosphere*, 45, 409–415
- [27] Palais F., Mouneyrac C., Dedourge-Geffard O., *et al.*, 2011. One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*, 83, 1062–1073.
- [28] Magniez G., Franco A., Geffard A., *et al.*, 2018. Determination of a new index of sexual maturity (ISM) in zebra mussel using flow cytometry: interest in ecotoxicology. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25, 11252–11263.
- [29] Białkowska J., Demianowicz W., Głogowski J., 2004. Determining the viability of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) spermatozoa and changes in the plasma membrane using the fluorescence method. *Arch. Pol. Fish.*, 12(1), 23-30.
- [30] Białkowska J., Dietrich G., Demianowicz W., *et al.*, 2004. Evaluation of CASA system for predicting the motility of zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas) spermatozoa. *EJPAU* 7(2), #04.
- [31] Ciereszko A., Dabrowski K., Piros B., *et al.*, 2001. Characterization of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) sperm motility: duration of movement, effects of cations, pH and gossypol. *Hydrobiol.*, 452, 225–232.
- [32] Catteau A., Le Guernic A., Palos-Ladeiro M., *et al.*, 2023. Validation of the zebra mussel as a relevant tool for active biomonitoring approach (BIOESSAI & BIOMOSE Programs).
- [33] DIRECTIVE 2008/105/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE. Lien internet : [eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0105](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0105).
- [34] INERIS, Portail Substances chimiques. Lien internet : <https://substances.ineris.fr/recherche-substances>.
- [35] Cécile Loumagne, Gaëlle Tallec. L'observation long terme en environnement : Exemple du bassin versant de l'Orgeval. Editions Quae, pp.336, 2013, 978-2-7592-2073-1. (hal-02599136)
- [36] Léo Persat, Hocine Henine, Julien Tournebize, Arnaud Blanchouin, Fatima Joly, Cédric Chaumont, Virginie Archaimbault, Sophie Guillon, Jérémie D. Lebrun. EAU'listic : Évaluation intégrée de l'impact écologique de la saisonnalité des transferts de pesticides vers les cours d'eau dans un contexte de bassin versant agricole drainé - Premiers résultats.