

Quels sont les effets d'une induction d'oestrogène et de progestatif de synthèse sur le comportement et la survie du gammare ?

Le contexte de notre expérience :

L'échec du nano-plastique :

Notre premier sujet ne se concentrait pas sur la pollution des rivières aux hormones sexuelles mais sur la fragmentation du microplastique de polyéthylène en nanoplastique par les gammares de l'Oise. Notre question s'originait dans l'article suivant :

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7393071/>

Les auteurs remarquent qu'une espèce de gammare : *Gammarus duebeni*, est capable de fragmenter le microplastique (polyéthylène) en nano plastique. Ce phénomène pose des enjeux environnementaux importants car le nano plastique est toxique et peut s'infiltrer dans les cellules. Après avoir commencé à mettre en place le plan expérimental et fais des recherches sur les gammares (ou les pêcher, comment les stocker et les maintenir en vie les temps de l'expérience...) nous avons abordé plusieurs questions pratiques concernant les techniques de mesures de la quantité de plastique à la fin de l'expérience. Ce point a été le premier problème dans la mise en place de notre plan expérimental car nous avions plusieurs idées en théorie (utiliser un filtre à nano ou micro particules, observation après évaporation ou centrifugation), mais dont nous ne connaissons pas l'efficacité. De plus nous n'étions pas sûr d'avoir le matériel nécessaire au greenlab.

Pour tester nos techniques, il a fallu produire nous même le microplastique. Pour cela, nous avons découpé à la main le haut de bidons de polyéthylène (que nous réutiliserons plus tard pour notre expérience sur les hormones sexuelles stéroïdiennes) avant de les broyer. Pour faire cela, nous comptions utiliser un ultra-turax, qui fut un échec.

N'ayant pas réussi à produire du micro plastique ni à répondre à toutes nos problématiques et ayant déjà perdu du temps, nous avons décidé de modifier notre sujet pour s'intéresser à l'effet

d'hormones sexuelles (œstrogène + progestatif de synthèse) sur le comportement d'une population de gammarus de l'Oise.

Plan expérimental :

Nous utilisons des pilules contraceptives de concentration de 30 microgrammes d'oestradiol par pilule. La concentration d'œstradiol dans chaque cuve est la variable indépendante de nature quantitative discrète.

3 conditions expérimentales sont testées :

- **Contrôle** : aucune modification des paramètres
- **Low** : Faible concentration d'oestradiol (7,5 microg/L soit 1/2 pilule par cuve)
- **High** : Forte concentration d'oestradiol (75 microg/L soit 10x plus soit 5 pilules par cuve)

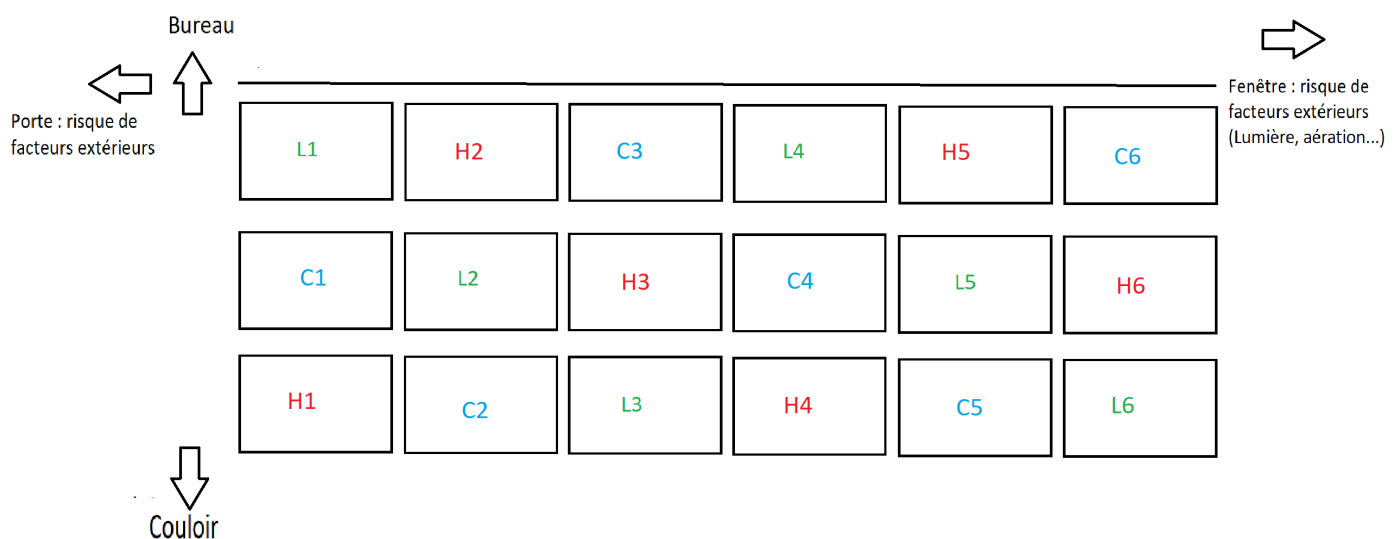
Chaque condition est répliquée 6 fois, nous avons donc un total de 18 cuves. O

utre la concentration d'oestradiol elles ont toutes les mêmes paramètres :

-2L d'eau d'Oise

-Oxygénation par bulleur - 6 gammarus (4 choisis aléatoirement et 1 couple présentant un comportement pré-copulatoire : gammarus mâle intelligent au dos d'une femelle) -3 granules broyées de nourriture pour crevette

Les cuves sont disposées de sortes à ce qu'aucune ne soit à côté d'une condition similaire afin de randomiser et d'éviter que les facteurs extérieurs n'influencent uniquement les cuves d'une condition, induits par une fenêtre (lumière et aération) et une porte (présence humaine)



Nous avons fait un relevé de résultats à 3 reprises, chacune espacées d'une semaine et sans condition modificatrice à part le rajout de nourriture. Cela nous permet d'observer l'évolution de la modification du comportement des gammarus au cours du temps. Dates des relevés : 24/11, 01/12, 08/12

Nous observons 3 variables dépendantes

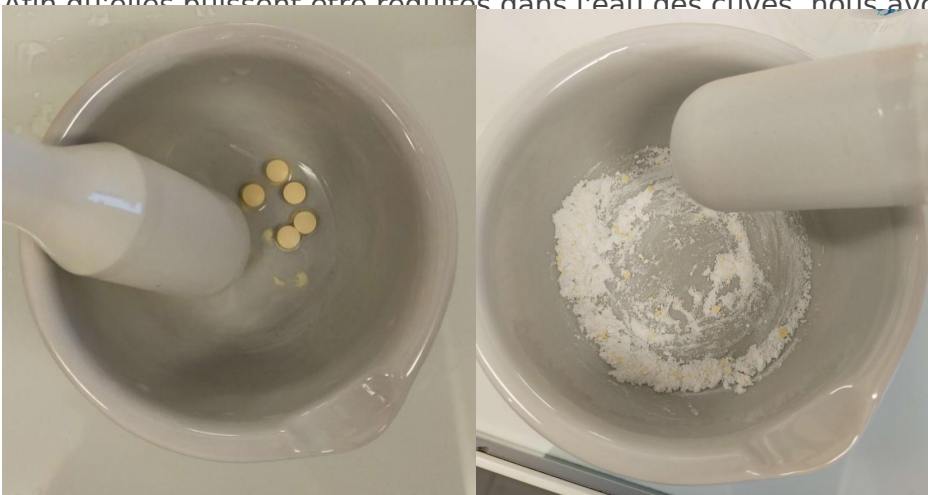
- Survie des gammarès (quantitative discrète)
- Temps de comportement pré-copulatoire (quantitative continue)
- Mobilité (quantitative discrète)

Protocole :

Préparation de l'expérience :

Pour commencer, nous avons pêché les gammarès dans l'Oise à Orry-la-Ville et nous avons récupéré l'eau (18 L pour les cuves + quelques litres en plus pour réaliser les mesures). Nous avons utilisé 18 bidons de polyéthylène de 5L pour en faire des cuves. Pour cela, nous avons coupé le haut. Puis nous avons rempli ces cuves de 2L d'eau de l'Oise chacune et nous les avons disposées (voir schéma du plan expérimental). Afin d'oxygéner les cuves, nous avons réalisé un montage en série avec des bulleurs cylindriques. Les gammarès ont été répartis aléatoirement dans les cuves, avec 6 gammarès par cuve dont un couple. Nous les avons nourris avec de la crevette pour nourriture et nous avons ajouté les pilules : une demi pour les cuves condition Low et 5 pour les cuves condition High.

Afin qu'elles puissent être réduites dans l'eau des cuves, nous avons broyées chacune de pilules en poudre entre chaque cuve.

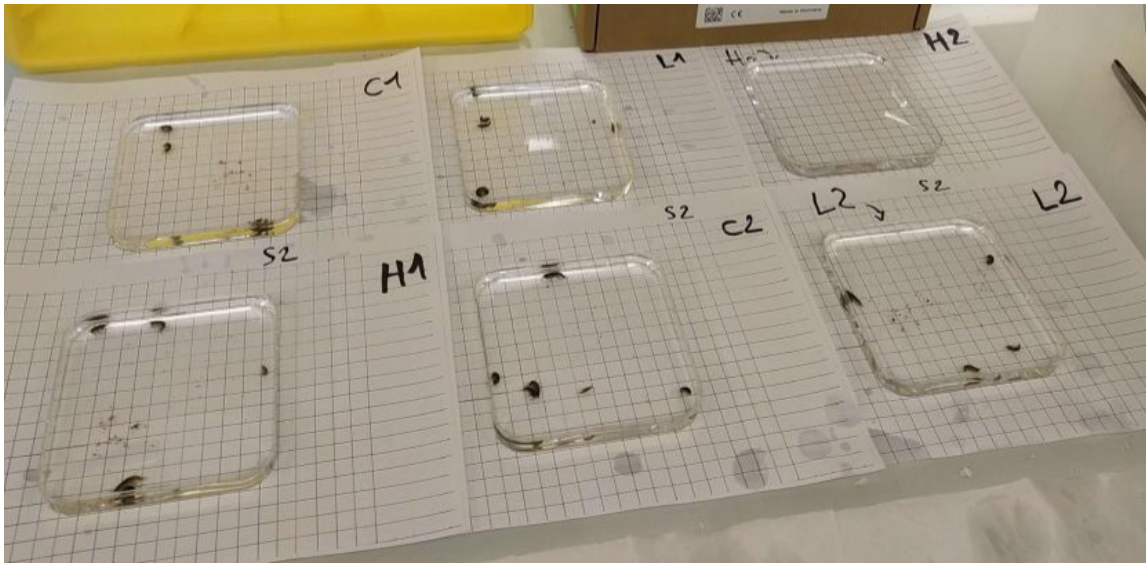


Pilules contraceptives pour la condition High, avant et après broyage par un mortier

Mesures :

Nous avons réalisé les mêmes mesures à trois reprises : le 24 novembre et les 1er et 8 décembre. Nous avons à chaque fois compté le nombre de gammarès morts par cuves, ainsi que le nombre de couples, c'est-à-dire les gammarès qui sont associées ensemble. Pour filmer les déplacements, nous avons utilisé 6 boîtes en verre plastifié de 15×15 cm. Sous ces boîtes, nous avons placé du papier quadrillé avec des carreaux de 1×1 cm (technique provenant de Vellinger et al. 2012). Nous avons rempli les boîtes avec 100 mL d'eau de l'Oise que nous avons en plus. Nous avons transféré les gammarès de 6 cuves dans les boîtes, tout en gardant la même répartition que dans les cuves. Nous les avons agités avec une baguette en bois le plus rapidement possible afin qu'ils ont subi les

mêmes perturbations puis nous avons attendu 1 minute avant de commencer l'enregistrement. Chaque vidéo dure 1 minute. Nous avons refait la même chose à 2 reprises pour avoir toutes les cuves. Nous avons ensuite regardé les vidéos et compté le nombre de carreaux que chaque gammare traverse en prenant un point de repère sur le corps du gammare.



Dispositif de prise de mesures de la mobilité des gammares pour 6 cuves

Journal de bord :

Rapport du 6/10/2022 et 12/10/2022 - 1ère et 2ème séances en groupe

Nous avons défini les enjeux de notre premier plan d'expérience sur la dégradation du micro plastique en nano. Nous avons aussi des recherches sur le mode de vie et la biologie des gammares :

Les gammares vivent en eau douce pour la plupart des espèces, dans des eaux entre 2 et 20°C. Ils supportent bien les changements de pH (entre 4 et 9,9) et la pollution dans une certaine mesure. En revanche, ils ont besoin d'une eau bien oxygénée.

Ils se nourrissent de débris organiques ou bien inorganiques, dont notamment des feuilles mortes. Les juvéniles peuvent aussi être cannibales s'ils n'ont pas assez de nourriture.

La reproduction a lieu toute l'année, chaque femelle peut avoir jusqu'à 6 "portées" par an. Les juvéniles sont la forme majoritaire toute l'année, leur croissance dure 2 à 3 semaines l'été, elle est ralentie en hiver. L'espérance de vie des gammares est entre 1 et 2 ans. La densité est maximale en septembre puis décroît pour atteindre la minimale en février-mars. Cela pose une limite : il ne faut pas trop tarder avant d'aller nous procurer nos gammares.

Enfin nous avons déterminé le lieu de pêche : Le lavoir d'Orry-La-Ville en Picardie, alimentées par l'Oise.

Rapport du 20/10/2022

Nous sommes rendus compte que notre expérience était bien trop compliquée à mener avec nos moyens et nos délais, donc nous avons dû modifier notre problématique. Nous avons dépassé la majorité de la séance à réfléchir à de nouvelles problématiques, mais qui pourraient toujours se concentrer sur la pollution aux microplastiques des rivières.

Nous avons reçu notre matériel :

- 18 cuves dans lesquelles nous allons contenir nos gammares
- Des bulleurs que nous allons monter en série

Rapport du 27/10/2022

Thomas est allé faire du repérage et récupère des gammares dans le lavoir le matin même.

Au Fablab nous avons découpé transversalement le haut de nos 18 cuves, broyer les morceaux de polyéthylène ainsi récupérés, puis grâce à l'ultra turax on crée des micro plastiques entre 20 et 40 microm (pour qu'ils passent dans nos filtres). Malheureusement l'ultra turax n'a pas fonctionné sur nos plastiques. Fautes de moyen nous avons dû passer à notre plan de secours et décider d'une autre problématique

Nous nous intéressons maintenant à l'effet d'une forte quantité d'œstrogène sur une population de gammares. On en retrouve dans nos rivières à cause de la pollution par le rejet de pilules contraceptives et par nos urines. Chez les poissons, cette hormone entraîne des phénomènes de féminisation. Moins d'études ont été accordées quant à son effet sur les arthropodes mais on peut hypothétiser qu'il y en a et c'est ce que nous allons chercher à prouver.

Rapport du 27/10/2022

Nous nous sommes rendus au greenlab pour vérifier que les gammares pêchées par Thomas étaient toujours vivantes. Nous avons observé leur comportement (comportement pré-copulatoire, présence de nouvelles larves, comportement d'accrochages ...) et j'ai testé les protocoles (quelle taille de quadrillage ressort le mieux à la vidéo, plutôt utiliser un quadrillage ou une alerte graduée pour la mesure en hauteur, les vidéos filmées au téléphone sont-elles exploitables..)

Après tous ces tests, nous avons découvert que l'expérience et la prise et l'analyse de données étaient réalisables.

Rapport du 17/11/2022

Lucie, Thomas et Hugo se sont donnés rendez-vous le matin pour prendre le train vers la Picardie : direction le lavoir !

Nous sommes partis avec 9 bidons de 5L, que nous avons chacun remplis d'eau du lavoir. Cela nous fait donc un total de 45L. Pour remplir nos 18 cuves de 2L il nous faut 36L, ce qui nous laisse 9L de côté pour les rinçages et les mesures.

A l'aide d'épuisettes nous avons pêchés les gammares. Ce n'était pas difficile car une fois que nous retournions les feuilles mortes au fond du lavoir (profondeur de 30cm environ) des gammares par dizaine s'activaient. Il nous fallait un total de 108 gammares pour nos expériences. Afin d'en avoir de côté si il y avait des morts pendant le transport, des parasites etc nous en avons pêché environ 160. Nous les avons entreposés dans 4 bidons différents pour éviter les problèmes de densité. Nous devons prendre le train en fin de matinée pour ramener nos gammares au campus Pierre et Marie Curie, cependant tous les transports ont été interrompus, nous sommes restés bloqués et arrivés sur Paris qu'aux environs de 21h. Nous avons entreposés les bidons chez Thomas pour la nuit.



Capture de gammares au lavoir d'Orry-la-ville

Rapport du 18/11/2022

Nous avons ramenés les bidons au campus et disposés les gammares dans les 18 cuves. Aucune gammare n'est morte durant le transport (yes !). Nous avons pu lancé le protocole : broyer les pilules et les introduire dans les cuves High et Low. Nous avons aussi nourris nos gammares à l'aide de granules pour crevettes, elles aussi broyées au mortier.

26/11/2022, 01 et 08/12/2022

Nous avons fait les mesures de résultats selon le protocole détaillé plus haut

Mois de décembre

Nous avons analysé les vidéos afin de créer notre jeu de donnée pour les analyses statistiques

TRUCS A SUPP

Notre question s'origine dans l'article suivant :

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7393071/>

Les auteurs remarquent qu'une espèce de gammare : *Gammarus duebeni*, est capable de fragmenter le microplastique (polyéthylène) en nano plastique. Ce phénomène pose des enjeux environnementaux importants car le nano plastique est toxique et peut s'infiltrer dans les cellules. La séance du jour nous a permis de poser les principaux enjeux de notre sujet. *Gammarus duebeni* est une espèce que l'on retrouve plutôt en Irlande et dans une moindre mesure dans les eaux douces britanniques. Nous nous demandons donc si ce phénomène de fragmentation peut se retrouver chez d'autres espèces de gammares en Ile-de-France ou dans les environs.

Pour tester notre hypothèse, nous avons décidé de réaliser une expérience. Bien que pour le moment encore en cours de réflexion, nous réussirons à introduire des gammares dans une cuve d'eau douce et leur donner du microplastique pendant une certaine durée puis doser le nano plastique ou microplastique par la suite.

Afin de réaliser notre expérimentation, nous suivrons plusieurs indications dans l'article cité plus haut. Plusieurs problématiques se déclinent de suite :

- Les auteurs de l'article indiquent avoir cherché au sein même des organismes la présence de nano plastique, ce qui peut laisser entendre que ces particules restent piégées dans les parois digestives des gammares. Ceci est à prendre en compte pour une analyse correcte de nos particules. Nous avons pensé à doser la présence de nano plastique dans l'eau, hors peut-être que nous n'aurons rien si on ne prend pas en compte le fait que le plastique peut encore résider dans les gammares. Pour cela, au moins deux possibilités sont avancées : mesurer microplastique et nano plastique et en faire le rapport afin de voir s'il manque de la matière, ou bien lyser les gammares à la fin de l'expérience pour récupérer le nano plastique (nous n'avons pas encore trouvé comment faire cela).
- Il y a une grande diversité de classification du microplastique et nano plastique vis-à-vis des tailles que cela représente. Nous allons sûrement nous référer à la classification utilisée dans l'article pour nos mesures.
- Nous ne connaissons pas la dynamique du micro- et nano plastique dans l'eau, est-ce que cela se sédimente rapidement ? Cela dépend par ailleurs de l'induction ou non d'un courant dans la cuve pour gammares. De plus, on ne sait pas comment le plastique va réagir et s'agréger à la matière organique générée par les gammares.

L'expérience :

Pour notre expérience, nous avons au moins 3 conditions différentes à réaliser :

- Contrôle 1 : eau douce sans gammares
- Contrôle 2 : eau douce issue du lieu de capture de gammares sans gammares
- Condition 1 : eau douce issue du lieu de capture de gammares avec gammares

Le contrôle 2 a pour objectif de vérifier que c'est bien la présence de gammares qui permet la fragmentation du microplastique et non des micro-organismes ou des conditions spécifiques de l'eau. Le contrôle 1 permet de vérifier, dans le cas où le contrôle 2 et la condition 1 montre toutes deux que le plastique est fragmenté, que l'eau ne permet pas seule de fragmenter le plastique (auquel cas, on montrera alors le rôle prépondérant de l'eau douce issue du lieu de capture de gammares dans le processus de fragmentation). Il pourra exister d'autres hypothèses concernant ce résultat : protocole exp., matériel ou utilisé autre..

Le nombre de réplicats est encore indéterminé, de même que la réalisation dans le temps des manipulations. Selon nos connaissances actuelles, nous pouvons réaliser une condition d'une durée de 4 jours - temps donné par l'article auquel nous nous référons. On peut donc choisir de réaliser toutes les conditions en même temps, sachant que cela peut poser un problème à la fin des 4 jours lorsque nous aurons toutes les manipulations à faire pour doser le plastique.

Dans tous les cas, il nous semble important d'essayer rapidement des manipulations autour du microplastique pour, lorsque l'expérience commencera, être confiant sur la méthode que nous

aurons choisie pour le mesurer. Il faut donc prévoir d'acheter du microplastique (polyéthylène ?) rapidement.

Pour la semaine prochaine :

Notre groupe étant composé de 5 personnes, nous sommes répartis les recherches autour du sujet.

1. Le mode de vie des gammares
2. Le plastique et sa dégradation
3. Le repérage des lieux pour capturer les gammares
4. La logistique autour de notre expérimentation
5. La gestion d'un planning pour réaliser l'expérience
6. Le plan d'expérience/protocole

L'ensemble des informations sera ici ajouté. Il semble aussi important de se fixer la semaine prochaine sur la forme de la cuve et sa fabrication pour essayer rapidement de mesurer le microplastique dans un environnement qui sera proche - voir identique - à celui que nous utiliserons au cours de l'expérimentation. De même, il serait utile de se fixer un délai pour réaliser l'expérience afin d'avancer à la bonne vitesse.

Le plastique et sa dégradation

La première question à laquelle répondre est le choix du plastique à utiliser. Dans l'expérience de l'article dont nous nous inspirons, le plastique utilisé est le **polyéthylène** car il s'agit de l'un des polymères les plus courants dans les produits de soins personnels et, par conséquent, dans les systèmes aquatiques (par la pollution). De plus il est probable qu'il soit consommé par les gammares car sa densité est inférieure à celle de l'eau, il flotte donc en surface, et les gammares sont capables de collecter de la nourriture à la surface de l'eau, y compris des lentilles d'eau flottantes.

Nous avons donc décidé d'utiliser aussi ce plastique, quant à la taille des morceaux à introduire dans les cuves il s'agirait d'éléments de 15 à 40 micromètre de diamètre. Pour nous en fournir nous comptons soit sur :

- Nous en fournissons directement au fablab
- Acheter un rouleau sur internet puis le découper nous même grâce à une micro broyeuse
- Ou grâce à une ponceuse suivi d'un tri par filtre pour ne sélectionner que les tailles qui nous intéressent

Techniques de mesures de la quantité de plastique à la fin de l'expérience :

Nous sommes passés par différentes idées, pour compter/déterminer la quantité de nano ou micro plastique à la fin de l'expérience et ainsi conclure sur la question de la fragmentation du microplastique par nos gammares.

Dans tous les cas, nous souhaitons faire des observations au microscope pour avoir un support visuel sur lequel se baser. Il faudra aussi faire des études statistiques.

Nous pensons aussi pouvoir colorer les microplastiques afin de faciliter l'observation, notamment si nous faisons une lyse des gammares

-Filtre à nano ou micro particules. On prélève des petits volumes d'eau de la cuve qu'on filtre puis on compte/pese la quantité de fragments trouvés et on compare à ce qui a été introduit initialement. **-Evaporation** : On prélève v puis on fait s'évaporer l'eau : il reste les micro et nano plastiques et dedans on mesure la masse / compte + obs microscope. Si il ya des fragmentations on observe un plus grand nombre de fragments et ils seront plus petits **-Centrifugation** : On prélève v et on fait centrifuger : dans le culot il y aura des micro et dans le surnageant de nano -> facilite le comptage

La logistique autour de notre expérimentation

Taille et fonctionnement des cuves : 2L avec bulleur pour oxygéner les cuves (montage en série pour utiliser moins de bulleur)

Faire du microplastique : Ultra turax pour "mixer" à haute vitesse le plastique et obtenir des micro particules (mais taille non contrôlable) ou utiliser une ponceuse pour avoir de la "poussière" de plastique qui fera office de micro particules (mais pareil, taille incontrôlable)

Transport et stockage des gammares : Transport dans des bouteilles en plastique transparentes industrielles contenant l'eau du milieu de l'organisme et dépôt des gammares le plus vite possible dans les cuves sur le campus Pierre et Marie Curie. Prévoir, en plus, des bouteilles contenant uniquement l'eau du milieu où évolue l'organisme pour ne pas manquer de liquide dans les cuves

Nourriture pour gammares : gammares --> détritivores --> nourriture pour poisson/crevettes suffira

Gestion d'un planning pour l'expérimentation / protocole / plan d'expérimentation

Suite à divers échanges et réflexions, nous sommes en train de construire le plan d'expérimentation (qui doit être fini pour le 20 octobre). Il est préférable pour des questions pratiques, et de maximisation de la randomisation, de réaliser notre expérimentation en plusieurs temps successifs tout en conduisant nos différentes conditions en parallèles.

Nous avons 3 conditions (4 si nous décidons de tester une condition contrôle en plus : a savoir eau claire + gammare sans introduction de plastique - dans le but de vérifier que les gammares ne rejettent pas naturellement du nano plastique dans l'environnement). La durée d'une condition est de 4 jours (l'intervalle entre les mises en place des 4 jours d'expérimentation est nommé rotation). Nous allons donc réaliser une fraction de chaque condition en parallèle des autres, et de répéter ces fractions tous les 4 jours jusqu'à avoir assez de mesures pour une analyse statistique viable.

Si l'on souhaite réaliser 15 répétitions de chaque conditions, on se retrouve à 15x3 ou 15x4 : soit 45 ou 60 mesures au total.

Dans le cas des 3 conditions, nous aurions besoin idéalement de 15 cuves pour gammares. On peut alors faire 5 mesures par condition en parallèle et réaliser ainsi l'expérience en 3 rotations soit 12 jours au total.

Dans le cas des 4 conditions, nous aurions besoin idéalement de 16 cuves pour gammares. On peut alors faire 4 mesures par condition en parallèle et réaliser ainsi l'expérience en 4 rotations soit 16 jours au total.

Sachant qu'il nous faudra randomiser à la fois les emplacements des conditions à chaque rotation et les expérimentateurs venant s'occuper des gammares et des cuves vides.

Globalement, il reste la question des gammares :

- Doit-on les chercher à chaque rotation dans la rivière ou bien les stocker en attendant leur mise en cuve ? Il semble que dans les deux cas, cela pose des limites concernant l'interprétation des résultats. La solution la plus pratique est tout de même le stockage. Il faut par ailleurs faire attention à la possible présence d'un parasite du gammare, et qui réduit son ressentiment.
- Combien de fois les nourrir avant les 4 jours, combien de fois par jour ? On note ici une information encore jamais explicite dans le document : les gammares, une fois l'expérience acquise (donc durant les 4 jours d'expérimentation) ne sont pas nourries. Le début de l'expérimentation est consécutif à une induction de microplastique de type polyéthylène dans toutes les cuves.

Rapport du 24/11/2022

Après réflexion, on va mesurer :

- Mobilité en longueur : on pose chaque lot de 5 individus sur une feuille quadrillée, on filme leurs mouvements et on compte le nombre de fois qu'ils changent de carreaux. On fait qq secondes de vidéos et plusieurs répliques pour chaque vu. On capturera 30 secondes de vidéos pour chaque cuve s'il y a beaucoup de mouvement durant la prise ou alors 1 minute si les gammares ne bougent pas beaucoup.
- Nombres de gammares liés : le fait que certains gammares se déplacent à 2 traduit un comportement reproducteur qui pourra nous permettre probablement de faire un lien entre concentration d'hormone et comportement reproducteur.
- Nombre de mort par cuves : survie des gammares

Nous ne savons pas encore si nous allons individualiser nos observations par rapport à chaque gammare dans la cuve ou alors faire une moyenne des données obtenues de chaque cuve, on penche plus pour une moyenne voiture, statistiquement c'est plus simple à traiter, mais il ya quand même des désavantages. On a commencé à faire les mesures. On a prélevé les gammares dans 6 cuves aléatoirement pour les mettre dans 6 boîtes (XxY) remplies avec 100 mL d'eau de la rivière posées sur des feuilles cadriées (1cm=1carreau). Il y a donc 6 gammares par cuves. On a mis des objets opaques autour des boîtes pour éviter que les gammares ne soient trop autorisées pendant l'enregistrement par la lumière. On a mis le téléphone à une hauteur de X cm de manière à enregistrer les 6 cuves en même temps. On agit les gammares avec une baguette en bois après qu'on les ait tous mis dans les cuves, on laisse reposer 2 minutes et enfin on enregistre la vidéo pendant 1 minute. On a fait tous les enregistrer aujourd'hui, cela fait donc 3 minutes d'enregistrement en tout pour 24 cuves à observer.

Revision #21

Created 12 October 2022 08:28:52 by Tichit Hugo

Updated 23 February 2023 12:36:06 by Legrand Lucie