

Projet Seine-Aval 6

HQFISH

Impact de la qualité des habitats estuariens de la Seine
sur le fonctionnement d'une population de poisson.
Le flet : du recrutement des juvéniles, au processus de
reproduction.

Octobre 2020

Coordination : Rachid Amara & Jean Laroche

**Co-Auteurs : Jérôme Cachot ; Jérôme Couteau ; Alain Devaux ; Simon Devin ;
Stéphane Le Floch ; Christophe Minier ; Baghdad Ouddane**

TABLE DES MATIERES

RESUME EXECUTIF	3
REMERCIEMENTS	5
SCIENTIFIQUES AYANT PARTICIPE AU PROJET	6
PARTICIPANTS AU SUIVI DE PROJET	7
INTRODUCTION	8
QUALITE DES ZONES DE NOURRICERIES ESTUARIENNES	13
1 Imprégnation du flet juvénile (1 mois)	14
1.1 Niveaux de contaminations chimiques dans les sédiments et les poissons	15
1.2 Réponses biologiques des poissons	17
2 Imprégnation du flet juvénile (5 mois)	23
QUALITE DE L'HABITAT ESTUARIEN DE LA SEINE & FITNESS DES POISSONS ADULTES	27
3 Dosages chimiques dans le foie des flets	27
4 Dosage d'un métabolite des HAP : l'hydroxypyrene dans la bile des flets adultes	30
5 Mesure de différents indicateurs de la fitness chez les poissons adultes	31
6 Biologie de la reproduction	34
7 Expérimentation sur la fertilité	37
8 Biomarqueurs : AChE, Comètes, EROD, TBARS, Carbonylation des protéines	41
9 Les lipides membranaires (SPG, PS, FS) : de nouveaux biomarqueurs en écotoxicologie ?	43
10 Activités enzymatiques : CS & G6PDH	44
11 Intégration des réponses du flet aux contaminants	45
12 Variabilité génétique de la population de flet de Seine relativement aux estuaires européens	49
CONCLUSION & PERSPECTIVES	52
LISTE DES ILLUSTRATIONS	56
BIBLIOGRAPHIE	58

RESUME EXECUTIF

Objectifs

A partir d'une approche multibiomarqueurs et de la combinaison de monitoring actif (encagement de poissons sur des sites d'intérêt) et passif (captures de poissons dans les milieux naturels), le projet SA6-HQFISH évalue l'impact de la qualité de l'estuaire de Seine dans le maintien des populations de poissons, du recrutement des juvéniles dans l'estuaire jusqu'à la phase de reproduction des adultes. Notons que le modèle biologique de cette étude est le flet, un poisson plat dont l'essentiel du cycle biologique se passe en estuaire.

Principaux résultats

Qualité des nourriceries de Seine (imprégnation de flets juvéniles durant un mois : caging). La qualité des nourriceries a été évaluée par la mise en cage durant un mois de flets juvéniles (7 - 9 cm de longueur) capturés dans un milieu modérément contaminé (estuaire de Canche) et encagés en septembre-octobre, sur différents sites : en Canche et en Seine (Rouen, Fosse Nord, avant-port du Havre). Un gradient croissant de contamination chimique très marqué a été observé sur les sédiments de Seine (de la Fosse Nord vers Rouen), qui présentent par ailleurs des concentrations nettement plus élevées relativement à ceux de Canche, particulièrement pour les polluants organiques. Les teneurs en contaminants chimiques mesurées dans les flets encagés ne reflètent pas forcément celles des sédiments ; on suggère par exemple que la biodisponibilité des métaux est limitée pour les poissons de Rouen qui présentent ainsi une faible bioaccumulation, malgré de fortes teneurs métalliques dans les sédiments.

HQFISH a permis de développer et d'améliorer la technique d'encagement au cours des trois années du suivi ; l'enjeu était d'améliorer le bien-être et de réduire le stress du poisson lié à l'encagement pour ne pas biaiser l'interprétation des réponses biologiques en lien avec la contamination chimique des milieux étudiés. La mise en place d'un collecteur d'invertébrés au sein des cages a ainsi considérablement amélioré la disponibilité trophique et a permis un gain en termes de survie et d'état de santé des poissons en fin d'exposition. L'interprétation et la comparaison inter-sites des réponses biologiques des poissons en lien avec la contamination chimique des milieux étudiés se sont avérées délicates du fait du stress associé à l'encagement. Les marqueurs moléculaires précoces identifiés sur les flets encagés, par la protéomique haut débit, ont néanmoins permis de diagnostiquer les impacts d'un stress chimique croissant sur le poisson, de l'aval vers l'amont de la Seine.

Qualité des nourriceries de Seine (imprégnation de flets juvéniles durant 5 mois *in natura*). On estime ici que les flets 0+ sont recrutés en estuaires globalement au mois de Mai-Juin, et donc qu'une capture de poissons 0+ en Septembre-Octobre signifie que ces individus ont séjourné en moyenne 5 mois dans leur estuaire. La mesure d'indicateurs liés à la fitness (indice de condition, état des réserves, taux de croissance) et de biomarqueurs (génétoxicité, dommages liés au stress oxydant) ne met pas en évidence de différences significatives entre les flets juvéniles (7 - 9 cm) capturés en Seine Aval (Fosse Nord) vs Canche. L'amélioration globale de la qualité chimique des eaux de la Seine depuis les années

2000 et la situation aval des prélèvements (moindre contamination à l'embouchure) pourraient expliquer ce résultat.

Qualité de l'habitat estuarien de Seine pour les poissons adultes (imprégnation 2 à 3 ans). Des flets adultes de 2 à 3 ans (longueur > 25 cm) ont été capturés dans la partie aval des estuaires de Seine et Canche, en Janvier (période de maturation sexuelle) et en Juillet (période de repos sexuel). La bioaccumulation des polluants dans le foie du flet est plus importante en Seine qu'en Canche particulièrement pour les polluants organiques, alors que les concentrations en métaux sont peu différenciées dans les deux populations. Sur la Seine comme sur la Canche, on remarque que la contamination dans le biote est plus importante en hiver qu'en été ; on suggère que la contamination apportée par les fleuves est plus soutenue en hiver où les débits sont élevés. Une grande partie des polluants peut être éliminée par les poissons par l'émission de leurs produits sexuels ; ce phénomène pouvant aussi expliquer les teneurs limitées en polluants pour les poissons en post-reproduction, en été.

L'évaluation d'indicateurs de fitness (indice de condition, taux de croissance, réserve lipidique) ne montre pas de différence significative entre flets adultes de Seine vs Canche. Par contre l'histologie du foie met en évidence des signatures pathologiques plus élevées en Seine vs Canche. Par ailleurs, la neurotoxicité, les activités de détoxification et la peroxydation lipidique sont significativement plus élevées en Seine vs Canche, particulièrement en hiver. Au final l'analyse pathologique et les biomarqueurs reflètent les effets d'un stress chimique plus marqué sur les flets adultes de Seine vs Canche.

L'analyse de la biologie de la reproduction des flets en Seine comme en Canche a permis de détecter un décalage dans le cycle de reproduction. Ce décalage est très probablement lié à l'impact du réchauffement climatique qui se traduit notamment par des automnes très doux, conduisant à une maturation sexuelle plus tardive et plus étalée dans le temps.

L'étude de la diversité génétique neutre de la population de flet de Seine comparée à celle d'autres estuaires européens ne met pas en évidence de perte de diversité génétique en Seine ; ceci indique que sur les dernières décennies, il n'y a pas eu d'effondrement démographique en Seine. Par ailleurs l'analyse de la diversité génétique d'un gène impliqué dans la réponse au stress chimique, rapproche la population de Seine d'autres estuaires pollués en Europe ; cette convergence reflète probablement une adaptation locale de la population de Seine à la contamination chimique.

Synthèse et perspectives

Le biomonitoring actif : un outil en devenir, pour faire du diagnostic sur la qualité des estuaires à l'échelle de l'habitat

Le projet HQFISH a permis de tester pour la première fois la faisabilité du caging de flets juvéniles, sur un mois, de Rouen au Havre, avec un certain succès ; le modèle flet de par ses capacités d'osmorégulation exceptionnelles permettant donc de comparer des secteurs oligohalins, méso et polyhalins. Sur les trois années du projet, des améliorations de la méthodologie d'encagement ont été réalisées ; l'enjeu était d'améliorer le bien-être et de réduire le stress du poisson lié à l'encagement pour ne pas biaiser l'interprétation des réponses biologiques en lien avec la contamination chimique des milieux étudiés. La mise en place d'un collecteur d'invertébrés au sein des cages a ainsi considérablement amélioré la disponibilité trophique et a permis un gain en termes de survie et d'état de santé des poissons en fin d'exposition. **Des améliorations sont encore possibles pour limiter au maximum le stress des poissons lié à l'encagement, et pour effectuer un monitoring de l'environnement**

propre à la cage (fixation de sondes sur la cage pour la mesure de paramètres hydrobiologiques, et de POCIS : échantillonneurs passifs de polluants émergents même à très faibles doses). L'utilisation des méthodologies « omique », et notamment de la protéomique haut débit paraît pertinente pour explorer les réponses sans a priori du poisson encagé, et donc aller vers une identification des stressseurs à l'échelle de l'habitat.

Risque écologique pour la population de flet de l'estuaire de la Seine

Au bout de cinq mois d'exposition dans l'estuaire aval de Seine, les flets juvéniles (0+) ne présentent pas d'altération significative de leur état de santé, relativement à ceux prélevés dans l'estuaire modérément contaminé de la Canche. L'impact du stress chimique non détectable sur ces flets juvéniles en aval de Seine pourrait être lié à leur période d'exposition relativement courte, à la disponibilité en nourriture importante en Seine aval, et à la dilution des apports en polluants du fleuve par les courants de marée.

Au bout de deux à trois ans d'exposition, les flets adultes de Seine présentent certains indicateurs d'état de santé convergents avec ceux de Canche, mais des signatures de réponses au stress chimique spécifiques (pathologie hépatique, neurotoxicité, détoxification et peroxydation lipidique) plus marquées en Seine. La population de flet de Seine est donc impactée par le stress chimique ; elle présente une adaptation locale à ce stress chimique identifiée par les outils génétiques (travaux historiques et actuels), qui se traduit par un coût physiologique. On remarque par ailleurs que la population de flet de Seine a maintenu sa diversité génétique neutre, et donc n'a pas subi de déclin démographiques récents.

A l'échelle globale, le réchauffement climatique impacte très directement la biologie de la reproduction du flet en décalant la maturation sexuelle dans le temps, avec la disparition d'un pic de ponte pouvant être préjudiciable au succès reproducteur. **On peut s'interroger sur la capacité de la population de Seine à faire face au réchauffement climatique, son adaptation locale au stress chimique pouvant compromettre son aptitude à répondre à des stressseurs additionnels, comme le réchauffement des eaux ; cette hypothèse étant basée sur une expérience passée sur les flets juvéniles présentant une gamme thermique acceptable plus étroite en Seine qu'en Vilaine, et sur les données de la bibliographie sur des populations de poissons soumises à des stress chimiques chroniques. La population de flet de Seine présente donc un risque écologique ; l'impact du multi-stress (réchauffement climatique global et pollution locale) sur cette population devra être étudié avec attention dans la prochaine décennie.**

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'équipe des plongeurs de la Plateforme Plongée Scientifique de l'IUEM: Erwan AMICE, Thierry LE BEC, Isabelle BIHANNIC et de Wimereux : François Gevaert, Gwendoline Duong, Ingrid Richard, Jean-louis LenNe.

Nos remerciements s'adressent aussi à tous ceux qui ont facilité la réalisation de ce projet : la Capitainerie du Port du Havre, Pascal TOURNIER du GPMR; Thomas Lecarpentier de la réserve de l'estuaire Seine, Cédric Fisson et Nicolas Bacq du GIP Seine Aval.

SCIENTIFIQUES AYANT PARTICIPE AU PROJET

- **Equipe 1** : UMR-LOG, Université du Littoral Côte d'Opale

Coordination scientifique : Rachid AMARA

Equipe : Mamadou DIOP, Vincent CORNILLE, Khalef RABHI, François GEVAERT, Gwendoline DUONG, Eric TAVERNIER; Michel LAREAL; Valentin BOUVOT; Marie-Anais LEPRETRE; Maria KAZOUR

- **Equipe 2** : UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, LEMAR Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Université de Bretagne Occidentale

Coordination scientifique : Jean LAROCHE

Equipe : Elodie BORCIER, Jennifer LAURENT, Grégory CHARRIER, Vianney PICHEREAU

- **Equipe 3** : TOXEM, Montivilliers

Equipe : Géraldine MAILLET, Jérôme COUTEAU

- **Equipe 4** : SEBIO, Le Havre

Equipe : Christophe MINIER

- **Equipe 5** : UMR LEHNA 5023, USC INRA 1369

Equipe : Thérèse BASTIDE, Sylvie BONY, Alain DEVAUX

- **Equipe 6** : UMR EPOC, 5805 CNRS, Université de Bordeaux, EPHE Jérôme Cachot

Equipe : Christelle CLERANDEAU, Blandine DAVAIL, Jérôme CACHOT

- **Equipe 7** : CEDRE, Brest

Equipe : Julien GUYOMARCH, Justine RECEVEUR, Stéphane LE FLOCH

- **Equipe 8** : UMR 8516 LASIR, Université de Lille 1

Equipe : David DUMOULIN, Baghdad OUDDANE

- **Equipe 9** : LIEC, UMR 7360, Université de Lorraine, CNRS

Equipe : Virginie JOUFFRET, Simon DEVIN

PARTICIPANTS AU SUIVI DE PROJET

Personnes ayant contribué au suivi du projet ou ponctuellement à un atelier de travail.

GIP Seine-Aval : Cédric Fisson, Manuel Muntoni, Elise Avenas, Nicolas Bacq

Acteurs de l'estuaire : Catherine Dehondt (FCN), Emmanuel Jestin (AESN), Barbara Leroy (AESN), Claire Berville (GPMR)

Scientifiques : Jean-Michel Olivier (Université de Lyon), Jérémy Lobry (INRAE), Benoît Xuereb (Université du Havre)

Autres partenaires : Maïa Akopian (OFB).

INTRODUCTION

Les zones côtières en général et les estuaires en particulier sont des milieux complexes et fluctuants. Situés à l'interface du milieu continental et du milieu marin, ils jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement du cycle de vie de nombreuses espèces de poissons. Les estuaires représentent à la fois un habitat pour des populations de milieux d'eaux douces et saumâtres, une zone de nourricerie, d'alimentation et de refuge pour les juvéniles et les adultes d'espèces marines et un milieu de transit pour les espèces migratrices amphihalines (Mc Lusky & Elliott, 2004). Pour les juvéniles de poissons marins, les estuaires servent de refuge contre la prédation tout en offrant d'importantes quantités de nourriture. Ces conditions favorisent la croissance des juvéniles avant qu'ils ne soient recrutés dans la population adulte. Ainsi, du fait de leur rôle de nourricerie, les estuaires assurent une fonction clé dans le cycle biologique de nombreuses espèces de poissons et constituent un maillon essentiel du renouvellement des stocks exploitables et de leur pérennisation. Cette fonction est l'une des composantes écologiques essentielles des estuaires. En effet, 44% des espèces d'intérêt halieutique faisant l'objet d'une évaluation au niveau européen présentent une dépendance côtière et/ou estuarienne à un moment de leur cycle de vie, et ces espèces représentent 77% du tonnage des débarquements (Seitz et al., 2014). Ces écosystèmes sont ainsi qualifiés d'habitat halieutique essentiel (*Essential Fish Habitat*).

Les estuaires et les zones côtières constituent des territoires à forts enjeux stratégiques pour les économies et pour l'environnement. Ces habitats d'intérêts halieutiques essentiels sont ainsi souvent impactés par les nombreuses pressions anthropiques qui s'y exercent. Pour les poissons qui fréquentent ces écosystèmes, le coût énergétique d'un stress environnemental se solde par une diminution de la quantité d'énergie disponible pour la maintenance, la reproduction et la croissance et en conséquence par une réduction de la fitness des individus (Lauwrence et al., 2003 ; Kerambrun et al., 2012, 2013). Une qualité médiocre de l'habitat côtier peut augmenter significativement la mortalité des juvéniles et donc conduire à un faible renouvellement du stock (Gibson, 1994 ; Le Pape et al., 2007 ; Archambault et al., 2015). Aujourd'hui, on estime qu'une partie de la chute des abondances des stocks de poissons est liée à la dégradation des habitats côtiers et estuariens des poissons. La préservation de ces habitats est donc fondamentale pour maintenir le potentiel de renouvellement des stocks halieutiques (Beck et al., 2001).

En Manche orientale, 30 à 40% des espèces halieutiques dépendent à un moment où un autre de leur cycle de vie des estuaires (Bessineton et al., 1994 ; Amara, 2011). Dans cette région, la Seine est le plus grand estuaire mais aussi le plus anthropisé. La Seine a longtemps été considérée comme un des estuaires les plus contaminés en Europe nord-occidentale (Dauvin, 2008). De nombreux contaminants chimiques à la toxicité avérée (métaux lourds, HAPs, PCBs, pesticides mais aussi substances pharmaceutiques) ont été ainsi retrouvés dans les eaux, les sédiments et bioaccumulés dans les organismes vivants (Miramand et al., 2001 ; Cachot et al., 2006 ; Ouddane et al., 2008 ; Abarnou et al., 2000 ; Dagnat et Fisson, 2010 ; Budzinski et al., 2012). De nombreuses études ont mis en évidence des effets biologiques pour les organismes exposés à cette multi-contamination de l'estuaire de la Seine (e.g. précédents programmes Seine Aval et programme PNETOX). Il a été montré par exemple que les juvéniles de flet vivant dans la partie amont de l'estuaire présentaient de 2 à 10 fois plus

de dommages à l'ADN que ceux vivant dans la partie aval de l'estuaire et que 5% des flets adultes présentent des lésions hépatiques tumorales ou pré-tumorales (Cachot, 1998). Toutefois, l'impact de la pollution sur la qualité des habitats halieutiques et le maintien des populations de poissons est encore peu ou mal connu. Une étude réalisée sur 13 estuaires de la façade Manche-Atlantique a révélé une perturbation de la fonction de nurricerie des estuaires en relation avec les perturbations d'origine anthropique (Courrat et al., 2009). Une diminution de l'abondance et du nombre d'espèces de juvéniles utilisant les estuaires comme zone de nurriceries a ainsi été reliée aux niveaux de contamination métallique et organique malgré la forte productivité des estuaires les plus anthropisés tel que la Seine. D'autres études ont montré que les juvéniles de poissons de la Seine présentaient des performances physiologiques moindres comparées à ceux d'estuaires peu anthropisés de la région (Gilliers et al., 2006 ; Amara et al., 2009 ; Kerambrun et al., 2013, Henry et al., 2014 ; Dupuy et al., 2015) avec des signes de dégradation de la fonction de nurricerie (Le Pape et al., 2007). Par ailleurs, des travaux sur les poissons adultes de la Seine ont mis en évidence une pression de sélection liée très probablement aux polluants qui retient dans le milieu des génotypes de résistance présentant une certaine tolérance au stress chimique associée cependant à un coût physiologique pour le poisson : réduction générale de la fécondité, du taux de croissance et de l'état d'embonpoint (Marchand et al., 2004, 2013 ; Calvès et al., 2013).

Le besoin de méthodes d'évaluation de l'imprégnation chimique des milieux et de leur qualité écologique pour la mise en œuvre de la directive cadre européenne sur l'eau, ainsi que de mesures prédictives du risque toxique pour l'environnement, entraînent un regain d'intérêt pour la biosurveillance en tant qu'outils d'aide au diagnostic de contamination et à la gestion du risque toxique (Péry & Garric, 2017)

Les réponses biologiques des organismes à la qualité de leur environnement peuvent être évaluées à partir 3 approches différentes et complémentaires (Figure. 1).

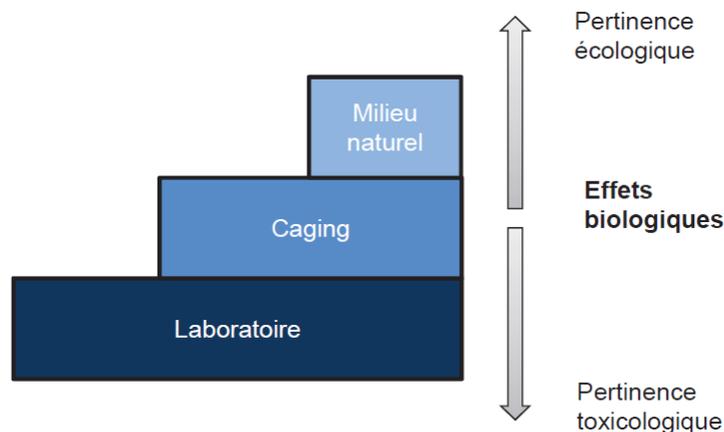


Figure 1 : Méthodes d'étude des effets biologiques des contaminations chimiques en relation avec leur pertinence écologique et toxicologique (modifiée de Triebkorn et al., 2001)

Chacune des approches présente des avantages et des inconvénients. Les réponses biologiques, directement mesurées sur des organismes prélevés ou transplantés dans le milieu naturel, rendent compte des effets toxiques de la contamination, en intégrant les variations de biodisponibilité et les effets mélanges, dans un contexte on ne peut plus réaliste.

Dans le cas des poissons, la biosurveillance passive consiste à mesurer les réponses biologiques d'individus prélevés au sein des populations indigènes des habitats ou stations d'intérêt. Cette approche est sans doute la plus proche de la réalité écologique ; les organismes reflétant l'imprégnation du milieu durant toute la durée d'occupation de l'habitat considéré.

Néanmoins, la biosurveillance passive présente un certain nombre de contraintes et de limites :

- absence du modèle biologique dans tous les sites d'intérêts et à toutes les saisons (difficulté pour le suivi saisonnier de la qualité du milieu). Le choix des stations étudiées est donc forcément conditionné par la présence de l'espèce ciblée ;
- la mobilité des organismes peut conduire à des artefacts dans l'interprétation des réponses biologiques pour un site ou un habitat donné ;
- problème d'homogénéité des individus-modèles (taille, âge, sexe, état physiologique, génétique,..) pouvant être des facteurs confondants dans l'interprétation des résultats.

Plus récemment, et pour contourner ces limites, la biosurveillance active (encagement de poissons) s'est développée en tant que méthode d'étude alternative pour évaluer la qualité des habitats et les effets des contaminants chimiques sur les poissons dans des cours d'eau continentaux (Bervoets et al., 2009 ; Cazenave et al., 2014 ; Scarcia et al., 2014 ; Gagnaire et al., 2015 ; Vincze et al., 2015 ; Gagnaire et al., 2015 ; Le Guernic et al., 2016 ; Delahaut et al., 2019 ; Catteau et al., 2020 ; van der Oost et al., 2020). Cette approche présente un avantage certain en connaissant avec précision la localisation et la durée d'exposition des espèces tout en conservant les caractéristiques environnementales du site étudié (Oikari *et al.*, 2006). Elle permet d'utiliser des organismes contrôlés et calibrés, provenant d'une même population, et ainsi limiter l'impact de nombreux facteurs biologiques, dits de confusion. Toutefois, les effets de l'encagement sur les réponses mesurées restent encore mal connus (Kellison et al., 2003 ; Le Guernic et al., 2016). Aussi cette approche perd en réalisme écologique au profit d'une plus grande pertinence toxicologique (Figure 1).

La majorité des études d'encagement a été réalisée avec des juvéniles ou des adultes de petits poissons (e.x. l'épinoche) pour des durées d'exposition généralement de 3 à 7 semaines. Peu d'études d'encagement de poissons ont été réalisées en milieu côtier. Il s'agit le plus souvent de zones côtières abritées comme les zones portuaires (Kerambrun et al., 2012a, b ; de Cerio et al., 2018 ; Diaz de Cerio et al., 2018) ou les fjords norvégiens (Beyer et al., 1996 ; Goksøyr et al., 1994 ; Dale et al., 2019). Dans les milieux estuariens à fort hydrodynamisme, les rares études ont été réalisées aussi dans des milieux abrités (ports, digues) (Sogard et al., 1992 ; Able et al., 1999 ; Duffy-Anderson et al., 1999) ou des zones d'herbiers (Phelan et al., 2000). À notre connaissance, aucune étude de biomonitoring actif n'a été réalisée dans un estuaire mégatidal ou macrotidal, du type de la Seine.

Le projet SA6-HQFISH s'inscrit dans l'axe prioritaire de SA6 qui vise à caractériser l'effet de la qualité des habitats estuariens sur la dynamique des populations de poissons afin d'accompagner les stratégies de restauration et de maintien des fonctions écologiques estuariennes.

L'objectif du projet est d'évaluer, à partir d'une approche multi-biomarqueurs et par la combinaison de méthodes de biomonitoring actif (encagement de poissons) et passif (capture

de poissons du milieu naturel), le rôle de la qualité de l'estuaire de la Seine dans le maintien des populations halieutiques, du recrutement des juvéniles à la reproduction des adultes. Le modèle biologique est un poisson amphihaline, le flet (*Platichthys flesus*) ; cette espèce réalise la majeure partie de son cycle biologique en estuaire (de son recrutement à l'état juvénile dans les zones de nurseries estuariennes, à sa reproduction à l'embouchure des estuaires) ; c'est un modèle biologique intégrateur de la qualité de l'habitat estuarien. Cette espèce est donc particulièrement pertinente pour valider des méthodologies exploratoires sur le fonctionnement de populations soumises à des stress environnementaux dans des écosystèmes estuariens, de la zone oligohaline à la zone polyhaline.

Afin d'évaluer les effets des multi-stress environnementaux sur la population de flet de la Seine, 3 durées d'imprégnation (exposition) ont été considérées :

* Pour évaluer la qualité de la nurserie :

- 1- Imprégnation du flet juvénile (1 mois) : des flets juvéniles (7-9 cm) capturés dans un milieu modérément pollué (estuaire de Canche) et encagés en septembre/octobre sur une période d'un mois, sur différents sites en Canche et en Seine (Rouen, Fosse Nord, avant-port du Havre)
- 2- Imprégnation du flet juvénile (5 mois) : flets juvéniles (7-9 cm) capturés *in natura* en Canche et en Seine en septembre/octobre, ayant donc vécu environ cinq mois en estuaire.

* Pour évaluer l'état de santé des adultes et leur capacité de reproduction :

- 3- Imprégnation du flet adulte (2 à 3 ans) : flets adultes (>25 cm) capturés en hiver et en été en aval des estuaires de Canche et Seine.

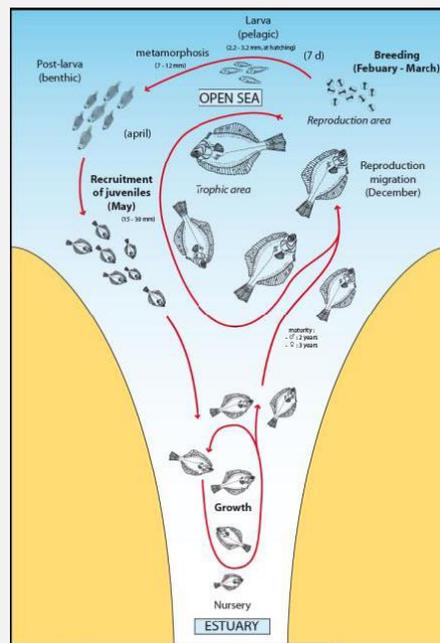
En parallèle du projet HQFISH, les équipes ont été mobilisées pour déployer les outils de biosurveillance (flet et crevette) dans le cadre de l'évaluation des impacts sur la Seine de l'accident Lubrizol. Les résultats de cette étude sont présentés séparément en annexe 1.

Encadré 1 : Le Flet

Le modèle biologique choisi dans cette étude est un poisson plat benthique de la famille des Pleuronectidae, le flet (*Platichthys flesus*). Cette espèce affectionnant les fonds meubles des estuaires et des zones côtières. Il se reproduit en hiver (de février à mars) dans des eaux peu profondes (15 à 30m) souvent localisées à l'embouchure des estuaires. Après une vie pélagique de quelques semaines, les larves se rapprochent des côtes puis se métamorphosent à une taille de 15-30 mm avant de coloniser les estuaires à partir du mois de juin. Les jeunes juvéniles sont essentiellement localisés dans la partie oligohaline (amont) des estuaires, avec leur croissance ils vont progressivement exploiter la partie mésohaline, puis enfin la partie polyhaline (aval) vers l'âge de 4-6 mois (septembre-octobre) (Kerstan, 1991 ; Freitas et al., 2009 ; Selleslagh & Amara, 2008). Sa vie juvénile est essentiellement estuarienne et dure 2,5 ans. Le flet se nourrit dans les eaux côtières peu profondes et sur les vasières intertidales estuarienne (De Groot, 1971) ; c'est une espèce opportuniste qui se nourrit d'invertébrés benthiques comme les amphipodes, les polychètes, les isopodes ou encore des larves d'insectes (De Groot, 1971 ; Aarnio et al., 1996 ;

Selleslagh & Amara, 2015). Bien que communément considéré comme une espèce catadrome (Summers, 1979), le flet peut présenter une certaine plasticité de son cycle biologique avec des individus capables de se reproduire soit en mer, dans des eaux saumâtres et en eau douce, comme cela a été montré en Seine et en Gironde (Daverat et al., 2012).

Le flet est un poisson euryhalin que l'on retrouve dans des eaux de salinité comprises entre 0 et 35 g/L. C'est le seul poisson plat marin en Europe qui remonte les cours d'eau douce, plus particulièrement en été. Il réalise une partie importante de son cycle biologique en estuaire. C'est donc un modèle biologique intégrateur de la qualité de l'habitat estuarien aux niveaux chimique, physique et hydro-climatique. Cette espèce est donc particulièrement pertinente pour valider des méthodologies exploratoires sur le fonctionnement de populations soumises aux multi-stress environnementaux rencontrés dans les écosystèmes estuariens, de la zone oligohaline à la zone polyhaline (Borcier, 2019). Le flet est présent sur toutes les côtes européennes, C'est une espèce préconisée dans le cadre de la convention OSPAR (Commission de Oslo et Paris du 22 septembre 1992) pour la surveillance et la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est.



Cycle de vie du flet, *Platichthys flesus*

QUALITE DES ZONES DE NOURRICERIES ESTUARIENNES

Deux approches ont été développées pour explorer la qualité des zones de nurseries estuariennes en Seine : i) le déploiement de juvéniles encagés (7 - 9 cm) pendant un mois au niveau de différents sites en Seine et en Canche ; ii) l'échantillonnage de juvéniles de flets (7 - 9 cm) *in natura*.

La réponse individuelle des juvéniles (capturés *in natura* et encagés) à leur environnement a été analysée par l'intermédiaire d'une approche multi-biomarqueurs prenant en compte différents niveaux d'organisation biologique (indicateurs de fitness et des réponses moléculaires (Tableau.1). Parallèlement à ces métriques biologiques, les teneurs en contaminants chimiques (inorganiques : métaux et organiques : PCB, PBDE, Pesticides, HAPs) ont été mesurées dans les poissons (muscle) et dans les sédiments.

Cette première partie du projet sur les réponses des poissons juvéniles *in natura* et mis en cage a pour objectif l'intégration des réponses des juvéniles de flet pour diagnostiquer la qualité et la fonctionnalité des nurseries de l'estuaire de Seine sur un gradient amont-aval, comparativement à celle d'un milieu relativement peu anthropisé en Manche et reconnu historiquement comme en meilleur état, l'estuaire de la Canche.

Tableau 1 : Liste des indicateurs de fitness et des biomarqueurs mesurés sur les juvéniles de flet.

	Flets encagés	Flets <i>in natura</i>
Indicateurs de fitness		
Survie	X	
Croissance (en taille / poids)	X	
Croissance récente : otolithe	X	X
Indice de condition K	X	X
Indice ARN/ADN (muscle)	X	X
Réserves lipidiques (TAG/ST) (muscle)	X	X
Teneurs en protéines (muscle)	X	X
Biomarqueurs		
Test des Comètes (sang)	X	X
Numération des micronoyaux (sang)	X	X
Peroxydation lipidique: TBARS (branchies)	X	X
Carbonylation des protéines (branchies)	X	X
Expression de gènes : C3, TNF-R, CCOII (foie)	X	X
Protéomique haut-débit « shotgun » (foie)	X	

1 Imprégnation du flet juvénile (1 mois)

Dans cette partie du projet, il s'agissait de mettre au point et de tester pour la première fois la faisabilité de la biosurveillance active (encagement) dans des milieux estuariens soumis à de fortes contraintes hydrodynamiques (système macrotidal). Du 4 au 9 septembre 2017, 350 flets (taille moyenne = $8,1 \pm 1$ cm; poids moyen = $5,42 \pm 2,16$ g) ont été capturés au petit chalut à perche dans l'estuaire de la Canche et maintenus vivants au centre Mareis (<http://www.mareis.fr/>) situé à proximité de l'estuaire de la Canche. Les flets ont été acclimatés pendant une semaine dans un aquarium de 500 L et nourris avec des proies vivantes (Mysidacea, crevettes et artémias).

La mise en cage des flets s'est déroulée du 12 au 17 septembre 2017 au niveau de 4 sites dans l'estuaire de la Seine (Avant-Port du Havre ; Fosse Nord; Fosse Sud et aval de Rouen) et 1 site dans l'estuaire de la Canche (Figure 2). A chaque site, 2 cages (dimension : L= 1m ; l = 0,6 m; H=0,6 m; volume = $0,36 \text{ m}^3$; maillage = 1cm) ont été déployées. De plus, à chaque site, une troisième cage en Inox a été déployée pour l'étude des microplastiques (mutualisation avec le projet PlasticSeine).

15 à 20 juvéniles de flet ont été placés dans chaque cage. 24 h avant la mise en cage, les poissons ont été anesthésiés à l'eugénol (35 mg/L), marqués individuellement (Alpha Tag), mesurés et pesés afin de suivre la croissance individuelle. Les cages ont été relevées un mois après entre le 13 et le 15 octobre. Toutes les cages ont été retrouvées sauf celles du site de la Fosse Sud. Ces dernières ont soit été emportées par les activités de pêche nombreuses se déroulant dans le secteur (chalutage), soit elles ont été décrochées par les courants (cela semble peu probable, car à tous les autres sites, les cages n'ont pas bougé).

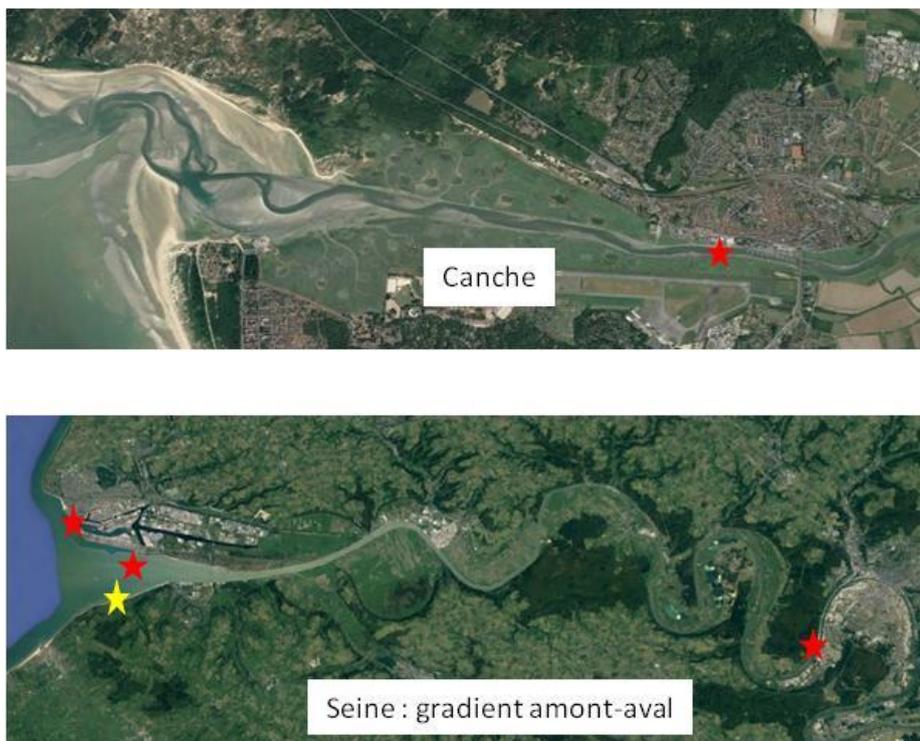


Figure 2 : Localisation des sites d'implantation des cages. À noter qu'au niveau de Fosse sud les cages n'ont pas été retrouvées.

Après un mois d'encagement, le taux de survie moyen (67%) est satisfaisant mais variable selon les sites. Les meilleurs taux de survie correspondent aux sites de Rouen (97%) et de l'avant Port du Havre (83%). Cela pourrait s'expliquer par le fait que ces 2 sites sont situés dans des zones plus abritées et donc exposés à des conditions environnementales moins fluctuantes comparativement aux sites situés dans le chenal des estuaires (Fosse Nord et Canche).

En 2018 et 2019, nous avons réalisé de nouvelles expérimentations d'encagement afin d'apporter des améliorations à la technique d'encagement et une meilleure prise en compte du bien-être animal par l'installation d'aménagements pour favoriser la présence et le développement des proies et de zones de refuges pour les poissons. Les résultats obtenus ont été concluants et permettent aujourd'hui de proposer un protocole pour la mise en place d'une biosurveillance active standardisée et opérationnelle avec des juvéniles de flet.

1.1 Niveaux de contaminations chimiques dans les sédiments et les poissons

Les contaminants inorganiques (métaux) et organiques (PCB, PBDE, Pesticides et HAP) ont été dosés dans les sédiments et dans les muscles des poissons de chacun des 4 sites étudiés. Un **gradient** croissant de contamination chimique très marqué a été observé sur les sédiments de Seine (de la Fosse Nord vers Rouen), qui présentent par ailleurs des concentrations nettement plus élevées relativement à ceux de Canche. **Le site de Rouen** présente des concentrations 10 fois (pour les métaux) ou 7 fois (pour les PCB) plus importantes qu'en Canche (Figure 3).

Nous avons pu mettre en évidence **des profils de contamination différents entre les sites** : Fosse Nord se caractérisant par les contaminants organiques : PBDE et PCB et l'avant-Port du Havre par les éléments-traces métalliques.

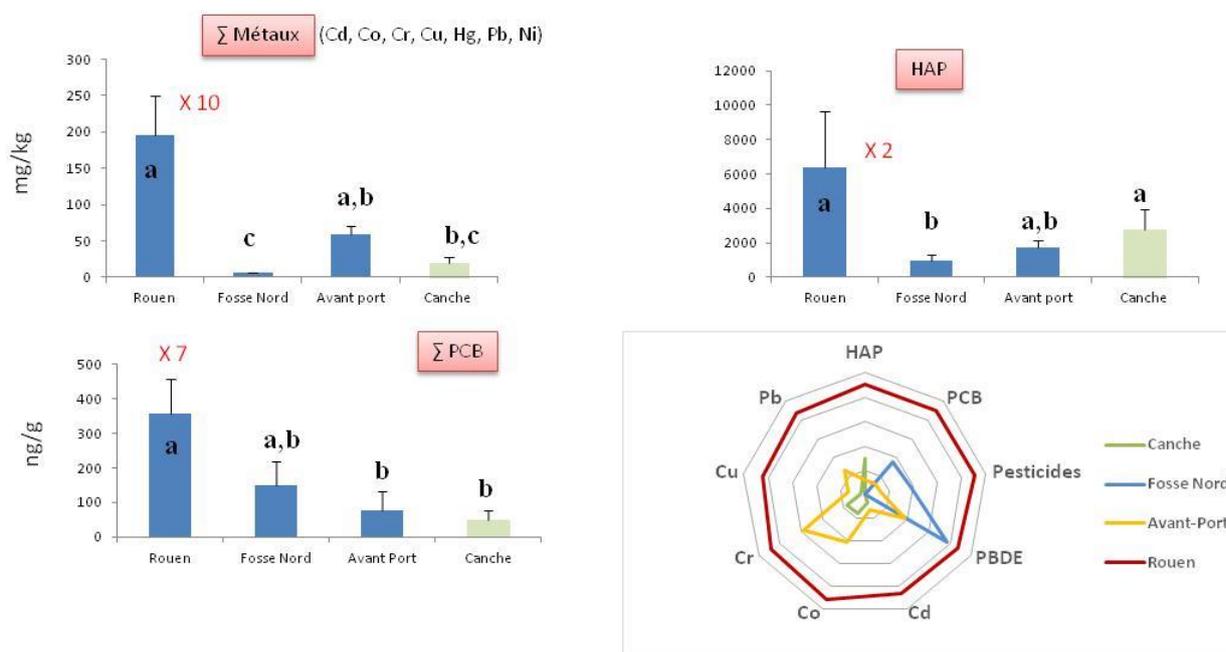


Figure 3 : Concentrations en éléments-traces métalliques, PCB et HAP dans les sédiments (en mg/g de poids sec). (les mêmes lettres au-dessus des histogrammes indiquent l'absence de différence significative).

Après un mois d'encagement, tous les poissons ont accumulé des contaminants dans leur muscle. Par rapport aux témoins (poissons analysés avant la mise en cage) les concentrations ont augmenté de 3 (métaux) à 8 fois (PCB). **Cela montre que les poissons ont bioaccumulé pendant la période d'encagement** (Figure 4).

Pour les PCB, nous retrouvons le même gradient amont-aval que dans les sédiments. Par contre, pour les métaux, la bioaccumulation est plus élevée au niveau de l'avant-Port du Havre et plus faible à Rouen. Proportionnellement aux teneurs trouvées dans les sédiments, les poissons de Rouen ont globalement bioaccumulé moins qu'au niveau des autres sites.

Nous avons pu mettre en évidence des profils de bioaccumulation différents :

- Forte bioaccumulation de PCB à Rouen, mais faible pour les autres contaminants
- Profils de bioaccumulation très différents entre Fosse Nord (HAP, Pesticides) et Avant-Port (métaux).

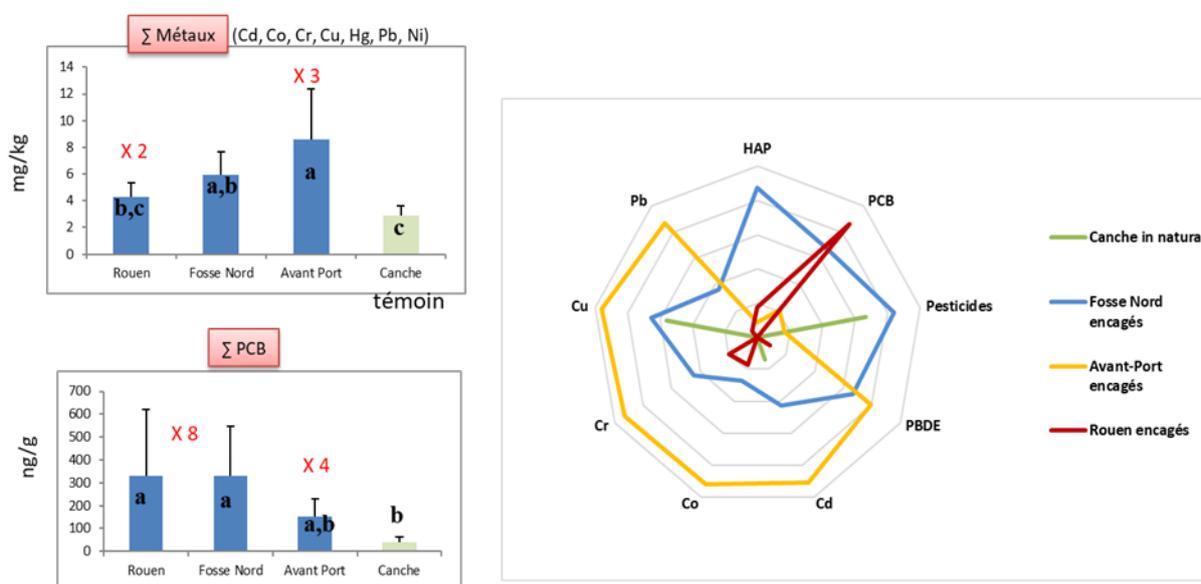


Figure 4 : Concentrations en éléments-traces métalliques et en PCB dans les muscles de juvéniles de flet encagés comparés au témoin (poissons analysés avant la mise en cage). (les mêmes lettres au-dessus des histogrammes indiquent l'absence de différence significative).

L'analyse de co-inertie entre les concentrations dans les poissons et les sédiments montre l'absence de co-structure. **Les données de la contamination chimique du biote ne reflètent pas celles des sédiments.** Dans une étude d'encagement de flets adultes pendant 3 mois dans un fjord norvégien, Beyer et al. (1996) ont également trouvé que les concentrations de contaminants dans les flets ne reflétaient pas celles des sédiments des sites encagés. Ils supposent que les poissons étaient moins exposés aux métaux que ne l'indiquent les concentrations mesurées dans les sédiments. Ils expliquent cela par le fait que les échantillons de sédiments analysés représentent une épaisseur de 5 à 6 cm alors que les poissons au fond de la cage ne sont en contact qu'avec les couches les plus récentes de sédiments, les moins polluées. Dans l'estuaire de la Seine, du fait de la nature des sédiments (sableux-vaseux à vaseux) et du fort hydrodynamisme, il y a une forte remobilisation et déplacement des sédiments. Cela constitue un biais potentiel pour la comparaison de la contamination sédimentaire avec la contamination du biote sur un même site.

La contamination du biote (bioaccumulation) semble être un bon indicateur de la biodisponibilité des contaminants. De nombreux facteurs (salinité, taux de matière organique du sédiment, granulométrie,...) influencent la biodisponibilité des contaminants pour les poissons. Ainsi, certains contaminants métalliques sont bien présents dans les sédiments de Rouen, mais en concentrations faibles dans les flets encagés sur ce site ; la biodisponibilité de ces métaux y est donc vraisemblablement très réduite. De toute évidence, ces observations illustrent la nécessité de poursuivre les recherches sur la biodisponibilité des contaminants des sédiments et leurs bioaccumulations chez les poissons encagés. Il faut noter que la contamination de la colonne d'eau n'a pas été prise en compte et que pour les métaux au moins c'est une source de contamination majeure. Une perspective serait l'utilisation d'échantillonneurs passifs (POCIS, DGT) fixés au niveau des cages pour mesurer la concentration en contaminants dissous « biodisponibles ».

La contamination par voie trophique, c'est-à-dire le niveau de contamination des proies et les processus de transfert, est souvent considérée comme un facteur important dans la bioaccumulation chez les poissons. Dans le cas de la présente expérimentation, les poissons se sont mal nourris (ils ont tous perdu du poids durant l'encagement) ce qui laisse penser que cette voie de contamination a été réduite. Dans le cadre des expérimentations d'encagements réalisées, en 2018 et 2019, les gammares qui ont colonisé les récifs de coquilles installés dans les cages (constituant ainsi une partie importante de la nourriture des flets pendant l'encagement) ont été conservés pour de futures analyses chimiques et explorer cette hypothèse.

1.2 Réponses biologiques des poissons

A) Indices de fitness

Bien que les cages aient été fixées sur le substrat, et présentaient un fond recouvert de quelques centimètres de sédiments facilitant l'accès à la macrofaune (principales proies des juvéniles de flets), les poissons ont perdu du poids (en moyenne 0,73% / jour) du fait d'un manque très probable d'accessibilité et/ou de disponibilité de la nourriture. Ces résultats sont confirmés par l'analyse des contenus stomacaux (taux de vacuité élevé) et la diminution des différents indices de fitness (l'indice de condition K de Fulton et des indices biochimiques (Protéines, ARN/ADN, TAG/ST)) (Figure 5). **Les flets encagés ont des indices de fitness significativement plus faibles que ceux des témoins** (poissons stabulés avant mise en cage) (Figure 6). Une diminution des indices de fitness a déjà été observée chez des poissons (épinoches) encagés pendant 40 jours (Le Guernic et al., 2016) ou des juvéniles de carpe encagés 4 semaines (Bervoets et al., 2009). **L'interprétation et la comparaison inter-sites des réponses biologiques des poissons encagés reste délicate du fait de l'effet de l'encagement sur la fitness** et très probablement sur les réponses des biomarqueurs. C'est ce qui a été montré notamment chez l'épinoche dans le cadre d'une étude expérimentale *in situ* avec des effets sur la fitness et les réponses immunitaires (Le Guernic et al., 2016). Les améliorations apportées au cours du projet offrent toutefois de très bonnes perspectives.

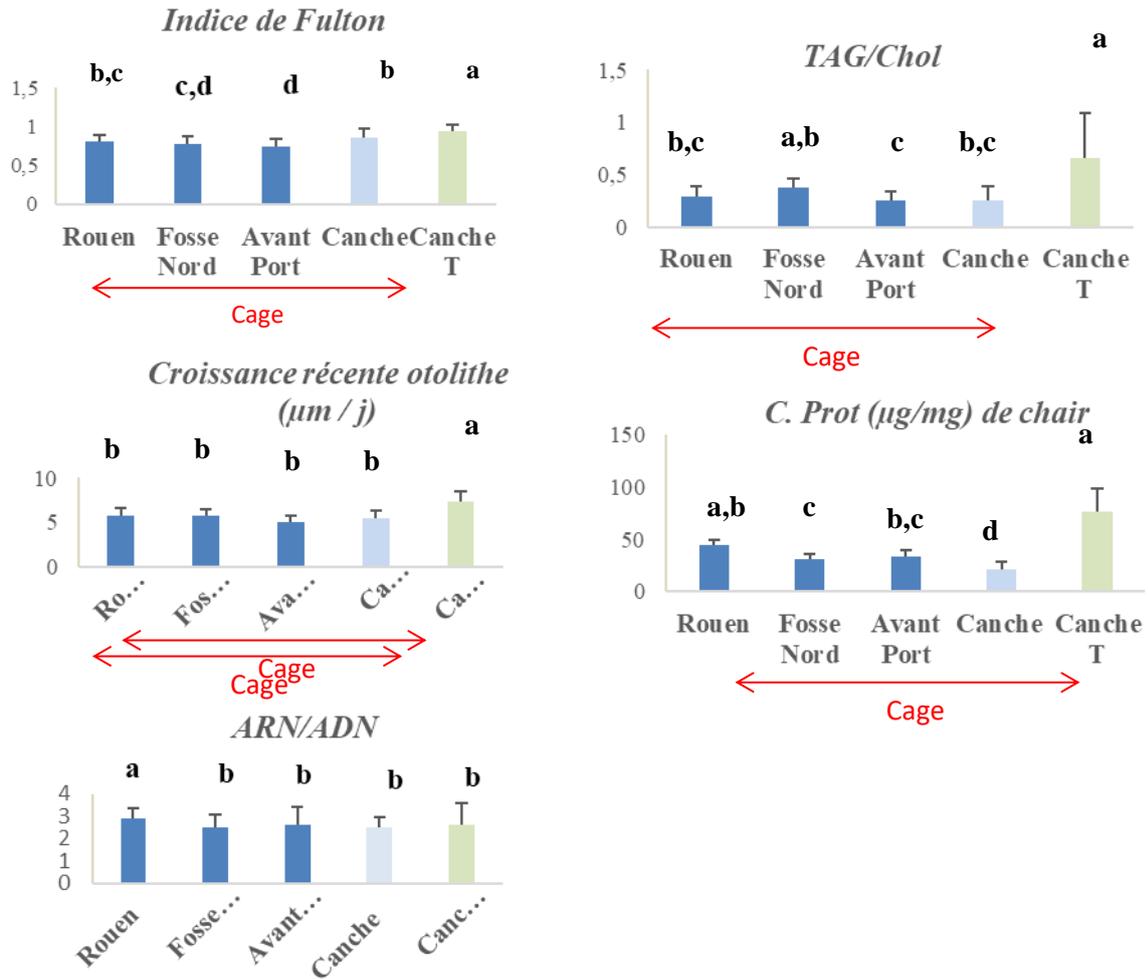


Figure 5 : (A) Indice de condition K de Fulton ; (B) croissance récente de l'otolithe (largeur des 15 derniers accroissements) ; (C) rapport ARN/ADN ; (D) rapport TAG/ST et (E) concentration en protéines des juvéniles de flets encagés un mois au niveau des 3 sites en Seine (Rouen, Fosse Nord et Avant-Port du Havre) et de la Canche. Les valeurs du témoin correspondent aux flets de la Canche stabilés avant mise en cage. (les mêmes lettres au-dessus des histogrammes indiquent l'absence de différence significative).

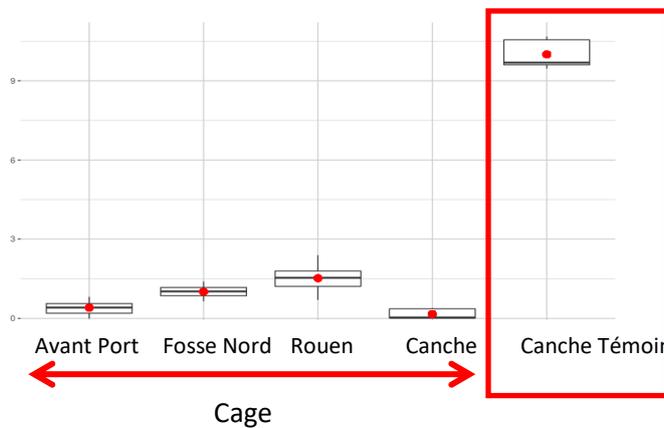


Figure 6 : IBR fitness moyen des juvéniles de flets encagés un mois au niveau des 3 sites en Seine (Rouen, Fosse Nord et Avant-Port du Havre) et de la Canche. Les valeurs du témoin correspondent aux flets de la Canche stabilés avant mise en cage.

HQFISH a permis de développer et d'améliorer la technique d'encagement au cours des trois années du suivi ; l'enjeu était d'améliorer le bien-être et de réduire le stress du poisson lié à l'encagement pour ne pas perturber les indicateurs de fitness en lien avec la contamination chimique des milieux étudiés. Différentes améliorations et enrichissement (zone-refuge, abris contre les courants, collecteur d'invertébrés,...) ont été développées (Figure 7).

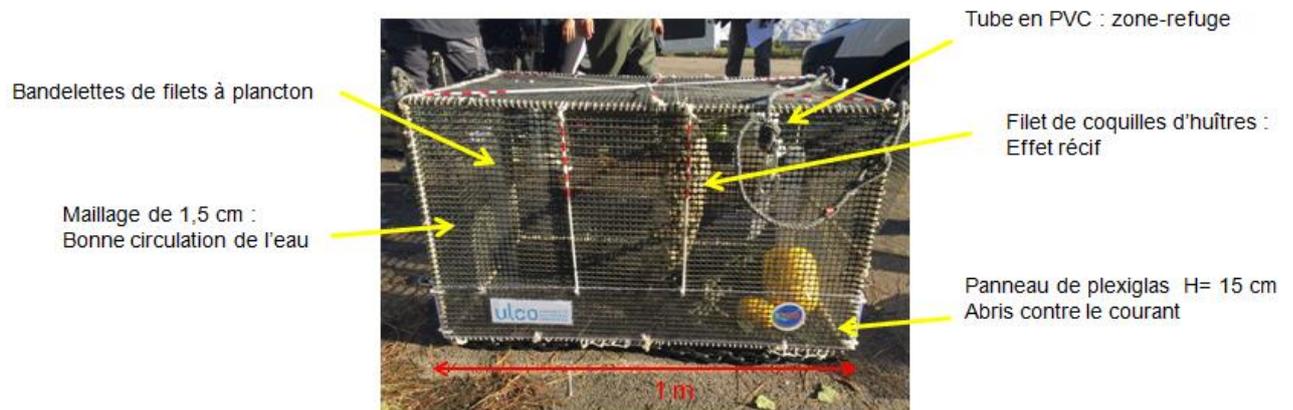


Figure 7 : Cage développée dans le projet HQFISH pour l'encagement des juvéniles de flets avec différentes améliorations et enrichissement pour favoriser le bien-être des poissons.

Les résultats obtenus sont très encourageants :

- Amélioration très significative de l'alimentation des poissons durant l'encagement : 7 à 10 invertébrés (gammare) retrouvés par estomac; taux de vacuité de 0% (Rouen) et 13% (Canche) alors qu'en 2017, le taux de vacuité était > 75% .
- Amélioration de la survie et des indices de fitness (Figure 8)

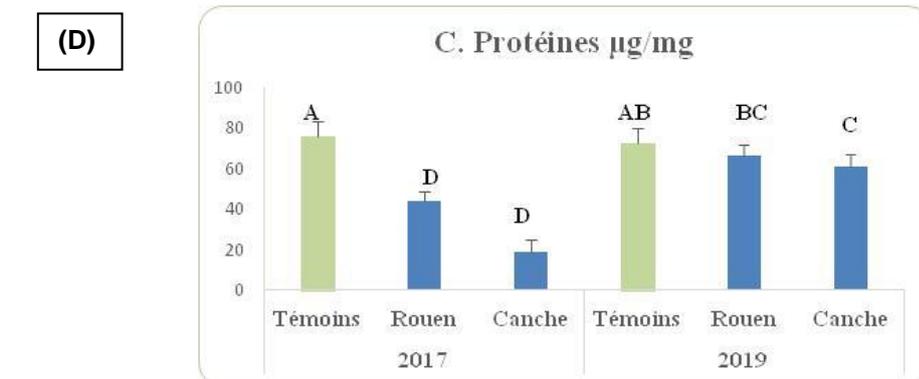
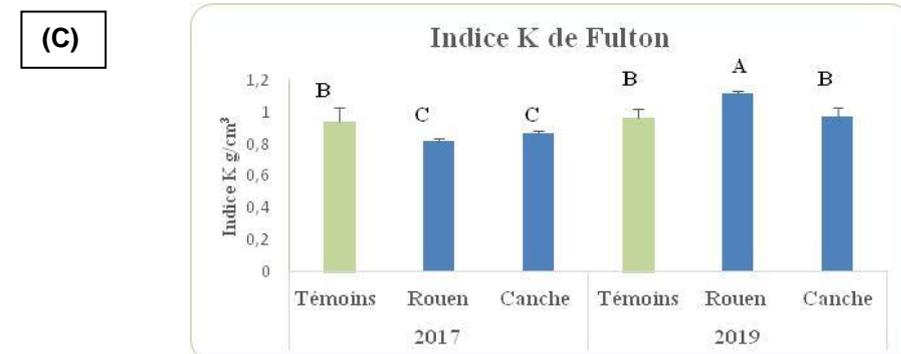
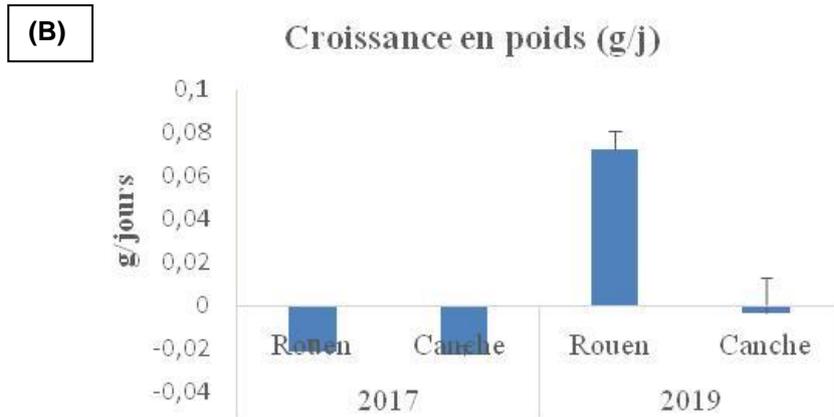
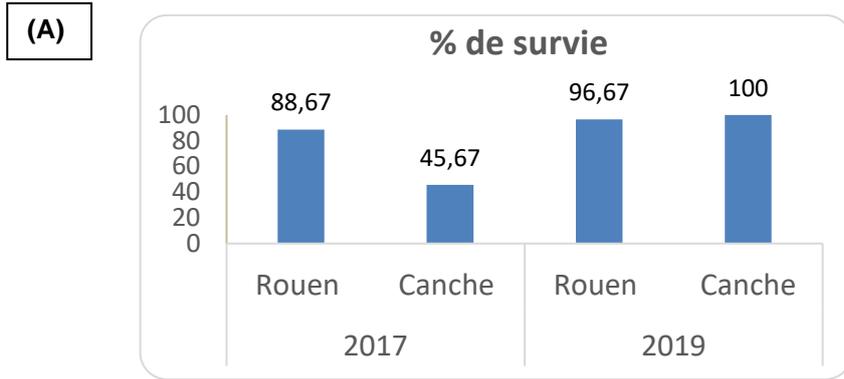


Figure 8 : Comparaison de quelques indicateurs de fitness de juvéniles de flet engagés avant (2017) et après (2019) les améliorations et enrichissements de la technique de caging. Les comparaisons ont été réalisées au niveau de 2 sites : la Canche et Petit-Couronne (Rouen). (A) : Taux de survie au bout d'un mois d'encagement (%) ; (B) Taux de croissance en poids (*g/jour*) ; (C) *Indice de condition de Fulton K* et (D) : *Concentration en protéines des muscles (µg/mg)*.

B) Réponses des biomarqueurs

Les différents biomarqueurs analysés (test des Comètes, peroxydation lipidique : TBARS, carbonylation des protéines, C3, TNF-R, CCOII) montrent des réponses variables et difficilement interprétables (Figure 9).

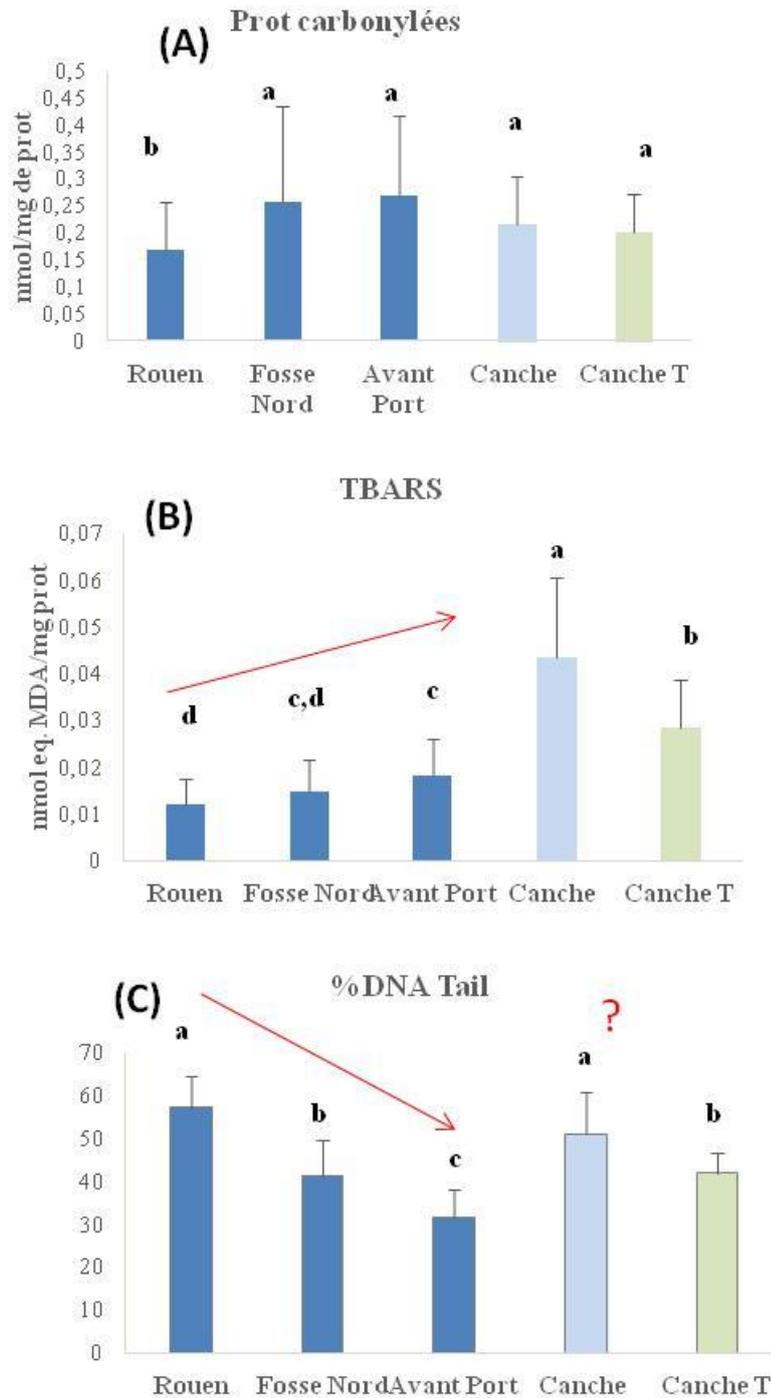


Figure 9 : Comparaison des réponses de certains biomarqueurs chez des juvéniles de flets engagés un mois au niveau des 3 sites en Seine (Rouen, Fosse Nord et Avant-Port du Havre) et de la Canche. Le témoin Canche correspond aux poissons capturés en Canche.

Des analyses protéomiques haut-débit « shotgun » ont été menées sur le foie des poissons, pour rechercher sans a priori de nouvelles protéines candidates en lien avec les réponses du flet aux stress dans les estuaires (Figure 10). Cette nouvelle technique permet d'identifier sans a priori des milliers de protéines candidates, en une seule analyse par individu, à partir d'un échantillon de foie très petit, ne dépassant pas les 20 mg. Les analyses ont été réalisées sur 3 lots de flets post encagement (Canche, Fosse Nord, Rouen).

Les résultats montrent une surproduction de nombreuses protéines impliquées dans la détoxification des xénobiotiques, bien marquée à Rouen et de moindre intensité en Fosse Nord (Figure 10). Le stress chimique est maximum dans l'estuaire de Seine notamment dans sa partie la plus amont, à Rouen. On observe clairement dans ce milieu une sur-expression des GST, BHMT, CYP450, PDCD4 qui témoignent de la réponse des poissons au milieu très pollué de Rouen vs Canche. Il existe donc une relation positive entre le niveau de pollution et le facteur d'expression des signatures protéomiques, ce qui suggère la pertinence de l'approche en protéomique pour le diagnostic du stress chimique sur la réponse de flets encagés sur un mois (Borcier et al., 2019). Il est à noter la non-identification de métallothionéines suractivées, ce qui suggère des contaminants métalliques à priori peu biodisponibles notamment à Rouen. Cela va dans le sens des observations précédemment faites sur la faible bioaccumulation des contaminants métalliques à Rouen.

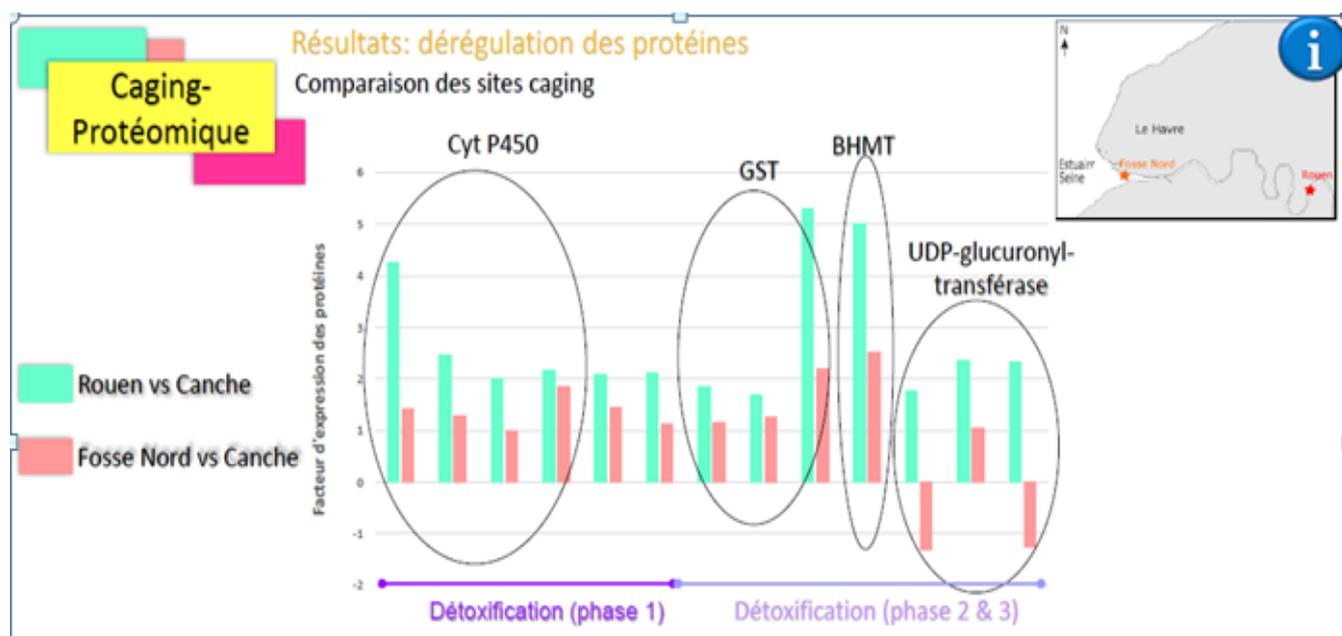


Figure 10 : Signatures protéomiques des flets encagés à Rouen et Fosse Nord par rapport à ceux encagés dans la Canche.

Notons que les capacités d'osmorégulation exceptionnelles du flet permettent à cette espèce de dépenser très peu d'énergie pour s'acclimater à des conditions de salinité qui peuvent être extrêmement variables en suivant le cycle de marée (Lundgreen et al., 2008). Nous émettons donc l'hypothèse que le coût énergétique réduit de l'osmorégulation chez le flet, ne peut conduire à la modification des signatures protéiques de ce poisson, en réponse à des salinités différentielles à Rouen vs Fosse Nord.

2 Imprégnation du flet juvénile (5 mois)

Malgré les nombreuses tentatives d'échantillonnage au niveau des différents sites étudiés, nous n'avons pu capturer des juvéniles de flet que dans l'estuaire de la Canche et au niveau aval de la Seine, dans la vasière Nord. C'est l'une des limites de la biosurveillance passive (absence du modèle biologique sur tous les sites d'intérêt).

La comparaison des concentrations de contaminants bioaccumulés dans les poissons *in natura* de la Canche et de Fosse Nord montre :

- Une bioaccumulation des PCB plus importante à Fosse Nord / Canche
- Une bioaccumulation des contaminants métalliques et des pesticides plus importante en Canche / Fosse Nord.

Si l'on compare les concentrations de contaminants bioaccumulés entre les poissons *in natura* et les poissons encagés d'un même site, il apparaît que la bioaccumulation est toujours plus importante dans les poissons encagés (1 mois d'exposition) comparés aux poissons prélevés directement dans la Seine ou la Canche (exposition de l'ordre de 4 à 5 mois) (Figure 11). Toutefois, les signatures chimiques (proportions des contaminants) sont similaires entre poissons encagés et poissons sauvages (*in natura*).

Plusieurs études ont précédemment signalé des différences de réponse entre les organismes encagés et indigènes exposés à la pollution de l'environnement (Lacroix et al., 2015). C'est le cas des moules où une plus forte bioaccumulation chez les organismes encagés comparés aux individus du milieu naturel (natives) a déjà été observée (Nigro et al., 2006 ; Schøyen et al., 2017). Les différences observées ont été attribuées à plusieurs facteurs : absence d'effets cumulatifs à long terme des polluants dans les organismes en cage (Nigro et al., 2006) ; aux différences physiologiques des individus et donc aux capacités à se détoxifier (Schøyen et al., 2017) ; l'existence de traits adaptatifs ou de mécanismes compensatoires chez les moules indigènes exposées de façon chronique à la pollution, conduisant par exemple à des niveaux de bioaccumulation inférieurs à ceux des organismes en cage à court terme (Marigómez et al., 2013 ; Greenfield et al., 2014).



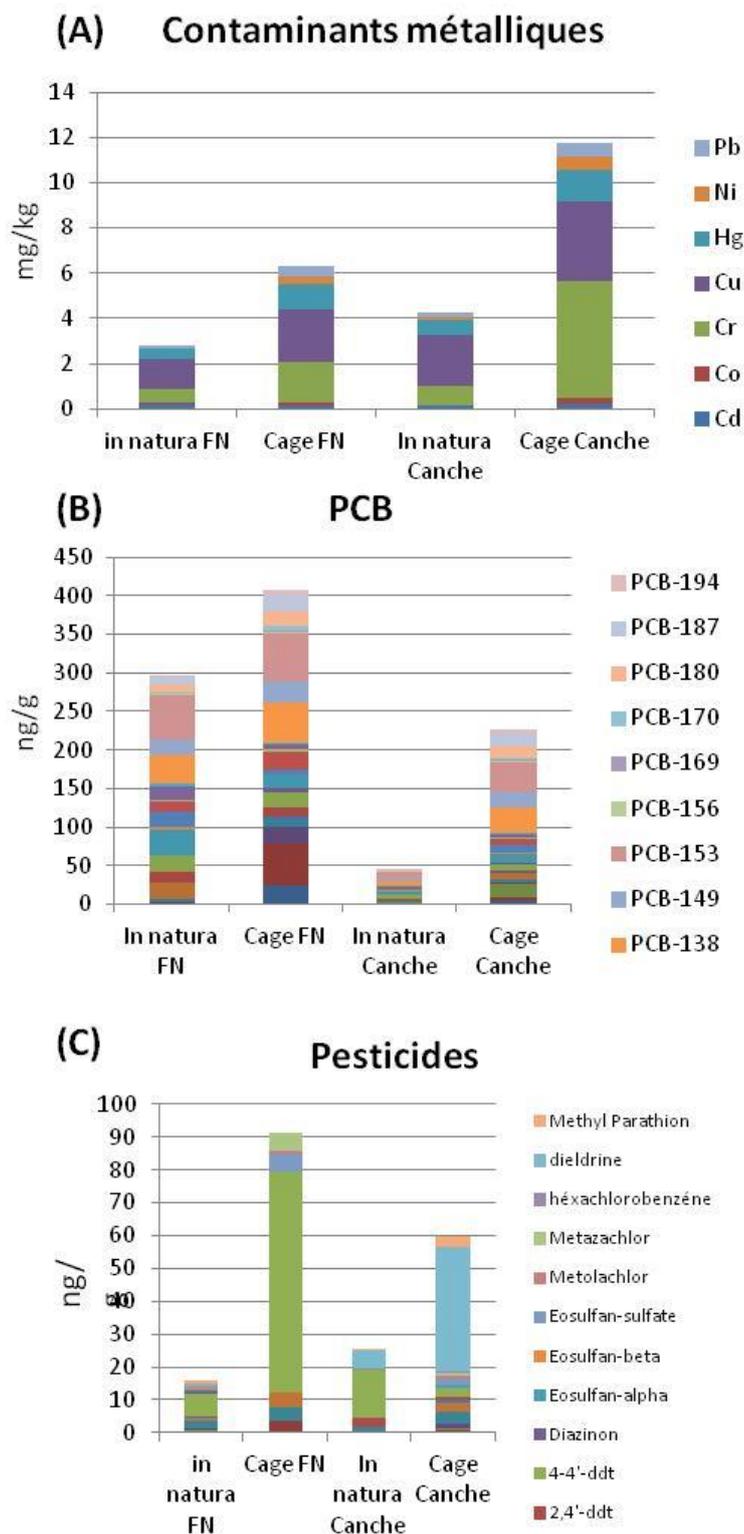


Figure 11 : Comparaison des concentrations en contaminants métalliques (A), PCB (B) et Pesticides (C) entre juvéniles de flets capturés in natura et encagés un mois sur le même site en Canche et au niveau de Fosse Nord.

La différence de contamination entre poissons encagés et prélevés *in natura* pose la question d'une potentielle pression de sélection des polluants sur les individus résidant dans les systèmes les plus contaminés. Les individus à même de mieux se détoxifier ou à même d'éviter les zones de fortes contaminations seraient favorisés. Une perspective proposée serait de comparer des profils de bioaccumulation d'individus issus de Canche et de Seine, exposés dans la même cage et donc au même environnement ; l'objectif serait ici de détecter des capacités différentielles à bioaccumuler des polluants, et de mettre ainsi en évidence une possible adaptation locale des populations de poissons face à la contamination chimique.

La comparaison de l'état de santé des juvéniles prélevés *in natura* dans la Seine aval (Fosse Nord) et dans la Canche ne montre pas de différence significative sur les indicateurs de fitness et les biomarqueurs (sauf pour le TBARS, dont les niveaux sont néanmoins très faibles) (Figure 12). Cela suggère que les juvéniles de flet ne sont pas a priori plus impactés par le stress chimique dans la partie aval de la Seine vs dans l'estuaire de la Canche. Ces résultats sont différents des études réalisées il y a une dizaine d'années qui ont montré un état de santé des juvéniles de flet de la Seine significativement moindre comparé aux flets de la Canche ou d'autres petits estuaires comme l'Authie (Amara et al., 2009 ; Kerambrun et al., 2013 ; Henry et al., 2014 ; Dupuy et al., 2015).

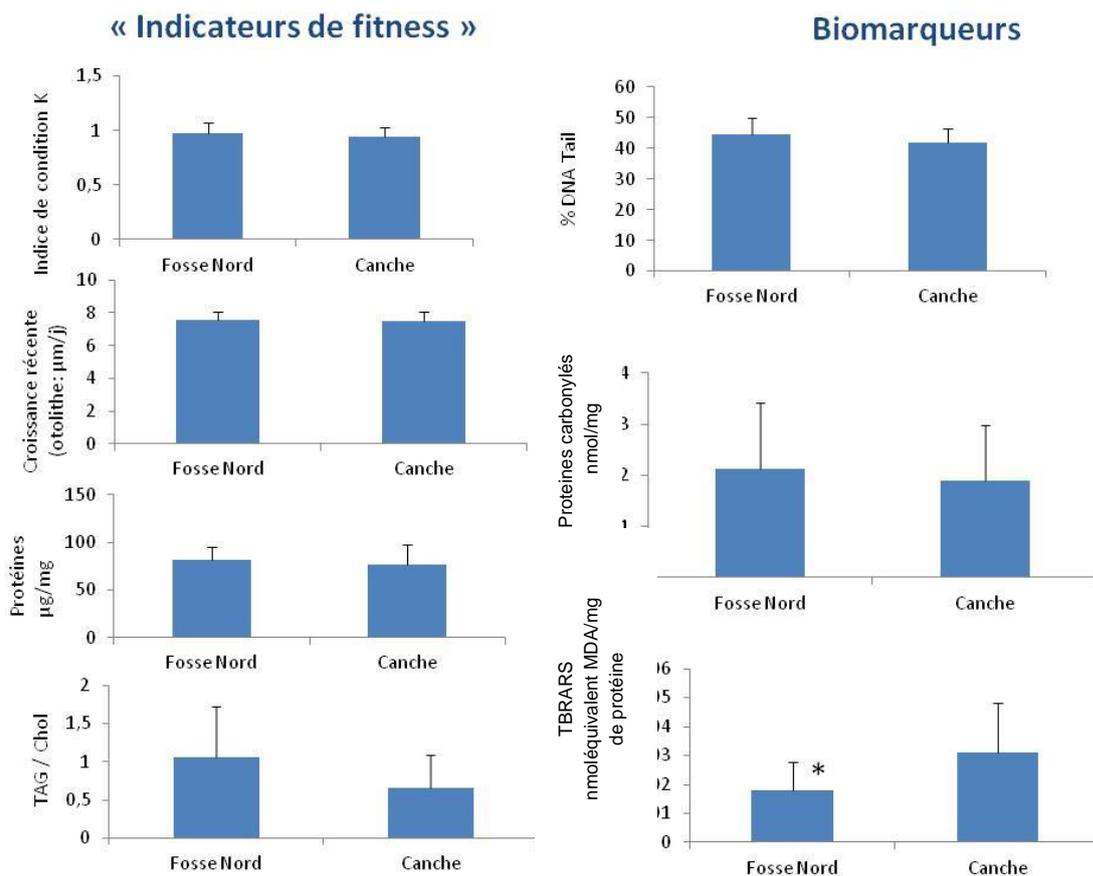


Figure 12 : Comparaison des indicateurs de fitness (indice de condition K, croissance récente de l'otolithe, concentration en protéines, et réserves lipidiques TAG/ST) et des biomarqueurs (% DNA Tail, Protéines carbonylées, TBARS) mesurés sur des juvéniles (7- 9 cm) de flets capturés en septembre 2017 en Canche et dans la partie aval (Fosse Nord) de la Seine.

La comparaison de l'évolution des concentrations en contaminants métalliques sur 10 ans dans les sédiments mais aussi dans les juvéniles de flets de Canche et de la partie aval de la Seine, montre une diminution très significative en Seine. En Canche, les concentrations sont restées relativement stables (Figure 13). L'amélioration globale de la qualité chimique de la Seine depuis les années 2000 et la situation aval des prélèvements (moins de contamination à l'embouchure) pourraient expliquer l'absence de différences observées au niveau des indicateurs d'état de santé des flets capturés en 2017.

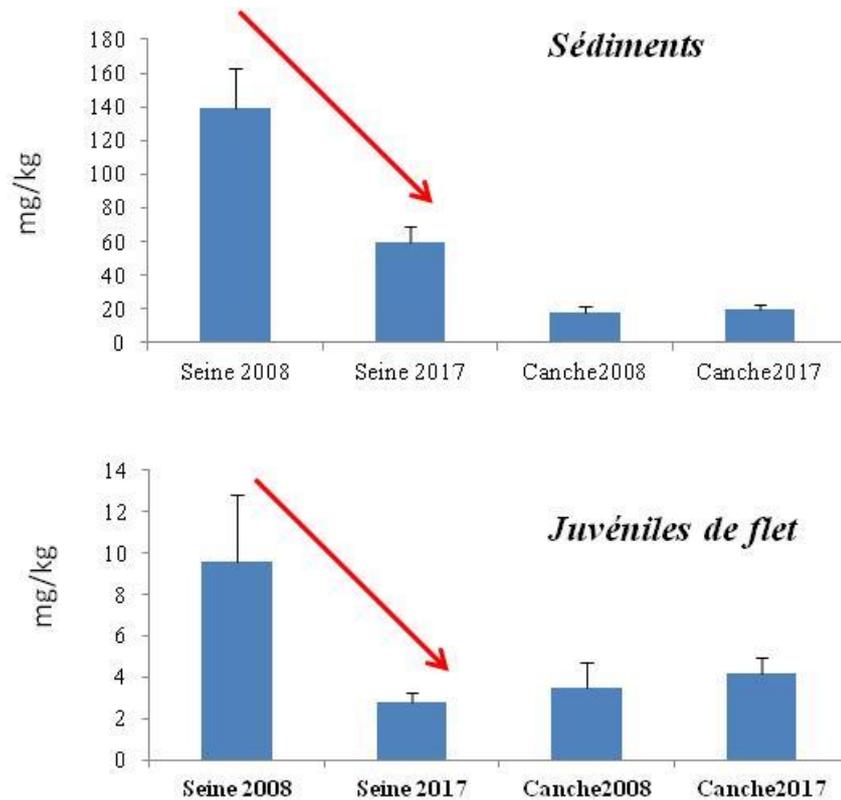


Figure 13 : Comparaison de l'évolution des concentrations en contaminants métalliques (Σ Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Pb, Ni) dans les sédiments et les juvéniles de flet prélevés en Canche et dans la partie aval de la Seine en 2008 (Henry et al., 2012) et en 2017 (projet HQFish). A noter qu'en 2008, les dosages de contaminants ont été réalisés sur des flets plus petits capturés en juin et donc qui ont eu une durée d'imprégnation en estuaire plus courte qu'en 2017.

QUALITE DE L'HABITAT ESTUARIEEN DE LA SEINE & FITNESS DES POISSONS ADULTES

Cette partie du projet HQFISH va quantifier des indicateurs de fitness et développer une approche multi-biomarqueurs sur des flets adultes de Seine soumis à un stress chimique a priori élevé, relativement à des poissons adultes de Canche présentant un stress chimique considéré comme modéré. Cette approche doit nous permettre de quantifier le potentiel de la population de Seine à faire face au stress chimique et donc à assurer sa résilience.

Un échantillonnage de flets adultes a été mené à 2 saisons et dans 2 sites.

Notons que 30 flets adultes ont été prélevés par saison et par site, pour un total donc de $30 \times 2 \times 2 = 120$ poissons. La longueur totale de ces poissons est comprise entre 25 et 35 cm, ce qui permet de les qualifier de flets adultes (2 ans < âge < 3 ans).

Voici le détail des opérations de pêche au chalut :

hiver (flet a priori au stade: fin de maturation sexuelle)

le 16/01/2018, quelques kilomètres au Nord de l'embouchure de la Canche, sur le site d'Hardelot ; les poissons ayant été pêchés entre 4 et 10 mètres de profondeur (nom du site : « Canche ») ;

le 23/01/2018, dans l'embouchure de l'estuaire de Seine (nom du site : « Seine »);

en été (flet a priori au stade: repos sexuel)

le 5/07/2018, sur le site de « Seine »

le 6/07/2018, sur le site de « Canche ».

Suite à chaque opération de pêche, les poissons ont été ramenés aux laboratoires (TOXEM-Le Havre & LOG-Wimereux) puis mesurés, pesés, et disséqués dans la journée ; les différents tissus prélevés étant congelés à -80°C , ou fixés au formol pour les échantillons destinés à l'histologie.

3 Dosages chimiques dans le foie des flets

Différents dosages ont été menés sur les polluants organiques et métalliques sur muscle et foie de poisson (HAP, PCB, pesticides organochlorés - organophosphorés, métaux). Nous ferons ici un focus sur les résultats obtenus sur le foie qui bioaccumule naturellement plus les polluants que le muscle, en retenant préférentiellement les polluants organiques les plus persistants (PCB & pesticides) ainsi que les métaux.

Les analyses de PCB et de pesticides font clairement ressortir des concentrations environ 10 fois plus fortes en PCB dans le foie en Seine vs Canche, quelle que soit la saison ; les teneurs en pesticides étant 40 fois et 4 fois plus fortes, respectivement en hiver et en été, en Seine vs Canche (Fig. 14).

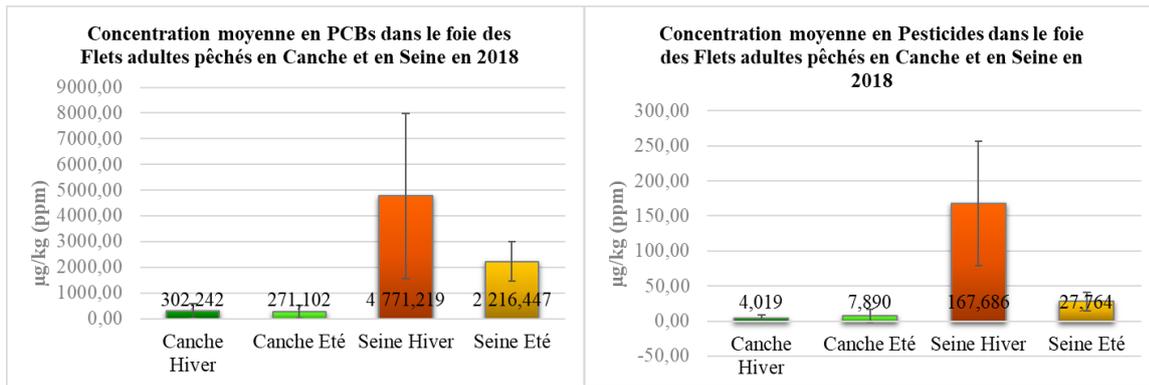


Figure 14 : Concentrations en PCBs et pesticides organochlorés-organophosphorés dans le foie de flets adultes en Canche et en Seine en hivers et en été 2018 (résultats exprimés / poids sec).

Les analyses de métaux dans le foie mettent en évidence des concentrations très proches en Cu et Zn en Canche vs Seine, quelle que soit la saison. Les valeurs de contaminations métalliques pour Cd, Co, Cr, Ni, Pb sont proches en hiver pour Canche et Seine, et nettement différentielles en été où les individus de Seine sont nettement plus contaminés (Fig. 15).

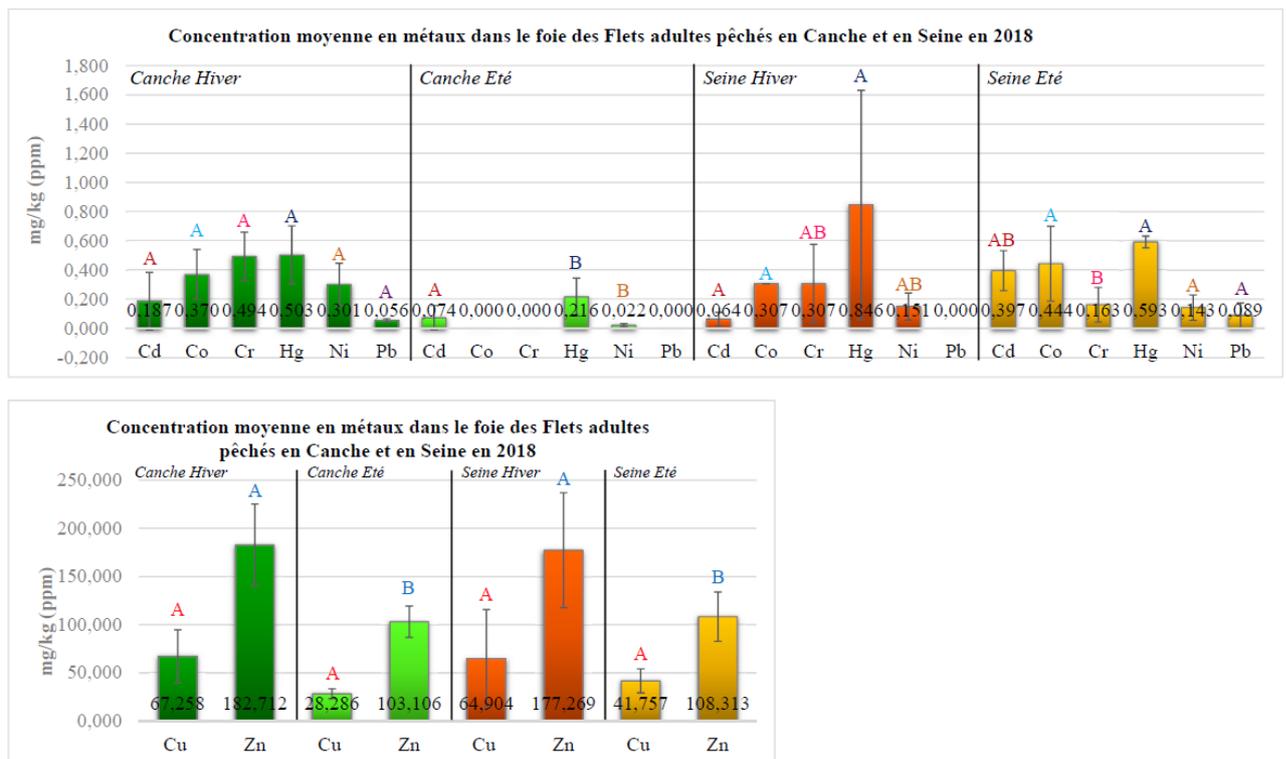


Figure 15 : Concentrations en métaux dans le foie de flets adultes en Canche et en Seine (résultats exprimés / poids sec).

La contamination des poissons avec les Polluants Organiques Persistants (PCB & pesticides organochlorés-organophosphorés) est donc nettement plus élevée en Seine vs Canche ; elle pourrait être potentiellement expliquée par la contamination résiduelle encore très élevée en POP des sédiments de Seine, relativement aux sédiments à l'embouchure de l'estuaire de la Canche.

La contamination métallique est par contre de même niveau global en Seine et Canche, particulièrement en hiver. Ce résultat n'est pas vraiment surprenant, car les dosages de métaux dans les foies de flets adultes ont mis en évidence dans le passé des niveaux de contamination métallique très proches en embouchure de Seine, en Baie de Somme, voire devant Boulogne sur mer, Calais et Dunkerque (Henry et al. 2004). Nous émettons l'hypothèse que les poissons de l'embouchure de la Canche sont soumis à l'impact du « fleuve côtier » (Brylinski et al., 1991) de la Manche orientale. Cette bande d'eau côtière est vraisemblablement entretenue par les apports fluviaux de la Baie de Seine au Pas de Calais et se caractérise par une dessalure et des teneurs en polluants non négligeables ; elle dériverait lentement vers le Nord, sous l'impact de la résiduelle des marées et des vents dominants du Sud-Ouest. Nous émettons l'hypothèse que la contamination métallique assez réduite en été au niveau de l'embouchure de la Canche, pourrait être due à un débit des fleuves plus réduit et particulièrement à des apports de la Baie de Seine en contaminants plus limités.

Globalement, les niveaux de certains métaux chez le flet en Canche et Seine paraissent nettement plus élevés relativement aux données des petits estuaires peu contaminés du Golfe de Gascogne (ie, Ster de Lesconil avec Cd = 0,01 mg/kg et Cu = 15 mg/kg *in* Evrard et al. 2009), parfois identiques à ceux observés dans les grands estuaires très anthropisés (Gironde, Loire avec $45 < \text{Cu} < 60$ mg/kg *in* Evrard et al. 2009), voire inférieurs relativement à la contamination au cadmium très élevée observée en Gironde (Cd = 1,27 mg/kg *in* Evrard et al. 2009). On remarque que la contamination métallique pour le flet en Canche et Seine demeure en moyenne 5 fois plus faible (pour Cr, Cd, Ni, Hg, Cu) relativement à celle observée dans les estuaires fortement pollués d'Angleterre : Tyne et Mersey (Williams et al. 2011). Notons par contre une concentration en Zn élevée dans les flets de Canche - Seine (180 mg/kg), proche de celle observée en Tyne - Mersey (250 mg/kg *in* Williams et al. 2011).

Le différentiel de contamination hiver-été marqué pour les polluants organiques, particulièrement pour les poissons de la Seine, pourrait s'expliquer par la décontamination des poissons adultes au cours de la phase de reproduction ; en effet, une partie des polluants notamment liposolubles peut être éliminée par leur transfert dans les gamètes des poissons, puis leur émission dans le milieu naturel (Ostrach et al., 2008). Les poissons capturés en été, en situation de post-ponte auraient ainsi éliminé une partie de leur charge polluante, suite à la reproduction par la production de gamètes et/ou la mobilisation de leurs réserves musculaires ; ils présenteraient donc un niveau de contamination plus faible qu'en hiver. On remarque que pour les PCBs les plus communs, le niveau de contamination détecté dans le foie de flet en hiver est modéré en Canche (300µg/kg) et représentatif de ce qui est trouvé classiquement dans les estuaires peu contaminés, comme le Ster de Lesconil (200µg/kg *in* Evrard et al. 2009). Par contre la contamination en PCBs communs dans les flets de Seine en hiver atteint une valeur très forte (4700µg/kg) dépassant très largement celle observée dans d'autres grands estuaires en France ($500 < \text{PCB} < 800$ µg/kg pour la Loire et la Gironde *in* Evrard et al. 2009), comme dans les estuaires très pollués en Angleterre ($400 < \text{PCB} < 1600$ µg/kg pour Tyne & Mersey, *in* Williams et al. 2011). Cette contamination importante par les PCB en Seine témoigne encore du gros passé industriel de cet estuaire, et de la forte rémanence de cette famille de molécules dans les sédiments.

Contamination en polluants organiques persistants dans le foie, nettement plus forte chez les poissons adultes de Seine vs Canche ; avec une signature encore très élevée des PCB en Seine, typique d'un estuaire très industrialisé. Contamination en métaux proche en Seine et Canche, présentant en hiver des valeurs moyennes à fortes relativement à l'ensemble du littoral français.

4 Dosage d'un métabolite des HAP : l'hydroxypyrrène dans la bile des flets adultes

Le métabolite qui est dosé dans la bile, l'hydroxypyrrène, correspond à un hydrocarbure parent majoritairement rencontré dans les milieux aquatiques, le pyrène, une molécule largement distribuée dans l'environnement et biodisponible.

Le dosage de l'hydroxypyrrène met en évidence des signatures significativement plus fortes en Seine vs Canche particulièrement en hiver (Fig. 16) ; des valeurs supérieures de ce métabolite en hiver vs été ayant aussi été observées pour le flet en Loire et Vilaine (Evrard 2010).

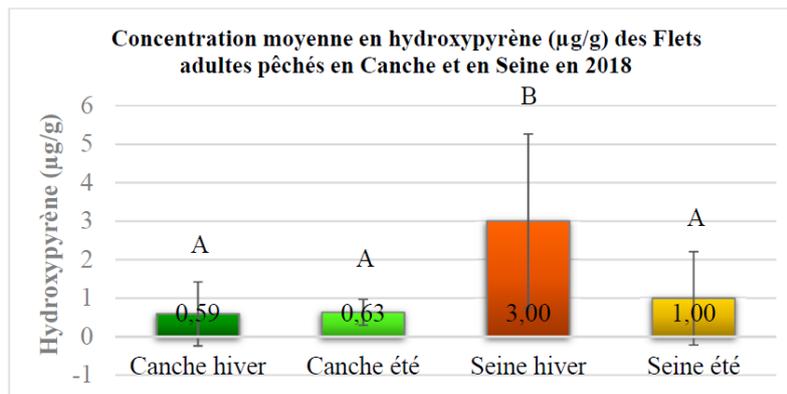


Figure 16 : Dosage de l'hydroxypyrrène dans la bile de flets adultes en Canche et en Seine.

De façon générale, l'ensemble du littoral de la Manche est impacté par les HAPs véhiculés par le lessivage des sols, les transports atmosphériques, puis par leur dilution et diffusion vers le milieu marin côtier ; ceci expliquant naturellement des concentrations plus élevées en Seine très fortement anthropisée, relativement au Pas de Calais. Nous confirmons ici que les poissons de l'estuaire de Seine présentent des concentrations de métabolites de HAP très significatives, considérées comme étant parmi les plus fortes d'Europe (Kamman et al., 2017), et proches de celles observées dans certains estuaires industriels comme l'Escaut aux Pays Bas, où la contamination des poissons aux HAP serait en partie expliquée par les activités soutenues de dragage pour entretenir les chenaux de navigation qui remobilisent des sédiments contaminés (Vethaak et al., 2016). Nous ne pouvons pas comparer directement nos résultats sur Seine et Canche relativement aux travaux pré-cités sur les HAP, les méthodes de dosage de l'hydroxypyrrène dans la bile de flet étant différentes. Cependant Kamman et al. (2017) indiquent pour la bile du flet des concentrations 17 et 4 fois plus fortes d'hydroxypyrrène, respectivement en Seine vs Islande, puis en Seine vs Mer du Nord – Hollande, confirmant ainsi les fortes signatures de la Seine en HAP.

Contamination par les HAP significativement plus forte en Seine vs Canche ; les teneurs en hydroxypyrene dans la bile de flet en Seine restant vraisemblablement élevées relativement à celles détectées en Mer du Nord .

5 Mesure de différents indicateurs de la fitness chez les poissons adultes

Indice de condition : K

L'indice de condition moyen a été calculé par localité et par saison. Rappelons que l'indice de condition (K) est calculé de la manière suivante :

$$K = (\text{Longueur totale du poisson})^3 / \text{poids corporel}$$

Cet indice reflète l'état d'embonpoint du poisson et est considéré comme un indicateur de l'état de santé du poisson. Les indices de conditions sont identiques en Seine & Canche en hiver comme en été ; on remarque par ailleurs un indice de condition plus fort en été qu'en hiver pour les deux populations, très probablement liée à une alimentation très active du poisson en post-ponte, sur la période printemps-été (Fig. 17).

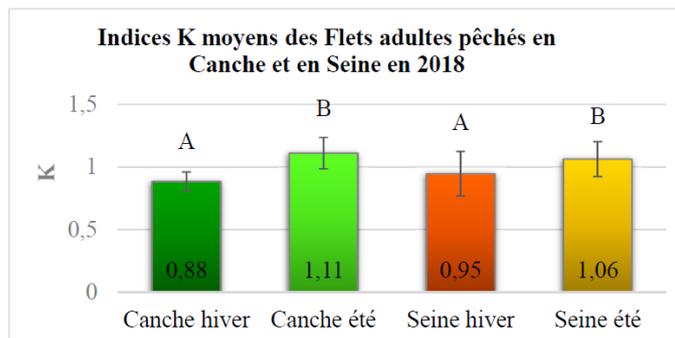


Figure 17 : Indice de condition des flets adultes en Canche et Seine.

Taux de croissance : GR (« Growth Rate »)

Le taux de croissance des flets a été déterminé par rétro-calcul sur les otolithes. Ces pièces calcifiées localisées dans l'oreille interne du poisson sont relativement faciles à lire sur le flet, d'autant plus que nous avons une longue pratique sur la lecture des otolithes de cette espèce. La croissance individuelle a donc été estimée entre le début du premier hiver et le début du deuxième hiver, ce qui correspond à un âge moyen compris entre 8 mois et 20 mois, *i.e.* une période où la croissance du poisson est encore très rapide et linéaire.

Les taux de croissance moyens ne sont pas significativement différents entre les deux systèmes, avec cependant une croissance légèrement plus forte (Fig. 18) en Seine (10 cm/an) vs Canche (9 cm /an).

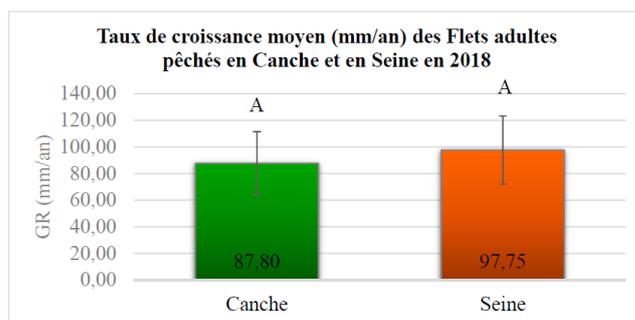


Figure 18 : Taux de croissance estimé par rétrocalcul sur les otolithes du flet, entre le début du premier hiver et le début du deuxième hiver.

Notons que la croissance du flet sur un an en Seine paraît très stable dans le temps. Elle était en effet en 2003 estimée entre 9 et 12 cm/an dans les grands estuaires anthropisés de Seine, Loire et Gironde ; une croissance nettement inférieure à celle observée dans de petits estuaires peu contaminés comme le Ster de Lesconil : 17 cm/an (Marchand et al. 2004). On aurait pu s'attendre a priori à un taux de croissance supérieur à 10 cm/an pour les flets de Canche ; il semblerait donc que les conditions de croissance ne soient pas optimales dans ce dernier système estuarien et peut-être liées à des conditions trophiques médiocres.

Etat des réserves lipidiques musculaires : TG/FS

L'état des réserves musculaires chez le poisson peut être classiquement évalué par l'analyse de la teneur en lipides du muscle. Nous avons mesuré ici le rapport entre un lipide de réserve le triglycérol (TG) et un lipide qui rentre dans la constitution des membranes cellulaires, le stérol libre (FS : « Free Sterol »). TG/FS reflète les capacités du poisson à plus ou moins bien maintenir ses réserves, suivant son état de maturation sexuelle, ou suivant le niveau du stress qu'il subit. Notons que de manière générale, tout stress induit un coût énergétique pour le poisson ; donc si l'intensité du stress est forte et/ou si le stress se prolonge dans le temps, on peut a priori détecter une baisse des réserves lipidiques musculaires chez le poisson.

On remarque une augmentation de TG/FS de l'hiver à l'été, en Canche comme en Seine (Figure 19). Cette tendance est classiquement décrite chez les poissons adultes, avec une mobilisation des réserves musculaires pour la production de gamètes en période de maturation sexuelle (janvier pour le flet), et une reconstitution des réserves quelques mois après la ponte (juillet pour le flet) (Kopko & Dabrowska, 2018). On remarque de plus, quelle que soit la saison, un niveau des réserves lipidiques plus faible en Canche vs Seine qui pourrait être lié à une disponibilité en nourriture globalement plus réduite pour les poissons adultes en Canche vs Seine.

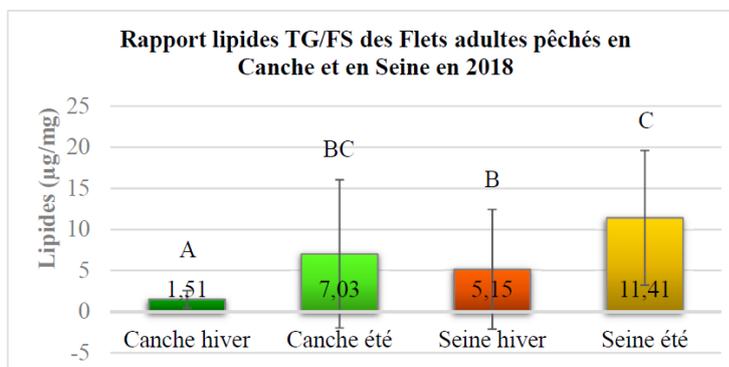


Figure 19 : Etat des réserves lipidiques (Triglycéride/Stérol libre) dans le muscle de flets adultes.

Histo-pathologie du foie (note de gravité)

L'analyse histologique des dommages hépatiques est utilisée depuis plusieurs années comme une réponse intégrée pour la surveillance des effets biologiques généraux, pour l'évaluation de l'état de santé général du poisson, aussi bien au niveau individuel qu'au niveau populationnel. L'intercalibration et la standardisation méthodologique de l'analyse histologique des pathologies hépatiques chez les poissons marins a permis l'application de cette analyse dans le monitoring des effets biologiques (Feist *et al.*, 2004). Le morceau de foie prélevé est fixé au formol à 4 %, déshydraté puis inclus en paraffine ; 1 à 2 sections de 3 à 5 µm du tissu ont ensuite été placées sur une lame de microscopie avant coloration hématoxyline/Eosine/Safran (H/E/S). Les observations sur les atteintes hépatiques ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique. Dans un objectif de biosurveillance, les lésions hépatiques ont été catégorisées selon les recommandations de Feist & collaborateurs en 2014 (ICES N°38, 2004, Biological effects of contaminants : Use of liver pathology of the European flatfish dab and flounder for monitoring). De plus, afin d'utiliser pleinement l'histopathologie hépatique comme un outil indépendant permettant de mesurer les effets biologiques des contaminants sur les poissons plats, nous avons attribué arbitrairement un grade de sévérité de 1 à 5 pour chaque catégorie de lésions (tableau ci-dessous).

Atteintes hépatiques sur le flet recherchées par analyse histologique.

Non Specific Lesions	Early Toxicopathic non neoplastic lesions	Foci of cellular alteration (FCA)	Benign Neoplasms	Malignant Neoplasms
1	2	3	4	5
Necrosis	Phospholipidosis	Clear cell foci	Hepatocellular adenoma	Hepatocellular carcinoma
Apoptosis	Fibrillar inclusion	Vacuolated foci	Cholangiomas	Cholangiocarcinoma
Lipidosis	Hepatocellular nuclear polymorphism	& Eosinophilic foci	Hemangiomas	Pancreatic acinar cell carcinoma
Haemosiderosis	Hydropic vacuolation	Basophilic foci	Pancreatic acinar & cell adenomas	Mixed cell carcinoma
Variable glycogen content	Peliosis and spongiosis hepatis	Mixed cell foci		Other
Increased numbers and size of macrophage aggregates				
Lymphocytic infiltration				
Granuloma & Abscess				
Fibrosis				
Regeneration				

Ainsi, pour chaque flet adulte prélevé en Seine et en Canche, il peut être calculé un index de dommage hépatique correspondant à la somme des grades observés. De la même manière, un indice global peut être attribué à un site ; il correspond à la somme des grades de sévérité mesuré divisé par le nombre d'individus composant l'échantillon. Cela permet, dans la mesure où les campagnes de pêche sont réalisées à la même période de comparer plusieurs sites. Au final un indice de gravité moyen a été calculé par site et par saison (Fig. 20) ; les signatures histo-pathologiques sont significativement plus fortes en Seine vs Canche, quelle que soit la saison considérée.

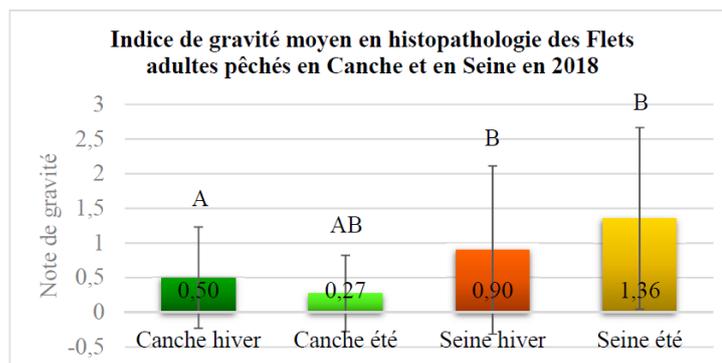


Figure 20 : Note de gravité pour les signatures histo-pathologiques détectées sur le foie des flets adultes.

Les signatures pathologiques sur le foie de flet sont étudiées depuis plus de 15 ans dans les estuaires en Grande Bretagne et dans les eaux côtières et estuariennes en Hollande ; elles présentent une plus forte prévalence dans les sites contaminés et une certaine réduction dans les systèmes côtiers où la qualité de l'eau s'est améliorée (Lyons et al., 2004 ; Vethaak et al., 2009). Ces signatures pathologiques, intégratrices de l'état de santé des individus, sont considérées comme des marqueurs d'intérêt majeur pour mieux comprendre l'impact des pollutions chroniques sur les populations de poissons (Martínez-Gómez & Vethaak, 2019).

Indices de conditions & taux de croissance des flets de Seine et de Canche sont très proches. L'état des réserves musculaires est cependant plus faible en Canche vs Seine, ce différentiel étant possiblement lié à une disponibilité en nourriture plus faible en Canche vs Seine.

Si les paramètres précédents ne mettent pas en évidence un différentiel net en termes de fitness entre les populations, les flets de Seine présentent par contre des signatures pathologiques clairement plus lourdes que celle de Canche.

6 Biologie de la reproduction

Rapport Gonado-Somatique (RGS) chez les femelles en Janvier & Juillet 2018

L'investissement dans l'effort de reproduction est mesuré par le Rapport Gonado Somatique (RGS = % du poids des gonades / poids du corps) pour les flets femelles en Janvier (mois où cette espèce est censée achever sa maturation sexuelle, la ponte démarrant a priori en Février), et en Juillet où les poissons sont a priori au repos sexuel.

Les RGS le 20 Janvier sont d'environ 12% pour les flets femelles de Canche comme de Seine, puis tombe en été à 1% (Fig. 21).

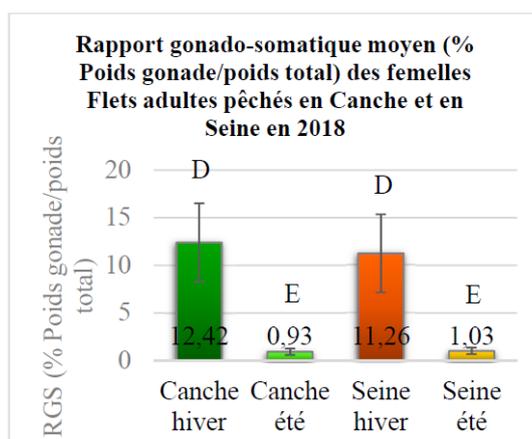


Figure 21 : Rapport Gonado-Somatique (RGS) en Janvier et Juillet 2018 pour Seine & Canche.

Le RGS - Janvier 2018 paraît faible relativement aux résultats historiques obtenus sur le flet : RGS en Seine - 15 février 2004 = 19%, RGS en Loire & Gironde - 30 Janvier 2005 = 23%. On observe donc ici un investissement faible dans l'effort de reproduction des flets femelles en 2018, et/ou un décalage dans la période de reproduction.

Indice de maturation sexuelle chez les femelles, évalué par l'histologie des gonades

L'analyse histologique des gonades permet d'observer les différents stades de la gamétogénèse ; un indice de maturation est calculé à partir des proportions relatives des différents types d'ovocytes (primaires, secondaires, ...). Il a été calculé pour les flets femelles de Canche et Seine, en Janvier et Juillet 2018 (Fig. 22).

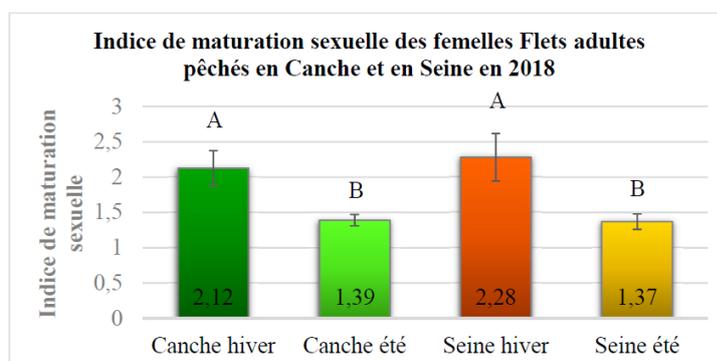


Figure 22 : Indice de maturation sexuelle des flets femelles en Janvier et Juillet 2018.

Les indices de maturation sont identiques en Canche et Seine pour chaque saison (Fig. 22). On observe des valeurs d'indice de maturation sexuelle des femelles en Janvier 2018 qui sont faibles (moyenne = 2,20), relativement au même indice calculé en Janvier 2005-2006 pour des femelles de Loire et Gironde (moyenne = 3). L'évolution de l'indice de maturation de 2005 à 2018 permet donc de préciser que l'effort de reproduction plus limité en 2018 s'accompagne donc d'un retard de la maturation sexuelle.

Dosage des hormones stéroïdiennes (11KT, E2) et de la vitellogénine (VTG) dans le plasma

Les hormones 11-cétotestostérone (11KT) et oestradiol (E2) ainsi que la vitellogénine (précurseur du vitellus) dosés dans le plasma, sont des indicateurs fiables de la maturité sexuelle et susceptibles d'indiquer des perturbations endocriniennes (Fig. 23 & 24).

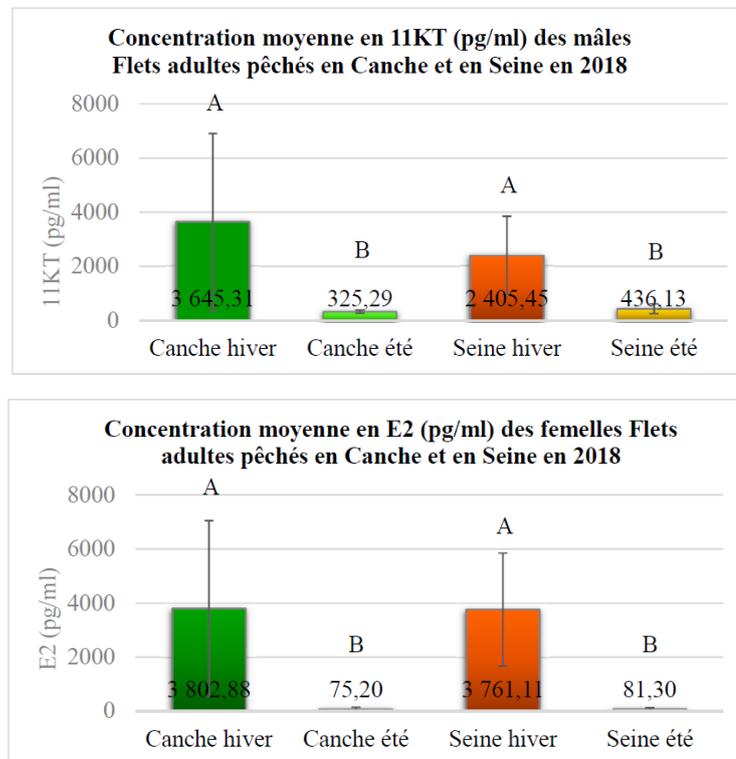


Figure 23 : Dosages dans le plasma de la 11KT chez les flets mâles et de E2 chez les flets femelles.

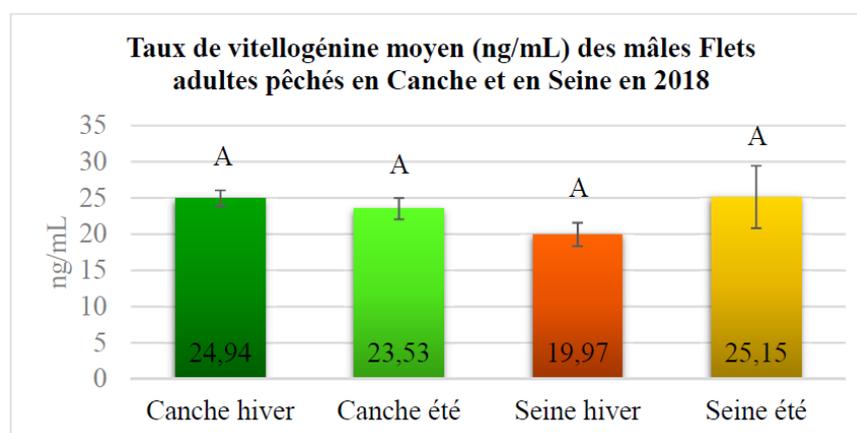


Figure 24 : Dosages de la vitellogénine plasmatique chez les flets mâles.

Les taux d'hormones 11KT et E2 sont significativement plus élevés en période de maturation sexuelle qu'en repos sexuel pour les deux sites (Fig. 23) ; les signatures VTG restent faibles (*i.e.* « normales » pour des flets mâles), ainsi que de même niveau pour les poissons mâles

de Canche et Seine, quelle que soit la période considérée (Fig. 24). Les variations des paramètres hormonaux ainsi que de la vitellogénine apparaissent donc très liées à la période de reproduction et au sexe, et ne présentent pas d'anomalie liée à des perturbations endocriniennes.

Pas de perturbation endocrinienne détectée au niveau de la reproduction du flet, en Canche comme en Seine. Retard sur les deux sites de la maturation sexuelle des flets femelles en Janvier 2018, comparativement aux données obtenues sur le flet dans les grands estuaires en 2004-2005.

7 Expérimentation sur la fertilité

Dans le chapitre précédent (2.4 Biologie de la reproduction) nous avons mis en évidence en Janvier 2018 un faible investissement des flets femelles dans l'effort de reproduction, ainsi qu'un certain retard de la maturation sexuelle des femelles. Nous avons commencé à constater lors de cet hiver 2018 l'absence du pic de ponte d'intensité maximale en février, comme il était classiquement observé dans les années 2000-2003 en Seine (Gallien-Landriau, 2003), ainsi qu'un certain étalement de la période de ponte débordant sur les mois de Mars voire d'Avril-Mai 2018.

Le but de l'expérimentation sur la fertilité était de comparer la performance de reproduction des flets issus de la Seine et de la Canche, par l'analyse du lien entre le niveau d'intégrité de l'ADN spermatique et la qualité de la descendance *via* le suivi du développement embryonnaire. Compte tenu de la grande difficulté d'obtenir des géniteurs matures en quantité suffisante, quatre tentatives ont été faites pour mener une expérience de fertilité (LEMAR Brest, du 19 au 23 février 2018 ; LEMAR Brest, le 19 mars 2018 ; LOG Wimereux, du 25 au 31 mars 2018 ; LOG Wimereux, du 25 février au 3 mars 2019).

Manipulation du 25 au 31 mars 2018

La troisième tentative (25-31 mars) nous a permis de réaliser une première expérience de fertilité sur le flet ; il a été décidé d'utiliser les gamètes obtenus sur les 2 sexes et sur les 2 populations de Seine et Canche, afin de tester le protocole de fécondation artificielle et de suivre le développement embryonnaire jusqu'à éclosion.

Un protocole de fécondation et d'élevage a été expérimenté sur le flet dans une chambre thermostatée régulée à $11 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Notons qu'immédiatement après la collecte des produits génitaux par stripping sur les poissons, les spermatozoïdes sont maintenus à 4°C et les œufs à 11°C . Un aliquote de chaque sperme est rapidement congelé dans l'azote liquide après dilution au 1/100 dans un tampon de cryoconservation (tampon de Vindelov), pour analyse ultérieure des dommages à l'ADN spermatique par l'essai des comètes en conditions alcalines.

La photo suivante montre l'installation expérimentale mise en œuvre pour le développement embryonnaire :



Essais réalisés

On réalise 3 essais sur les individus de Seine (à partir du 26/03) :

S10 (a&b) : 100 mL d'œufs d'un pool de 2 femelles sont fécondés par 1 mL de sperme d'un pool de 3 mâles puis 10 mL d'œufs fécondés sont mis en incubation en dupliqua dans des béchers de 2 L.

S'5 (a&b) et S'10 (a&b) : 40 mL d'œufs d'une seule femelle sont fécondés par 100 μ L de sperme d'un seul mâle puis 5 mL (S'5) ou 10 mL (S'10) d'œufs fécondés sont mis en incubation en dupliqua dans les béchers de 2 L.

Pour les individus de la Canche on réalise 4 essais (à partir du 27/03). :

C15 et C25 : 40 mL d'œufs d'un pool de 3 femelles sont fécondés par 300 μ L de sperme d'un pool de 6 mâles puis 15 mL (C15) ou 25 mL (C25) d'œufs fécondés sont mis en incubation en dans un bécher de 2 L.

C'15 et C'25 : 90 mL d'œufs d'une femelle sont fécondés par 700 μ L de sperme d'un pool de 6 mâles puis 15 mL (C15') ou 25 mL (C25') d'œufs fécondés sont mis en incubation dans un bécher de 2 L.

Résultats

La durée de motilité des spermatozoïdes des flets de la Canche a été évaluée pour affiner le protocole de fécondation : 150 μ L de sperme sont mélangés à 40 mL d'eau de mer à 12°C et immédiatement observés entre lame-lamelle sous microscope (X 400). On observe 95 % de spermatozoïdes mobiles à T0, 5% à 5 min, 0% à 10 min.

La mesure du niveau de dommages à l'ADN par le test des comètes en conditions alcalines (protocole standard modifié avec 1h30 de lyse ; Devaux et Bony, 2013) met en évidence l'absence de dommages significatifs (tail intensity <5%) sur le sperme du flet et ne montre pas de différence entre les poissons de la Canche (% tail intensity moyen \pm écart-type : 2,81 \pm 0,97) et ceux de la Seine (3,24 \pm 1,04).

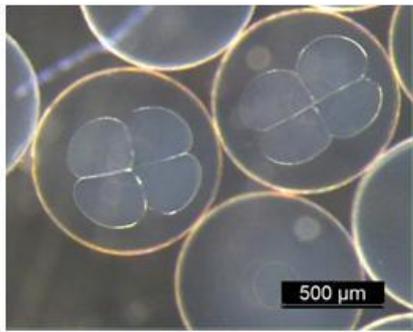
A l'éclosion qui débute à 43,9 degrés.jours à 11,2°C en moyenne (et après avoir constaté telles que décrites dans la littérature, les grandes étapes du développement aux temps attendus), on mesure le taux d'anomalies des larves qui sont essentiellement des œdèmes du sac vitellin, des œdèmes cardiaques et des déformations vertébrales ou des individus morts en nécrose. Les résultats sont les suivants :

Echantillon à l'éclosion	Larves écloses (nombre / pourcentage du total)		Larves non écloses (nombre / pourcentage du total)	
	normaux	anormaux	normaux	anormaux
S10 a & b*	31/80	2/5	3/8	3/8
S'5 a & b*	146/76	13/7	33/17	0
S'10 a & b*	104/55	10/5	74/39	1/0,5
C15 + C25*	2/2	0	79/93	4/5
C'15 + C'25*	46/13	2/0,6	152/43	2/0.6

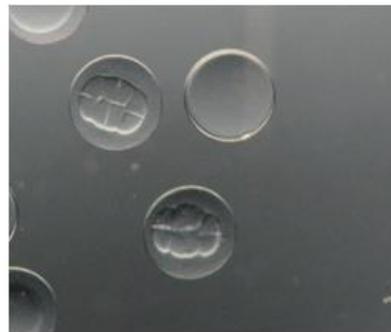
* dans ce cas, les larves des deux béciers ont été regroupées du fait du faible nombre de larves obtenues

On peut décrire une première tendance à partir du tableau précédent : le taux de larves écloses anormales parait plus élevé pour les individus de Seine (5 à 7%), relativement à celui des individus de Canche (0 à 0,6%).

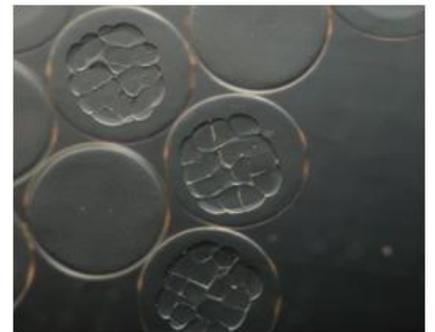
Les photos suivantes illustrent quelques étapes du développement embryon-larvaire du flet (hpf = heures post fécondation) :



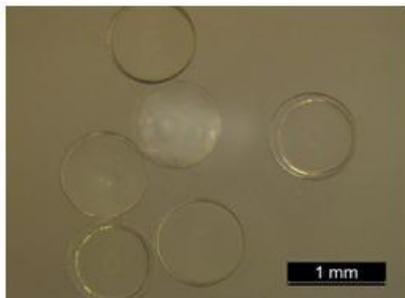
Stade 4 cellules à 3hpf



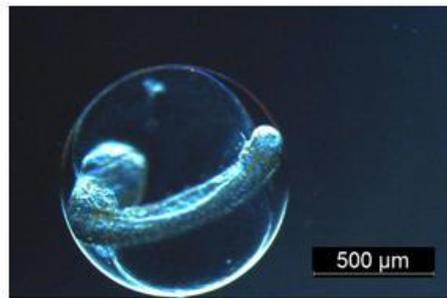
Blastocyste 8 cellules à 4,5 hpf



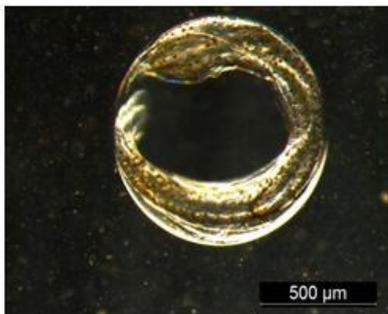
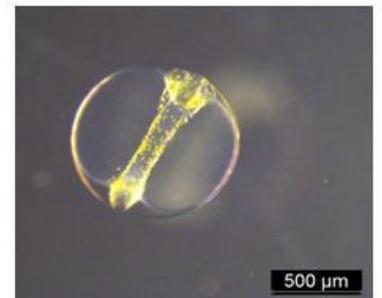
Blastocyste 16 cellules à 5 hpf



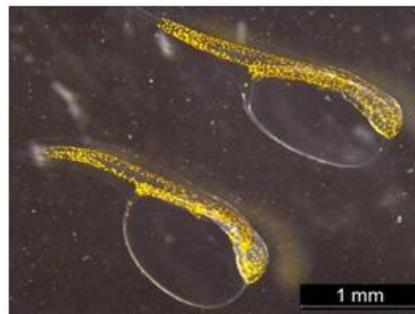
Après 24 hpf.



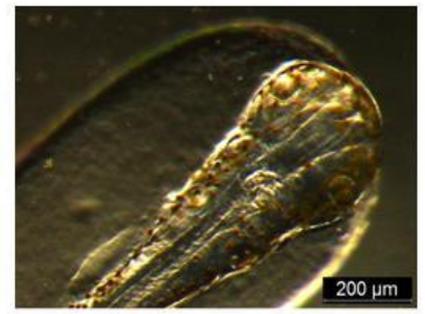
Après 70 hpf



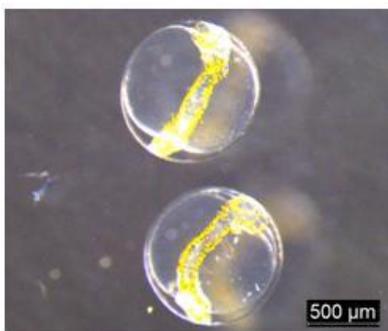
Après 96 hpf, larve proche de l'éclosion



Après 96 hpf (larves juste écloses en résorption vitelline)



Détails de la tête, yeux, cœur et pigmentation d'une larve éclos (96 hpf)



Anomalies de développement sur larves non écloses à 96 hpf (déformations vertébrales).



Anomalie (œdème vésicule vitelline et déformation caudale) sur larve éclos à 96 hpf



Anomalie (œdème vésicule vitelline et déformation caudale) sur larve éclos à 96 hpf



Dernière tentative sur l'estimation de la fertilité (25 février – 3 mars 2019)

Une dernière tentative sur la fertilité du flet a été menée au LOG à Wimereux. Nous étions cette fois-ci équipés d'un système d'incubation permettant de vidanger par gravité les œufs et les larves mortes (type carafe de Zoug) et de renouveler plus facilement le milieu d'incubation qui a eu tendance au cours des essais préliminaires à se troubler systématiquement malgré les changements d'eau quotidiens.

Cette dernière expérimentation s'est soldée par un échec, en effet nous n'avons pas pu disposer simultanément pour les deux populations (Seine et Canche) d'un minimum de femelles matures présentant des œufs de bonne qualité (n=4 à 5), et d'un nombre de mâles matures suffisant (n= 10 à 15 par station), en vue de tester un éventuel effet paternel de l'endommagement de l'ADN spermatique sur la qualité du développement embryon-larvaire.

Il faut rester prudent sur les conclusions de ces essais préliminaires menés sur très peu de géniteurs. Les premiers résultats indiquent une absence de génotoxicité marquée sur le sperme du flet, en Canche comme en Seine, et un taux de larves écloses anormales plus élevé en Seine (5 à 7%) vs Canche (0 à 0,6 %). Nous suggérons donc ici une possible perte de fertilité des poissons de Seine vs Canche. Par ailleurs, nos manipulations sur la fertilité ont confirmé un décalage dans le temps de la maturation sexuelle du flet les années 2018-2019, relativement aux années 2000-2005. Le flet est une espèce à affinité boréale, dont le processus de maturation sexuelle est accéléré par le flux d'eau froide issu du fleuve, arrivant dans l'estuaire en automne (Dando, 2011) ; les automnes doux retardent donc l'arrivée de ce signal froid qui conduit à un retard dans le processus de maturation sexuelle du flet. Le pic de ponte traditionnellement observé en Février n'a pas été observé au cours des deux années étudiées, caractérisées par une période de ponte probablement plus étalée, allant de Février à Juin. Cet étalement dans la période de ponte se traduit désormais par la présence en septembre-octobre d'une très large gamme de tailles de flets 0+ recrutés dans les estuaires de la Façade Atlantique (de 3 à 9 cm de longueur).

8 Biomarqueurs : AChE, Comètes, EROD, TBARS, Carbonylation des protéines

Différents biomarqueurs ont été mesurés : l'activité acétylcholinestérase AChE mesurée sur le cerveau (neurotoxicité), le test Comètes sur le sang (génotoxicité), l'activité EROD sur le foie (métabolisation des xénobiotiques), le dosage des TBARS (marqueur de peroxydation lipidique) et la carbonylation des protéines sur la branchie permettant de mesurer les dommages liés au stress oxydant (Fig. 25).



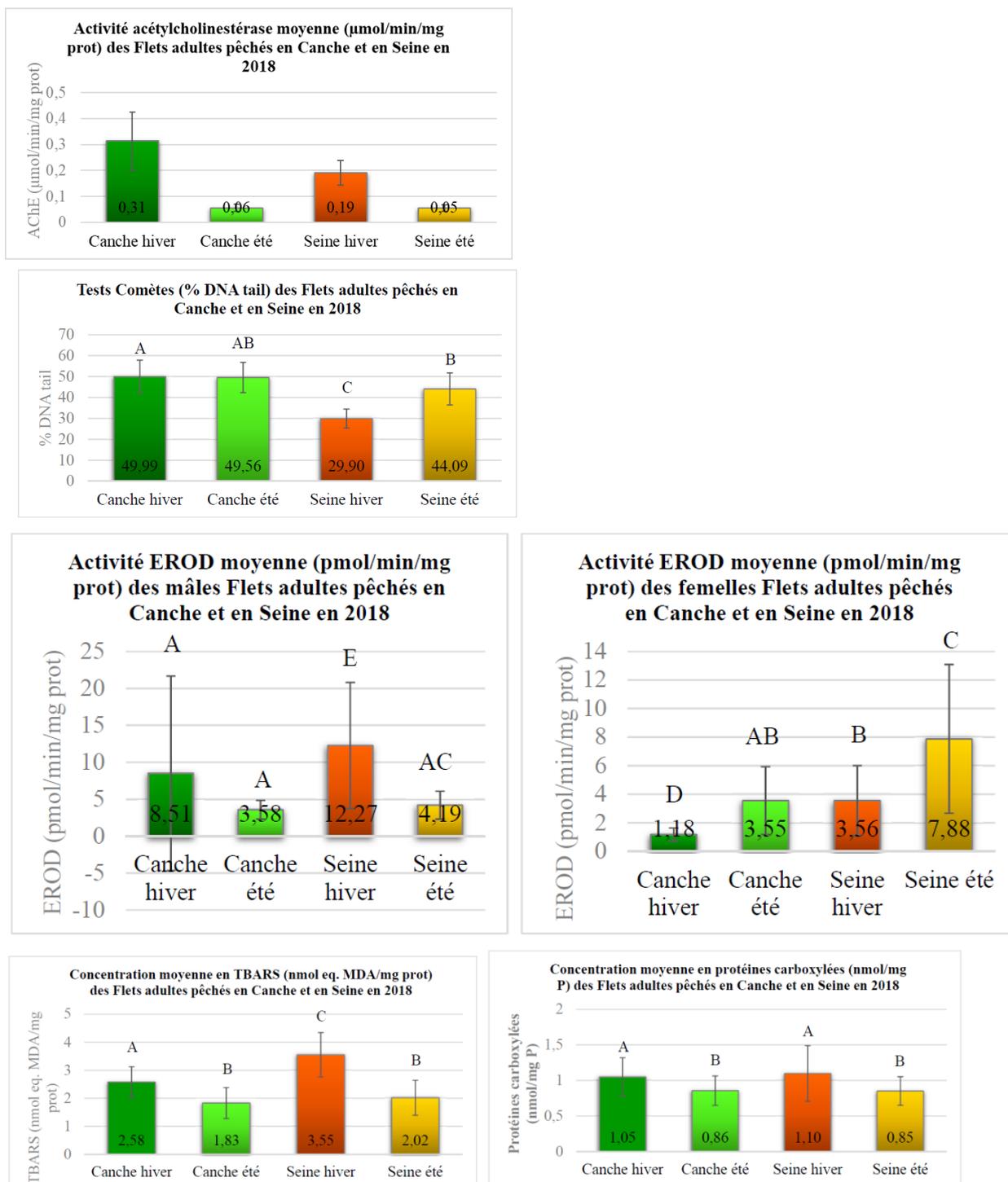


Figure 25 : Biomarqueurs mesurés sur les flets adultes de Canche et Seine : AChE, Test Comètes, EROD mâles, EROD femelles, TBARS, Carbonylation des protéines.

Les activités AChE sur le cerveau sont significativement plus élevées en hiver sur la Canche vs Seine (Fig. 25) ; ce qui traduit une neurotoxicité plus forte en Seine en Janvier. Une forte diminution de l'AChE est observée conjointement en Canche et en Seine en été ; actuellement nous n'avons pas les éléments pour l'interpréter. Notons que l'activité AChE moyenne pour les flets de ce projet HQFish est de 55 nanomoles/min/mg en Juillet 2018, et donc proche de celle observée pour les flets de Seine lors du programme ECOTONE en Juillet 2017 : 75 nanomoles/min/mg.

Le test des Comètes indique au contraire une génotoxicité sur les hématies plus forte en Canche vs Seine en hiver (Fig. 25). Nous suggérons que le stress chimique d'origine essentiellement métallique en Canche, même s'il reste modéré, puisse induire une génotoxicité significative dans la population de flets, quelle que soit la saison. Par ailleurs, plusieurs travaux conduits dans le passé au LEMAR (Marchand et al., 2004, 2013), ont démontré qu'en Seine il existe une véritable pression de sélection du cocktail polluant sur la population de flets, qui retient préférentiellement dans cet estuaire les individus les plus aptes à protéger-réparer leur ADN ; cette adaptation locale de la population se traduisant donc par des signatures de génotoxicité réduites en Seine, malgré la présence importante de composés génotoxiques dans les sédiments.

Les mesures EROD sur le foie (Fig.25) mettent en évidence pour les mâles, une activité plus forte sur la Seine vs Canche en hiver, et pour les femelles, une activité plus forte sur la Seine vs Canche en été. Globalement, les activités de métabolisation des xénobiotiques sont donc plus fortes en Seine vs Canche. On remarque que classiquement l'activité EROD est plus soutenue en hiver chez les mâles relativement aux femelles ; les flets femelles montrant durant la saison de reproduction une corrélation négative entre l'activité EROD et l'indice gonadosomatique (Ferreia et al. 2004).

Les niveaux de TBARS sur la branchie (mesures des dommages liés à la peroxydation lipidique des membranes par le stress oxydant) (Fig. 25) sont plus élevés pour les flets de Seine vs Canche en hiver. Le niveau de carbonylation des protéines de la branchie (autre marqueur de dommage lié au stress oxydant) ne permet pas de différencier Seine vs Canche ; on remarque simplement une plus forte carbonylation pour les deux populations en hiver, période où le stress chimique est plus marqué (Fig. 25).

Résultats des biomarqueurs contrastés en hiver en Seine vs Canche, une période caractérisée par la reproduction du flet coûteuse en énergie, probablement aussi par un flux polluant plus fort au niveau des estuaires, voire par une biodisponibilité plus marquée de certains polluants. L'hiver est donc associé à une sensibilité accrue des poissons face aux multi-stress.

Les signatures neurotoxiques, de métabolisation des xénobiotiques et de stress oxydant sont globalement plus fortes en hiver, en Seine vs Canche. La génotoxicité plus faible observée en Seine vs Canche confirme probablement une adaptation locale de la population de flets de Seine à la contamination chimique chronique (Marchand et al. 2013).

9 Les lipides membranaires (SPG, PS, FS) : de nouveaux biomarqueurs en écotoxicologie ?

Dans un travail récent conduit par le LEMAR (soumis à publication), des explorations ont été menées sur les lipides membranaires dans le muscle de flets capturés en hiver, en estuaire de Seine vs dans un milieu peu contaminé (Baie de Douarnenez). La fréquence de trois phospholipides membranaires augmente en Seine vs Douarnenez : Sphingomyéline (SPG), Phosphatidylsérine (PS) et Stérol libre (FS) ; il a été mis en évidence dans ce travail une



relation positive entre les niveaux de ces 3 phospholipides et la capacité des poissons à gérer le stress oxydatif et à métaboliser les xénobiotiques. Nous avons donc décidé de continuer nos investigations sur les phospholipides dans le cadre du projet HQFish.

Nous confirmons dans ce projet HQFish, la pertinence de ces trois lipides membranaires en écotoxicologie :

- par une augmentation du niveau de SPG, PS et FS, dans les flets adultes, en milieu très pollué (Seine) vs peu contaminé (Canche), ceci en hiver
- par une mise en évidence de leur possible rôle dans la gestion du stress oxydant (voir dans le chapitre sur l'intégration des marqueurs 2.9).

Les lipides de membranes : Sphingomyéline, Phosphatidylsérine & Stérol libre, et plus largement toutes les modifications du métabolisme des phospholipides, pourraient devenir des marqueurs particulièrement pertinents en écotoxicologie aquatique.

10 Activités enzymatiques : CS & G6PDH

La Citrate Synthase est une enzyme de la matrice mitochondriale impliquée dans l'aérobiose au niveau cellulaire, et dont l'activité mesurée dans le muscle peut être considérée comme un proxy du taux d'activité métabolique du poisson. La G6PDH est une enzyme qui conduit à la production de NADPH, élément essentiel pour les réactions de biotransformation et de détoxification ; elle peut être inactivée par les polluants suite à sa carbonylation.

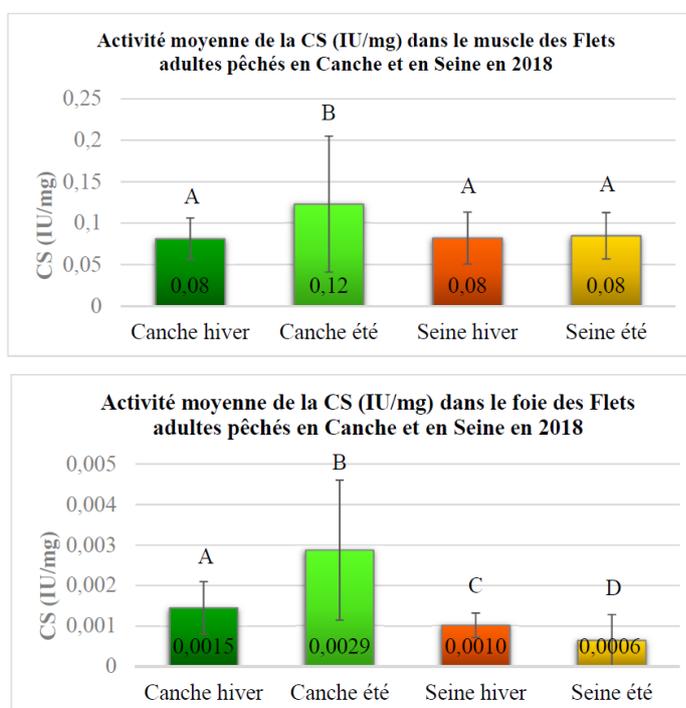


Figure 26 : Activité enzymatique de la Citrate Synthase dans le muscle et le foie de flets adultes.

Les activités enzymatiques mesurées sur la Citrate Synthase mettent en évidence une augmentation de l'activité en passant de l'hiver à l'été pour la Canche, pour le muscle comme pour le foie (Fig. 26) ; cette augmentation n'étant pas observée en Seine. Nous émettons l'hypothèse qu'une possible altération du métabolisme énergétique des flets de Seine ne leur permettrait pas d'augmenter leur niveau d'activité métabolique, parallèlement au réchauffement des eaux en période estivale.

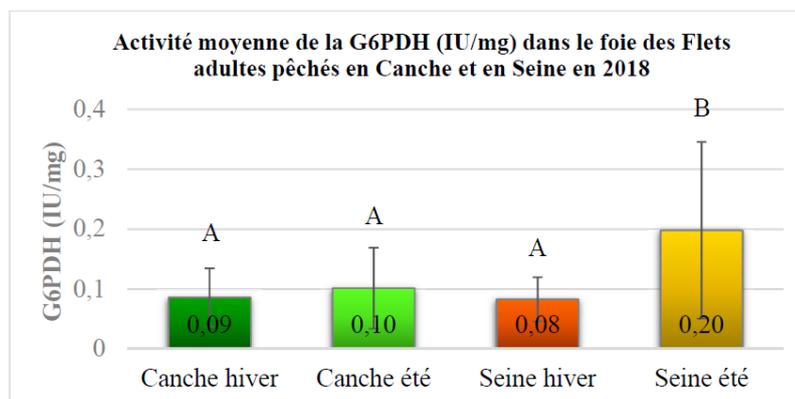


Figure 27 : Activité enzymatique de la G6PDH dans le foie de flets adultes.

Les niveaux d'activité enzymatique de la G6PDH au niveau du foie pour Canche et Seine sont globalement très faibles ($0,10 < \text{activités} < 0,20$) pour cette année 2018 (Fig. 27), relativement à nos mesures réalisées en mars 2016 sur des flets adultes de Douarnenez vs Seine ($0,6 < \text{activités} < 0,9$). Ces faibles valeurs détectées en 2018, pourraient être liées à une inhibition de l'activité de la G6PDH en Canche et Seine, comme cela a été observé sur des flets prélevés dans des estuaires fortement pollués de la Mer du Nord (Van Noorden et al., 1997 ; Koeler, 2004). Ces faibles valeurs de l'activité G6PDH devront être confirmées dans le futur ; elles pourraient refléter une perte relative des capacités du flet à gérer le stress oxydant.

Hypothèses sur une altération du métabolisme énergétique du flet en Seine, et sur une perte relative de la capacité du flet à gérer le stress oxydant en Canche & Seine.

11 Intégration des réponses du flet aux contaminants

Analyses en Composantes Principales : corrélations entre biomarqueurs pour la Seine et la Canche en hiver

Des Analyses en Composantes Principales (ACP) ont été menées en intra-site, pour explorer les relations possibles entre 15 marqueurs biologiques mesurés sur les flets adultes (Hydroxypyrene (Hydroxy P), K, GR, TG/FS, Histopathologie (Histo), AChE, Comètes, TBARS, SPG, PS, FS, CSm (sur le muscle), CSf (sur le foie), G6PDHf, LgT (longueur totale du poisson)).

On remarque sur les figures 28 et 29 présentant l'intégration des différents marqueurs sur les flets adultes respectivement en Canche-Hiver puis Seine-Hiver, période où l'impact du stress chimique est le plus marqué, la distribution des individus (en rouge) et la distribution des 15 variables (en vecteurs). Une similarité entre les 2 analyses est mise en évidence (Fig. 28 & 29), par la signalisation de certains vecteurs en bleu ; nous observons ainsi une convergence remarquable de certains résultats en Canche & Seine, *i.e.* une opposition entre un groupe de vecteurs (SPG, PS, Comet, AChE) et la variable TBARS.

Les flets en hiver montrant les plus fortes teneurs en Sphingomyéline et Phosphatidylsérine dans leurs membranes cellulaires, présentent une neurotoxicité réduite au niveau du cerveau, une génotoxicité élevée au niveau du sang, et une faible peroxydation lipidique au niveau branchial.

Relation positive en hiver entre la teneur des membranes cellulaires en Sphingomyéline et en Phosphatidylsérine et la capacité du flet à gérer le stress oxydant ; confirmation de la pertinence de ces deux phospholipides en écotoxicologie.

Dans un deuxième temps, une ACP a été menée en inter-sites, *i.e.* en comparant les réponses du flet adulte en Canche-Hiver vs Seine-Hiver (Fig. 30). Là aussi nous avons mis en évidence les marqueurs remarquables détectés dans les ACP en intra-site, par une signalisation bleue. Notons de plus, que sur cette figure, nous avons regroupés les flets de Canche dans un ensemble vert vs les flets de Seine dans un ensemble rose.

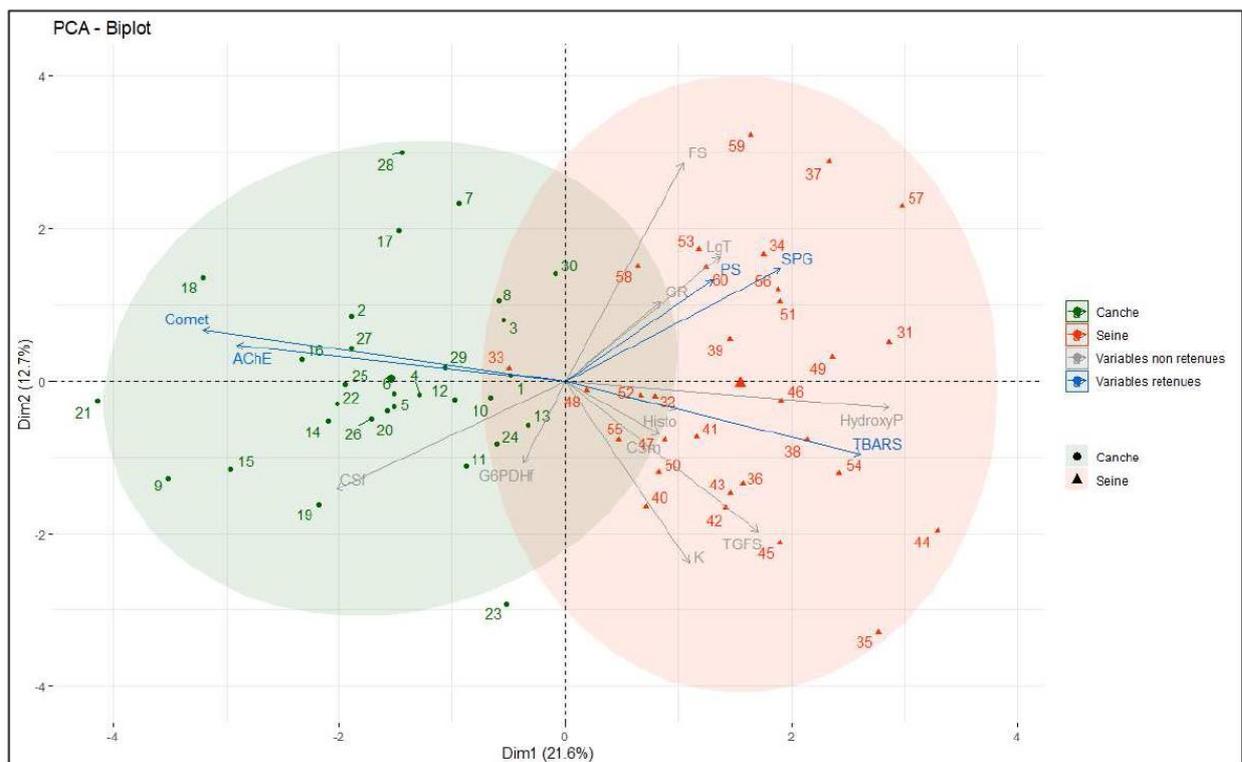


Figure 30 : ACP sur 15 marqueurs biologiques mesurés sur les flets adultes, en Canche-Hiver & Seine-Hiver.

L'analyse menée conjointement sur les deux sites, permet de dégager les grandes tendances du jeu de données en hiver (Fig. 30), la période de plus forte contamination au stress chimique :

- une augmentation de la teneur des membranes cellulaires en Sphingomyéline et en Phosphatidylsérine, en Seine (site très pollué) vs Canche (site modérément pollué)
- une peroxydation lipidique et une neurotoxicité plus marquées en Seine vs Canche

une génotoxicité plus marquée en Canche vs Seine.

IBR : réponse intégrée sur les biomarqueurs

La méthodologie IBR (integrated biomarker response) a été ici mise en œuvre (Devin et al. 2014) pour intégrer les réponses des différents biomarqueurs en Seine et en Canche, en hiver comme en été (Fig. 31).

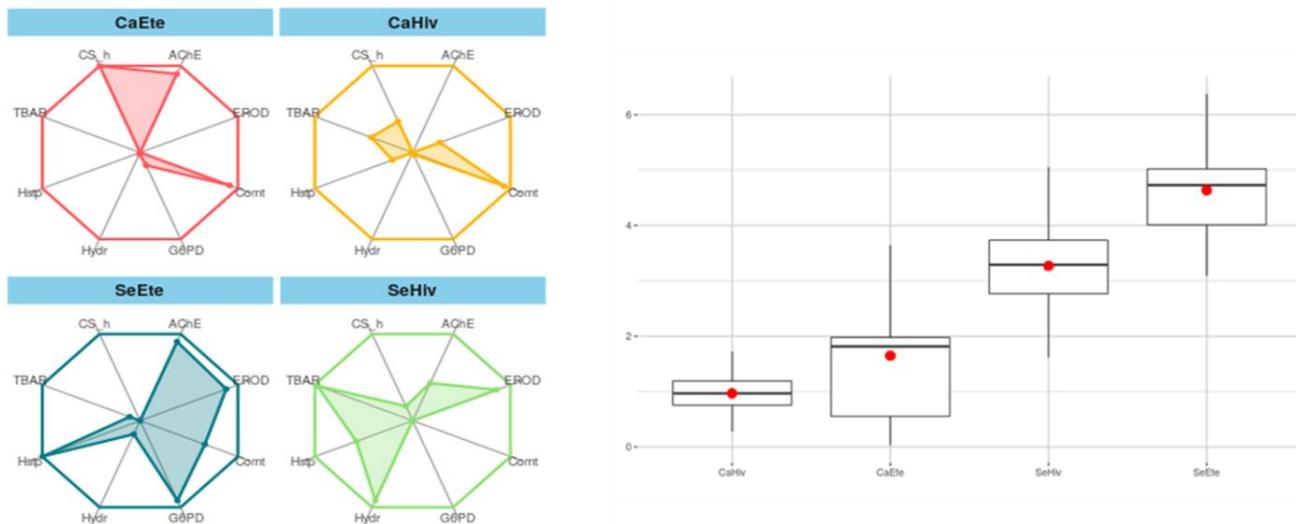


Figure 31 : Figure gauche : synthèse graphique des différents biomarqueurs par site (Ca : Canche, Se : Seine) et par saison (Eté, Hiver) : AChE, EROD, Comt (test Comètes), G6PDH (foie), Hydroxypyrrène, Histopathologie, TBARS, CS (foie).

Figure droite : Valeur de l'IBR qui intègre toutes les réponses des biomarqueurs (de gauche à droite : Canche-hiver, Canche-été, Seine-hiver, Seine-été).

On observe clairement (Fig. 31) que l'IBR de Seine en hiver comme en été est significativement supérieur à celui de Canche ; ceci confirmant que le stress chimique est globalement plus marqué sur les flets adultes de Seine vs Canche. Il faut néanmoins signaler que cette comparaison est ponctuelle et reflète la situation des populations de flet dans les deux estuaires, en Janvier et Juillet 2018.

12 Variabilité génétique de la population de flet de Seine relativement aux estuaires européens

Variabilité génétique neutre mesurée à partir de marqueurs microsatellites

Différentes populations de flet ont été prélevées en Europe (environ 30 individus prélevés par site) du Portugal à la Norvège, en incluant la Mer Baltique (Fig. 32). Ces individus ont été génotypés au niveau de 11 locus neutres de type microsatellite. Nous avons ensuite étudié la diversité génétique intra-populationnelle en calculant par population la diversité allélique (soit le nombre moyen d'allèles par locus) (Fig. 33).

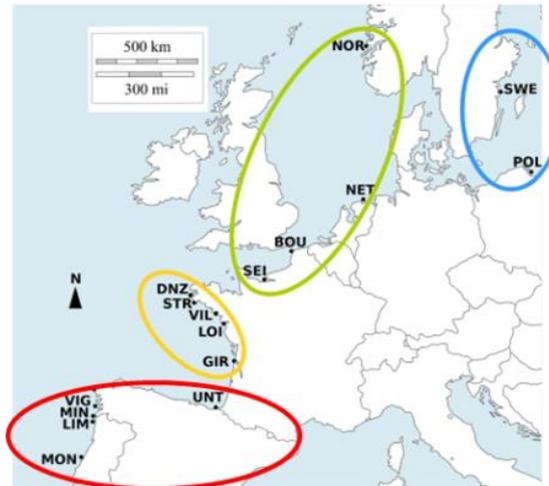


Figure 32 : Populations de flet échantillonnées à travers l'Europe (regroupement des populations en groupes phylogéographiques).



Figure 33 : Diversité génétique (diversité allélique) des populations de flet (ellipse verte : Seine 2005 et 2013)

La diversité génétique de la population de Seine (2005-2013) est conforme à celles observées pour les populations de la Côte Atlantique Française (Fig. 33) ; ce résultat a été confirmé pour la population de Seine en 2016. La population de flet de Seine a maintenu sa diversité génétique et n'a donc pas connu de goulots d'étranglement démographiques récents.

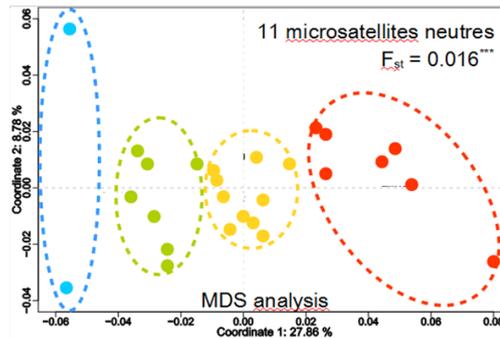


Figure 34 : Structure phylogéographique des populations de flet (l'ellipse verte contient les 2 échantillons de Seine)

L'étude de la différenciation génétique entre les populations, à partir des marqueurs microsatellites, met en évidence l'appartenance de la population de Seine au groupe phylogéographique Manche-Est - Mer du Nord (Fig. 32 & 34 - ellipse verte).

Variabilité génétique étudiée sur PGDS, un gène impliqué dans la réponse aux stress chimiques

La variabilité génétique dans les populations de flet en Seine et en Europe, a été étudiée sur un gène PGDS (Prostaglandine D Synthase : métabolisation & réponses inflammatoires) impliqué dans la réponse aux stress chimiques. Cette variabilité génétique a été analysée par une approche multidimensionnelle (Fig. 35) ; elle met clairement en évidence le regroupement des échantillons de Seine avec d'autres populations particulièrement exposées à la pollution (Hollande et Pologne). Nous émettons en conséquence l'hypothèse d'une probable pression de sélection exercée par le stress chimique sur la population de flet de Seine, qui se traduit par une adaptation locale de cette population à la pollution ; nous confirmons ainsi les travaux précédents de génétique de populations du Laboratoire LEMAR en Seine (Marchand et al., 2010, 2013 ; Calvès et al., 2013).

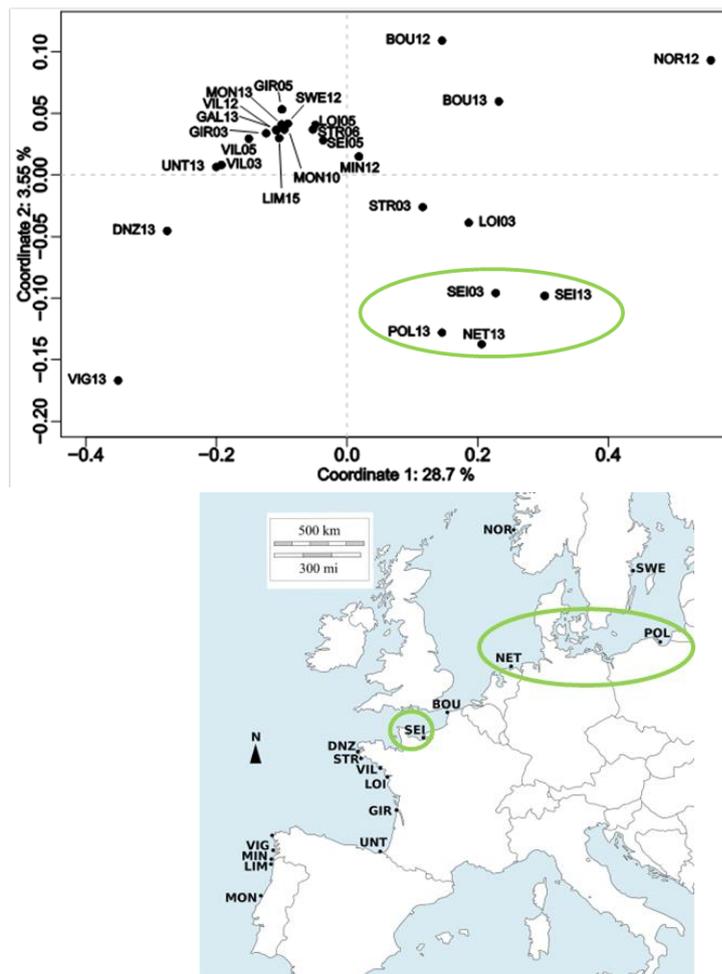


Figure 35 : Analyse MDS : distribution de la variabilité génétique du gène PGDS.

Maintien de la diversité génétique neutre de la population de flet de Seine depuis les années 2005 : pas de déclin démographique récent du flet en Seine.
 Pression de sélection sur des gènes impliqués dans la réponse au stress chimique : adaptation locale de la population de flet de Seine aux contaminants

CONCLUSION & PERSPECTIVES

La biosurveillance active pour évaluer la qualité des zones de nurseries estuariennes

Deux approches ont été développées pour explorer la qualité des zones de nurseries estuariennes en Seine : i) la biosurveillance active avec le déploiement de juvéniles encagés (7 - 9 cm) pendant un mois au niveau de différents sites en Seine et en Canche; ii) la biosurveillance passive avec l'échantillonnage de juvéniles de flets (7 - 9 cm) *in natura*. Cette deuxième approche a montré ses limites avec la difficulté de capturer des flets juvéniles à tous les sites d'intérêt, particulièrement dans un grand système comme la Seine. D'où l'intérêt du caging qui permet un suivi des sites d'intérêts par transplantation de juvéniles de flet calibrés, issus d'une même population et prélevés dans un milieu modérément anthropisé (Canche).

Le projet HQFISH a permis de tester pour la première fois la faisabilité du caging de flets juvéniles, sur un mois avec un certain succès. Le modèle juvénile de flet du fait de ses capacités d'osmorégulation exceptionnelles donne la possibilité de l'utiliser pour un biomonitoring actif pour comparer des habitats oligohalins, méso et polyhalins, dans des estuaires de toutes tailles. La première année d'expérimentation (2017) a aussi permis de mettre en évidence certaines limites de la technique d'encagement. La principale contrainte concerne l'effet de l'encagement sur les réponses biologiques des poissons. Bien que les cages aient été fixées sur le substrat, et présentaient un fond recouvert de quelques centimètres de sédiments facilitant l'accès à la méio- et macrofaune (principales proies des juvéniles de flets), les poissons ont perdu du poids du fait d'un manque très probable d'accessibilité et/ou de disponibilité de la nourriture. HQFISH a néanmoins permis de développer et d'améliorer la technique d'encagement au cours des trois années du suivi ; l'enjeu était d'augmenter le bien-être et de réduire le stress du poisson lié à l'encagement, pour ne pas biaiser l'interprétation des réponses biologiques en lien avec la contamination chimique des milieux étudiés. Différentes améliorations et enrichissements (zone-refuge, abris contre les courants, collecteur d'invertébrés,...) ont été développés et ont permis une nette amélioration de l'alimentation des poissons avec un gain en termes de survie et d'état de santé en fin d'exposition.

Réponses biologiques et qualité des zones de nurserie de la Seine

Si les réponses des indices de fitness et des biomarqueurs mesurés sur les flets encagés sont difficilement interprétables du fait de facteurs confondants liés à "l'effet encagement" et notamment la limitation de la nourriture durant l'encagement, tous les poissons ont bioaccumulé des contaminants dans leur muscle. Par rapport aux témoins les concentrations en contaminants ont augmenté de 3 (métaux) à 8 fois (PCBs). D'ailleurs, les concentrations de contaminants bioaccumulés dans les poissons encagés sont supérieures à celles mesurées dans les poissons *in natura* d'un même site. Toutefois, cette bioaccumulation ne reflète pas la contamination des sédiments qui se caractérise par un gradient croissant de contamination chimique très marquée en Seine (de la Fosse Nord vers Rouen). On suggère par exemple que la biodisponibilité des métaux est limitée pour les poissons de Rouen qui présentent ainsi une faible bioaccumulation, malgré de fortes teneurs métalliques dans les



sédiments. De toute évidence, ces observations illustrent la nécessité de poursuivre les recherches sur la biodisponibilité des contaminants des sédiments et leurs bioaccumulations chez les poissons encagés. Une perspective serait l'utilisation d'échantillonneurs passifs de polluants (POCIS, DGT) fixés au niveau des cages pour mesurer la concentration en contaminant dissous « biodisponibles ». La bioaccumulation des contaminants dans les flets encagés pourrait s'avérer être un bon indicateur de la biodisponibilité des contaminants et donc des risques d'exposition des organismes. Cette approche de biosurveillance active pourrait ainsi servir « d'indicateur d'exposition » et présenter un intérêt pour le monitoring environnemental et le diagnostic du risque environnemental.

L'interprétation et la comparaison inter-sites des réponses biologiques des poissons en lien avec la contamination chimique des milieux étudiés se sont avérées délicates du fait du stress associé à l'encagement. Les marqueurs moléculaires précoces identifiés sur les flets encagés, par la protéomique haut débit, ont néanmoins permis de diagnostiquer les impacts d'un stress chimique croissant sur le poisson, de l'aval vers l'amont de la Seine.

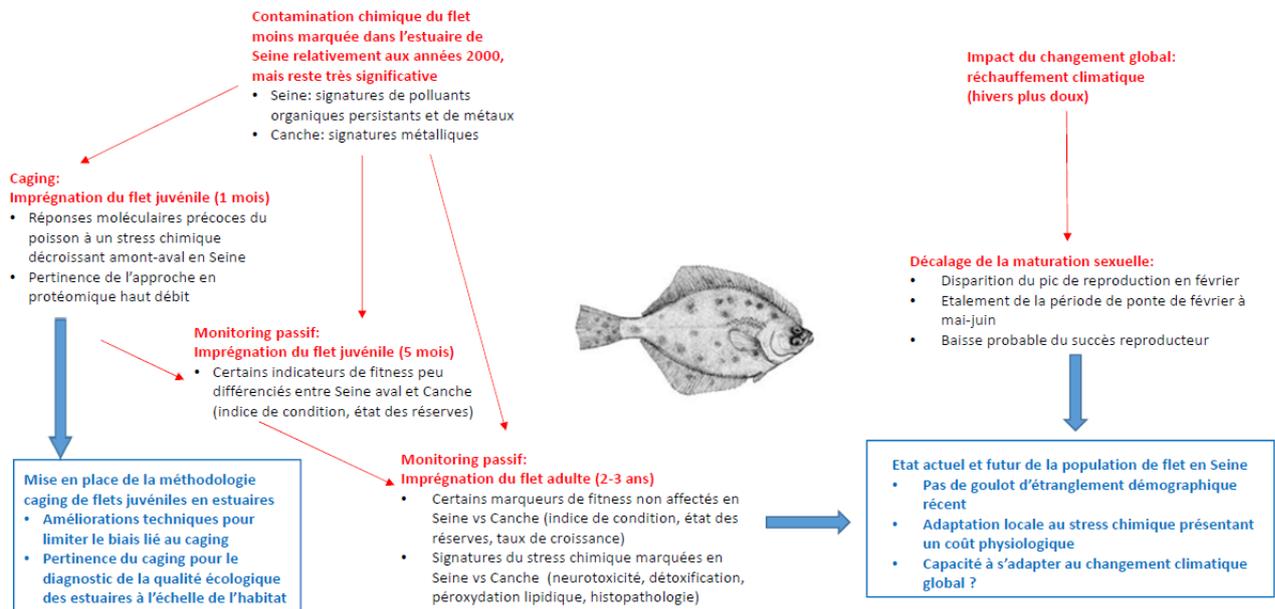
La comparaison de l'état de santé des juvéniles prélevés *in natura* dans la Seine aval (Fosse Nord) et dans la Canche en septembre/octobre (individus ayant séjourné en moyenne 5 mois dans leur estuaire) ne montre pas de différences significatives sur les indicateurs de fitness et les biomarqueurs (sauf pour le TBARS). Cela suggère que les juvéniles de flet ne sont pas a priori plus impactés par le stress chimique dans la partie aval de la Seine vs dans l'estuaire de la Canche. Ce résultat contraste avec la situation décrite dans les années 2000 qui montrait un moins bon état de santé des juvéniles de flet de la Seine par rapport à la Canche (Amara et al., 2009 ; Kerambrun et al., 2013 ; Henry et al., 2014 ; Dupuy et al., 2015). L'amélioration globale de la qualité chimique des eaux de la Seine depuis les années 2000 et la situation aval des prélèvements (moindre contamination à l'embouchure) pourraient expliquer ce résultat. D'autres études sont nécessaires pour confirmer cette tendance.

Le projet HQFISH a montré que la biosurveillance active et passive apportent des informations complémentaires. La première approche peut être utilisée comme un outil de diagnostic d'un site donné pendant une durée d'exposition donnée. Elle permet de développer une vision plus fine à « micro-échelle » dans un habitat donné et/ou pour le biomonitoring environnemental, là où le modèle biologique est absent. Elle présente un fort intérêt lors d'une pollution aiguë ou le suivi de remédiation d'un site. L'amélioration du protocole de caging de juvéniles de flet offre aujourd'hui de très bonnes perspectives d'application comme celles mise en oeuvre dans le cadre de l'évaluation des impacts sur la Seine de l'accident Lubrizol (Annexe 1) ou plus largement le cadre du projet Biosurveillance*.

** Le projet Biosurveillance a pour objectif principal de proposer un pilote, basé sur la méthodologie développée dans le projet SASHIMI- (Surveillance active de l'impact de la pression chimique par des biomarqueurs- financement AFB), afin d'appuyer la surveillance des masses d'eau continentales, de transition et côtières sur le district Seine Normandie.*



Bilan sur l'état de santé de la population de flets de Seine et sur les capacités d'accueil futures de l'estuaire de Seine pour les populations de poissons



En analysant les réponses moléculaires précoces du flet, par la protéomique haut débit, nous avons constaté que les poissons encagés sur un mois présentent des signatures de détoxification vis-à-vis des xénobiotiques nettement plus marquées dans la partie amont vs aval de l'estuaire de Seine, tout en maintenant leurs indicateurs de fitness, le temps d'exposition restant réduit.

Si on s'intéresse maintenant aux flets juvéniles natifs de Seine, capturés en aval (Fosse Nord) l'impact du stress chimique est non détectable relativement aux individus natifs de Canche ; la disponibilité importante en nourriture en Seine aval et la dilution des polluants par les flux de marées pourraient limiter les effets des polluants. Notons par ailleurs que la période d'exposition aux contaminants estuariens est encore ici assez limitée pour ces individus natifs (5 mois) ; un suivi temporel d'une cohorte de flet en estuaire de Vilaine ayant détecté un accroissement très significatif des dommages cellulaires, de l'activité métabolique et de la détoxification, après 7 à 8 mois d'exposition de cette cohorte aux polluants dans son milieu naturel (Evrard et al. 2013).

Au bout de 2 à 3 ans d'exposition, les poissons adultes capturés en Seine présentent certains indicateurs de fitness convergents avec ceux de Canche, mais des signatures de réponse au stress chimique plus élevées (pathologie hépatique, neurotoxicité, détoxification, peroxydation lipidique), ainsi qu'une possible perte de fertilité (à confirmer par des expériences complémentaires). Ces résultats reflètent le statut physiologique des populations de flet en Seine vs Canche identifié en Janvier et Juillet 2018 ; les tendances détectées sur la population de flet de Seine devront être confirmées dans les futurs travaux du GIP Seine-Aval.

La population de flet de Seine présente une adaptation locale à la contamination chimique démontrée par les outils génétiques et par une certaine capacité de résistance vis-à-vis de la génotoxicité (Marchand et al., 2004, 2013 ; Calvès et al., 2013 ; ce projet HQFish), mais qui

implique donc un coût physiologique probablement important. Le coût énergétique lié au stress conduit les organismes à mettre en place des compromis « trade-off » pour gérer leurs différentes fonctions, certaines étant préservées et d'autres altérées, suivant la nature et l'intensité du stress (Sokolova, 2013).

Par les outils génétiques nous avons démontré par ailleurs que la population de flet de Seine a conservé sa diversité génétique neutre relativement aux populations d'autres estuaires européens, et donc qu'elle n'a pas subi de déclin démographique récents. Cet indicateur pourrait être a priori considéré comme un facteur de stabilité pour le futur de la population de flet de Seine.

Cependant, nous observons dans ce projet HQFish que le réchauffement climatique global impacte très directement la biologie de la reproduction du flet, en Seine comme en Canche, en décalant sa maturation sexuelle dans le temps, et en conduisant à un certain étalement de la période de ponte pouvant être préjudiciable au succès reproducteur. De plus, on peut s'interroger sur la capacité particulièrement de la population de Seine à faire face au réchauffement climatique en cours ; en effet, son adaptation locale au stress chimique pourrait compromettre son aptitude à répondre à un stress additionnel, comme le réchauffement des eaux ; des travaux récents ayant démontré que le coût de l'adaptation locale au stress chimique chronique se traduit par des altérations métaboliques des poissons estuariens réduisant leur tolérance thermique ; ceci chez le flet (Lavergne et al., 2015), comme chez *Fundulus heteroclitus*, une espèce modèle particulièrement étudiée en Ecotoxicologie Evolutive en Amérique du Nord (Jayasundara et al., 2017).

Nous suggérons donc au final que la population de flet de Seine présente un risque écologique et que l'impact du multi-stress (réchauffement climatique global et pollution locale) devra être étudié avec attention dans la prochaine décennie.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : METHODES D'ETUDE DES EFFETS BIOLOGIQUES DES CONTAMINATIONS CHIMIQUES EN RELATION AVEC LEUR PERTINENCE ECOLOGIQUE ET TOXICOLOGIQUE (MODIFIEE DE TRIEBSKORN ET AL., 2001)	9
FIGURE 2 : LOCALISATION DES SITES D'IMPLANTATION DES CAGES. À NOTER QU'AU NIVEAU DE FOSSE SUD LES CAGES N'ONT PAS ETE RETROUVEES.	14
FIGURE 3 : CONCENTRATIONS EN ELEMENTS-TRACES METALLIQUES, PCB ET HAP DANS LES SEDIMENTS (EN MG/G DE POIDS SEC). (LES MEMES LETTRES AU-DESSUS DES HISTOGRAMMES INDIQUENT L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE).	15
FIGURE 4 : CONCENTRATIONS EN ELEMENTS-TRACES METALLIQUES ET EN PCB DANS LES MUSCLES DE JUVENILES DE FLET ENCAGES COMPARES AU TEMOIN (POISSONS ANALYSES AVANT LA MISE EN CAGE). (LES MEMES LETTRES AU-DESSUS DES HISTOGRAMMES INDIQUENT L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE).....	16
FIGURE 5 : (A) INDICE DE CONDITION K DE FULTON ; (B) CROISSANCE RECENTE DE L'OTOLITHE (LARGEUR DES 15 DERNIERS ACCROISSEMENTS) ; (C) RAPPORT ARN/ADN ; (D) RAPPORT TAG/ ST ET (E) CONCENTRATION EN PROTEINES DES JUVENILES DE FLETS ENCAGES UN MOIS AU NIVEAU DES 3 SITES EN SEINE (ROUEN, FOSSE NORD ET AVANT- PORT DU HAVRE) ET DE LA CANCHE. LES VALEURS DU TEMOIN CORRESPONDENT AUX FLETS DE LA CANCHE STABULES AVANT MISE EN CAGE. (LES MEMES LETTRES AU-DESSUS DES HISTOGRAMMES INDIQUENT L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE).....	18
FIGURE 6 : IBR FITNESS MOYEN DES JUVENILES DE FLETS ENCAGES UN MOIS AU NIVEAU DES 3 SITES EN SEINE (ROUEN, FOSSE NORD ET AVANT-PORT DU HAVRE) ET DE LA CANCHE. LES VALEURS DU TEMOIN CORRESPONDENT AUX FLETS DE LA CANCHE STABULES AVANT MISE EN CAGE.....	18
FIGURE 7 : CAGE DEVELOPPEE DANS LE PROJET HQFISH POUR L'ENCAGEMENT DES JUVENILES DE FLETS AVEC DIFFERENTES AMELIORATIONS ET ENRICHISSEMENT POUR FAVORISER LE BIEN-ETRE DES POISSONS.	19
FIGURE 8 : COMPARAISON DE QUELQUES INDICATEURS DE FITNESS DE JUVENILES DE FLET ENCAGES AVANT (2017) ET APRES (2019) LES AMELIORATIONS ET ENRICHISSEMENTS DE LA TECHNIQUE DE CAGING. LES COMPARAISONS ONT ETE REALISEES AU NIVEAU DE 2 SITES : LA CANCHE ET PETIT-COURONNE (ROUEN). (A) : TAUX DE SURVIE AU BOUT D'UN MOIS D'ENCAGEMENT (%) ; (B) TAUX DE CROISSANCE EN POIDS (G/JOUR) ; (C) INDICE DE CONDITION DE FULTON K ET (D) : CONCENTRATION EN PROTEINES DES MUSCLES ($\mu\text{G}/\text{MG}$).	20
FIGURE 9 : COMPARAISON DES REPONSES DE CERTAINS BIOMARQUEURS CHEZ DES JUVENILES DE FLETS ENCAGES UN MOIS AU NIVEAU DES 3 SITES EN SEINE (ROUEN, FOSSE NORD ET AVANT- PORT DU HAVRE) ET DE LA CANCHE. LE TEMOIN CANCHE CORRESPOND AUX POISSONS CAPTURES EN CANCHE.....	21
FIGURE 10 : SIGNATURES PROTEOMIQUES DES FLETS ENCAGES A ROUEN ET FOSSE NORD PAR RAPPORT A CEUX ENCAGES DANS LA CANCHE.	22
FIGURE 11 : COMPARAISON DES CONCENTRATIONS EN CONTAMINANTS METALLIQUES (A), PCB (B) ET PESTICIDES (C) ENTRE JUVENILES DE FLETS CAPTURES IN NATURA ET ENCAGES UN MOIS SUR LE MEME SITE EN CANCHE ET AU NIVEAU DE FOSSE NORD.	24
FIGURE 12 : COMPARAISON DES INDICATEURS DE FITNESS (INDICE DE CONDITION K, CROISSANCE RECENTE DE L'OTOLITHE, CONCENTRATION EN PROTEINES, ET RESERVES LIPIDIQUES TAG/ST) ET DES BIOMARQUEURS (% DNA TAIL, PROTEINES CARBONYLEES, TBARS) MESURES SUR DES JUVENILES (7- 9 CM) DE FLETS CAPTURES EN SEPTEMBRE 2017 EN CANCHE ET DANS LA PARTIE AVAL (FOSSE NORD) DE LA SEINE.	25
FIGURE 13 : COMPARAISON DE L'EVOLUTION DES CONCENTRATIONS EN CONTAMINANTS METALLIQUES (Σ Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Pb, Ni) DANS LES SEDIMENTS ET LES JUVENILES DE FLET PRELEVES EN CANCHE ET DANS LA PARTIE AVAL DE LA SEINE EN 2008 (HENRY ET AL., 2012) ET EN 2017 (PROJET HQFISH). A NOTER QU'EN 2008, LES DOSAGES DE CONTAMINANTS ONT ETE REALISES SUR DES FLETS PLUS PETITS CAPTURES EN JUIN ET DONC QUI ONT EU UNE DUREE D'IMPREGNATION EN ESTUAIRE PLUS COURTE QU'EN 2017.....	26
FIGURE 14 : CONCENTRATIONS EN PCBs ET PESTICIDES ORGANOCHLORES-ORGANOPHOSPHORES DANS LE FOIE DE FLETS ADULTES EN CANCHE ET EN SEINE EN HIVERS ET EN ETE 2018 (RESULTATS EXPRIMES / POIDS SEC).....	28



FIGURE 15 : CONCENTRATIONS EN METAUX DANS LE FOIE DE FLETS ADULTES EN CANCHE ET EN SEINE (RESULTATS EXPRIMES / POIDS SEC).	28
FIGURE 16 : DOSAGE DE L'HYDROXYPYRENE DANS LA BILE DE FLETS ADULTES EN CANCHE ET EN SEINE.	30
FIGURE 17 : INDICE DE CONDITION DES FLETS ADULTES EN CANCHE ET SEINE.	31
FIGURE 18 : TAUX DE CROISSANCE ESTIME PAR RETROCALCUL SUR LES OTOLITHES DU FLET, ENTRE LE DEBUT DU PREMIER HIVER ET LE DEBUT DU DEUXIEME HIVER.	32
FIGURE 19 : ETAT DES RESERVES LIPIDIQUES (TRIGLYCERIDE/STEROL LIBRE) DANS LE MUSCLE DE FLETS ADULTES.....	32
FIGURE 20 : NOTE DE GRAVITE POUR LES SIGNATURES HISTO-PATHOLOGIQUES DETECTEES SUR LE FOIE DES FLETS ADULTES.....	34
FIGURE 21 : RAPPORT GONADO-SOMATIQUE (RGS) EN JANVIER ET JUILLET 2018 POUR SEINE & CANCHE. 35	
FIGURE 22 : INDICE DE MATURATION SEXUELLE DES FLETS FEMELLES EN JANVIER ET JUILLET 2018.....	35
FIGURE 23 : DOSAGES DANS LE PLASMA DE LA 11KT CHEZ LES FLETS MALES ET DE E2 CHEZ LES FLETS FEMELLES.....	36
FIGURE 24 : DOSAGES DE LA VITELLOGENINE PLASMATIQUE CHEZ LES FLETS MALES.	36
FIGURE 25 : BIOMARQUEURS MESURES SUR LES FLETS ADULTES DE CANCHE ET SEINE : ACHE, TEST COMETES, EROD MALES, EROD FEMELLES, TBARS, CARBONYLATION DES PROTEINES.....	42
FIGURE 26 : ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CITRATE SYNTHASE DANS LE MUSCLE ET LE FOIE DE FLETS ADULTES.....	44
FIGURE 27 : ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA G6PDH DANS LE FOIE DE FLETS ADULTES.....	45
FIGURE 28 : ACP SUR 15 MARQUEURS BIOLOGIQUES MESURES SUR LES FLETS ADULTES, EN CANCHE-HIVER.	46
FIGURE 29 : ACP SUR 15 MARQUEURS BIOLOGIQUES MESURES SUR LES FLETS ADULTES, EN SEINE-HIVER. 46	
FIGURE 30 : ACP SUR 15 MARQUEURS BIOLOGIQUES MESURES SUR LES FLETS ADULTES, EN CANCHE-HIVER & SEINE-HIVER.	47
FIGURE 31 : FIGURE GAUCHE : SYNTHESE GRAPHIQUE DES DIFFERENTS BIOMARQUEURS PAR SITE (CA : CANCHE, SE : SEINE) ET PAR SAISON (ETE, HIVER) : ACHE, EROD, COMT (TEST COMETES), G6PDH (FOIE), HYDROXYPYRENE, HISTOPATHOLOGIE, TBARS, CS (FOIE).	48
FIGURE 32 : POPULATIONS DE FLET ECHANTILLONNEES A TRAVERS L'EUROPE (REGROUPEMENT DES POPULATIONS EN GROUPES PHYLOGEOGRAPHIQUES).....	49
FIGURE 33 : DIVERSITE GENETIQUE (DIVERSITE ALLELIQUE) DES POPULATIONS DE FLET (ELLIPSE VERTE : SEINE 2005 ET 2013)	49
FIGURE 34 : STRUCTURE PHYLOGEOGRAPHIQUE DES POPULATIONS DE FLET (L'ELLIPSE VERTE CONTIENT LES 2 ECHANTILLONS DE SEINE).....	50
FIGURE 35 : ANALYSE MDS : DISTRIBUTION DE LA VARIABILITE GENETIQUE DU GENE PGDS.	51

TABLEAU 1 : LISTE DES INDICATEURS DE FITNESS ET DES BIOMARQUEURS MESURES SUR LES JUVENILES DE FLET.....	13
--	----

BIBLIOGRAPHIE

- Abarnou, A., Burgeot, T., Chevreuil, M., Leboulenger, F., Loizeau, V., Madoulet-Jaouen, A., & Minier, C. (2000). Programme Seine Aval.
- Able, K. W., Manderson, J. P., & Studholme, A. L. (1999). Habitat quality for shallow water fishes in an urban estuary: the effects of man-made structures on growth. *Marine Ecology Progress Series*, 187, 227-235.
- Amara, R. (2003). Localisation et diagnostic de l'état de santé des nourriceries d'espèces d'intérêt halieutique en Manche Orientale et sur le littoral atlantique. Rapport de contrat final Liteau du MEDD.
- Amara R, Meziane T, Gilliers C, Hermel G, Laffargue P (2007) Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Marine Ecology Progress Series* 351: 201-208
- Amara, R., Selleslagh, J., Billon, G., Minier, C., 2009. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia* 627, 87–98.
- Archambault, B., Rivot, E., Savina, M., & Le Pape, O. (2015). Using a spatially structured life cycle model to assess the influence of multiple stressors on an exploited coastal-nursery-dependent population. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*.
- Beck, M. W., Heck, K. L., Able, K. W., Childers, D. L., Eggleston, D. B., Gillanders, B. M., ... & Orth, R. J. (2001). The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates: a better understanding of the habitats that serve as nurseries for marine species and the factors that create site-specific variability in nursery quality will improve conservation and management of these areas. *Bioscience*, 51(8), 633-641.
- Bervoets, L., Van Campenhout, K., Reynders, H., Knapen, D., Covaci, A., & Blust, R. (2009). Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3), 720-728.
- Beyer, J., Aas, E., Borgenvik, H. K., & Ravn, P. (1998). Bioavailability of PAH in effluent water from an aluminium works evaluated by transplant caging and biliary fluorescence measurements of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Marine Environmental Research*, 46(1-5), 233-236.
- Beyer, J., Sandvik, M., Hylland, K., Fjeld, E., Egaas, E., Aas, E., & Skåre, J. U. (1996). in Sørfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology*, 36, 75-98.
- Burgeot T., C. Minier, G. Bocquené, D. Vincent, J. Cachot, V. Loizeau, A. Jaouen, P. Lesueur, P. Miramand, T. Guyot, E. Rochard & P. Boet, 2000. Des organismes sous stress. Collection de fascicules du programme Scientifique Seine Aval. 14, Eds IFREMER, 39 p.
- Borcier E., Artigaud S., Gaillard J. C., Armengaud J., Charrier G., Couteau J., Receveur J., Ouddane B., Diop M., Amara R., Laroche J., Pichereau V. (2019). Coupling caging and proteomics on the European flounder (*Platichthys flesus*) to assess the estuarine water quality at micro scale. *Science of the Total Environment*, 695, 133760
- Brylinski J.M., Lagadeuc Y., Gentilhomme V., Dupont J.P., Lafite R., Dupeuble P.A., Huault M.F., Auger Y., Puskaric E., Wartel M., Cabioch L. (1991). Le "fleuve côtier": un phénomène hydrologique important en Manche orientale. Exemple du Pas-de-Calais. *Oceanologica Acta*. vol. sp. N°11, 197-203

- Cachot, Jerome, Minier, Christophe, LAW, Mac, *et al.* The use of embryos of the Lambda cII transgenic medaka to assess short and long term effects of sediment-sorbed pollutants: Application to sediments of the Seine estuary (Normandy, France). In : Marine Environmental Research.
- Cachot J, Chereil Y, Larcher T, Pfohl-Leszkowicz A, Laroche J, Quiniou L, Morin J, Schmitz J, Burgeot T, Pottier D (2013). Histopathological lesions and DNA adducts in the liver of European flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Seine estuary versus two reference estuarine systems on the French Atlantic coast. *Environmental Science and Pollution Research*. 20 : 723-737.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., ... & Budzinski, H. (2006). Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic toxicology*, 79(3), 257-267.
- Calvès I., Lavergne E., Meistertzheim A.L., Charrier G., Cabral H., Guinand B., Quiniou L., Laroche J. (2013). Genetic structure of European flounder (*Platichthys flesus*): effects of both the southern limit of the species' range and chemical stress. *Marine Ecology Progress Series*. 472, 257-273
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., & Parma, M. J. (2014). Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: a field caging study. *Ecological indicators*, 38, 104-112.
- COURRAT A, J. LOBRY, D. NICOLAS, P. LAFFARGUE, R. AMARA, M. LEPAGE, M. GIRARDIN, O. LE PAPE. 2009. Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 81: 179-190.
- Dale, K., Müller, M. B., Tairova, Z., Khan, E. A., Hatlen, K., Grung, M., ... & Lyche, J. L. (2019). Contaminant accumulation and biological responses in Atlantic cod (*Gadus morhua*) caged at a capped waste disposal site in Kollevåg, Western Norway. *Marine environmental research*, 145, 39-51.
- Dando P.R. (2011). Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder, *Platichthys flesus* (L.), in the Tamar Estuary, South-West England. *Marine Ecology Progress Series*. 430, 183-196
- Dargnat, C., & Fisson, C. (2010). Les PolyChloroBiphényles (PCB) dans le bassin de la Seine et son estuaire. *Etude réalisée par le GIP Seine-Aval*.
- Dauvin, J.C., 2008, Effects of heavy metal contamination on the macrobenthic fauna in estuaries : The case of the Seine estuary. *Marine Pollution Bulletin* 57, 160-169.
- Daverat, F., Morais, P., Dias, E., Babaluk, J., Martin, J., Eon, M., ... & Antunes, C. (2012). Plasticity of European flounder life history patterns discloses alternatives to catadromy. *Marine Ecology Progress Series*, 465, 267-280.
- De Groot, S. J. (1971). On the interrelationships between morphology of the alimentary tract, food and feeding behaviour in flatfishes (Pisces: Pleuronectiformes). *Netherlands Journal of Sea Research*, 5(2), 121-196.
- de Cerio, O. D., Bilbao, E., Izagirre, U., Etxebarria, N., Moreno, G., Díez, G., ... & Cancio, I. (2018). Toxicology tailored low density oligonucleotide microarray for the thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*): Biomarker gene transcription profile after caging in a polluted harbour. *Marine environmental research*, 140, 265-277.
- Delahaut, V., Daelemans, O., Sinha, A. K., De Boeck, G., & Bervoets, L. (2019). A multibiomarker approach for evaluating environmental contamination: Common carp (*Cyprinus carpio*) transplanted along a gradient of metal pollution. *Science of The Total Environment*, 669, 481-492.
- Devin S., Burgeot T., Gambiérini L., Minguez L., Pain-Devin S. (2014). The integrated biomarker response revisited : optimization to avoid misuse. *Environmental Science and Pollution Research*. 21, 2448-2454

- Duffy-Anderson, J. T., & Able, K. W. (1999). Effects of municipal piers on the growth of juvenile fishes in the Hudson River estuary: a study across a pier edge. *Marine Biology*, 133(3), 409-418
- Dupuy C., Galland C., Pichereau V., Sanchez W., Amara R., Charrier G., Laroche J. (2015). Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Marine Pollution Bulletin*, 95: 634–645.
- Evrard E., Devaux A., Bony S., Burgeot T., Riso R., Budzinski H., Le Du M., Quiniou L., Laroche J. (2010). Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries : load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers*, 15(2) : 111-127
- Evrard E., Devaux A., Bony S., Cachot J., Charrier G., Quiniou L., Laroche J. (2013). Responses of juvenile European flounder (*Platichthys flesus*) to multistress in the Vilaine estuary, during a 6-month survey. *Environmental Science and Pollution Research*. 20: 676-689
- Ferreira M, Antunes P, Gil O, Vale C, Reis-Hentiques MA (2004). Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet *Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 69(4), 347-357
- Freitas, V., Costa-Dias, S., Campos, J., Bio, A., Santos, P., & Antunes, C. (2009). Patterns in abundance and distribution of juvenile flounder, *Platichthys flesus*, in Minho estuary (NW Iberian Peninsula). *Aquatic ecology*, 43(4), 1143.
- Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Betoulle, S., Amara, R., Camilleri, V., Cavalié, I., ... & Palluel, O. (2015). Former uranium mine-induced effects in caged roach: a multiparametric approach for the evaluation of in situ metal toxicity. *Ecotoxicology*, 24(1), 215-231.
- Gallien-Landriau I. (2003). Etude de l'altération fonctionnelle du système reproducteur par les perturbateurs endocriniens. Caractérisation des effets, identification des xéno-estrogènes impliqués et conséquences sur les populations de poissons en estuaire et Baie de Seine. Thèse de Doctorat, Université du Havre, 151pp
- Goksøyr, A., Beyer, J., Husøy, A. M., Larsen, H. E., Westrheim, K., Wilhelmsen, S., & Klungsøyr, J. (1994). Accumulation and effects of aromatic and chlorinated hydrocarbons in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) caged in a polluted fjord (Sørfjorden, Norway). *Aquatic Toxicology*, 29(1-2), 21-35.
- Greenfield, R., Brink, K., Degger, N., & Wepener, V. (2014). The usefulness of transplantation studies in monitoring of metals in the marine environment: South African experience. *Marine pollution bulletin*, 85(2), 566-573.
- Henry F, Amara R, Courcot L, Lacouture D, Bertho ML (2004). Heavy metals in four fish species from the French coast of the Eastern English Channel and Southern Bight of the North Sea. *Environment International*, 30, 675-683.
- HENRY F, I. FILIPUCI, G. BILLON, L. COURCOT, E. KERAMBRUN AND R. AMARA. 2012. Metal concentrations, growth and condition indices in European juvenile flounder (*Platichthys flesus*) relative to sediment contamination levels in four Eastern English Channel estuaries. *J. Environ. Monit.*, 2012, 14, 3211-3220.
- Jayasundara N., Fernando P.W., Osterberg J.S., Cammen K.M., Schultz T.F., Di Giulio T. (2017). Cost of tolerance: physiological consequences of evolved resistance to inhabit a polluted environment in teleost fish *Fundulus heteroclitus*. *Environmental Science and Technology*. 51, 8763-8772
- Kamman U., Akcha F., Budzinski H., Burgeot T., Gubbins M.J., Lang T., Le Menach K., Vethaak A.D., Hylland K. (2017). PAH metabolites in fish bile: from the Seine estuary to Iceland. *Marine Environmental Research*. 124, 41-45

- Koehler A. (2004). The gender-specific risk to liver toxicity and cancer of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the German Wadden Sea coast. *Aquatic Toxicology*, 70, 257-276
- Kopko O., Dabrowska H., 2018. Variability of biological indices, biomarkers, and organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) in the Gulf of Gdańsk, southern Baltic Sea. *Chemosphere*, 194, 701-713
- Lacroix, C., Richard, G., Seguineau, C., Guyomarch, J., Moraga, D., & Auffret, M. (2015). Active and passive biomonitoring suggest metabolic adaptation in blue mussels (*Mytilus* spp.) chronically exposed to a moderate contamination in Brest harbor (France). *Aquatic Toxicology*, 162, 126-137.
- Lavergne, E., Pedron, N., Calves, I., Claireaux, G., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J., Le Bayon, N., Cahu, C., Laroche, J., 2015. Does the chronical chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? *Mar. Poll. Bull.* 95, 658-664
- Le Pape, O., Gilliers, C., Riou, P., Morin, J., Amara, R., & Désaunay, Y. (2007). Convergent signs of degradation in both the capacity and the quality of an essential fish habitat: state of the Seine estuary (France) flatfish nurseries. *Hydrobiologia*, 588(1), 225-229.
- Kellison, G. T., Eggleston, D. B., Taylor, J. C., & Burke, J. S. (2003). An assessment of biases associated with caging, tethering, and trawl sampling of summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Estuaries*, 26(1), 64-71.
- Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, F., & Amara, R. (2011). Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154(3), 187-195.
- Kerambrun E., Le Floch S., Sanchez W., Thomas Guyon H., Meziane T., Henry F., Amara R. 2012. Responses of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to acute concentrations of crude oil, as assessed by molecular and physiological biomarkers. *Chemosphere*, 87, 692-702.
- Kerambrun, E., Henry, F., Cornille, V., Courcot, L., & Amara, R. (2013). A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere*, 91(4), 498-505.
- Kerstan, M. (1991). The importance of rivers as nursery grounds for 0-and 1-group flounder (*Platichthys flesus* L.) in comparison to the Wadden Sea. *Netherlands Journal of Sea Research*, 27(3-4), 353-366.
- Lawrence, A.J., Arukwe, A., Moore, M., Sayer, M., Thain, J., 2003 Molecular/cellular processes and the physiological response to pollution. In: *Effects of pollution on fish, molecular effects and population responses* (eds. Lawrence A. J., Hemingway K. L.), 83– 133. Blackwell Sciences.
- Le Guernic, A., Sanchez, W., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Turies, C., Chadili, E., ... & Betoulle, S. (2016). In situ experiments to assess effects of constraints linked to caging on ecotoxicity biomarkers of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Fish physiology and biochemistry*, 42(2), 643-657.
- Lundgreen K, Kiilerich P, Tipsmark CK, Madsen SS, Jensen FB (2008). Physiological response in the European flounder (*Platichthys flesus*) to variable salinity and oxygen conditions. *Journal of Comparative Physiology B*, 178: 909-915.
- Lyons B.P., Stentiford G.D., Green M., Bignell J., Batman K., Feist S.W., Goodsir F., Reynolds W.J., Thain J.E. (2004). DNA adduct analysis and histopathological

- biomarkers in European flounder (*Platichthys flesus*) sampled from UK estuaries. *Mutation Research* 552, 177-186
- Marchand J., Evrard E., Guinand B., Cachot J., Quiniou L., Laroche J. (2010). Genetic polymorphism and its potential relation to environmental stress in five populations of the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Marine Environmental Research*. 70 : 201-209
- Marchand J, Quiniou L, Laroche J (2013). Relationships between genotypes and phenotypes in natural populations of the European flounder (*Platichthys flesus*) under different types of contamination in estuaries. *Journal of Xenobiotics*. 3(s1):e14: 36-39
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M. T., & Laroche, J. (2004). Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquatic Toxicology*. 70(4), 327-343
- Martínez-Gómez C., Vethaak A.D. (2019). Understanding the impact of chemicals on marine fish populations: the need for an integrative approach involving population and disease ecology. *Current Opinion in Environmental Science and Health*. 11, 71-77
- McLusky, D. S., & Elliott, M. (2004). *The estuarine ecosystem: ecology, threats and management*. Oxford University Press.
- Miramand P, Guyot T, Rybarczyk H, Elkaim B, Mouny P, Dauvin JC, Bessineton C (2001) Contamination of the Biological Compartment in the Seine Estuary by Cd, Cu, Pb, and Zn. *Estuaries* 24: 1056-1065.
- Marigómez, I., Zorita, I., Izagirre, U., Ortiz-Zarragoitia, M., Navarro, P., Etxebarria, N., ... & Cajaraville, M. P. (2013). Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. *Aquatic toxicology*, 136, 32-48.
- Nigro, M., Falleni, A., Del Barga, I., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F., & Frenzilli, G. (2006). Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology*, 77(4), 339-347.
- Ouddane, B., Mikac, N., Cundy, A. B., Quillet, L., & Fischer, J. C. (2008). A comparative study of mercury distribution and methylation in mudflats from two macrotidal estuaries: The Seine (France) and the Medway (United Kingdom). *Applied Geochemistry*, 23(4), 618-631.
- Oikari, A., 2006. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic Toxicology* 78, 370–381.
- Ostrach D.J., Low-Marchelli J.M., Eder K.J., Whiteman S.J., Zinkl J.G. (2008). Maternal transfer of xenobiotics and effects on larval striped bass in the San Francisco Estuary. *PNAS*. 105 (49), 19354-19359
- Phelan, B. A., Goldberg, R., Bejda, A. J., Pereira, J., Hagan, S., Clark, P., ... & Able, K. W. (2000). Estuarine and habitat-related differences in growth rates of young-of-the-year winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and tautog (*Tautoga onitis*) in three northeastern US estuaries. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 247(1), 1-28.
- Scarcia, P., Calamante, G., & de la Torre, F. (2014). Responses of biomarkers of a standardized (*Cyprinus carpio*) and a native (*Pimelodella laticeps*) fish species after in situ exposure in a periurban zone of Luján river (Argentina). *Environmental toxicology*, 29(5), 545-557.
- Selleslagh, J., & Amara, R. (2008). Environmental factors structuring fish composition and assemblages in a small macrotidal estuary (eastern English Channel). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 79(3), 507-517

- Selleslagh, J., & Amara, R. (2015). Are estuarine fish opportunistic feeders? The case of a low anthropized nursery ground (the Canche Estuary, France). *Estuaries and coasts*, 38(1), 252-267
- Schøyen, M., Allan, I. J., Ruus, A., Håvardstun, J., Hjermand, D. Ø., & Beyer, J. (2017). Comparison of caged and native blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) for environmental monitoring of PAH, PCB and trace metals. *Marine environmental research*, 130, 221-232.
- Sokolova I.M. (2013). Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology*, 53(4), 597-608
- Triebkorn, R., Adam, S., Casper, H., Honnen, W., Pawert, M., Schramm, M., Schwaiger, J., Kohler, H.R., 2002. Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. *Ecotoxicology* 11, 451–65.
- Van Noorden C.J.F., Bahns S., Köhler A. (1997). Adaptational changes in kinetic parameters of G6PDH but not PGDH during contamination-induced carcinogenesis in livers of North Sea flatfish. *Biochim. Biophys. Acta*. 1342, 141-148
- Vethaak A.D., Baggelaar P.K., van Lieverloo H.M., Ariese F. (2016). Decadal trends in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination assessed by 1-Hydroxypyrene in fish bile fluid in the Netherlands: declining in marine waters but still a concern in estuaries. *Frontiers in Marine Science*. 3 (215), 1-13
- Vethaak A.D., Jol J.G., Pieters J.P.F. (2009). Long-Term Trends in the Prevalence of Cancer and Other Major Diseases Among Flatfish in the Southeastern North Sea as Indicators of Changing Ecosystem Health. *Environmental Science and Technology*. 43(6), 2151-2158
- van der Oost, R., McKenzie, D. J., Verweij, F., Satumalay, C., van der Molen, N., Winter, M. J., & Chipman, J. K. (2020). Identifying adverse outcome pathways (AOP) for Amsterdam city fish by integrated field monitoring. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 74, 103301.
- Vincze, K., Scheil, V., Kuch, B., Köhler, H. R., & Triebkorn, R. (2015). Impact of wastewater on fish health: a case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11822-11839.
- Williams TD, Turan N, Wu H, Mackenzie C, Bartie KL, Hrydziusko O, Lyons B, Stentiford GD et al. (2011). Towards a system level understanding of non-model organisms sampled from the environment: a network biology approach. *PLOS computational biology*, 7(8), e1002126

■ ■ ■ ■ ■ POUR PLUS D'INFORMATIONS SUR LE GIP SEINE-AVAL

www.seine-aval.fr

CONTACT

GIP Seine-Aval
Hangar C - Espace des Marégraphes
CS 41174
76176 ROUEN Cedex 1
Tél : 02 35 08 37 64
gipsa@seine-aval.fr

En cas d'utilisation de données ou d'éléments de ce rapport, il devra être cité sous la forme suivante :

Amara R. & Laroche J. (Coord.), Cachot J., Couteau J., Devaux A., Devin S., Le Floch S., Minier C., Ouddane B., 2020. Projet HQ-Fish : Impact de la qualité des habitats estuariens de la Seine sur le fonctionnement d'une population de poisson (flet). Rapport de recherche du programme Seine-Aval 6, 64 p.

Le GIP Seine-Aval ne saurait être tenu responsable d'évènements pouvant résulter de l'utilisation et de l'interprétation des informations mises à disposition.

Pour tout renseignement, veuillez contacter le GIP Seine-Aval.

Les membres financeurs du GIP Seine-Aval sont :

