



Projet Seine-Aval 5 **ECOTONES**

« Effets de la contamination sur les organismes de
l'estuaire de la Seine »

Mai 2019

Coordination : Benoit Xuereb

Co-Auteurs : Iris Barjhoux, Paco Bustamante

TABLE DES MATIERES

RESUME EXECUTIF	3
SCIENTIFIQUES AYANT PARTICIPE AU PROJET	4
PARTICIPANTS AU SUIVI DE PROJET	5
RESULTATS	6
Contexte et enjeux	6
1 Effet de la contamination sur la faune aquatique	9
1.1 Une stratégie de biosurveillance passive	9
1.2 Synthèse des résultats bruts	11
1.3 Sélection des outils	16
1.3.1 Les prérequis	16
1.3.2 Stratégies de définition des références	17
1.3.3 Les outils sélectionnés	18
1.4 Intégration des réponses	19
1.4.1 LOE Biomarqueurs	19
1.4.2 Comparaison des conclusions du modèles vs. Analyse brute de l'ensemble des biomarqueurs	23
1.4.3 Mise en regard des résultats de la LOE Biomarqueurs avec les niveaux d'imprégnation chez la moule et de contamination du milieu	24
1.5 Bilan et préconisations	26
2 Effet de la contamination sur l'avifaune	29
2.1 Rappel du contexte	29
2.2 Rappel de la stratégie	29
2.3 Analyse brute	31
2.4 Intégration des mesures	32
Conclusion	36
BIBLIOGRAPHIE	37
ANNEXES	40

RESUME EXECUTIF

Le projet ECOTONES s'est proposé de mobiliser les compétences a priori disponibles pour retranscrire les effets de la contamination sur les organismes indigènes de l'estuaire de la Seine. Les objectifs étaient (i) d'identifier le niveau d'opérationnalité des différents outils biologiques vis-à-vis d'une application en biosurveillance environnementale des masses d'eau de transition et (ii) de pallier au manque de connaissances relatives au niveau d'imprégnation chimique d'un maillon trophique supérieur, l'avifaune.

Pour répondre au premier objectif, 9 espèces, incluant annélides, mollusques, crustacés et poissons, ont été échantillonnées durant 3 années consécutives (i.e. 2015, 2016, 2017). Plus d'une trentaine de réponses biologiques (sub-individuelles, individuelles et populationnelles) ont été mesurées pour un total de 82 couples réponse/espèce. Les résultats ont montré que 21 de ces couples réponse/espèce restaient, dans l'état actuel des connaissances, ininterprétables. Parmi les 61 restants, les deux tiers ont retranscrit un état de santé altéré des organismes. Néanmoins, seulement 10 de ces métriques ont présenté un niveau d'opérationnalité permettant (i) d'interpréter de façon claire le niveau de gravité des effets mesurés et (ii) intégrer leur réponse dans un indice global (i.e. selon l'approche Weight of evidence). L'approche intégrée a confirmé les premières observations, à savoir un niveau majeur d'effets biologiques durant les 3 années de suivi. Ce constat s'est révélé très cohérent avec les niveaux de qualité obtenus par l'intégration des données de bioaccumulation dans les bivalves en embouchure d'estuaire (i.e. Réseau d'Observation de la Contamination CHimique ; IFREMER). En revanche, les indices d'intégration des données de contamination des matrices eau et sédiment, mobilisées par ailleurs, n'ont révélé qu'un état de dégradation léger à modéré. Globalement, ce projet a permis de souligner une nouvelle fois l'importance de considérer la réponse biologique dans le diagnostic de la qualité des masses d'eau estuariennes. Toutefois, il montre également à quel point il est indispensable de ne pas négliger les travaux visant à finaliser le périmètre d'application et d'interprétation des indicateurs biologiques, dans une perspective de pouvoir les proposer comme des outils opérationnels pour la surveillance environnementale.

Par ailleurs, des échantillons de plasma et de plumes ont été collectés sur des poussins de 3 espèces de goélands (*Larus marinus*, *L. argentatus* et *L. fuscus*), ainsi que chez le cormoran huppé (*Phalacrocorax aristotelis*). Au total, 205 individus ont été suivis durant la période de 2015 à 2017, dans 4 sites différents : la ville du Havre, milieu urbanisé dans la zone des entrepôts au sud de la ville ; l'îlot du ratier, reposoir et zone de nidification, au centre de l'estuaire ; Antifer, au pied des falaises situées au nord du Havre ; aux îles Chausey, site témoin éloigné des zones urbaines et industrielles. Plus de 70 contaminants différents ont été recherchés, incluant des éléments traces, des polluants organiques persistants, des alkylphénols ainsi que des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Parallèlement les signatures isotopiques du carbone, du soufre et de l'azote ont été examinées pour tracer les habitats d'alimentation et le positionnement trophique des différentes espèces. Enfin, des mesures biométriques, un sexage moléculaire et quelques marqueurs de stress (i.e. hormone de stress et stress oxydant) ont été réalisés en support à l'analyse. Les résultats confirment que les oiseaux nichant dans et autour de l'estuaire sont fortement exposés aux polluants organiques persistants, en lien avec la composition et l'origine de leur alimentation. Parmi les

4 espèces étudiées, le goéland marin est particulièrement exposé en raison de sa position trophique élevée et de son habitat d'alimentation plus marin que les autres espèces. La grande majorité des individus de Seine de cette espèce dépassaient les seuils de toxicité du mercure, des PCB et des DDTs ; ce qui suggère que ces contaminants pourraient avoir des effets toxiques. L'absence de valeurs seuils pour les biomarqueurs ne permet cependant pas d'établir si ces biomarqueurs révèlent des altérations liées à l'exposition à ces contaminants.

SCIENTIFIQUES AYANT PARTICIPE AU PROJET

- **Equipe 1** : UMR-I02 SEBIO, Equipe 1a Université du Havre, Equipe 1b : Université de Reims Champagne-Ardenne

Coordination scientifique : Benoît XUEREB (Equipe 1a), Iris Barjhoux (Equipe 1b)

Autres chercheurs (ou équivalents) : Joëlle FORGET-LERAY; Céline BOULANGE-LECOMTE; Tiphaine MONSINJON; Frank LE FOLL, Alexandre ERRAUD, Matthieu PAIOLA, Aurélie DUFLOT, Nathalie GIUSTI.

- **Equipe 2** : UMR 7266 LIENSs et UMR 7372 CEBC, Université de La Rochelle

Coordination scientifique : Paco BUSTAMANTE

Autres chercheurs (ou équivalents) : Olivier CHASTEL, Jérôme FORT, Carine CHURLAUD; Maud BRAULT-FAVROU; Gaël GUILLOU; Colette TROUVE; Charline PARENTEAU Cécile RIBOUT

- **Equipe 3** : EA 2160 MMS Equipe 3a : Université Catholique de l'Ouest ; Equipe 3b : Université de Nantes

Coordination scientifique : Catherine MOUNEYRAC (Equipe 3a), Laurence POIRIER (Equipe 3b)

Autres chercheurs (ou équivalents) : Aurore ZALOUK-VERGNOUX; Hanane PERREIN-ETTAJANI; Isabelle METAIS; Amélie CHATEL ; Mohammed MOULOUD ; Patrick GILLET ; Abderrahmane KAMARI ; Mélanie BRUNEAU

- **Equipe 4** : UMR 8187 LOG, Université Lille 1

Coordination scientifique : Sami SOUISSI

Autres chercheurs (ou équivalents) : Gaël DUR ; Yen-Ju PAN ; Dominique MENU

- **Equipe 5** : SARL TOXEM

Coordination scientifique : Jérôme COUTEAU

Autres chercheurs (ou équivalents) : Géraldine MAILLET, Géraldine LOPPION

- **Equipe 6** : UMR 5805 EPOC, Université de Bordeaux

Coordination scientifique : Hélène BUDZINSKI

Autres chercheurs (ou équivalents) : Pierre LABADIE ; Marie-Hélène DEVIER ; Mélanie LAUZENT ; Marine GALLIEN ; Laurent PELUHUET; Karyn LE MENACH; Patrick PARDON

- **Equipe 7** : GIP Seine-Aval

Coordination scientifique : Cédric Fisson

PARTICIPANTS AU SUIVI DE PROJET

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

Acteurs de l'estuaire : Claire BERVILLE (GPMR), Catherine DEHONDT (UIC Normandie), Barbara LEROY (AESN), Marlène MINOR-ENOT (DREAL), Manuel SARRAZA (AESN).

Scientifiques : Claude AMIARD-TRIQUET (Conseil scientifique Seine-Aval), Simon DEVIN (LIEC-Univ. Metz), Jean LAROCHE (LEMAR-UBO).

RESULTATS

Contexte et enjeux

Les milieux aquatiques regroupent les écosystèmes les plus productifs de la planète, en termes de Biens et Services rendus à l'Homme, tant dans l'approvisionnement en énergie, en eau, en nourriture, qu'en services culturels et en aménités (Costanza et al., 1997 et 2014). Ces milieux sont aussi les plus exposés aux facteurs d'érosion de la biodiversité. Ils constituent notamment l'exutoire final pour une grande part des contaminants et macro-déchets générés par l'activité humaine, une pollution qui n'a cessé de croître et de se diversifier durant ces dernières décennies. Le constat généralisé de la dégradation chimique et biologique des différents compartiments aquatiques a conduit à une prise de conscience collective, favorisant l'émergence de cadres réglementaires. La mise en place récente de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE ; 2000/60/CE) et de la Directive Cadre sur la Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM ; 2008/56/CE) renforce les actions de surveillance, de maintien et/ou de restauration de l'intégrité des différents écosystèmes aquatiques. Toutefois, l'atteinte des objectifs fixés par ces réglementations nécessite de disposer d'outils performants pour évaluer la qualité des masses d'eau et, le cas échéant, identifier les causes probables de leur dégradation.

La caractérisation de la qualité des masses d'eau, telle que décrite par la DCE, repose sur la mise en œuvre de l'analyse chimique, dans les matrices abiotiques, de 53 substances prioritaires (*i.e.* « état chimique ») et la mesure de diverses métriques biologiques basées sur les communautés de microalgues, de plantes aquatiques, d'invertébrés et de poissons (*i.e.* « état écologique »). Ces mesures qui reposent sur des savoir-faire bien établis, ont prouvé leur utilité. Toutefois, la stratégie actuelle présente des limites. L'état chimique ne considère que les substances réglementées, et ne rend pas compte de la biodisponibilité et des effets toxiques de la contamination, d'autant moins dans des situations de mélange et d'interactions entre substances (*i.e.* contexte environnemental de multicontamination). A l'opposé, les indices biocénotiques, très pertinents sur le plan écologique, produisent un diagnostic *a posteriori* qui ne permet pas d'identifier les causes de non-atteinte du bon état écologique. Dès lors, il apparaît important de se doter d'outils permettant un meilleur discernement des relations de causalité (*i.e.* cohérence et incohérence) entre état chimique et état écologique, de sorte à guider plus efficacement la gestion et la restauration des milieux.

De ce constat, est née une volonté de compléter les méthodes de surveillance, conduisant à l'intégration au sein des réglementations, d'observations biologiques aux niveaux sub-individuel et individuel, incluant le suivi des niveaux bioaccumulation des substances, la mesure de biomarqueurs¹ et/ou l'application de bioessais². A titre d'exemple, à l'issue des travaux réalisés dans le cadre de la convention OSPAR³, plusieurs biomarqueurs et bioessais ont été inscrits dans le plan d'action de la DCSMM (*i.e.* descripteur 8). Actuellement, des groupes de réflexion ont été commissionnés tant à l'échelle européenne que nationale (e.g. projet *Biomarqueurs et Biodiversité*, financé par l'Agence Française de la Biodiversité) pour évaluer le périmètre d'intégration de ces outils dans la DCE. Toutefois, l'intégration de tels

¹ Tout changement au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, observable ou mesurable au sein des tissus ou des fluides corporels ou au niveau de l'individu entier, permettant de mettre en évidence l'exposition à/ou les effets d'un ou plusieurs polluants chimiques, chez des spécimens exposés en le milieu naturel.

² Méthode d'exposition *in vitro* ou *in vivo*, de cellules ou d'organismes, permettant d'évaluer la toxicité d'échantillons environnementaux dans un contexte expérimental contrôlé de laboratoire.

³ Convention Oslo-Paris pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est (25 mars 1998).

outils biologiques dans la stratégie de surveillance environnemental nécessite de s'assurer, au préalable, de leur opérationnalité. Il est notamment indispensable de préciser leur conditions et limites d'application, et garantir une interprétation claire et robuste pour les gestionnaires qui centralisent l'information.

Les biomarqueurs, directement mesurés 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. L'intégration d'une sélection de biomarqueurs de pertinences toxicologiques, physiologiques et écologiques complémentaires constitue, dès lors, une approche d'intérêt pour diagnostiquer une atteinte à la santé des organismes et préciser l'état de qualité du milieu. Toutefois, l'utilisation des biomarqueurs en surveillance environnementale se confronte, aujourd'hui encore, à certains écueils. Notamment, l'influence des facteurs dits « confondants⁴ » sur la modularité de la réponse biologique n'est pas systématiquement prise en compte ; ce qui constitue sans aucun doute la principale limite (e.g. Jemec et al., 2010). Certains travaux ont pourtant clairement illustré l'importance de comprendre la variabilité naturelle des biomarqueurs pour améliorer leur fiabilité et limiter le risque de confusion entre modulation physiologique naturelle et effet toxique (e.g. Hanson, 2011). Il est donc essentiel que des référentiels d'interprétation des biomarqueurs soient établis de sorte à intégrer au mieux la variation de la réponse biologique inhérentes aux facteurs confondants (e.g. Coulaud et al., 2011 ; Lacaze et al., 2011b ; Xuereb et al., 2009). Les référentiels ainsi construits permettent de s'affranchir d'une comparaison ponctuelle avec une condition témoin (e.g. comparaison amont-aval d'un effluent) qui ne tient généralement pas compte de la variabilité environnementale. Les référentiels offrent alors la possibilité d'évaluer la qualité d'une eau sur des stations isolées, déconnectées et réparties sur une large échelle géographique, tout en garantissant de pouvoir les comparer et les prioriser. Si de tels niveaux de finalisation méthodologique commencent à être atteints pour quelques couples biomarqueurs/espèces en milieu marin et dans certaines portions des bassins versants continentaux, ce n'est pas encore le cas pour les écosystèmes estuariens qui restent largement moins étudiés à cet effet.

L'estuaire de la Seine est le réceptacle de nombreuses et diverses sources de polluants, comprenant des apports du bassin versant amont, des sources intra-estuariennes (*i.e.* pôles urbains, zones industrielles, terrains agricoles) et la remobilisation des archives de contaminants contenues dans les sédiments (*i.e.* lors de travaux d'aménagement du couloir de navigation ou de phénomènes climatiques extrêmes tels que les crues ou les tempêtes). Les différentes composantes de l'écosystème estuarien portent la marque de cette multi-contamination et le niveau d'imprégnation de l'estuaire est largement documenté et fait l'objet de suivis. Par ailleurs, 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 ; Amiard-Triquet et Rainbow, 2017 ; Poisson et al., 2011). Ce constat est documenté à différents niveaux trophiques (e.g. crustacés, annélides, poissons), d'organisation (e.g. cellulaire, organique, individuel, populationnel) et pour un large panel d'effets (e.g. stress oxydant, neurotoxicité, reprotoxicité, génotoxicité). Enfin, différents suivis écologiques (*i.e.* invertébrés benthiques, crustacés, poissons, oiseaux) apportent des informations sur la dynamique des populations présentes dans l'estuaire et

⁴ Tout facteur intrinsèque au organismes (e.g. âge/taille, stade de développement, sexe, stade de maturité sexuelle) ou environnemental (biotique : toutes interaction avec les autres espèces de la biocénose ; ou abiotique : e.g. température, salinité, oxygène dissout) susceptible d'entraîner une modulation mesurable de la réponse biologique d'intérêt.

mettent en évidence des évolutions spatiales et temporelles. Ces acquisitions de données couvrent des champs disciplinaires complémentaires (chimie, écotoxicologie, écologie), mais s'inscrivent dans des dynamiques (scientifiques ou opérationnelles) non pérennes qui, en outre, ne sont pas nécessairement reliées entre elles. Etant données les connaissances acquises tant au niveau local (*i.e.* estuaire de la Seine) que global (*i.e.* communauté scientifique), et la tendance actuelle à repositionner l'utilisation des réponses biologiques dans un contexte réglementaire de surveillance, il devenait pertinent d'évaluer l'état d'opérationnalité des méthodologies applicables au contexte estuarien. C'est donc dans ce contexte qu'a émergé le projet ECOTONES. Fort de l'expertise acquise lors de précédents travaux, ce projet avait pour ambition, à terme, de proposer une sélection d'outils opérationnels permettant de caractériser l'état écotoxicologique de l'estuaire, dans une perspective d'initier un suivi pérenne de l'état de santé de la faune estuarienne et de son évolution.

La stratégie mise en place reposait sur une approche multi-espèce (annélides, mollusques, crustacés, poissons et oiseaux) visant à favoriser la représentativité de différents groupes taxinomiques, niveaux trophiques et habitats présents en estuaire de Seine, de façon à couvrir différentes voies ou sources d'exposition. Les effets de la contamination ont également été examinés à plusieurs niveaux d'organisation biologique (sub-individuel, individuel, populationnel), en fonction du recul scientifique et des contraintes expérimentales propres à chaque modèle, afin d'estimer l'état de santé des organismes et de guider les interprétations écologiques vis-à-vis de l'état des populations. Les perturbations en lien avec des grandes fonctions biologiques susceptibles d'avoir des répercussions à long terme, notamment sur le niveau de performance écologique des individus ont été particulièrement ciblées (*i.e.* génotoxicité, reprotoxicité, immunotoxicité et altération du comportement ou des traits d'histoire de vie). La prise en compte de l'exposition et/ou de l'imprégnation chimique des organismes a reposé exclusivement sur la mobilisation des données acquises de la littérature (précédents projets du GIP Seine-Aval et autre bibliographie existante), excepté dans le cas particulier de l'avifaune qui a fait l'objet d'un volet spécifiquement centré sur ces aspects pour pallier au manque de données.

Ce rapport propose une lecture synthétique et transversale des résultats obtenus dans le cadre du projet ECOTONES, l'intégralité des travaux effectués étant détaillée dans le recueil d'annexes.

1 Effet de la contamination sur la faune aquatique

1.1 Une stratégie de biosurveillance passive

Le suivi des réponses biologiques chez la faune aquatique a été réalisé durant les trois années consécutives, **2015, 2016 et 2017**, selon une approche de **biosurveillance passive** (Encadré 1). **Cinq espèces d'invertébrés**, représentatives de différents habitats et niveaux trophiques, ont été étudiées au cours de ce projet : 2 espèces endobenthiques, *Hediste diversicolor* (Annélides, Polychètes) et *Scrobicularia plana* (Mollusques, lamellibranches), 2 espèces épibenthique, *Mytilus edulis* (Mollusques, Lamellibranches) et *Palaemon longirostris* (Crustacés, Malacostracés), 1 espèce pélagique, *Eurytemora affinis* (Crustacés, Copépodes). De même, le suivi a été initié chez **4 espèces de poissons** : 2 espèces épibenthiques, *Platichthys flesus* et *Solea solea*, et 2 espèces pélagiques, *Dicentrarchus labrax* et *Osmerus eperlanus*. Toutefois, les investigations sur l'éperlan (*O. eperlanus*) ont été rapidement abandonnées à l'issue de la première année du fait des difficultés à maintenir cet organisme en vie durant le retour des échantillons au laboratoire. La période et les zones d'échantillonnage étaient spécifiques à chaque espèce (Figure 1).

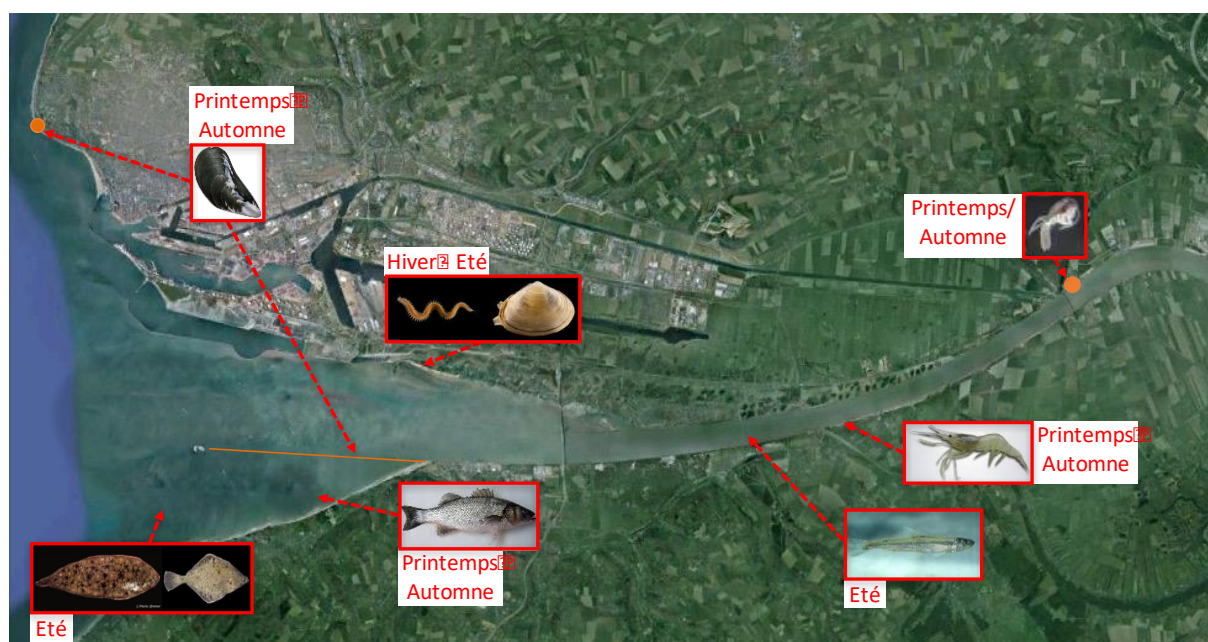


Figure 1 Illustration des zones et des périodes de prélèvement réalisés dans le cadre du suivi de la faune aquatique. De gauche à droite : *Solea solea*, *Platichthys flesus*, *Mytilus edulis*, *Dicentrarchus labrax*, *Hediste diversicolor*, *Scrobicularia plana*, *Osmerus eperlanus*, *Palaemon longirostris* et *Eurytemora affinis*.

Encadré 1 Repositionnement des différentes approches de déploiement *in situ* des biomarqueurs en surveillance environnementale : approche passive *versus* approche active

L'approche passive consiste à mesurer les biomarqueurs au sein des populations indigènes, directement après prélèvement de spécimens au niveau des stations d'intérêt.

Cette approche est sans doute la plus proche de la réalité écologique. Elle traduit l'état de santé des organismes autochtones dans un contexte environnemental précis. Elle intègre par conséquent les potentielles spécificités phénotypiques (e.g. variations de la sensibilité à la pollution) découlant de modifications de la structure génétique de la population *via* des phénomènes de sélection et/ou de dérive génétique.

En contrepartie, l'approche passive ne permet pas de maîtriser l'exposition des organismes. Le choix des stations étudiées est donc forcément conditionné par la présence des espèces sentinelles ciblées. Il sera d'autant plus difficile de garantir l'attachement d'un spécimen à sa zone de prélèvement que l'espèce sera mobile ; ce qui peut flouter le diagnostic. Par ailleurs, l'utilisation directe d'individus prélevés *in natura* permet difficilement de contrôler leurs traits de vie. Il est donc compliqué, voire impossible, d'accéder à la mesure de marqueurs individuels comme la survie, la croissance, l'alimentation ou la reproduction. De même, le suivi de spécimens en provenance de différentes stations, ayant un passif différent (e.g. âge pour une taille donnée, état nutritionnel, stade de maturation), peut conduire à des artefacts dans l'interprétation de certains biomarqueurs.

L'approche active repose sur la transplantation d'organismes d'une origine commune (*i.e.* population de référence, sauvage ou d'élevage) dans des systèmes d'encagement.

L'approche active perd en réalisme environnementale au profit d'une plus grande pertinence toxicologique. Egalement dénommée « bioessai *in situ* », l'approche active présente l'avantage de maîtriser les conditions d'exposition. Les spécimens, de même provenance, partagent le même historique de vie ; il n'est donc plus question de variabilité inter-populationnelle. Il devient possible de les calibrer en taille/âge, stade de développement, stade de maturation sexuelle, et de restreindre ainsi la variabilité interindividuelle. La période, la durée et la localisation de l'exposition sont totalement maîtrisées, donnant accès à une meilleure compréhension de la relation entre exposition et apparition des effets. Cet avantage permet d'accéder au suivi de certains traits d'histoire de vie (e.g. survie, croissance, maturation sexuelle). La transplantation permet d'investiguer les stations d'où l'espèce est absente, à condition que l'écart au préférendum écologique ne soit pas trop important. Enfin, l'acquisition en temps réel de données environnementales peut permettre de minimiser l'influence de facteurs confondants (e.g. la température) sur la réponse biologique, lorsque des calibrations ont été réalisées au préalable.

La principale difficulté de l'approche active est sans doute de maintenir des conditions optimales d'encagement (e.g. densité, disponibilité en nourriture, débit d'eau), afin qu'aucun stress ne vienne biaiser l'interprétation des réponses biologiques suivies. Il est donc impératif d'évaluer, au préalable, les effets artéfactuels de l'encagement en milieu sain. En outre, l'approche active ne permet pas de s'intéresser au phénomène d'adaptations locales, susceptibles de rendre les populations moins sensibles à la contamination. En fin, cette approche ne permet pas non-plus de considérer les effets se mettant en place à moyen-long terme, au cours du développement tels que l'intersexualité chez les poissons ou l'imposex chez les gastéropodes.

Plus d'une trentaine de réponses biologiques ont été mesurées, comprenant :

- la mesure des **potentiels (anti)-oestrogénique, (anti)-androgénique et génotoxique** sur extrait de matrice biologique au moyen de biotests cellulaires (test (anti)-YES, -YAS et SOS),
- la mesure de **biomarqueurs de défense anti-oxydante** et de **biotransformation** (activités enzymatiques de la superoxyde dismutase, glutathion-S-transférase, catalase et éthoxyrésorufine-o-dééthylase),
- la mesure de **biomarqueurs de dommages oxydatifs** (taux de peroxydation lipidiques), **neurotoxiques** (activités enzymatiques de l'acétylcholinestérase), **génotoxiques** (intégrité de l'ADN et micronoyaux), **reprotoxiques** (qualité des spermatozoïdes, taux de vitellogénine circulante chez les mâles, intersexualité gonadique) et **dérèglement de la réponse immunitaire** (viabilité, numération, formulation des cellules immunitaires, bouffée oxydative, phagocytose),
- la mesure de **biomarqueurs de condition** (taux de glycogène, taux de lipides, ratio ARN:ADN, stabilité lysosomale, histopathologies hépatiques, indices de condition),
- le suivi de **traits d'histoire de vie** (comportement d'enfouissement, comportement reproducteur, indice de maturité sexuelle),
- le suivi de **descripteurs populationnels** (densité, biomasse, répartition des stades de développement, sex-ratio).

Ces différentes réponses ont été déployées de manière hétérogène, dépendamment de l'expertise et des contraintes méthodologiques et/ou physiologiques inhérentes à chaque modèle (Tableau 1). De même, certains couples marqueur/espèce bénéficiaient déjà d'un important recul scientifique, alors que d'autres (e.g. qualité spermatique et la modulation de la réponse immunitaire), au contraire, ont été sélectionnés au-delà de leur aspect novateur, du fait de leur pertinence écotoxicologique et/ou pour pallier au manque de connaissances.

1.2 Synthèse des résultats bruts

L'ensemble des résultats relatifs au suivi de la faune aquatique sont détaillées dans les Annexes 1 à 6.

Au total, **82 couples réponse biologique/espèce** ont été suivis une à deux fois par an sur la durée du projet. Le tableau 2 est une restitution de l'analyse brute des résultats dépendante de l'expertise de chaque partenaire en charge des analyses. Globalement, **26 %** (i.e. $n = 21$) des paramètres mesurés ont présenté des fluctuations **ininterprétables** du fait notamment de l'absence d'un référentiel auquel les comparer. Parmi les **74 %** d'outils en mesure d'être **interprétés**, **67 %** (i.e. $n = 41$) ont transmis des signaux de perturbations au moins une fois au cours du projet (41,0 % à l'issue de chaque prélèvement), **les 33 %** restant n'ayant montré aucun signe de perturbation.

Considérant plus spécifiquement la mesure des **potentiels toxiques** contenus dans les **matrices biologiques**, il peut être souligné que des activités anti-ostrogéniques et anti-androgéniques (*i.e.* antagonistes) ont été observées, respectivement, dans 5 et 4 des 7 espèces qui ont été étudiées à cet effet, malgré des différences de positionnement trophique, taxinomique et d'habitat. En revanche, aucune activité agoniste aux récepteurs des œstrogènes et des androgènes n'a été révélée quel que soit l'organisme. Le potentiel génotoxique, quant à lui, a été souligné uniquement dans les extraits de foie de poissons, à l'exception des œufs de crevette en 2015.

L'analyse des **paramètres immunitaires** constituait un volet très exploratoire, initié à la demande des gestionnaires lors de la construction du projet ECOTONES (détaillée en Annexe 6). Cette analyse a été conduite chez la moule *M. edulis* et le bar *D. labrax*. Le recul sur expérience reste encore trop limité pour conduire une interprétation de la fluctuation de ces marqueurs, notamment du fait du manque de maîtrise de leur variabilité naturelle et de l'absence de valeurs de référence. Néanmoins, ce projet aura permis d'éprouver l'utilisation de ces outils en milieu naturel et d'établir les lignes directrices pour de futurs travaux.

Des **marqueurs du système antioxydant** ont été suivis chez le copépode *E. affinis*, le mollusque *S. plana* et l'annélide *H. diversicolor*. La mesure de l'activité de la glutathion-S-transférase n'a traduit aucune tendance, à l'exception d'une induction significative chez le copépode en Mai 2015. En revanche, les activités de la catalase et de la superoxyde-dismutase présentaient une tendance identique chez *S. plana* et *H. diversicolor*, montrant des niveaux significativement plus élevés en 2015 qu'en 2016 et 2017. Les **dommages oxydatifs** (*i.e.* peroxydation lipidique), mesurés chez ces mêmes organismes, présentaient des niveaux significativement plus élevés en 2015 et 2016 qu'en 2017. L'expertise acquise chez *H. diversicolor* a permis d'interpréter ces niveaux de peroxydation lipidique comme des effets sévères, et ce durant les 3 années. L'**activité de biotransformation** (*i.e.* activité EROD) mesurée chez le flet *P. flesus* présente également un niveau significativement plus élevé en 2015 en comparaison à 2016 et 2017.

Tableau 1 Récapitulatif des différents couples marqueurs/espèces suivis dans le cadre du projet ECOTONES (détaillés dans les annexes 1 à 6). Les différences de couleurs permettent d'associer à cette répartition, les différents partenaires impliqués dans le projet.

Répartition au sein des partenaires			Organismes							
<div><div></div>UMR-I02SEBIO - Techniques qui étaient à valider</div> <div><div></div>UMR 8187 LOG</div> <div><div></div>EA 2160 MMS</div> <div><div></div>SARL TOXEM</div>			Crustacés <i>Eurytemora affinis</i> <i>Palaemon longirostris</i>		Annélide <i>Hediste diversicolor</i>		Mollusques <i>Mytilus edulis</i> <i>Scrobicularia plana</i>		Poissons <i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Osmerus eperlanus</i> <i>Solea solea</i> <i>Platyichthys flesus</i>	
Effets ciblés	Potentiel toxiques	géntoxique	SOS Chromotest (<i>P. longirostris</i>)		SOS Chromotest		SOS Chromotest		SOS Chromotest (<i>O. eperlanus</i> , <i>P. flesus</i> & <i>S. solea</i>)	
		(anti)-oestrogénique, -androgénique	Test (anti)-YES/-YAS (<i>P. longirostris</i>)		Test (anti)-YES/-YAS		Test (anti)-YES/-YAS		Test (anti)-YES/-YAS (<i>O. eperlanus</i> , <i>P. flesus</i> & <i>S. solea</i>)	
	Défences	Stress oxydant	GST (<i>E. affinis</i>)		Catalase, GST, SOD		Catalase, GST, SOD (<i>S. plana</i>)			
		Biotransformation							EROD (<i>P. flesus</i> & <i>S. solea</i>)	
	Dommages	Géntoxique	Comet spermatozoïdes (<i>P. longirostri</i>)		Comet coelomocytes		Comet hémocytes (<i>S. plana</i>)	Comet et micro-noyaux hémocytes (<i>M. edulis</i>)	Comet erythrocytes (<i>P. flesus</i> & <i>S. solea</i>)	
		Reprotoxique	Vtg (<i>E. affinis</i>)						Intersexualité gonadique et Vtg (<i>P. flesus</i> & <i>S. solea</i>)	
		Immunotoxicité					Hémocytes : viabilité, numération, formulation, bouffée oxydative, phagocytose (<i>M. edulis</i>)		Leucocytes : viabilité, formulation, bouffée oxydative, phagocytose (<i>D. labrax</i>)	
		Neurotoxicité, Stress oxydant	AChE (<i>E. affinis</i>)		AChE, peroxydation lipidique		AChE, Peroxydation lipidique (<i>S. plana</i>)		AChE (<i>P. flesus</i> & <i>S. solea</i>)	
	Condition		Lipides, ratio ARN/ADN (<i>E. affinis</i>)	Indices de condition allométriques	Glycogène, lipides		Glycogène, lipides (<i>S. plana</i>)	Stabilité lysosomale (<i>M. edulis</i>)	Histologie hépatique (<i>P. flesus</i> & <i>S. solea</i>)	
	Traits d'histoire de vie	Comportement	Succès de reproduction (<i>E. affinis</i>)		Test enfouissement		Test enfouissement (<i>S. plana</i>)			
		Indice de maturité	Fécondité et qualité des œufs (<i>E. affinis</i>)		Indice de maturité sexuelle					
	Descripteurs populationnels		Densité, sex-ratio, stades de développement (<i>E. affinis</i>)		Densité/biomasse, structure, relations allométriques		Densité/biomasse, structure (<i>S. plana</i>)			

AChE : activité de l'acétylcholinestérase ; EROD : activité de l'éthoxyrésorufine-o-dééthylase ; GST : activité de la glutathion-S-transférase ; SOD : activité de la superoxyde dismutase, Vtg : vitellogénine (transcrit ou taux circulant) ; YAS : yeast androgen screen ; YES : yeast estrogen screen.

Tableau 2 Analyse brute des différents couples marqueurs/espèces analysés dans le cadre des 3 années de suivi du projet ECOTONES (détaillés dans les annexes 1 à 6). Case verte : situation normale ; Case rouge : situation perturbée ; Case grise : non-interprétable ; N.D. : non-déterminé. Les mois sont précisés dans les cases rouges lorsque l'effet n'a été diagnostiqué à chaque prélèvement. Pour les potentiels toxiques, la mention « anti » fait référence aux potentiels anti-ostrogéniques ou anti-androgéniques.

	H. diversicolor			S. plana			E. affinis			P. longirostris			M. edulis			D. labrax			P. flesus			S. solea			O. eperlanus		
Potentiels toxiques (bioessais)	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017
(anti)-oestrogénique (test (anti)-Yes)	anti	anti	N.D	anti	anti	N.D						N.D	anti	anti	N.D				anti	anti	anti	anti	anti	anti		N.D	N.D
(anti)-androgénique (test (anti)-Yas)		anti	N.D			N.D						N.D	anti	anti	N.D				anti	anti	anti	anti	anti	anti		N.D	N.D
Test SOS			N.D			N.D						N.D			N.D						N.D			N.D		N.D	N.D
Biotransformation (biomarqueur)																											
Activité EROD																											
Défence antioxydante (biomarqueurs)																											
Activité SOD																											
Activité GST							mai																				
Activité catalase																											
Dommages oxydatifs (biomarqueur)																											
Péroxydation lipidique (TBARS)																											
Neurotoxicité (biomarqueur)																											
Activité AChE	mars	juin	juin																								
Immunotoxicité (biomarqueurs)																											
Viabilité													N.D			N.D											
Numération													N.D			N.D	N.D	N.D									
Formule hémocyttaire													N.D			N.D											
Phagocytose													N.D			N.D											
Bouffée oxydative																N.D											
Génotoxicité (biomarqueurs)																											
Intégrité de l'AND (Comet)																											
Micronoyaux																											
Reprotoxicité (biomarqueurs)																											
Qualité des spermatozoïdes																											
Vitellogénine																											
Intersexe																											
Indices de condition (biomarqueurs)																											
Glycogène																											
Lipides			mars	mars																							
ARN/ADN																											
Stabilité lysosomale																											
Histopathologies hépatiques																											
Indice de condition																											
Trais d'histoire de vie																											
Comportement																											
Indice de maturité sexuelle																											
Descripteurs populationnels																											
Densité / biomasse																											
Structure de stade de développement																											
Sexe-ratio							mars																				

AChE : activité de l'acétylcholinestérase ; EROD : activité de l'éthoxyrésorufine-o-dééthylase ; GST : activité de la glutathion-S-transférase ; SOD : activité de la superoxyde dismutase ; YAS : yeast androgen screen ; YES : yeast estrogen screen

Des inhibitions significatives de l'activité de l'acétylcholinestérase, un marqueur reconnu de **perturbation de la transmission nerveuse**, ont été diagnostiquées chez *E. affinis*, *S. plana* et *H. diversicolor* en 2015, 2016 et 2017. De même, la mesure de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes de crevettes a révélé des niveaux de dommage très importants au cours des 3 ans, traduisant à la fois une **pression génotoxique** importante et un risque pour les **performances de reproduction** chez ces organismes. Chez la moule *M. edulis*, le flet *P. flesus* et la sole *S. solea*, en revanche, l'énumération des micronoyaux n'a traduit un effet génotoxique significatif qu'en 2017. Enfin, les **marqueurs de reprotoxicité** (*i.e.* taux de vitellogénine circulante et intersexualité chez les mâles) déployés chez ces deux espèces de poissons n'ont révélé **aucun signe de féminisation, excepté en 2016**, année durant laquelle 21 % des flets analysés présentaient des signes d'intersexualité.

La majorité des **marqueurs de conditions** tels que le taux de réserves énergétiques (*i.e.* lipides et glycogène) mesurés chez *E. affinis* et *H. diversicolor*, la stabilité lysosomale chez la moule *M. edulis* ou les lésions hépatiques chez les poissons ont tous traduit un **état perturbé** des organismes durant les 3 années de suivi. Cela se retranscrit assez bien dans les perturbations des traits de vie (*i.e.* comportement d'enfouissement et indice de maturité sexuelle) mesurés chez les 2 invertébrés endobenthiques *H. diversicolor* et *S. plana*. En revanche, l'indice de condition chez le copépode *E. affinis* n'a présenté un état préoccupant qu'en 2017, année durant laquelle des altérations du comportement reproducteur ont été mises en évidence chez cette espèce. Enfin, l'interprétation des descripteurs populationnels chez *H. diversicolor* et *E. affinis* tendait à montrer des perturbations dans leur dynamique démographique.

Globalement, des signaux de perturbation ont été enregistrés à tous les niveaux d'organisation biologique, ainsi que chez l'ensemble des organismes quelle que soit leur position taxinomique ou trophique. Pour autant, la corrélation des différentes réponses dans le cadre d'une approche AOP⁵, chez les espèces étudiées du niveau sub-individuel au niveau populationnel (*i.e.* *E. affinis*, *S. plana* et *H. diversicolor*) reste encore inaccessible. Plus important, une telle analyse des résultats reste trop subjective et difficilement exploitable pour préciser l'état de santé des organismes et dégager des tendances interannuelles d'amélioration ou de dégradation. Pour atteindre cet objectif, il est essentiel de (i) sélectionner les outils répondant au minimum prérequis pour une utilisation en surveillance environnementale et (ii) recourir à des méthodes d'intégration des données, permettant ainsi d'accéder à un diagnostic plus clair et plus précis. Le consortium d'ECOTONES a donc procédé à une sélection des outils au regard des prérequis permettant de juger du niveau d'opérationnalité dans un contexte de biosurveillance *in situ*.

⁵ Adverse outcome pathway : construction conceptuelle qui assemble les connaissances sur le lien entre un évènement moléculaire initiateur tel qu'une interaction entre une substance chimique et un récepteur moléculaire et un effet néfaste à un niveau pertinent pour l'évaluation des risques (Réseau des écotoxicologues de l'INRA).



1.3 Sélection des outils

1.3.1 Les prérequis

Pour être totalement opérationnels dans un réseau de surveillance environnemental, les indicateurs (*i.e.* chimiques, biologiques ou écologiques) doivent produire un diagnostic clair de l'état de préservation ou de dégradation du milieu concerné. Dans le cas de l'évaluation de l'état écologique, cela se traduit généralement par une notation sur une échelle à 5 niveaux de gravité (de « très bon état » à « très mauvais état ») qui rend l'interprétation complètement abordable pour tout tiers non expert dans les techniques analytiques. Par ailleurs, cette transformation des données sur une échelle semi-quantitative facilite l'intégration des différentes métriques mesurées dans un indice de qualité globale. En contrepartie, cela nécessite d'avoir acquis un bon niveau de maîtrise tant dans l'application et l'analyse que dans l'interprétation.

Le niveau de maîtrise d'une mesure biologique peut être évalué sur la base de trois groupes de critères. Le premier groupe, d'ordre purement méthodologique, repose sur le niveau de **maîtrise technique** de la mesure : caractérisation de la robustesse, de la répétabilité et du seuil de détection de la mesure ; mise en place d'une procédure standardisée, voire automatisée. Le second groupe relève de la **connaissance de la dynamique de la réponse** étudiée : caractérisation de la sensibilité, de la cinétique de réponse face au gradient de stress, du temps de rémanence après disparition du stress et de la signification de la réponse en termes d'effets sur la *fitness*⁶. Le dernier groupe réside dans la **maîtrise de la variabilité naturelle de la réponse** qui constitue le prérequis essentiel pour discriminer sans difficulté les effets d'un stress anthropique (*e.g.* stress chimique) du bruit de fond lié à la modulation naturelle de la réponse biologique considérée. Lorsque tous ces critères sont bien maîtrisés, il est possible de produire des valeurs auxquelles se référer telles que (i) un **niveau de base** de la réponse, (ii) un ou des **seuil(s) de significativité** délimitant les variations basales, (iii) un ou des **seuil(s) effectif(s)** sensé(s) délimiter un niveau critique pour la *fitness* de l'organisme et (iv) une **pondération** de l'importance de la réponse vis-à-vis de sa pertinence écologique. Plus le recul sur expérience est important et plus ces différentes valeurs deviennent robustes.

Il est intéressant de souligner que la démarche entreprise par le groupe national de réflexion pour l'intégration des biomarqueurs dans la stratégie de surveillance environnementale de la DCE (*i.e.* projet *Biomarqueur et Biodiversité*, financé par l'Agence Française de la Biodiversité), évalue l'opérationnalité des biomarqueurs sur la base des critères précédemment cités. Dans le cadre d'ECOTONES, nous nous étions fixés comme prérequis, pour la sélection et la recommandation des outils au terme du projet, de pouvoir disposer *a minima* du niveau de base et de(s) seuil(s) de significativité. D'ailleurs, la définition des valeurs de référence avait été annoncée par le consortium d'ECOTONES comme une étape clé du projet.

⁶ brièvement, ce terme anglais est utilisée en biologie pour caractériser la capacité d'un organisme à survivre et se reproduire.

1.3.2 Stratégies de définition des références

Le **principal verrou** pour la définition de valeurs de référence est sans doute la **maitrise de la variabilité naturelle**. Celle-ci peut être induite par des caractéristiques biologiques intrinsèques aux organismes (e.g. âge/taille, sexe, stade de reproduction, distance génétique) et/ou par des facteurs environnementaux (e.g. température, salinité, oxygène dissous, interactions biotiques). Une des stratégies consiste à produire une **distribution de données** (i.e. spatiales et/ou chronologiques) dans des conditions **de référence** (e.g. stations non- ou peu impactées) et d'analyser la **variabilité au regard des principaux facteurs intrinsèques et environnementaux** (e.g. Coulaud et al., 2011 ; Jemec et al., 2010 ; Xuereb et al., 2009). Lorsque les amplitudes de variations sont élevées et stochastiques, la réponse biologique ne présente aucun potentiel pour le déploiement *in situ*. Dans d'autres cas, la variabilité est faible ou peut être atténuée par la sélection de spécimens selon un standard préétabli (e.g. Xuereb et al., 2009), le choix d'une période d'échantillonnage (e.g. Akcha et al., 2004) ou par la modélisation mathématique quand les variables impliquées sont bien identifiées (e.g. Coulaud et al., 2011). Cette stratégie est toutefois délicate à mettre en œuvre chez les espèces strictement estuariennes pour lesquelles il peut s'avérer difficile de trouver une population de référence. En effet, de par leur position transitoire entre bassin versant et milieu marin, les estuaires sont rarement préservés de la contamination chimique. Lorsque c'est le cas, il s'agit le plus souvent de petits estuaires dans lesquels il n'est pas garanti de trouver l'espèce d'intérêt. Une **stratégie alternative** consiste à **restaurer une réponse basale** après une phase de dépuración dans des conditions saines en laboratoire (Webb et Gagnon, 2013), avec la nécessité d'évaluer les limites que cela présente par rapport au milieu complexe. Lorsque qu'une distribution de référence a été produite, il devient alors possible de fixer un seuil de significativité.

Dans le cadre d'ECOTONES, plusieurs stratégies ont été adoptées pour tenter de définir des valeurs de référence. Au sein de l'équipe MMS, la **mobilisation de banque de données** acquises sur un site de référence (estuaire de l'Authie), durant la période de 2002 à 2004, a permis de définir un modèle mathématique tenant compte des fluctuations saisonnières (Barrick et al., 2016 ; Annexe 1). Un seuil de significativité et un seuil effectif ont été déterminés selon le modèle BAC⁷ et EAC⁸ (OSPAR Commission, 2013), pour plusieurs descripteurs chez le polychète *Hediste diversicolor*, tels que la mesure de l'activité d'enzymes anti-oxydantes (catalase et glutathion-S-transférase), l'activité de l'acétylcholinestérase, le taux de peroxydation lipidique, le taux de réserves énergétique (lipides et glycogène) et la densité populationnelle. Chez le copépode *Eurytemora affinis*, en revanche, la définition de distributions de référence a été basée sur des **expérimentations de récupération en laboratoire** (Annexe 3). Ces expérimentations ont été menées en faisant varier les principaux facteurs confondants dans les gammes rencontrées en estuaire de Seine. Des seuils de significativité (IC 95%) ont pu être déterminés pour un marqueur de condition (ratio ARN:ADN) et l'activité de l'acétylcholinestérase. Les seuils effectifs ont été déterminés d'après la littérature. Enfin, une distribution de référence et un seuil de significativité (IC 95%) ont été définis pour la mesure des dommages à l'ADN spermatiques chez la crevette *Palaemon*

⁷ BAC : baseline assessment criteria.

⁸ EAC : environmental assessment criteria.



serratus (Annexe 5). Ici, la stratégie a été basée sur une **double approche** consistant à utiliser une **distribution de référence** obtenue *via* le **suivi chronologique** d'une population de référence chez l'espèce cryptique *P. serratus* (Erraud et al., 2018b), après **validation** par des **expérimentations de récupération** en laboratoire de spécimens de *P. longirostris* (Erraud, 2018).

1.3.3 Les outils sélectionnés

En définitive, **seuls 10 marqueurs**, sur les 82 déployés initialement, ont pu être retenus pour la phase d'intégration (*cf.* section 2.4.1, Tableau 3,). Ils ne concernent que 3 des 9 espèces suivies dans le cadre du projet : chez le **copépode** *E. affinis* (compartiment planctonique), la **crevette** *P. longirostris* (compartiment épibenthique) et l'**annélide** *H. diversicolor* (compartiment endobenthique). Figurent parmi les réponses biologiques, 2 enzymes du **système de défense antioxydant** (catalase et glutathion-S-transférase), le marqueur de **dommage oxydatif** (peroxydation lipidique), le marqueur de **neurotoxicité** (activité de l'acétylcholinestérase), un marqueur de **génotoxicité/reprotoxicité** (dommage à l'ADN spermatique), 3 marqueurs du **métabolisme énergétique** (lipides, glycogène et ratio ARN/ADN), ainsi qu'un **descripteur populationnel** (densité).

Nombre d'autres marqueurs déployés dans le cadre du projet présentaient un intérêt évident, à commencer par les marqueurs recommandés à l'issue des travaux d'OSPAR (*e.g.* activité EROD, intersexualité, le niveau de vitéllogénine chez les poissons mâles), qui bénéficient d'un important recul scientifique. Toutefois, l'utilisation de ces outils s'est confrontée à une **difficulté de mobiliser** les données permettant de fixer **les référentiels** (*i.e.* à minima, les valeurs de base et seuils de significativité) indispensables à leur interprétation.

Il est vrai que la complexité des interactions entre une réponse biologique, le statut physiologique de l'organisme, les caractéristiques propres au pool génétique de sa population d'origine, et les variables environnementales ne permettent pas d'envisager facilement la construction d'un référentiel d'interprétation. Cela nécessite un investissement pour comprendre et fixer, pas à pas, les conditions d'application du marqueur concerné. Par ailleurs, le référentiel ne sera sans doute pas « parfait » dès le départ mais restera au contraire perfectible, voir évolutif au long terme et/ou en fonction de zones géographiques ciblées, car il est peu probable qu'un référentiel « universel » existe. Ces aspects n'enlèvent en rien l'intérêt de l'utilisation de biomarqueurs dans un contexte de biosurveillance (active ou passive), mais appuient la nécessité de définir les référentiels d'interprétation en parallèle des développements des marqueurs. Cette étape de définition et/ou d'utilisation de valeurs seuil a ainsi constitué le verrou d'une intégration d'un nombre plus important de marqueurs dans l'indice global de perturbation, alors même que certains outils devaient certainement disposer de référentiels utilisables, à défaut d'être parfaits.

Le travail des années à venir comprendra donc un effort certain pour affiner la compréhension des réponses biologiques proposées comme biomarqueur, améliorer les méthodologies de construction des référentiels, et ainsi lever les verrous qui entravent l'interprétation des biomarqueurs en surveillance environnementale.



1.4 Intégration des réponses

Afin d'illustrer l'utilisation des réponses des biomarqueurs dans un contexte de biosurveillance, nous avons proposé d'intégrer les données issues des indicateurs jugés opérationnels au sein d'un indice global. Plusieurs méthodes d'intégration existent à ce jour (e.g. Aarab et al. 2004, Beliaeff and Burgeot 2002 modifié par Devin et al. 2014, Broeg and Lehtonen 2006, Chèvre et al. 2003, Dagnino et al. 2007, Yeom et al. 2007, Piva et al. 2011). Parmi celles-ci, seule la méthodologie développée par Piva et al. (2011) puis modifiée par Barjhoux et al. (2018) rassemble les avantages suivants : (i) utilisation d'un référentiel externe complet (i.e. valeur de référence, seuil des variations basales et seuil d'effet), (ii) gradation des effets de chaque biomarqueur et de l'indice global en classes de risque, et (iii) pondération des biomarqueurs en fonction du niveau d'organisation biologique étudié. Par ailleurs, dans cette méthode, le calcul de l'indice autour des réponses des biomarqueurs s'effectue au sein d'une *Line of Evidence* (LOE) qui fait partie d'une approche plus complète d'évaluation de la qualité du milieu (approche *Weight-of-Evidence*, WOE) comprenant également d'autres LOE (Chimie, Biodisponibilité/Bioaccumulation et Bioessais).

Cette approche WOE a déjà été appliquée dans le cadre de l'évaluation de l'état de santé d'environnements industriels et/ou urbanisés soumis à des pressions anthropiques variées (Bebianno et al., 2015; Benedetti et al., 2012; Piva et al., 2011) et notamment la Seine amont, dans le cadre du programme PIREN-Seine (Barjhoux et al., 2018). Dans le cadre du projet ECOTONES, l'approche a été appliquée à l'intégration des 10 indicateurs biologiques évalués précédemment comme pleinement opérationnels (c.f. section 2.3) selon la méthodologie décrite par Barjhoux et al. (2018). Ainsi, les résultats de l'intégration des réponses biologiques acquises dans le cadre d'ECOTONES (LOE Biomarqueurs) ont ensuite pu être confrontés aux niveaux de bioaccumulation chez la moule *Mytilus edulis* (données Quadrige² du réseau de surveillance ROCCH ; LOE Bioaccumulation) et aux niveaux de contamination de la colonne d'eau et du sédiment (données Naiades du suivi AESN ; LOE Chimie) pour les trois années suivies dans le cadre du projet. Les principaux résultats sont présentés ci-dessous pour les moyennes annuelles de chaque paramètre. Le détail de la méthodologie appliquée et l'ensemble des résultats générés sont décrits en *Annexe 11*.

1.4.1 LOE Biomarqueurs

Le détail des calculs de la LOE Biomarqueur est présenté en Annexe 11 (*Figure S1*). Les valeurs de référence et seuils utilisés, ainsi que les résultats détaillés pour chaque biomarqueur sont rassemblés en Annexe 11 (*section 1*).

Les **quotients de risque BiomHQ⁹** calculés lors de cette intégration ont des valeurs comprises entre 22,9 et 43,2 pour les trois années de suivi, la plus forte valeur étant observée pour l'année 2016 (*Figure 2A*). Le risque associé à ces quotients est identique pour **toutes les**

⁹ le BiomHQ est construit sur la somme des écarts entre les valeurs observées et le référentiel de chaque réponse et traduit donc un aspect quantitatif de la perturbation ; le BiomHQ index est construit sur le pourcentage de biomarqueurs répartis dans les différentes classes de risque, insensible à l'importance des écarts entre valeurs observées et référentiel, il traduit plutôt un aspect qualitatif de la perturbation du milieu.

années de suivi et établi à « **majeur** », ne dénotant donc **aucune tendance temporelle notable** en termes de risque (Figure 2A).

Les profils de **contributions par famille de biomarqueurs** sont globalement similaires pour les deux premières années de suivi (Figure 2B), avec les marqueurs du stress oxydant comme principaux contributeurs, suivis des marqueurs de reprotoxicité et de neurotoxicité (cf. Annexe 11, section 4.2.1 pour plus de détails). Ces observations sont expliquées par un niveau de risque « sévère » attribué aux mesures de TBARS chez *H. diversicolor*, de dommages à l'ADN chez *P. longirostris* et d'ACHé chez *E. affinis* pour les années 2015 et 2016 (Tableau 3). Le profil de l'année 2017 est légèrement différent avec une absence de modulation notable des marqueurs du stress oxydant et des contributions réparties de manière assez homogène entre les autres familles de biomarqueurs, comprises entre 14 % pour les marqueurs du métabolisme énergétique et 35 % pour le marqueur de reprotoxicité (Figure 2B et Tableau 3). Outre l'absence de réponse des marqueurs de stress oxydant, l'année 2017 se distingue des deux autres années par la généralisation de la modulation des marqueurs du métabolisme énergétique, visible y compris sur les réserves lipidiques chez l'espèce polychète.

Il est intéressant de remarquer que, malgré le nombre bien plus important de biomarqueurs mesurés chez le ver *H. diversicolor*, les **contributions des trois espèces** sont très similaires pour cette année 2017 (Figure 2C). Les contributions sont un peu plus déséquilibrées pour les deux autres années, avec des valeurs d'environ 56 % pour *H. diversicolor*, 30 % pour *P. longirostris* et 13 % pour *E. affinis*. Néanmoins, si les contributions de chaque espèce sont ramenées au nombre de biomarqueurs analysés chez chacune d'entre-elles, *P. longirostris* s'avère le modèle le plus contributeur pour toutes les années de suivi (30-35% vs. 6-14% pour *E. affinis* et 5-8% pour *H. diversicolor*). Selon ces observations, il apparaît donc que l'analyse des dommages ADN chez la crevette estuarienne soit un marqueur particulièrement sensible pour retracer l'état de contamination de l'estuaire.

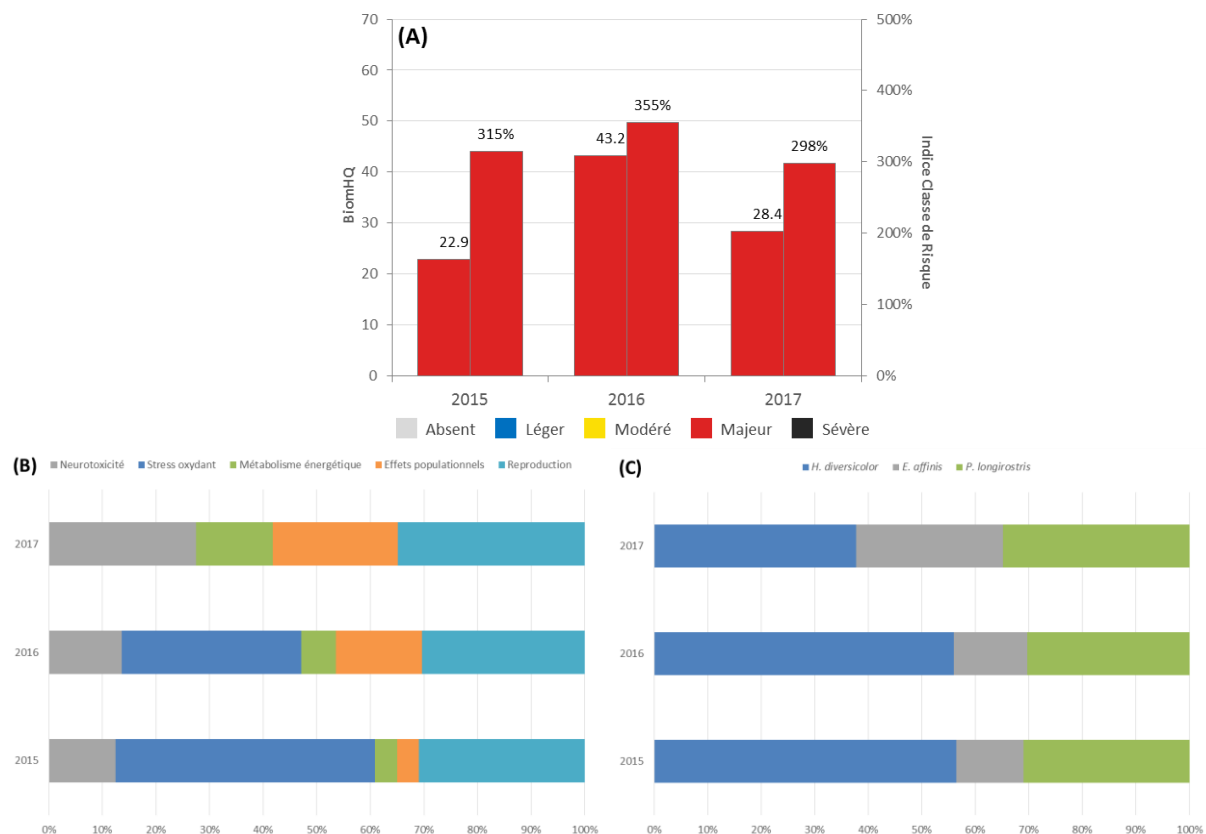


Figure 2 Quotient de danger et indice de classe de risque calculés pour les années 2015, 2016 et 2017 au sein des LOE Biomarqueurs (A), et contributions des familles de biomarqueurs (B) et des espèces modèles (C) aux valeurs de BiomHQ calculées pour les 3 années de suivi.

Tableau 3 Classes de risque associées aux valeurs d'effet E(i) calculées pour chaque biomarqueur lors de l'intégration globale annuelle.

Famille	Biomarqueurs.	Espèce	Sens de l'effet considéré	Weight	Classe de risque des Effets E(i)		
					2015	2016	2017
Stress oxydant	TBARS	<i>H. diversicolor</i>	Induction	0.75	Sévère	Sévère	Léger
Stress oxydant	GST	<i>H. diversicolor</i>	Induction	0.50	Absent	Absent	Absent
Stress oxydant	CAT	<i>H. diversicolor</i>	Induction	0.50	Absent	Absent	Absent
Neurotoxicité	AChE	<i>H. diversicolor</i>	Inhibition	0.75	Absent	Absent	Absent
Métabolisme énergétique	Lipides	<i>H. diversicolor</i>	Inhibition	1.20	Absent	Absent	Modéré
Métabolisme énergétique	Glycogène	<i>H. diversicolor</i>	Inhibition	1.20	Modéré	Majeur	Majeur
Effets populationnels	Densité	<i>H. diversicolor</i>	Inhibition	2.80	Modéré	Majeur	Majeur
Neurotoxicité	AChE	<i>E. affinis</i>	Inhibition	0.75	Sévère	Sévère	Sévère
Métabolisme énergétique	Rapport ARN/ADN	<i>E. affinis</i>	Inhibition	1.20	Absent	Absent	Absent
Reproduction	Dommages ADN (spermatozoïdes)	<i>P. longirostris</i>	Induction	1.70	Sévère	Sévère	Sévère



1.4.2 Comparaison des conclusions du modèles vs. Analyse brute de l'ensemble des biomarqueurs

De manière générale, l'intégration des réponses des biomarqueurs ne permet **pas** d'identifier de réelle **tendance interannuelle**. Ceci est en adéquation avec l'analyse globale de l'ensemble des réponses biologiques étudiée dans le cadre du projet ECOTONES qui ne parvient pas non plus à dégager de grande tendance commune (*cf.* partie 2.2 et Tableau 2). En effet, selon les réponses, les profils temporels sont différents et ne suivent pas la même dynamique. Ceci peut s'expliquer par plusieurs aspects comme (i) la diversité des espèces étudiées ne présentant pas la même sensibilité vis-à-vis d'un stress donné, (ii) la multiplicité des réponses analysées couvrant à la fois différents niveaux d'organisation biologiques et différentes fonctions physiologiques (e.g. différence de sensibilité, de labilité/rémanence, cinétique, (ir)réversibilité), et (iii) pour certaines réponses, la méconnaissance de l'impact de facteurs confondants sur la réponse.

Néanmoins, si une tendance doit être identifiée, elle le sera en termes d'intensité d'effet, *i.e.* au travers de l'examen des valeurs de BiomHQ⁹. Selon cet indice, l'année 2016 se distingue par des intensités d'effets plus marquées en comparaison des deux autres années. Des observations similaires sont également rapportées pour d'autres réponses (non-intégrées dans l'indice) comme par exemple plusieurs marqueurs de stress oxydant chez *S. plana*, le sex-ratio chez le copépode, certains biomarqueurs OSPAR analysés chez les espèces de poissons ainsi que les histopathologies hépatiques, et les tests *in vitro* de génotoxicité et de perturbation endocriniennes. Les cinétiques de plusieurs réponses laissent penser qu'un événement survenu en 2016, peut-être la crue exceptionnelle de cette année-là, aurait engendré un pic de toxicité chez les organismes de l'estuaire. Ce pic de toxicité s'atténuerait en 2017 pour les réponses les plus labiles (e.g. marqueurs de défenses antioxydant et de biotransformation chez *H. diversicolor*, *E. affinis* et *P. flesus*), alors que d'autres réponses à plus forte inertie restent à un niveau préoccupant en 2017 (e.g. histopathologie chez les poissons, densité de population du copépode). Ces observations effectuées sur l'ensemble des réponses analysées dans le cadre du projet ECOTONES sont en accord avec la modification du profil de réponses rapporté au sein de la LOE Biomarqueurs pour l'année 2017 (disparition du stress oxydant et augmentation des effets sur le métabolisme énergétique du polychète et l'activité AChE chez le copépode).

De plus, le niveau de réponse des marqueurs biologiques mesurés chez le flet et chez la sole sont globalement en baisse entre 2015 et 2018. Les valeurs mesurées sont également largement inférieures à celles obtenues sur des campagnes de mesure plus anciennes menées sur l'estuaire de la Seine (2008-2009, projet ICON), ce qui semble suggérer que l'estuaire est dans une **dynamique globale d'amélioration de sa qualité écologique**.

Ainsi, il apparaît qu'en dépit du faible nombre de réponses ayant pu être intégrées par rapport au nombre total de marqueurs suivis et interprétables (10 vs. 41), **les sorties de la LOE Biomarqueurs** parviennent à **retracer les tendances générales** tant en termes d'**intensité** que de **temporalité** des réponses. Cependant et bien que le panel de biomarqueurs intégrés dans la LOE réponde aux prérequis énoncés par Piva et al. (2011) (*i.e.* somme des *Weight* ≥ 6 et au moins trois biomarqueurs de poids $\geq 1,2$), il est indéniable que le

diagnostic d'état de santé des organismes gagnerait en pertinence et certainement en robustesse si d'autres paramètres comme les traceurs de trait d'histoire de vie et d'autres descripteurs populationnels (cf. Tableau 1) pouvaient être intégrés au modèle.

1.4.3 Mise en regard des résultats de la LOE Biomarqueurs avec les niveaux d'imprégnation chez la moule et de contamination du milieu

En plus d'une analyse des réponses biologiques chez les organismes estuariens, il nous a semblé pertinent d'utiliser d'autres modules de l'approche WOE pour les mettre en regard des niveaux de contamination du milieu (eau et sédiment) et des organismes (moule bleue), mesures répondant aux exigences de la réglementation et des programmes de surveillance nationaux (e.g. DCE et DCSMM).

Ainsi, les mesures de l'imprégnation de 20 composés dans les tissus chez la moule bleue *M. edulis* (données Quadrigé² pour les années 2015, 2016 et 2017 sur les sites de Villerville et Cap de la Hève) ont été intégrées au sein de la LOE Bioaccumulation. Les données de contamination de la colonne d'eau et des sédiments (respectivement 29 et 49 substances) ont été extraites de la banque de données Naiades pour les années 2015, 2016 et 2017 pour le site de Honfleur (pour les sédiments aucune donnée disponible pour 2017) et intégrées au sein de la LOE Chimie. L'intégration de ces données dans la LOE Bioaccumulation et la LOE Chimie a été effectuée selon la méthode décrite par Barjhoux et al. (2018) dont le détail est donné en Annexe 11 (section 2 pour la LOE Bioaccumulation et section 3 pour la LOE Chimie).

Les quotients de risque calculés pour la **LOE Bioaccumulation** sont très **similaires pour les trois années** de suivi (Figure 3A). Cependant l'année 2016 présente un risque associé moindre, évalué comme « **modéré** » alors que les deux autres années se voient assignées un risque « **majeur** » (cf. Annexe 11, Section 2, tableau S6B).

La **même tendance** est observée concernant les **niveaux de contamination de la colonne d'eau**, avec des valeurs de ChemHQ_{eau}¹⁰ plus faible en 2016 (Figure 3B). En revanche, les quotients de risque ChemHQ_{sed}¹⁰ présentent des valeurs similaires en 2015 et 2016. Les classes de risque associées à la contamination du milieu sont globalement plus faibles que pour la bioaccumulation (et les biomarqueurs) avec des risques établis à « **modéré** » pour le compartiment sédimentaire et « **absent** » à « **léger** » pour la colonne d'eau (Figure 3).

Les **seuls composés contribuant** aux valeurs de BioavHQ¹¹ calculées sont les **PCBs** et notamment les congénères 118 et 101 pour lesquels les plus hauts niveaux de risque (« **sévère** » ou « **majeur** ») sont identifiés. En revanche, les PCB ne font pas partie des

¹⁰ Le quotient de risque (ChemHQ) est construit sur la somme des écarts entre les mesures de contaminants dans le milieu (dans la colonne d'eau pour le ChemHQ_{eau} et dans les sédiments pour le ChemHQ_{sed}) et le référentiel de chaque substance (NQE-MA ou PNEC_{sédiment}) et traduit donc un aspect quantitatif de la contamination. C'est à partir de la valeur de cet indice qu'est attribué la classe risque associée à la LOE Chimie.

¹¹ Similairement à la LOE Biomarqueurs, le quotient de risque BioavHQ est construit sur la somme des écarts entre les concentrations accumulées et le référentiel de chaque substance (tirées des travaux d'Amouroux et Brun (2018)) et traduit donc un aspect quantitatif de la bioaccumulation ; le BioavHQ index est construit sur le pourcentage de substances réparties dans les différentes classes de risque, insensible à l'importance des écarts entre valeurs observées et référentiel, il traduit plutôt un aspect qualitatif de la perturbation du milieu et permet l'attribution de la classe de risque de la LOE Bioaccumulation.

substances identifiées comme problématique dans le compartiment abiotique. Ce sont les **HAP** qui sont les **principaux contributeurs** aux valeurs **ChemHQ**, mais là encore les substances identifiées diffèrent selon la matrice considérée : le benzo(b)fluoranthène (> 95%) pour la colonne d'eau et le pyrène, phénanthrène et le benzo(g,h,i)pérylène pour les sédiments. Les HAP ne montrent en revanche aucune accumulation notable chez la moule *M. edulis*, ce qui souligne l'importance d'intégrer des analyses sur le biote aux mesures des niveaux de contamination du milieu afin de confirmer ou non la biodisponibilité des composés pour les organismes aquatiques.

Ainsi, l'intégration des données d'**accumulation concorde** relativement **bien** à celle effectuée sur les **réponses biologiques** pour les années **2015 et 2017**, tant en intensité (i.e. 22.8 et 28.4 pour BiomHQ, 72.0 et 74.4 pour BioavHQ) qu'en niveau de risque établi (« majeur »). En revanche, **ce n'est pas le cas pour l'année 2016** qui, selon les données d'accumulation serait l'année la moins problématique (risque « modéré »), alors que les réponses biologiques tendent à montrer que c'est l'année présentant les effets les plus intenses. Enfin, les **écarts** de diagnostic entre la **LOE Chimie** et la **LOE Biomarqueurs** sont encore **plus importants** puisque l'analyse des contaminants présents dans le milieu ne parvient pas à prédire les effets toxiques retracés par les biomarqueurs, avec des classes de risque faibles (« absent » à « léger ») pour la colonne d'eau et « modéré » pour le sédiment). Ceci est probablement lié à la non-exhaustivité des analyses chimiques et de la non-prise en compte de la notion de spéciation/biodisponibilité des substances (à la fois dans la mesure et dans le référentiel).

Ces résultats montrent bien que si les **analyses chimiques** permettent bien de caractériser le milieu et d'identifier (une partie) des substances présentes (donc éventuellement les grandes sources de contamination), elles n'ont qu'une **pertinence limitée** quant à l'évaluation ou la **prédiction des effets** engendrés sur les organismes de l'estuaire.

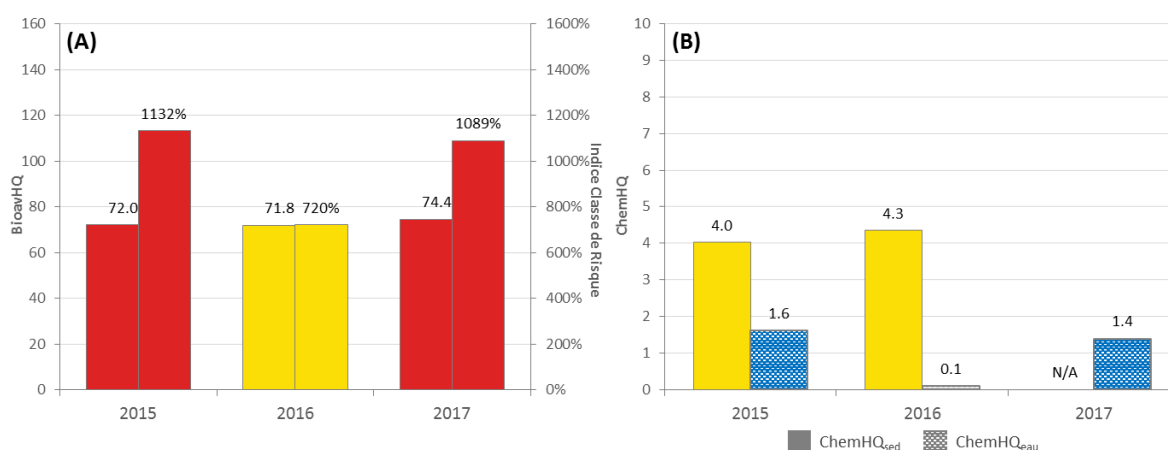


Figure 3 Quotients de danger et indices de classe de risque calculés pour les années 2015, 2016 et 2017 au sein des LOE Bioaccumulation (A) et Chimie (B).

N.B. Le modèle WOE permet la synthèse des informations issues de chaque LOE dans une intégration finale générant un indice et une classe de risque globaux. Cette dernière étape d'intégration est présentée à titre illustratif en Annexe 11 (voir section 4).

1.5 Bilan et préconisations

Un des points forts de l'étude menée dans le cadre du projet ECOTONES repose sur l'**analyse plurispécifique** des effets biologiques. Outre une amélioration de la représentativité de l'analyse par l'utilisation d'organismes aux habitats et niveaux trophiques différents, la démarche a permis de montrer des différences de sensibilité des biomarqueurs entre les espèces (e.g. activité AChE chez *E. affinis* et *H. diversicolor*). Grâce à cela, l'intégration des données a pu être effectuée sur trois espèces estuariennes : une espèce endobenthique (*H. diversicolor*), une espèce épibenthique (*P. longirostris*) et une espèce pélagique (*E. affinis*). Certes ce nombre est bien inférieur au nombre d'espèces étudiées dans le cadre du projet ; néanmoins, il est important de souligner que de nombreuses études de biosurveillance de la qualité des milieux aquatiques sur la base de l'analyse de biomarqueurs ne reposent que sur une seule espèce d'intérêt. L'intégration des résultats sur trois espèces est, en ce sens, déjà une avancée. En dépit du nombre restreint d'espèces et de réponses intégrées à ce jour dans l'approche WOE au regard du panel disponible au sein du projet, il est intéressant de noter que ce « petit extrait » de données retrace finalement assez bien les tendances générales de l'ensemble des couples espèces/réponses analysés par le consortium. Ainsi, la pertinence et la **justesse du diagnostic** ne semblent pas tant reposer sur un nombre maximisé d'espèces et de réponses biologiques étudiées que sur le **choix judicieux et éclairé** de celles-ci, sur la base de leur **sensibilité**, de leur **représentativité écologique/socio-économique** et de la **robustesse de leur référentiel** associé. Cependant, l'analyse gagnerait en pertinence écologique si plus d'espèces représentatives d'autres taxons (e.g. poissons, mollusques bivalves) étaient associées dans la procédure pour renforcer le diagnostic et sa pertinence/valeur aux yeux des gestionnaires.

Le nombre de réponses biologiques disposant d'un référentiel complet est notablement restreint par rapport au panel de biomarqueurs dits interprétables (cf. section 2.3). Certains bénéficient pourtant de nombreuses années d'expérience scientifique et d'un déploiement dans le cadre d'une surveillance environnementale. Ce constat illustre l'importance de produire des guides de recommandation concernant l'application et l'interprétation des outils biologiques, en amont du transfert vers les bureaux d'études et de leur application en suivi environnemental sur le moyen-long terme. De manière plus globale, bien que certaines analyses nécessitent encore des améliorations techniques et/ou analytiques pour atteindre le niveau d'opérationnalité requis à leur utilisation en biosurveillance de routine, il ressort du projet ECOTONES que le gros des efforts à venir doit se concentrer sur l'établissement et la validation, par des experts de chaque domaine, d'un référentiel d'interprétation des réponses biologiques. En ce sens, les futurs déploiements d'outils biologiques en surveillance environnementale ne devraient concerner que les outils présentant un niveau d'opérationnalité suffisant (cf. section 2.3.1).

Pour répondre à cet objectif, la mobilisation des futurs efforts de recherche et développement devrait être effectuée au regard de différents aspects :

- (i) La **pertinence des réponses** biologiques ciblées est un aspect important. Classiquement, il serait recommandable de focaliser les efforts d'investigation sur les réponses biologiques les plus susceptibles de traduire une **atteinte à la fitness** de l'organisme et/ou un **risque** pour le maintien de sa **population**. Ainsi, les marqueurs retranscrivant des dommages (e.g. intégrité de l'ADN, peroxydation lipidique, histopathologie) et/ou des altérations d'une grande fonction physiologique

- (e.g. reproduction, défense immunitaire, transmission nerveuse) devraient être priorités.
- (ii) Le **recul scientifique** déjà existant autour du couple réponse biologique / espèce est à prendre en considération, d'autant plus s'il garantit l'**atteinte d'un niveau opérationnel à court terme**. *A contrario*, les marqueurs déjà connus pour être difficilement interprétables *in situ*, du fait d'une variabilité naturelle trop importante et difficilement maîtrisable et/ou une toxicodynamique non-linéaire, ne devrait pas être retenus en priorité (e.g. enzymes de défense antioxydante).
 - (iii) La possibilité d'**harmoniser au maximum les méthodes** déployées chez les différentes espèces, de sorte à pouvoir comparer les différents groupes taxinomiques et trophiques, ne doit pas être négligée. L'harmonisation n'est toutefois pas un objectif atteignable pour tous les types de réponses du fait des divergences physiologiques entre taxa. S'il est possible d'évaluer l'atteinte à l'intégrité de l'ADN au moyen d'un test des Comet chez la plupart des organismes, il sera en revanche plus difficile de déployer une seule méthode consensuelle pour mesurer la reprotoxicité et la perturbation endocrinienne.
 - (iv) L'articulation, au sein des procédures d'intégration, entre des biomarqueurs moléculaires et cellulaires et des indicateurs de haut niveau organisationnel tels que l'histopathologie, les traits d'histoire de vie, voire des descripteurs populationnels (si l'expertise est suffisamment solide pour garantir leur interprétation), permettrait d'avoir à la fois des marqueurs « **d'alarme précoces** » et des marqueurs d'état « **critique** » (i.e. atteintes physiologiques et/ou populationnelles avérées). Triviale, cette dichotomie conduirait certainement à une meilleure classification du niveau d'urgence des stations (e.g. site avec des problèmes prévisibles ou à venir *versus* site d'ores et déjà dans un état écologique critique) et de guider au mieux les actions de gestion.
 - (v) La mise en œuvre d'**approches de surveillance active** par encagement d'organismes (*cf.* encadré 1), de par la maîtrise qu'elle octroie sur les conditions d'exposition et la calibration des individus, minimiserait l'influence de facteurs confondants sur les réponses biologiques mesurées et faciliterait l'accès au suivi des marqueurs de condition et des traits d'histoire de vie (e.g. survie, croissance). Ces approches favoriseraient, sans doute, la comparaison des réponses inter-espèce et améliorerait *in fine* le diagnostic écotoxicologique. Il faut noter toutefois que ces approches ne se prêtent pas au suivi de tous les marqueurs ni même de toutes les espèces. A titre d'exemple, elles ne permettent pas, en l'état, de remplacer les approches passives pour l'étude des phénomènes d'intersexualité, et restent difficilement applicables aux espèces endobenthiques.

Les résultantes de l'**intégration de données** effectuée sur différents aspects de la qualité de l'estuaire de Seine (i.e. **contamination du milieu, bioaccumulation et biomarqueurs**) montrent des **divergences de conclusions** notables (voir partie 2.4.3). En particulier, l'analyse de la qualité du milieu basée sur les mesures de contaminant sur matrices abiotiques semble fortement sous-estimer le risque pour l'état de santé des organismes qui y vivent. Ceci peut s'expliquer par plusieurs limites tant techniques que scientifiques (e.g. manque de valeur de référence, limites analytiques, nombre restreint de substances analysées au regard de la diversité des composés présents). Cette mésestimation n'est cependant pas systématique comme le montre une précédente étude (Barjhoux et al., 2018). Ceci semble indiquer que ce



n'est pas en lien avec la méthode d'intégration elle-même, mais souligne plutôt l'importance des points suivant :

- (i) L'intérêt évident d'adjoindre des analyses sur le biote aux mesures de contamination du milieu afin de **confirmer ou non la biodisponibilité** et l'**impact des composés** sur les organismes aquatiques.
- (ii) Le réel atout que représentent les biomarqueurs pour **identifier** clairement les effets de pollutions diffuses et complexes des milieux naturels car résultant de l'**effet du cocktail** de substances biodisponibles présent.

Enfin, bien que l'**approche WOE** proposée ici représente d'ores et déjà un **outil performant** pour synthétiser un grand nombre d'informations de natures variées, aisément transférable et interprétable par les gestionnaires, celle-ci pourrait **encore gagner en pertinence** et en intérêt en suivant les propositions suivantes :

- (i) L'**augmentation des poids des LOE d'intérêt** (ici, celles basées sur le biote) pour appuyer leur influence lors de l'intégration finale (voir Annexe 11, section 4), en particulier dans le cas où des espèces à fort intérêt socio-économique viendraient alimenter le modèle, en considérant leur position clé à la fois écologique mais aussi au regard des activités humaines associées.
- (ii) L'implémentation d'une stratégie de **classification du risque de type « One-out, all-out »**, comme appliquée dans le cadre de la DCE pour l'évaluation de l'**état chimique**, lors de modulations importantes de réponses ou de quotients de risque à forte pertinence écologique (e.g. effets reprotoxiques, populationnels).
- (iii) Le **découpage de la LOE Biomarqueurs** en deux afin de former un module d'alerte rassemblant les biomarqueurs précoces et prédictifs, et un second rassemblant les réponses d'état critique, afin de faciliter la classification de la station étudiée (voir point (iv) ci-dessus).



2 Effet de la contamination sur l'avifaune

2.1 Rappel du contexte

La majorité des programmes de suivi des contaminants et de leurs effets en milieu marin utilise des invertébrés pour des raisons pratiques évidentes (e.g. sédentarité, abondance, facilité de collecte, lien direct entre concentrations dans l'organisme et concentrations dans le milieu, utilisation standardisée de différents biomarqueurs d'exposition et/ou d'effets), les oiseaux marins sont également largement utilisés comme bioindicateurs pour le suivi de la contamination chimique environnementale en milieu marin dans les études scientifiques (Bustamante et Fort 2018). En effet, les oiseaux marins offrent de nombreux avantages quant à leur relative facilité d'observation et d'échantillonnage, la diversité de leur écologie trophique, leur large distribution spatiale, et leur capacité à refléter la contamination de leur environnement.

Même si du fait de leur physiologie plus complexe que celle des invertébrés, les oiseaux marins peuvent réguler plus efficacement les contaminants, leurs caractéristiques telles que longévité et position trophique font des oiseaux marins des intégrateurs remarquables de la contamination environnementale (e.g. Furness & Camphuysen 1997, Elliot & Elliot 2013). Du fait de leur longue durée de vie, ils sont soumis au processus de bioaccumulation et sont donc susceptibles d'accumuler des contaminants durant plusieurs décennies. En raison de leur position trophique, le plus souvent élevée voire terminale, les oiseaux marins sont fortement soumis au processus de bioamplification des contaminants dits bioamplifiables (*i.e.*, ceux dont la concentration augmente à chaque niveau trophique le long de la chaîne alimentaire). L'exposition des oiseaux marins aux contaminants entraîne des effets à différents niveaux englobant des effets comportementaux, neurologiques, endocriniens, immunotoxiques et reprotoxiques (Scheuhammer et al. 2007, Tan et al. 2009, Frederick et Jayasena 2011, Tartu et al. 2013), avec des conséquences avérées sur la démographie et la dynamique des populations impactées (Goutte et al. 2014ab). En outre, certaines études ont montré que les contaminants, qu'ils soient métalliques ou organiques, peuvent augmenter la production de dommages cellulaires *via* des processus oxydatifs (Whysner & Wang 2001, Isaksson, 2010). Dans ce contexte général, l'objectif de ce volet du projet ECOTONES était de faire un état des lieux de l'imprégnation chimique des oiseaux marins vivant dans l'estuaire de Seine, de comparer les niveaux des concentrations avec ceux d'un site éloigné de l'estuaire (*i.e.*, site témoin, les Iles Chausey) et des données de la littérature, et enfin de déterminer si des effets sur l'état de santé des oiseaux *via* différents paramètres reflétant le stress oxydant (*i.e.* paramètres enzymatiques, mesures de dommages) et le niveau de stress (niveau de la corticostérone) étaient observables, en lien avec l'exposition chimique.

2.2 Rappel de la stratégie

Durant les trois années consécutives, 2015, 2016 et 2017, les contaminants, les paramètres du stress oxydant et le niveau de stress ont été suivis chez 4 espèces d'oiseaux marins : le goéland marin *Larus marinus*, le goéland argenté *Larus argentatus*, le goéland brun *Larus fuscus* et le cormoran huppé *Phalacrocorax aristotelis*. Des prélèvements de sang ont



été réalisés sur 205 individus sur la période dans 4 sites différents : la ville du Havre, milieu urbanisé dans la zone des entrepôts au sud de la ville ; l'îlot du ratier, reposoir et zone de nidification, au centre de l'estuaire ; Antifer, au pied des falaises situées au nord du Havre ; aux îles Chausey, site témoin éloigné des zones urbaines et industrielles. Les dosages ont été réalisés sur le sang centrifugé, cellules sanguines pour les éléments traces métalliques et les isotopes stables, et sur le plasma pour les polluants organiques et les biomarqueurs. De surcroît, des plumes ont été prélevées sur lesquelles éléments traces métalliques et isotopes stables ont été mesurés. Le stade de vie « poussin » a été sélectionné car il permet de s'affranchir de l'histoire de vie souvent complexe des adultes pour lesquels les niveaux des contaminants intègrent l'exposition autour du site de capture mais aussi lors des migrations et de l'hivernage. Les poussins reflètent bien la contamination de la zone autour de la colonie, que cela soit pour le sang ou les plumes.

Plus de 70 contaminants différents ont été recherchés dans les tissus des oiseaux marins, comprenant :

- Seize éléments traces métalliques (douze métaux et deux métalloïdes)
- les pesticides organochlorés et leurs métabolites (OCPs) comprenant 13 composés
- les polychlorobiphényles (PCBs) comprenant les 7 congénères indicateurs
- les polybromodiphényléthers (PBDEs) comprenant 8 congénères
- les composés per- and polyfluorés (PFAS) comprenant 16 composés
- quatre alkylphénols et leurs métabolites (APs)
- Seize hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et leurs métabolites

Ces différentes mesures ont été réalisées de manière systématique même s'il faut souligner que dans un grand nombre de cas, les réponses sont restées sous la limite de détection des techniques analytiques employées.

De plus, ont été réalisées en parallèle :

- la mesure d'un biomarqueur de dommages oxydatifs (concentration en substances réactives à l'acide thiobarbiturique ou TBARs)
- la mesure des niveaux plasmatiques des enzymes associées au stress (activités spécifiques de la catalase, de la superoxyde dismutase et du glutathion-S-transférase)
- la mesure de la concentration plasmatique en corticostérone (hormone de stress chez les oiseaux). Il convient de rappeler ici que la prise de sang pour le dosage de la corticostérone doit être effectuée en moins de 3 minutes pour représenter le niveau de stress basal
- la mesure des paramètres morphologiques des individus (*i.e.* masse, longueur de l'aile, taille de la tête, du culmen et du tibiotarse)
- la mesure traceurs écologiques que constituent les ratios isotopiques des isotopes stables du carbone ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $\delta^{13}\text{C}$) et du soufre ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$, $\delta^{34}\text{S}$) (*i.e.* traceurs de l'habitat d'alimentation) d'une part, et d'autre part de l'azote ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $\delta^{15}\text{N}$) (*i.e.* traceur de la position trophique)
- la détermination du sexe par sexage moléculaire.



2.3 Analyse brute

L'ensemble des résultats relatifs au suivi de l'avifaune est détaillé dans les Annexes 7 à 10. Le tableau 4 présente de manière synthétique les mesures des différents paramètres suivis au cours de l'étude.

Tableau 4 Nombre d'échantillons dosés pour chaque paramètre (Contam : contaminants ; IS : isotopes stables ; CORT : corticostérone ; Biomark. : biomarqueurs) pour chaque espèce d'oiseau et par site.

Oiseaux	Site	2015					2016					2017				
		Contam.	IS	Sexe	CORT	Biomark.	Contam.	IS	Sexe	CORT	Biomark.	Contam.	IS	Sexe	CORT	Biomark.
Goéland marin	Le Havre	13	13	13	13	12	13	13	13	13	10	11	11	11	8	5
	Îlot du Ratier	13	13	13	12	12	13	13	13	13	10					
	Antifer											3	3	3	3	1
	Chausey											15	15	15	6	12
Goéland brun	Le Havre	12	12	12	12	10	10	10	10	10	9	3	3	3		2
Goéland argenté	Le Havre	12	12	12	12	12	15	15	15	15	14	12	12	12	6	11
	Îlot du Ratier	6	6	6	6	6	11	11	11	11	10					
	Chausey											16	16	16	5	12
Cormoran huppé	Antifer											2	2			2
	Chausey											10	10			8
Total		56	56	56	56	52	77	77	77	77	53	72	72	72	28	53

Des résultats bruts, il ressort que 50 % des contaminants mesurés étaient inférieurs à la limite de détection de la méthode analytique. L'ensemble des dosages entrepris pour les biomarqueurs et les hormones de stress ont été réalisés avec succès même si pour cette dernière les fluctuations restent difficiles à interpréter, probablement en raison de l'élévation du niveau de stress des poussins suite aux cris d'alerte des parents lors de l'arrivée des biologistes sur la colonie.

Considérant les valeurs des biomarqueurs mesurés, elles varient dans le temps et dans l'espace pour et entre espèces. L'absence de valeurs seuils établies ne permet néanmoins pas de comparer aisément nos résultats et de les situer par rapport à de tels seuils pour déterminer s'ils révèlent d'atteintes ou d'altérations. Le problème des seuils se pose de manière générale et pour les contaminants, seuls le mercure (1 ppm), le PFOS (1 ppb), la somme des DDT (Σ DDT 0,2 ppb), la somme des PCB (Σ PCB 2,6 ppb), la somme des PBDE (Σ PBDE 0,2 ppb) dans le sang des oiseaux marins ont des seuils définis. Sur l'ensemble des sites et des années, on notera que 98 % des goélands marins dépassent le seuil de toxicité pour le mercure contre seulement 3 goélands argentés sur 72, 1 goéland brun sur 25 et 4 cormorans sur 12. Indépendamment de la zone géographique, les concentrations relativement élevées de mercure chez les oiseaux marins sont assez fréquentes (Figure 4) tant chez les adultes que chez les poussins. Quoiqu'il en soit, la question des effets toxiques se pose d'autant plus pour les oiseaux de l'estuaire de Seine et de l'archipel de Chausey car ceux-ci présentent des concentrations relativement faibles de sélénium, élément protecteur contre la toxicité du mercure.

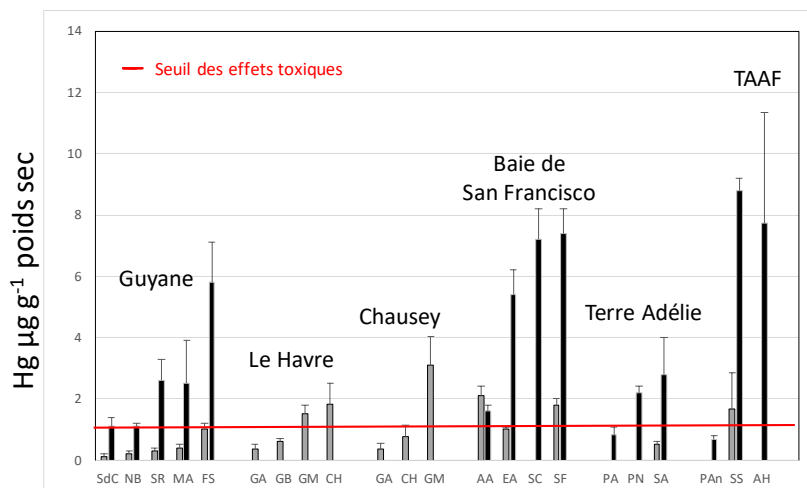


Figure 4. Comparaison des concentrations de mercure ($\mu\text{g g}^{-1}$ de poids sec) dans le sang des poussins (en gris) et des adultes (en noir) pour différentes zones géographiques. SdC : sterne de Cayenne ; NB : Noddi brun ; SR : sterne royale ; MA : mouette atricile ; FS : Frégate superbe ; GA : goéland argenté ; GB : goéland brun ; GM : goéland marin ; CH : cormoran huppé ; AA : Avocette d'Amérique ; EA : échasse d'Amérique ; SC : Sterne caspienne ; SF : sterne de Foster ; PA : pétrel antarctique ; PN : pétrel des neiges ; SA : skua antarctique ; PAn : prion antarctique ; SS : skua subantarctique ; AH : albatros hurleur.

De la même manière que pour le mercure, 88 % des goélands marins dépassent le seuil de toxicité pour les PCBs alors que seuls 20 goélands argentés et 15 goélands marins dépassent ce seuil. Il faut souligner que 100 % des goélands marins du Havre ont des concentrations en ΣPCB supérieures à 2,6 ppb. Bien qu'à ce stade, il ne soit pas possible d'évaluer l'impact toxicologique de ces contaminants sur la population de goélands marins de Seine, un effet sur la démographie pourrait exister (Goutte et al. 2014). La position trophique élevée du goéland marin est un facteur majeur expliquant les niveaux élevés tant pour le mercure que pour les PCBs qui sont des contaminants bioamplifiables et qui de ce fait montrent des concentrations croissantes le long de la chaîne alimentaire.

Pour d'autres éléments ou composés dont les seuils de toxicité sont établis (e.g. cadmium, plomb), quelle que soit l'espèce ou le site considérés, les concentrations restent inférieures aux valeurs à partir desquelles des effets toxiques ont été rapportés chez les oiseaux marins. Le plomb ne semble donc pas présenter de risque pour les populations des oiseaux marins de Seine.

2.4 Intégration des mesures

Du fait de leur position trophique élevée, souvent en fin de chaîne alimentaire, les oiseaux marins sont de bons intégrateurs de la contamination du système dont ils dépendent. Le régime alimentaire joue un rôle majeur dans la bioaccumulation des contaminants chez les oiseaux marins (Burger et Gochfeld, 2000). Dès lors, il convient de connaître leur écologie trophique à la fois en termes de position trophique que d'habitat d'alimentation. L'utilisation de traceurs chimiques est tout à fait adaptée pour obtenir des informations intégrées sur la position trophique (e.g. isotopes stables de l'azote) et de l'habitat d'alimentation (e.g. isotopes stables du carbone et du soufre).

Les mesures de contaminants dans les plumes ont été utilisées dans de nombreuses études, notamment car elles permettent de délimiter un cadre temporel et spatial, tout en s'affranchissant du biais potentiel lié à la bioaccumulation sur plusieurs années (Moreno et al., 2011). En effet, les niveaux de polluants détectés dans les plumes reflètent uniquement les apports alimentaires pendant la durée de la croissance de la plume chez les poussins. Les métaux sont assez bien accumulés dans les plumes, et montrent une influence du niveau trophique, de l'habitat d'alimentation et de la taxinomie (Abbasi et al., 2015). Néanmoins, certains métaux ne se retrouvent qu'en faibles concentrations dans les plumes, tels que le cadmium qui se retrouve majoritairement dans les reins, ou encore le plomb qui est stocké dans les os (Furness et Greenwood, 1993). Ceci peut expliquer que parmi les éléments métalliques recherchés, le cadmium, le cobalt, le nickel et le vanadium sont restés inférieurs à la limite de détection. En revanche, les plumes étant composées de kératine, des protéines riches en cystéine, favorisent donc la fixation des éléments à forte affinité pour le soufre des cystéines : tel est le cas du mercure qui présente des concentrations élevées dans les plumes, reflétant l'exposition environnementale à ce métal. En outre, il existe une corrélation forte entre les concentrations en mercure dans les plumes et dans le sang, indépendamment de l'espèce et du site (Figure 5).

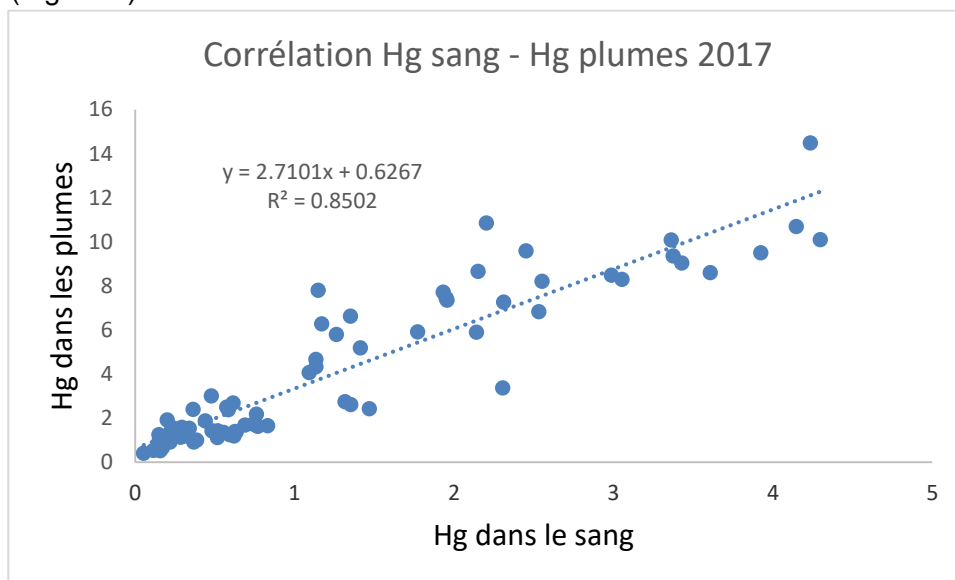


Figure 5 Exemple de corrélation entre les concentrations de Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$ de poids sec) dans le sang et les plumes. Sont présentés ici les oiseaux échantillonnés en 2015.

Les mesures de contaminants dans le sang sont également largement utilisées, étant donné qu'elles reflètent l'exposition pour le temps de renouvellement des éléments sanguins. En outre, le sang permet de doser les polluants organiques persistants beaucoup plus aisément que dans les plumes. Il permet également de mesurer des paramètres variés, notamment les biomarqueurs. En ce qui concerne les éléments traces, les concentrations d'argent, de cadmium, de cobalt, de nickel et de vanadium restaient inférieures aux limites de quantification dans le sang des oiseaux marins de Seine et du site témoin. Les éléments essentiels présentent des concentrations élevées, notamment le fer en raison de sa présence importante dans l'hémoglobine. Des variations suivant l'espèce et le site sont observées pour les éléments non essentiels détectés, le mercure et le plomb. De telles variations existent également pour les polluants organiques. Ainsi, si les PBDE restent généralement inférieurs aux limites de quantification, les PFAS sont bien détectés quel que soit le site. Il convient de noter que les concentrations de composés perfluorés sont particulièrement élevées en

comparaison d'autres zones impactées comme l'Arctique (Figure 6), même si cela ne semble pas spécifiquement lié aux apports par la Seine puisque les concentrations les plus fortes se rencontrent chez le cormoran huppé de l'archipel de Chausey.

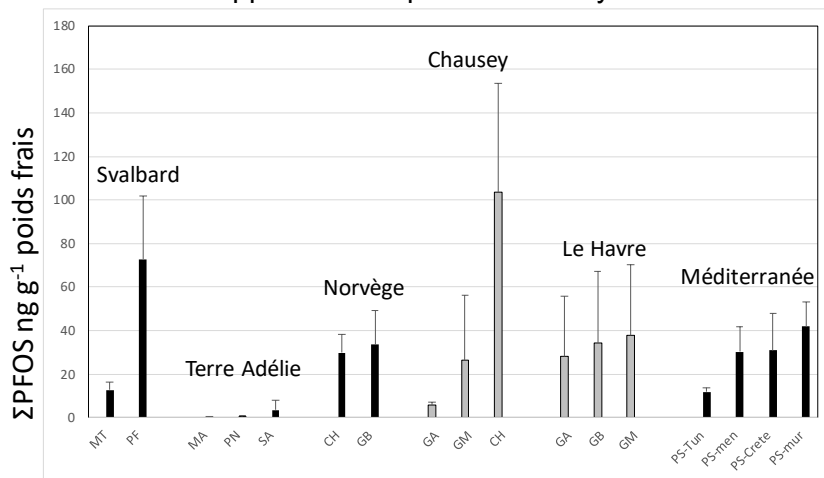


Figure 6. Comparaison des concentrations de ΣPFOS (ng g⁻¹ de poids frais) dans le sang des poussins (en gris) et des adultes (en noir) pour différentes zones géographiques. MT : mouette tridactyle ; PF : pétrel fulmar ; MA : manchot Adélie ; PN : pétrel des neiges ; SA : skua antarctique ; CH : cormoran huppé ; GB : goéland brun ; GA : goéland argenté ; GM : goéland marin ; PF : Puffin de Scopoli de Tun : Tunisie, men : Menorca, mur : Murcie.

Malgré une variation spatiale des niveaux des contaminants historiques (PCBs et OCPs), avec l'archipel de Chausey étant le site le moins imprégné, les sites du Havre et d'Antifer présentant des niveaux plus forts, et l'Îlot du Ratier étant le site le plus contaminé, le niveau de contamination des POPs historiques est globalement faible (exemple du HCB Figure 7).

Dans nos sites d'études en Manche, globalement les résultats montrent des variations liées :

- 1) à l'habitat d'alimentation : que cela soit au niveau de la Seine ou au niveau du site témoin, la zone d'alimentation influence l'exposition. Ainsi, les oiseaux s'alimentant le plus en mer sont plus exposés aux contaminants s'accumulant et se bioamplifiant dans les réseaux trophiques marins tels que le mercure. Ainsi, les goélands marins qui présentent la signature la plus marine en carbone et en soufre montrent les concentrations les plus élevées de mercure en Seine comme à Chausey ;
- 2) au régime alimentaire avec les plus fortes concentrations de mercure, de PCBs et de PBDE et d'OCPs chez les espèces ayant le niveau trophique le plus important (*i.e.* goélands marins, cormorans huppés) aussi bien en Seine qu'au site témoin. Au contraire, les concentrations de plomb et de HAPs (et ses métabolites) sont supérieures lorsque la position trophique est plus faible (*i.e.* goélands argentés) ;

Là encore, ces résultats soulignent le rôle majeur de la voie trophique comme voie d'exposition et de la composition du régime alimentaire dans les apports des contaminants.

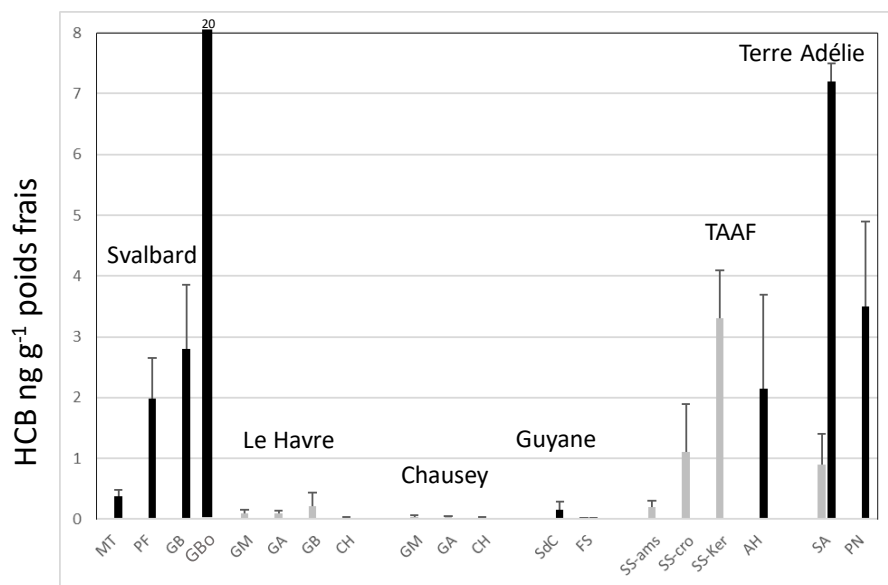


Figure 7. Comparaison des concentrations de HCB (ng g⁻¹ de poids frais) dans le sang des poussins (en gris) et des adultes (en noir) pour différentes zones géographiques. MT : mouette tridactyle ; PF : pétrel fulmar ; GB : goéland brun ; GBo : goéland bourgmestre ; GM : goéland marin ; GA : goéland argenté ; CH : cormoran huppé ; SdC : sterne de Cayenne ; FS : frégate superbe ; SS-ams : skua subantarctique d'Amsterdam ; SS-cro : skua subantarctique de Crozet ; SS-Ker : skua subantarctique de Kerguelen ; SA : skua antarctique ; PN : pétrel des neiges. TAAF : Terres Australes et Antarctiques Françaises.

A large échelle, la contamination générale de la zone par les perfluorés suggère une contamination globale de la zone. A plus petite échelle, au niveau de la zone de la Seine, des variations sont également à prendre en compte en lien avec la zone urbaine. Ainsi, les plus fortes concentrations de plomb et la composition en HAPs légers et ses métabolites dans le sang des goélands nichant dans la ville du Havre suggèrent une exposition des poussins par voie atmosphérique.

Conclusion

Le projet ECOTONES a permis de dresser un bilan des outils biologiques réellement applicables, à l'heure actuelle, dans le cadre d'un réseau de surveillance de la qualité environnementale de l'estuaire de Seine. En dépit du foisonnement d'indicateurs biologiques disponibles *a priori* (82 au total, chez 9 espèces), il apparaît que seulement 10 couples indicateur/espèce (des biomarqueurs de condition, de stress oxydant, de neurotoxicité, de génotoxicité et un descripteur populationnel ; chez 3 espèces : *Hediste diversicolor*, *Eurytemora affinis* et *Palaemon longirostris*) ont présenté un niveau de finalisation permettant une interprétation claire (*i.e.* caractérisation de valeurs de référence). Toutefois, dans leur ensemble, les résultats obtenus révèlent une qualité écotoxicologique médiocre des eaux estuariennes entre 2015 et 2017. La démarche d'intégration des données selon l'approche *Weight of Evidence* a démontré que l'analyse de la qualité du milieu simplement sur la base de mesures du niveau de contamination (non-exhaustives) pouvait conduire à une importante sous-estimation du risque pour l'état de santé des organismes qui y vivent. Aussi, il apparaît désormais essentiel de promouvoir des actions de recherche orientées sur la caractérisation de valeurs de référence robustes (*i.e.* indispensables à l'interprétation) pour quelques indicateurs d'intérêt, dans une perspective de consolider l'approche « indicateurs biologiques » (*i.e.* LOE biomarqueurs).

A un niveau d'intégration supérieur, les investigations menées sur l'avifaune confirment que les oiseaux nichant dans et autour de l'estuaire sont fortement exposés aux polluants organiques persistants (POPs), en lien avec la composition et l'origine de leur alimentation. Parmi les 4 espèces étudiées, le goéland marin est particulièrement exposé aux POPs en raison de sa position trophique élevée et de son habitat d'alimentation plus marin que les autres espèces. La grande majorité des individus de Seine de cette espèce dépassaient les seuils de toxicité du mercure, des PCB et des DDTs ce qui suggère que ces contaminants pourraient avoir des effets toxiques. L'absence de valeurs seuils pour les biomarqueurs ne permet cependant pas d'établir si ces biomarqueurs révèlent des altérations liées à l'exposition à ces contaminants.



BIBLIOGRAPHIE

- Aarab, N., Champeau, O., Mora, P., Daubeze, M., Garrigues, P., Narbonne, J.F., 2004. Scoring approach based on fish biomarkers applied to French river monitoring. *Biomarkers* 9, 258–270.
- Akcha, F., Leday, G., Pfohl-Leszkowicz, A., 2004a. Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: Effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 552, 197–207.
- Amiard-Triquet and Rainbow (Eds). *Environmental Assessment of Estuarine Ecosystems: A Case study*, CRC Press, Taylor & Francis, pp. 355.
- Amouroux, I., Brun, M., 2018. Substances prioritaires DCE : mollusques existants en milieu marin : DCE (NQE, VGE) et OSPAR (EAC, BAC). *Rapp. Ifremer RBE/BE/ARC*, 61.
- Barjhoux, I., Fechner, L.C., Lebrun, J.D., Anzil, A., Ayrault, S., Budzinski, H., Cachot, J., Charron, L., Chaumot, A., Clérandeau, C., Dedourge-Geffard, O., Faburé, J., François, A., Geffard, O., George, I., Labadie, P., Lévi, Y., Munoz, G., Noury, P., Oziol, L., Quéau, H., Servais, P., Uher, E., Urien, N., Geffard, A., 2018. Application of a multidisciplinary and integrative weight-of-evidence approach to a 1-year monitoring survey of the Seine River. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 23404–23429.
- Barrick A., Châtel A., Marion J.-M. Perrein-Ettajani H., Bruneau M., Mouneyrac C. 2016. A novel methodology for the determination of biomarker baseline levels in the marine polychaete *Hediste diversicolor*. *Marine Pollution Bulletin*. 180, 275-280.
- Barrick, A., Marion, J.-M., Perrein-Ettajani, H., Châtel, A., Mouneyrac, C., 2018. Baseline levels of biochemical biomarkers in the endobenthic ragworm *Hediste diversicolor* as useful tools in biological monitoring of estuaries under anthropogenic pressure. *Mar. Pollut. Bull.* 129, 81–85.
- Bebianno, M.J., Pereira, C.G., Rey, F., Cravo, A., Duarte, D., D'Errico, G., Regoli, F., 2015. Integrated approach to assess ecosystem health in harbor areas. *Sci. Total Environ.* 514, 92–107.
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 21, 1316.
- Benedetti, M., Ciaprin, F., Piva, F., Onorati, F., Fattorini, D., Notti, A., Ausili, A., Regoli, F., 2012. A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: Integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environ. Int.* 38, 17–28.
- Bocquené, G., Galgani, F., 1998. Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Tech. Mar. Environ. Sci.* 22, 19.
- Broeg, K., Lehtonen, K.K., 2006. Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 508–522.
- Burgeot, T., Gagné, F., Forget-Leray, J., Bocquené, G., 2011. Acetylcholinesterase: Methodology development of a biomarker and challenges of its application for biomonitoring. *ICES C. Code: F-25*, 309–316.
- Chapman, P.M., 2007. Determining when contamination is pollution - Weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environ. Int.* 33, 492–501.
- Chapman, P.M., Ho, K.T., Munns Jr, W., Solomon, K.R., Weinstein, M.P., 2002. Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 271–278.
- Chèvre, N., Gagné, F., Blaise, C., 2003. Development of a biomarker-based index for assessing the ecotoxic potential of aquatic sites. *Biomarkers* 8, 287–298.
- Costanza, R., D'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S.,

- O'Neill, R. V., Paruelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P., van den Belt, M., 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*. 387, 253–260.
- Costanza, R., de Groot, R., Sutton, P., van der Ploeg, S., Anderson, S.J., Kubiszewski, I., Farber, S., Turner, K., 2014. Changes in the global value of ecosystem services. *Global Environ. Change* 26, 152–156.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S., Chaumot, A., 2011. In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Res.* 45, 6417–6429.
- Dagnino, A., Allen, J.I., Moore, M.N., Broeg, K., Canesi, L., Viarengo, A., 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers* 12, 155–172.
- Dagnino, A., Sforzini, S., Dondero, F., Fenoglio, S., Bona, E., Jensen, J., Viarengo, A., 2008. A “Weight-of-Evidence” approach for the integration of environmental “Triad” data to assess ecological risk and biological vulnerability. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4, 314–326.
- Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L., Pain-Devin, S., 2014. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse.
- Erraud, A., 2018. Développement d'un biomarqueur de qualité spermatique chez deux espèces de crevettes Palaemonidae : état des lieux le long du continuum estuaire / littoral de la Seine. (Thèse de doctorat, spécialité Physiologie et biologie des organismes – populations - interactions, Université Le Havre Normandie, Le Havre, France).
- Erraud, A., Bonnard, M., Chaumot, A., Geffard, O., Dufлот, A., Forget-Leray, J., Le Foll, F., Geffard, A., Xuereb, B., 2018b. Use of sperm DNA integrity as a marker for exposure to contamination in *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Intrinsic variability, baseline level and in situ deployment. *Water Res.* 132, 124 – 134.
- European Commission (EC), 2000. Directive 2000/60/EC of the European parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, Official Journal of the European Union.
- European Commission (EC), 2013. Directive 2013/39/EU of the European parliament and of the council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.
- Hanson, N., 2011. Using biological data from field studies with multiple reference sites as a basis for environmental management: The risks for false positives and false negatives. *J. Environ. Manage.* 92, 610–619.
- Hering, D., Borja, A., Carstensen, J., Carvalho, L., Elliott, M., Feld, C.K., Heiskanen, A.-S., Johnson, R.K., Moe, J., Pont, D., 2010. The European Water Framework Directive at the age of 10: A critical review of the achievements with recommendations for the future. *Sci. Total Environ.* 408, 4007–4019. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.05.031
- Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T., Sepčić, K., 2010. Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 571–581.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., Geffard, O., 2011b. DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environ. Pollut.* 159, 1682–1691.
- MEDAD, 2015. Arrêté du 27 juillet 2015 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface pris en application des articles R. 212-10, R. 212-11.

- OSPAR Commission, 2013. Background document and technical annexes for biological effects monitoring. The Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic (ISBN 978-1-909159-22-8).
- Piva, F., Ciaprinì, F., Onorati, F., Benedetti, M., Fattorini, D., Ausili, A., Regoli, F., 2011. Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: A practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere* 83, 475–485.
- Poisson E., Fisson C., Amiard-Triquet C., Burgeot T., Couteau J., Dur G., Durand F., Forget-Leray J., Letendre J., Souissi S., Xuereb B., 2011. Effets de la contamination chimique : des organismes en danger ? Fascicule Seine-Aval 2.7, GIP Seine Aval, Rouen, pp. 68.
- Prato, S., La Valle, P., De Luca, E., Lattanzi, L., Migliore, G., Morgana, J.G., Munari, C., Nicoletti, L., Izzo, G., Mistri, M., 2014. The “one-out, all-out” principle entails the risk of imposing unnecessary restoration costs: A study case in two Mediterranean coastal lakes. *Mar. Pollut. Bull.* 80, 30–40. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.01.054
- Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J., Geffard, O., 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda). Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquat. Toxicol.* 93, 225–233.
- Yeom, D.-H., Adams, S.M., 2007. Assessing effects of stress across levels of biological organization using an aquatic ecosystem health index. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67:286–295

ANNEXES

Xuereb B. (coord.), Barjhoux I., Bustamante P., 2019. Projet ECOTONES : « Effets de la contamination sur les organismes de l'estuaire de la Seine », Annexes du rapport de recherche du programme Seine-Aval 5, 266 p.

Annexe 1. Approche multi-marqueurs sur invertébrés endobenthiques : l'annélide polychète *Hediste diversicolor*.

EA 2160 MMS/UCO - Amélie Châtel, Andrew Barrick, Vanda Dumay, Mohammed Mouloud, Mélanie Bruneau, Patrick Gillet, Hanna Perrein-Ettajani, Catherine Mouneyrac

Annexe 2. Approche multi-marqueurs sur invertébrés endobenthiques : le mollusque lamelibranche *Scrobicularia plana*.

EA 2160 MMS /UCO - Isabelle Métais, Hanane Perrein-Ettajani, Mélanie Bruneau, Catherine Mouneyrac

Annexe 3. Approche multi-marqueurs sur invertébré planctonique : le copépode *Eurytemora affinis*.

UMR-I02 SEBIO/ULHN - Joëlle Forget-Leray, Céline Boulangé-Lecomte, Gauthier Trémolet, Nathalie Giusti Romain Coulaud ; UMR-I02 SEBIO/URCA – Iris Barjhoux ; UMR 8187 LOG/ULille - Sami Souissi, Capucine Bialais, Gael Dur, Anissa Souissi.

Annexe 4. Mesures de marqueurs recommandés par l'OSPAR sur bivalve et poissons.

SARL TOXEM – Jérôme Couteau, Géraldine Maillet, Géraldine Loppion.

Annexe 5. Altération de l'ADN spermatique chez la crevette blanche *Palaemon longirostris*.

UMR-I02 SEBIO/ULHN – Alexandre Erraud, Romain Coulaud, Aurélie Duflot, Benoit Xuereb.

Annexe 6. Atteintes du système immunitaire chez le bar *Dicentrarchus labrax* et la moule bleue *Mytilus* sp.

UMR-I02 SEBIO /ULHN – Frank Le Foll, Tiphaine Monsinjon, Matthieu Paiola, Aurélie Duflot, Housseem Chalhmi, Agnès Poret.

Annexe 7. Contamination chimique par les éléments traces chez l'avifaune.

UMR 7266 LIENSs/ULR - Paco Bustamante, Maud Brault-Favrou, Carine Churlaud, Jérôme Fort, Gaël Guillou ; UMR 7283 CEBC/ULR - Olivier Chastel, Charline Parentau, Cécile Ribout ; Groupe Ornithologique Normand - Fabrice Gallien ; Maison de l'estuaire - Gilles Le Guillou.

Annexe 8 HAP et alkylphénols dans l'avifaune de l'estuaire de Seine.

EA 2160 MMS/UNantes – L. Poirier, A. Zalouk-Vergnoux, A. Kamari ; UMR 7266 LIENSs/ULR - Paco Bustamante.

Annexe 9. Impregnation de l'avifaune par les polluants organiques persistants en estuaire de Seine.

UMR 5805 EPOC/UBordeaux – Hélène Budzinski, Marie-Hélène Devier, Marine Gallien, Pierre Labadie, Mélanie Lauzent, Karine Le Menach, Patrick Pardon Laurent Peluhuet.

Annexe 10.. Suivi de biomarqueurs du stress oxydant chez l'avifane.

EA 2160 MMS/UCO - Isabelle Métais, Marine Barbarin, Mélanie Bruneau, Mohamed Mouloud, Amélie Châtel, Catherine Mouneyrac

Annexe 11. Intégration des données générées dans le cadre d'ECOTONES par une approche Weight of Evidence (WOE).

UMR-I02 SEBIO/URCA – Iris Barjoux.



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 :

Xuereb B. (coord.), Barjhoux I., Bustamante P., 2019. Projet ECOTONES : « Effets de la contamination sur les organismes de l'estuaire de la Seine », Rapport de recherche du programme Seine-Aval 5, 42 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 :

