

Projet Seine-Aval 5 **ECOTONES**

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

Annexes du rapport de recherche

Mai 2019

Coordination : Benoit Xuereb

Représentants du consortium : Iris Barjhoux, Paco Bustamante, Hélène Budzinski, Jérôme Couteau, Joëlle Forjet-Leray, Frank Le Foll, Tiphaine Monsinjon, Catherine Mouneyrac, Laurence Poirier, Sami Souissi

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Approche multi-marqueurs sur invertébrés endobenthiques : l'annélide polychète *Hediste diversicolor*. p. 3-22. 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*. p. 23-39. 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*. p. 41-69. UMR-I02 SEBIO/ULHN - Joëlle Forget-Leray, Céline Boulangé-Lecomte, Gauthier Trémolet, Nathalie Giusti Romain Coulaud ; UMR-I02 SEBIO/URCA – Iris Barjoux ; 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. p.71-104. SARL TOXEM – Jérôme Couteau, Géraldine Maillet, Géraldine Loppion.

Annexe 5. Altération de l'ADN spermatique chez la crevette blanche *Palaemon longirostris*. p. 105-133. 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. p. 135-156. UMR-I02 SEBIO /ULHN – Frank Le Foll, Tiphaine Monsinjon, Matthieu Paiola, Aurélie Duflot, Houssem Chalghmi, Agnès Poret.

Annexe 7. Contamination chimique par les éléments traces chez l'avifaune. p. 157-176. 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. p. 177-192. EA 2160 MMS/UNantes – L. Poirier, A. Zalouk-Vergnoux, A. Kamari ; UMR 7266 LIENSs/ULR - Paco Bustamante.

Annexe 9. t. Impregation de l'avifaune par les polluants organiques persistants en estuaire de Seine. p. 193-220. UMR 5805 EPOC/UBordeaux – Hélène Budzinski, Marie-Hélène Devier, Marine Gallien, Pierre Labadie, Mélanie Lauzent, Karine Le Menach, Patrick Pardon Laurent Peluhue

Annexe 10. Suivi de biomarqueurs du stress oxydant chez l'avifane. p. 221-229. 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). p. 231-265. UMR-I02 SEBIO/URCA – Iris Barjoux.



Annexes 1

Rapport Seine-Aval 5

Acronyme du projet : ECOTONES

Coordinateur : Benoit Xuereb

Tache 1. Evaluation des effets de la contamination sur la faune aquatique (responsable Benoit Xuereb)

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

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

1 Contexte



Figure 1 *Hediste diversicolor*

L'annélide polychaete *Hediste diversicolor* (Müller, 1776) est une espèce commune des estuaires, d'identification relativement aisée, facile à échantillonner et disponible tout au long de l'année. Sur le plan écologique, l'espèce joue un rôle fondamental dans la structure et le fonctionnement de l'écosystème estuarien. En effet, du fait de sa densité élevée en milieu naturel, elle constitue une réserve nutritive importante pour les prédateurs et est donc une espèce clé du réseau trophique. Par ailleurs, elle est également une espèce tolérante à un grand nombre de facteurs naturels tels que la température, la salinité et l'hypoxie. Son activité bioturbatrice est prépondérante dans les échanges eau – sédiment et dans la remobilisation des contaminants. Son habitat intra-sédimentaire, compartiment de stockage à long terme des contaminants des milieux aquatiques, implique un contact étroit avec les contaminants du milieu. En plus de ses caractéristiques écologiques, une littérature relativement bien fournie est disponible quant à différents aspects de sa biologie et physiologie (métabolisme, reproduction, croissance, développement de l'espèce). Ainsi, sa capacité à accumuler les métaux et les contaminants

organiques constituent des critères de choix quant à sa sélection comme modèle biologique dans le contexte de programmes de biosurveillance de la qualité du milieu estuarien (Diez *et al.*, 2000 ; Galloway *et al.*, 2004).

Afin de répondre aux objectifs du projet ECOTONES et de suivre l'état de santé, à différents niveaux d'intégration biologique, de l'annélide polychète sur l'estuaire de Seine, plusieurs marqueurs ont été étudiés.

2 Sites d'étude et campagnes de prélèvements

Dans le cadre du projet ECOTONES (2015 à 2017), les deux campagnes annuelles de prélèvements sur lesquelles repose cette étude, sont réalisées en Mars pour la première et en Juin/Juillet pour la seconde. Cet échantillonnage temporel permet d'évaluer l'impact de la contamination sur les organismes hors période de reproduction (i.e. en Mars) et pendant celle-ci (i.e. durant les mois de Juin/Juillet). Le site d'échantillonnage est localisé au niveau de l'estuaire de la Seine, entre les radiales 3 et 5 de la zone de suivi par la Cellule de Suivi du Littoral Normand ($49^{\circ}27'17.52''\text{N}$, $0^{\circ}11'19.57''\text{E}$) (Fig. 2).



Figure 2 Sites de prélèvement de *H. diversicolor*.

Au cours des prélèvements, des mesures de salinité et de température sont effectuées dans l'eau interstitielle. Les vers utilisés pour l'analyse de la densité, la biomasse, la L3 et la maturité sexuelle ont été prélevés en réalisant 4 quadrats de 25x25x20 cm.

Les individus extraits du sédiment ont été mis à dépurier durant 36 h dans des cristallisoirs à l'obscurité en présence d'eau de même salinité que le site de prélèvement et d'oxygène afin de vider leur tractus digestif.

55 individus ont été prélevés à même le sédiment pour l'analyse des biomarqueurs (15), des réserves énergétiques (20) et des enzymes digestives (20), rincés puis congelés dans de l'azote liquide sur le site avant d'être transférés à -80°C au laboratoire. 35 autres individus ont été prélevés dans le sédiment et maintenus sous oxygénation dans un peu de sédiment, d'eau de mer recouvert d'algues du site. Ces (35) organismes sont utilisés pour l'analyse de la génotoxicité et les tests d'enfouissement.

3 Marqueurs au niveau populationnel

3.1 Densité et structure de la population

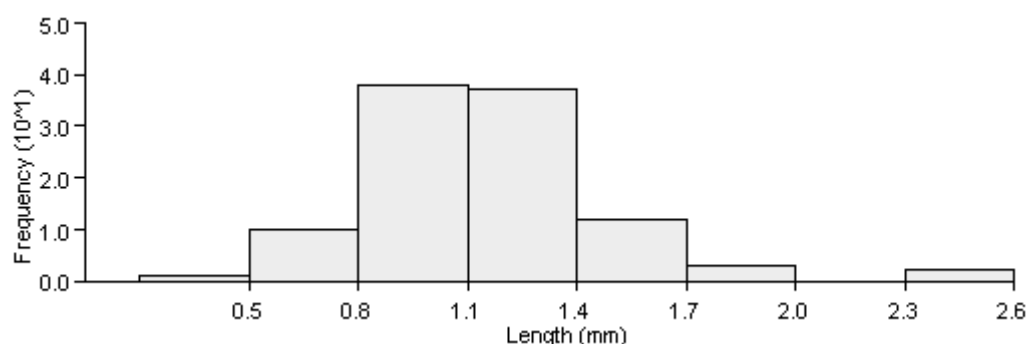
Après dépuration, la densité de *H. diversicolor* a été déterminée. Le poids frais de tous les individus a été mesuré avant de les placer dans l'éthanol à 70°.

La longueur L3 (Gillet & Torresani, 2003) correspond à la longueur du prostomium, du péristomium et du premier segment. La longueur de la L3 a été déterminée à la loupe binoculaire équipée d'un micromètre. Ces valeurs sont ensuite rangées par classe de taille afin d'identifier les différentes cohortes.

03. 2015

C 2

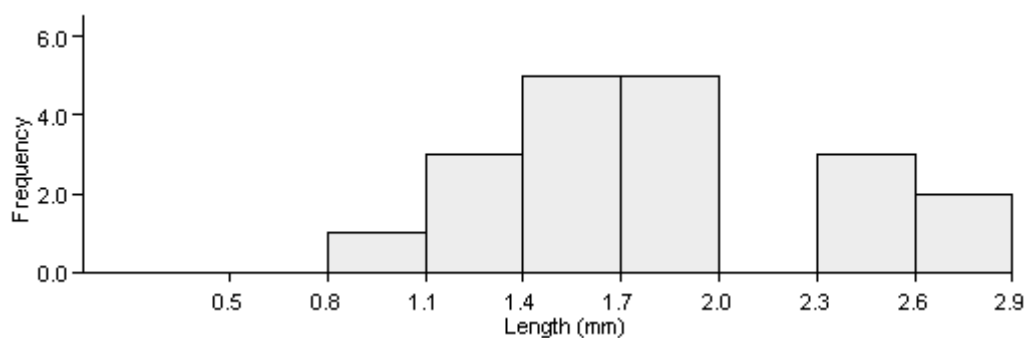
C 1



06. 2015

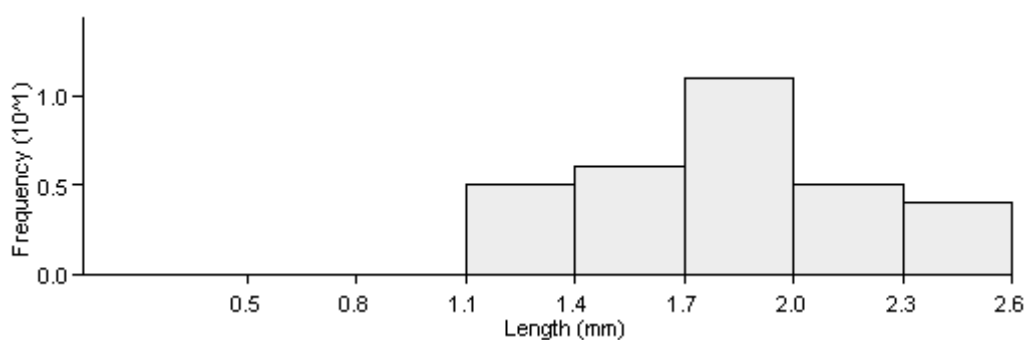
C 2

C 1



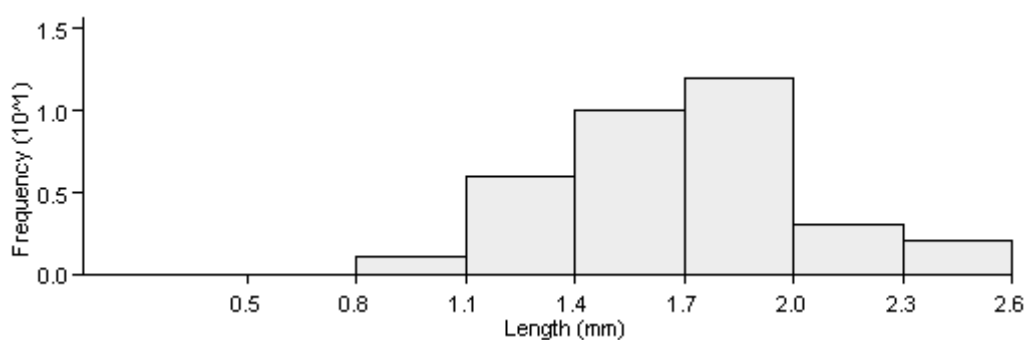
03.2016

C 2



07.2016

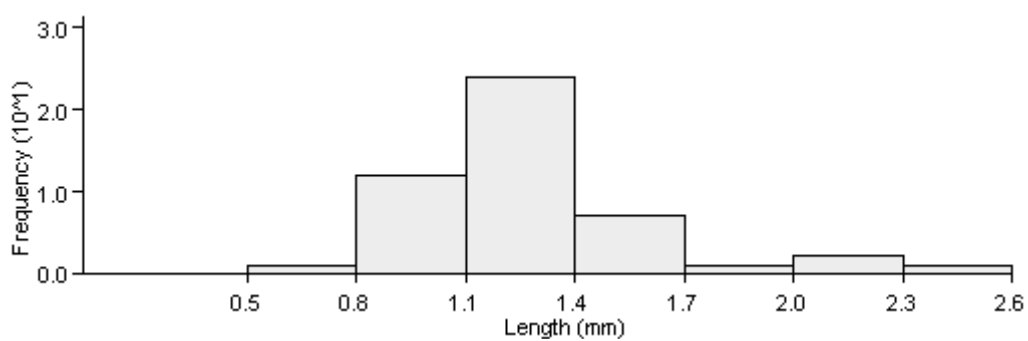
C 2



03.2017

C 3

C 2

Figure 3 Histogrammes de fréquence de taille de *H. diversicolor*.

En 2015, la population de *H. diversicolor* se compose de deux cohortes C1 de grande taille, la plus âgée issue du recrutement de 2014 et C2, de petite taille, la plus jeune, issue du recrutement de 2015.

En 2016, les histogrammes sont unimodaux avec une seule cohorte C2. Il n'y a donc pas eu de recrutement de juvéniles en 2016.

En 2017, l'histogramme présente deux cohortes C2 de grande taille, la plus âgée issue du recrutement de 2015 qui disparaît au mois de juin et une nouvelle cohorte C3 de petite taille, issue du recrutement de 2017 (Fig.3).

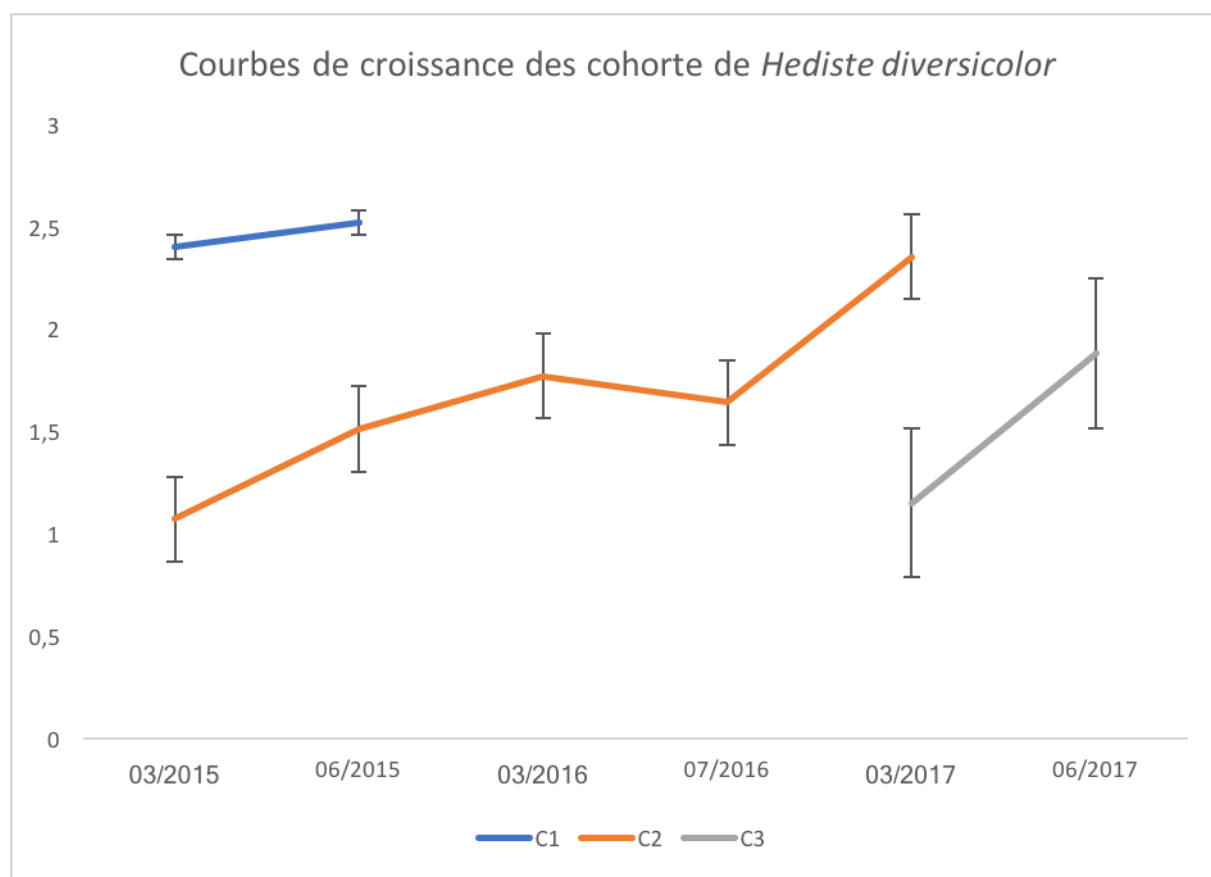


Figure 4 Courbes de croissance des différentes cohortes de *Hediste diversicolor*.

Les courbes de croissance (Fig.4) de *H. diversicolor* représentent trois cohortes C1 de 2014, C2 de 2015 et C3 de 2017. Le recrutement de l'espèce *Hediste diversicolor* dans l'estuaire de la Seine semble unimodal avec une seule période de recrutement annuel au printemps contrairement à l'estuaire de l'Authie (Gillet et al, 2008) et l'estuaire de la Loire (Gillet & Torresani, 2002) où il existe deux périodes de recrutement au printemps et en automne. On n'observe pas de recrutement de nouvelle cohorte pendant l'année 2016.

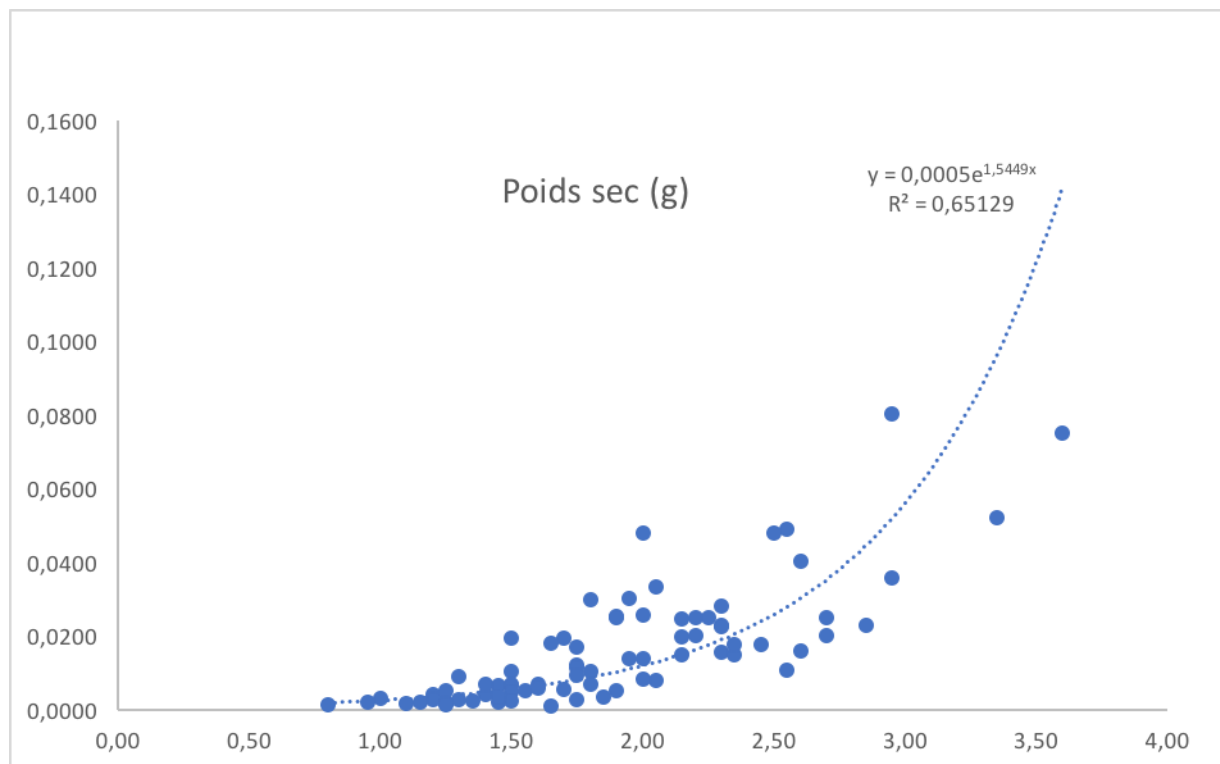
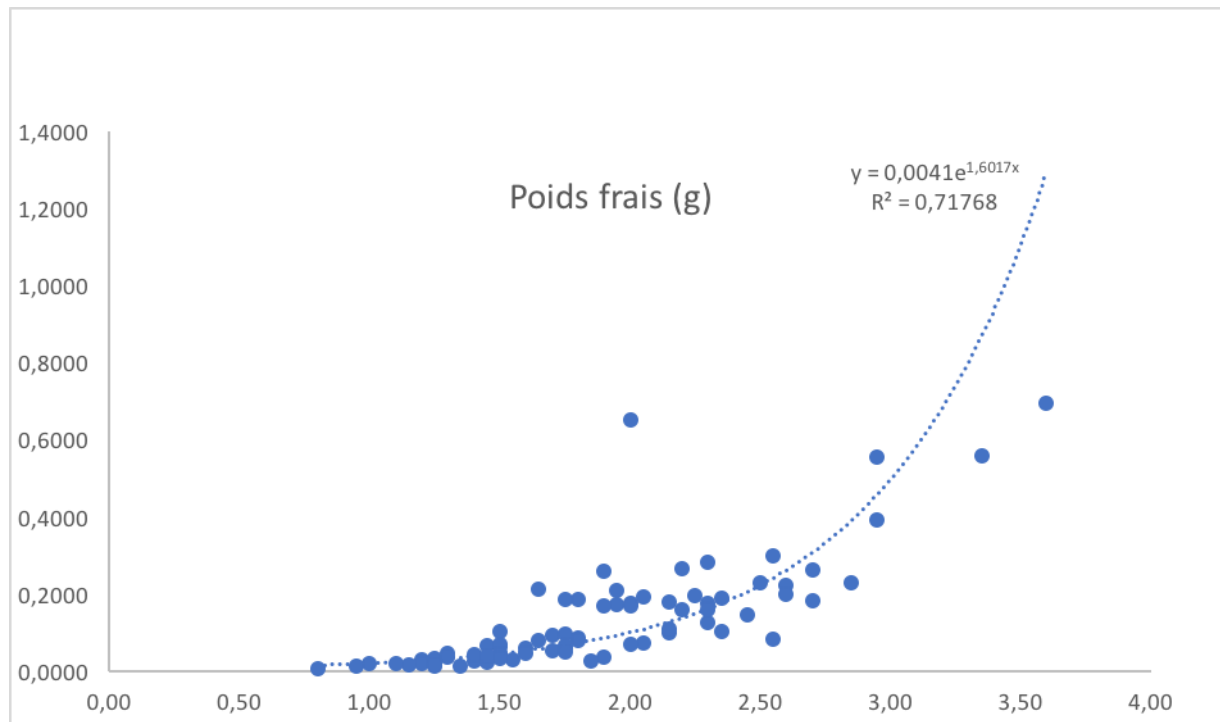


Figure 5 Relation la taille (L3 en mm) et le poids frais et sec (en g) chez *H. diversicolor*.

Les courbes de la relation taille-poids chez *H. diversicolor* (fig.5) montrent une corrélation positive entre la taille et le poids frais : $R^2 = 0,7177$ de même qu'entre la taille et le poids

sec : $R^2 = 0,6513$ comme cela a été observé auparavant dans l'estuaire de la Seine (Gillet et al, 2008).

Tableau 1 Activité bioturbatrice de *H. diversicolor*.

	Mars 2015	Juin 2015	Mars 2016	Juillet 2016	Mars 2017	Juin 2017
Densité m ²	452	96	124	156	196	324
Biomasse m ²	28,46	14,39	27,49	30,02	14,05	43,08
Surface des galeries Sg m ² /m ²	0,38	0,08	0,10	0,13	0,16	0,27
Taux de pompage Pr l/ m ²	1,36	0,29	0,37	0,47	0,59	0,97

L'activité bioturbatrice de *H. diversicolor* en fonction de la densité et de la biomasse de la population est estimée par la surface des galeries Sg (m²/m²) et par le taux de pompage Tp (l/ m²). Pour les années 2015, 2016 et 2017, la surface des galeries Sg varie de 0,08 à 0,38 m²/m² tandis que le taux de pompage Tp varie de 0,29 à 1,36 l/m² (Tableau 1). Ces résultats sont conformes aux résultats observés auparavant dans le cadre du programme PNETOX de 2002-2004 (Gillet et al, 2008).

4 Marqueurs au niveau individuel

4.1 Test d'enfouissement

Le test d'enfouissement est réalisé selon la méthode décrite par Boldina-Cosqueric *et al.*, 2010. Vingt organismes sont placés individuellement dans un bécher contenant environ 10 cm d'épaisseur de sédiment provenant des quadrats et 1 cm d'eau de mer. Cette expérience s'effectue dans une pièce thermo-réglée (environ 14°C) et obscure. Le nombre de vers présent à la surface du sédiment est relevé rapidement à l'aide d'une lampe toutes les 2 min pendant 30 min.

En l'absence de données historiques de ce test sur des vers issus du site de référence l'Authie, les résultats du projet Ecotones sont comparés à ceux obtenus en mars 2009 sur un site de

référence de la baie de Bourgneuf (Fig.6). La comparaison des cinétiques d'enfouissement de *H. diversicolor*, analysée en utilisant l'ANCOVA, montre des vitesses d'enfouissement significativement plus élevées ($p < 0.001$) pour les organismes issus du site de Bourgneuf comparées à ceux de la Seine et ce pour les 3 années (2015, 2016, 2017) et les deux périodes (mars et Juin/juillet).

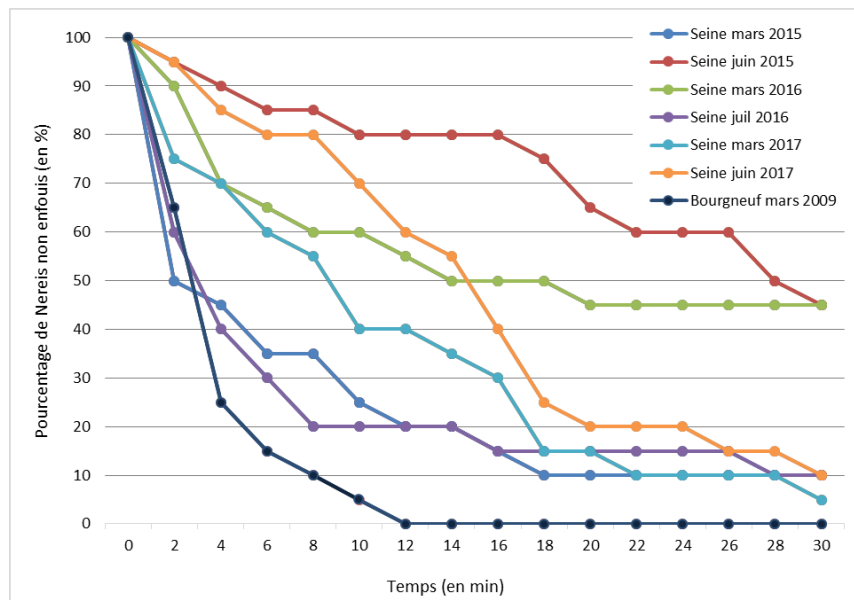


Figure 6 Cinétique d'enfouissement des vers *H. diversicolor* prélevés en Seine (2015, 2016, 2017) comparés à ceux du site de référence de la baie de Bourgneuf (2009).

4.2 Etude de la reproduction

La détermination du stade de maturité sexuelle des femelles est effectuée selon le protocole de Durou & Mouneyrac (2007). L'individu est mesuré puis déposé sur une lame avec une goutte d'alcool. Une légère incision est effectuée au niveau du dernier tiers de l'individu. L'extraction des ovocytes est facilitée par un léger appui de part et d'autre de l'incision. Lorsque l'animal est une femelle, 20 à 30 ovocytes par individu sont mesurés par observation au microscope. La taille des ovocytes permet alors de déterminer le stade de maturité sexuelle de *H. diversicolor*. L'indice de maturité sexuelle d'une population est alors calculé selon la formule de Siah *et al.*, (2003).

$$IMS = \frac{\sum_{i=0}^4 ni \times vi}{N}$$

Avec ni : nombre de femelles présentant le stade i ; vi : valeur du stade i et N : nombre total de femelles

Les résultats des paramètres de la reproduction présentés dans la figure 7 montrent que les vers des 3 campagnes de prélèvement en Seine présentent des indices de maturité sexuelle

(IMS) plus faibles (retard) pour la période de mars (2015 : 1,6 ; 2016 : 1,9 ; 2017: 0,8) comparés à ceux du site de référence ; l'Authie (février 2004, IMS: 2). Pour la période de Juin/juillet, à l'exception de 2017 (IMS : 0,96), l'inverse a été observé avec une maturité des vers plus avancée en Seine (2015 : 2,3 ; 2016 : 2,7) qu'en Authie pour une période équivalente (mai 2004, IMS : 1,4). La comparaison temporelle des IMS d'*H. diversicolor* du site de la Seine montre que ceux prélevés dans le cadre du programme Ecotones sont, en général, moins avancés sexuellement que ceux des données historiques de la Seine en 2004. Il est à souligner que les vers de la campagne de 2017, et ce pour les 2 périodes (mars et juin), présentent globalement les IMS les plus faibles comparativement aux données historiques (Authie et Seine) et aux données contemporaines (2015 et 2016).

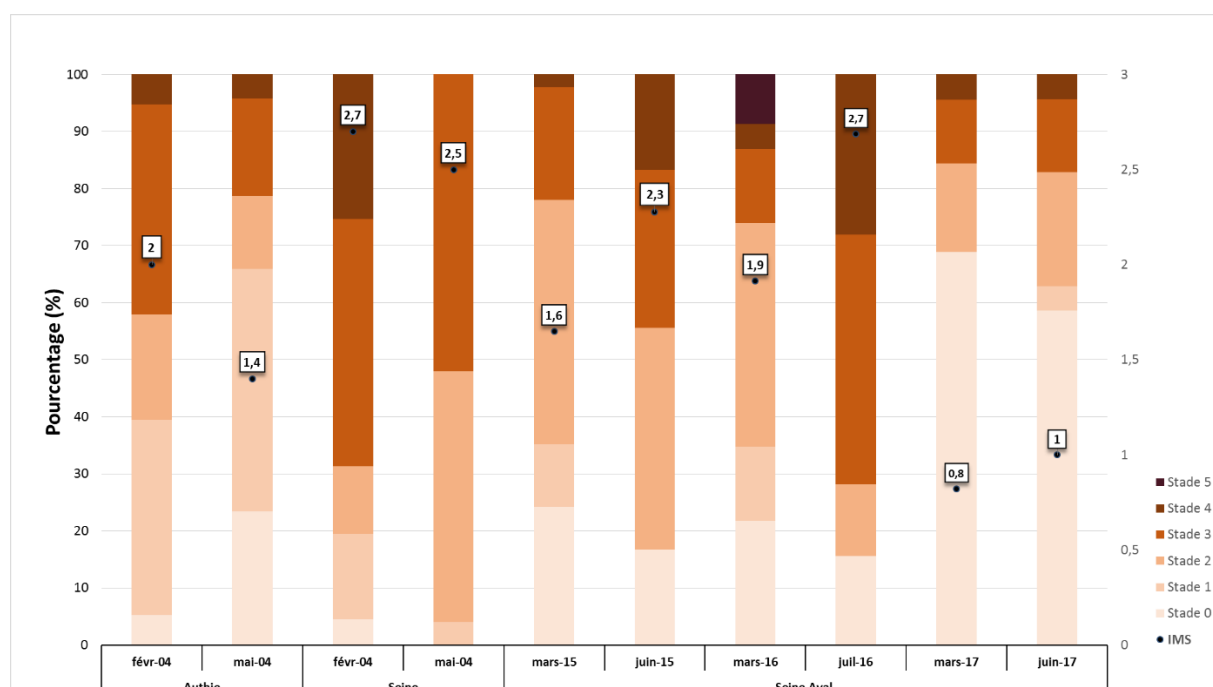


Figure 7 Stades de maturité sexuelle (en %) et indice de maturité sexuelle (IMS) chez les femelles de *H. diversicolor* prélevées en Seine dans le cadre du projet Ecotones (2015, 2016 et 2017) comparés aux données historiques en Seine et en Authie (2004).

4.3 Réserves énergétiques

Le dosage des réserves énergétiques (glycogène, lipides) est réalisé sur 20 individus de *H. diversicolor*. Chaque individu est pesé puis broyé dans un mortier avec de l'azote liquide jusqu'à obtention d'une poudre. Cette dernière est ensuite homogénéisée avec 1,5 mL de tampon citrate (0,1 M, pH 5). 200µL d'homogénat réservés au dosage des lipides sont congelés à -80°C. L'homogénat restant servira au dosage du glycogène après avoir été incubé pendant 4 min à 95°C puis congelé à -80°C.

4.3.1 Dosage des lipides

La concentration en lipides est déterminée selon la méthode de Frings *et al.* (1972). Deux gammes étalon d'huile d'olive (solution mère à 1 mg.mL⁻¹ et à 5 mg.mL⁻¹) sont réalisées, la première allant de 0 à 1 mg.mL⁻¹ et la seconde de 0 à 5 mg.mL⁻¹. Dans un tube, 200 µL d'acide sulfurique (à 96%) sont placés avec 20 µL de solution de gamme, d'échantillon. Une fois vortexées, ces solutions sont mises à ébullition pendant 10 minutes puis refroidies pendant 5 minutes. 1 mL de phosphovanilline (1 volume de vanilline 6 mg.mL⁻¹ pour 5 volumes d'acide ortho-phosphorique à 85%) est ajouté et la solution est de nouveau mélangée. C'est ce réactif qui permet de colorer les lipides insaturés en rose. Les tubes sont ensuite mis au bain-marie à 37°C pendant 15 minutes, puis laissés refroidir 5 min à température ambiante. La densité optique est lue à 540 nm à l'aide d'un lecteur microplaque (Sunrise, Tecan) et du logiciel Magellan. La concentration en lipide est déterminée en mg.g⁻¹ pour chaque individu.

4.3.2 Dosage du glycogène

Le dosage du glycogène est réalisé suivant le protocole de Carr & Neff (1984). Une gamme étalon de glycogène (6 mg.mL⁻¹) est préparée de 0 à 6 mg.mL⁻¹ dans du tampon citrate (0,1 M, pH 5). Une solution de glucose (3 mg/mL) servira de contrôle. Deux aliquots de 400 µL sont réalisées pour les échantillons et la gamme. Dans la première série est incorporé 10 µL d'amyloglucosidase (6000 unités.mL⁻¹) puis ces solutions sont incubées 2 h à 55°C. Cette enzyme permet l'hydrolyse du glycogène en glucose. La deuxième série, non soumise à l'enzyme, est quant à elle placée à 4°C. Toutes les solutions contenant les échantillons sont ensuite centrifugées pendant 10 min à 12 000 tours/min. 200 µL de tampon citrate (0,1 M) et 20 µL de solution de gamme, de standard, de surnageant d'échantillons digérés et non digérés sont ensuite mélangés après l'ajout de 1,6 mL de Glucose Oxydase Peroxydase (GOD-POD : Tris-HCl pH 7, O-Dianisine-di-HCl, peroxydase de type 1 et glucose oxydase de type 2). Après agitation et incubation à 20°C durant 40 min, la réaction est stoppée par l'ajout de 60 µL de HCl 5N. Le dosage en microplaque est réalisé en spectrométrie à 420 nm et la concentration en glycogène est déterminée en mg.g⁻¹ pour chaque individu.

Les résultats des réserves énergétiques chez *H. diversicolor* sont présentés dans la figure 8 (A et B). Les concentrations en glycogène et en lipides sont significativement plus faibles en hiver chez les vers de Seine par comparaison avec les données historiques du site de référence ; l'Authie. En été, aucune différence significative n'a été observée à l'exception des teneurs en glycogène des campagnes de 2016 et 2017. Si l'on considère les concentrations moyennes des réserves énergétiques des vers compilés sur les 3 années de prélèvement en Seine et par saison (hivers, été), celles-ci sont significativement plus faibles que celles des données historiques du site de référence, à l'exception des lipides pour la période de juin/juillet. La comparaison temporelle des teneurs en glycogènes et en lipides des vers prélevés durant les 3 années du projet Ecotones montre une variabilité saisonnière. En effet, le taux moyen de glycogène est de $2,26 \pm 1,56$ mg/g d'individu pour mars contre $3,6 \pm 2,15$ mg/g d'individu pour la période de juin/juillet. De même que pour les teneurs en lipides avec $4,14 \pm 1,70$ mg/g d'individu pour mars et $7,28 \pm 3,62$ mg/g d'individu en juin/juillet.

4.3.3 Détermination des BAC (Background Assessment Criteria) et des EAC (Environmental Assessment Criteria)

Un modèle mathématique initialement développé par Barrick et al. (2016) est utilisé. Il permet la détermination des valeurs de base : BAC (Background Assessment Criteria) et des EAC (Environmental Assessment Criteria), prenant compte des facteurs de confusion (salinité, poids des vers, température) sur les réserves énergétiques (lipides et glycogène) et définissant la base de référence pour *H. diversicolor*.

Les niveaux de référence ont été déterminés à partir de valeurs de glycogène et de lipides mesurées chez *H. diversicolor* provenant d'un site de référence, l'Authie, à différents moments de l'année (Janvier à Décembre) et pendant plusieurs années (2002 à 2004) (programme PNETOX).

Selon cette grille de lecture (figures 9 : A et B), les niveaux du glycogène des vers se situent en zones sublétales et létales et ce pour les 3 campagnes de prélèvements Ecotones (2015, 2016 et 2017) alors que pour les lipides, seul un prélèvement (mars 2017) se situe en zone létale.

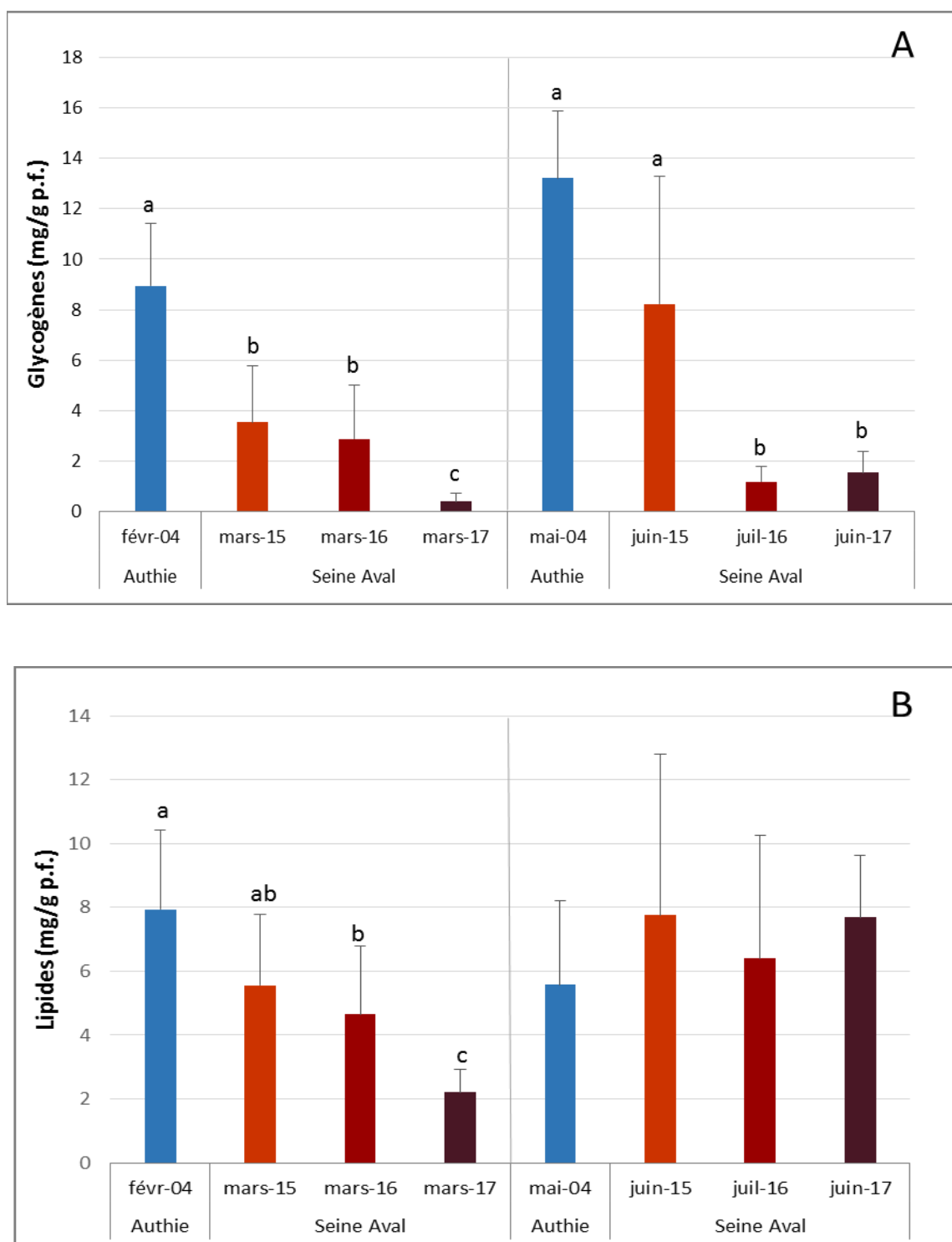


Figure 8 (A-B) Concentrations moyennes (en mg/g poids frais) du glycogène (A) et des lipides (B) chez *H. diversicolor* prélevés dans l'estuaire de la Seine (en 2015, 2016, 2017 ; mars et Juin/juillet) comparées aux données historiques du site de référence l'Authie (en 2004 ; Février et mai) (les mêmes lettres indiquent l'absence de différence significative).

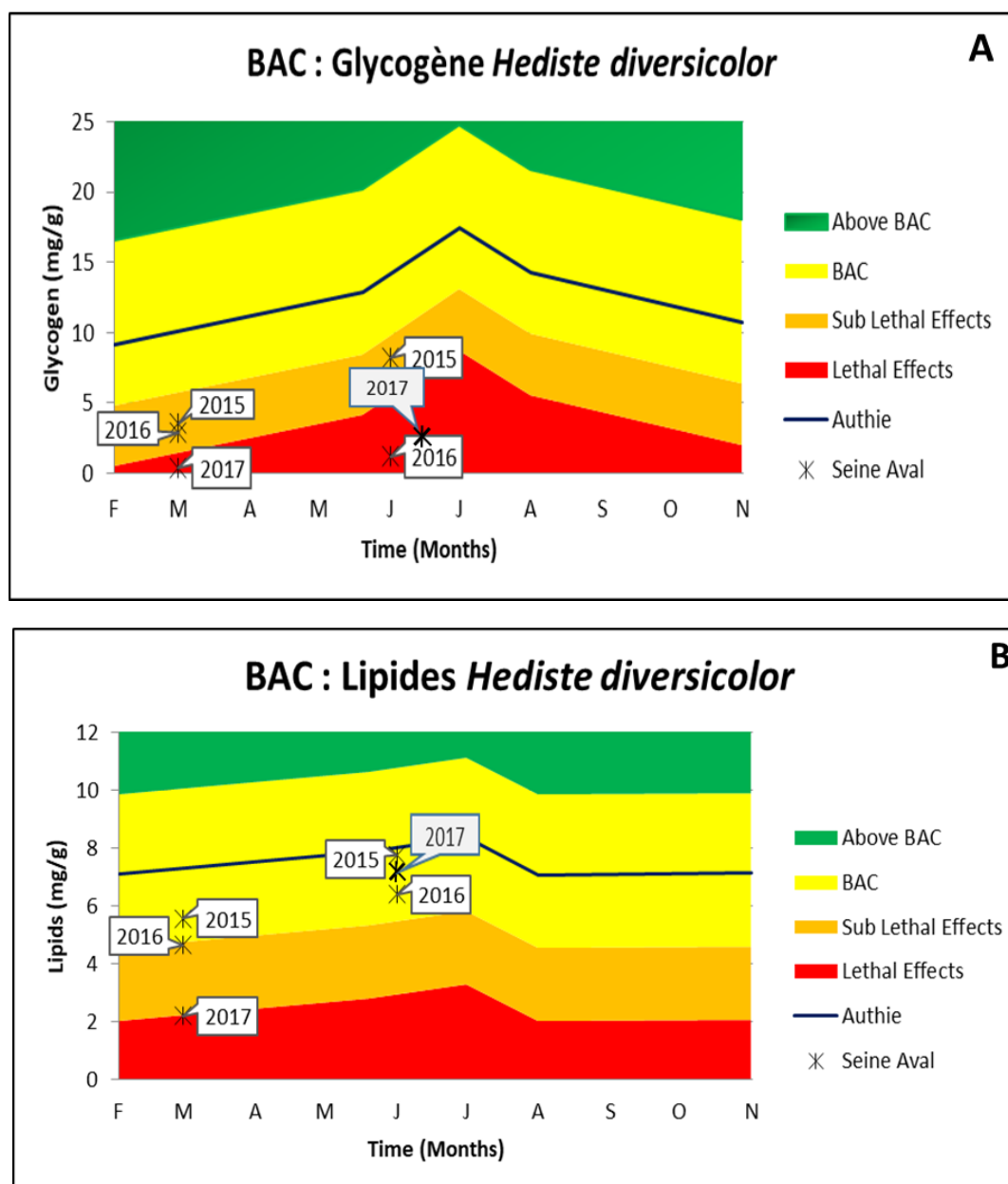


Figure 9 (A-B) Positionnement des concentrations du glycogène (A) et des lipides (B) chez *H. diversicolor* prélevés dans l'estuaire de la Seine (2015, 2016, 2017 ; mars et juin/juillet) par rapport aux niveaux de base (BAC) établis avec les données historiques du site de référence l'Authie.

5 Marqueurs au niveau sub-individuel

Les biomarqueurs sont analysés à partir d'individus entiers. Après avoir été pesés, les vers sont broyés et homogénéisés dans 3 volumes de tampon d'homogénéisation (Trizma base (tris) – HCl 0,8 M à pH 7,2 ; NaCl 2 M, Cocktail Inhibiteur de Protéases (CIP) ; dichlorodiphényltrichloroéthane (DTT) 100 M), à 4°C. Les homogénats sont ensuite

centrifugés à 9000 g, 4°C pendant 30 min. Les surnageants sont extraits, aliquotés et placés à - 80 °C avant analyses.

5.1 Analyse de l'Acétylcholinestérase (AChE)

Le dosage de l'AChE est conduit à partir du protocole réalisé par Ellman *et al.* (1961) et adapté aux microplaques par Galgani & Bocquene (1991). Elle consiste en la préparation de deux solutions réactionnelles : l'acide 5,5'- dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB à 0,01 M) et le substrat d'acétylthiocholine (AcTCh à 0,1 M), tous deux dilués dans du tampon phosphate (0,02 M, pH 7). 10 µL d'échantillons sont déposés en triplicats avec 190 µL de DTNB (0,01 M) et 100 µL d'Acétylthiocholine (AcTCh) (0,1 M) pour déclencher la réaction. L'AChE présente dans la fraction S9 des tissus étudiés réagit avec l'AcTCh en libérant de la Thiocholine (TCh) réagissant elle-même avec le DTNB en formant du TNB (Thionitrobenzoate). L'activité spécifique de l'AChE, exprimée en nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines, se détermine donc par l'apparition du TNB lue à 412 nm pendant 3 min.

5.2 Analyse de la Glutathion – S – Transferase (GST)

La détermination de la GST est réalisée à partir du protocole mis au point par Geracitano *et al.* (2002). Les échantillons sont dilués au 1/40 dans du tampon phosphate (100 mM, pH 6,5). Dans chaque puits, 100 µL d'échantillon dilué au 40ème sont déposés et la réaction est déclenchée en ajoutant 200 µL de réactif (1chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB) (60 mM) ; tampon phosphate (100 mM, pH 6,5) ; GSH (10 mM)). En parallèle, 100 µL de tampon phosphate et 200 µL de solution réactionnelle sont mélangés et déposés en triplicat pour servir de blanc. L'activité spécifique de la GST, exprimée en µmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines, est déterminée à travers le taux de CDBN s'étant lié au GSH (GS-CDNB). La cinétique d'apparition du GS-CDNB est suivie à 340 nm pendant 2 min à 25°C.

5.3 Analyse de la Superoxyde Dismutase (SOD)

Le protocole décrit par Chatelain *et al.* (2008) est appliqué pour quantifier l'activité de la SOD avec certains ajustements pour *H. diversicolor*. Une gamme étalon de SOD (30 unités.mL⁻¹) est préparée, allant de 0 à 3,15 U.mL⁻¹. La solution réactionnelle à pH 7,8 est composée de Xanthine 0,7 mM, de Cytochrome3+ C 0,03 M dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7,8) et de l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA 1mM). En microplaque, 50

μL d'échantillon dilué au 10ème ou la solution de gamme est ajouté à 200 μL de solution réactionnelle et à 50 μL de Xanthine oxydase 0,03 unité.mL⁻¹ (dans du Na-EDTA 0.1 mM). L'activité spécifique de la SOD, exprimée en U.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines, est mesurée à travers la cinétique d'apparition du Cytochrome2+ C.

La SOD, captant l'O₂⁻ nécessaire à la formation du Cytochrome2+ C, inhibe la réaction. La cinétique, suivie à 550 nm pendant 3 min, correspond donc à un pourcentage d'inhibition lié à la présence de la SOD.

5.4 Analyse de la Catalase (CAT)

L'activité de la catalase est mesurée en utilisant un protocole similaire à celui décrit dans Roméo *et al.* (2000). La solution réactionnelle est composée de H₂O₂ (9,78 M) et de tampon phosphate 100 mM à pH 7,4 dont la DO doit être comprise entre 0,520 et 0,550 à 240 nm. 995 μL de solution tampon et 5 μL d'échantillon non dilué sont déposés dans une cuve en quartz et analysés à 240 nm également. Trois répétitions de chaque échantillon sont mesurées. L'activité spécifique de la CAT, exprimée en $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines, se détermine selon la cinétique de disparition de H₂O₂ pendant 1 min à 240 nm.

5.5 Analyse des Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARS)

La concentration en TBARS est à partir du protocole de Knight *et al.* (1988). Cette mesure est basée sur les propriétés de certains composés, tels que le MDA (Malondialdéhyde) issu des lipides peroxydés, à réagir avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Une gamme étalon de tétraméthoxypropane (TMP), 11,82.10⁻² mM diluée dans l'éthanol 40%) est préparée à des concentrations allant de 0 à 11,82.10⁻² mM. 200 μL pour chaque échantillon et pour la gamme étalon sont mélangés à 1,2 mL d'acide phosphorique (1,2%), 300 μL de KCl (154 mM) et 500 μL de TBA (30 mM). Les tubes sont agités et incubés 45 min à 90°C. Après 5 min de refroidissement à température ambiante, les solutions sont placées en triplicats sur microplaque. En condition acide et à une température élevée, le MDA et le TBA forment un produit final coloré (rose) absorbant à une longueur d'onde de 532 nm. La concentration en lipides peroxydés peut alors être calculée en nmol.mg⁻¹ de protéines.

5.6 Évaluation de la génotoxicité

La génotoxicité est évaluée grâce au test Comète d'après le protocole adapté de Singh *et al.* (1988). Du fluide coelomique est extrait au niveau de la face ventrale de 15 individus (Buffet *et al.*, 2013). Des pools sont réalisés pour garantir la présence de coelomocytes. Après avoir contrôlé la viabilité cellulaire avec un test au Bleu de Trypan (supérieur à 80%), un contrôle positif est réalisé en mettant en contact les cellules avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 8,82 M), à l'obscurité pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules en suspension du fluide coelomique sont mélangées avec de l'agarose à 0,5 % (Low melting point (LMP) dilué avec du PBS à 1X, pH 7,4). Ce mélange est déposé sur six lames de microscope qui ont été au préalable recouvertes d'un gel d'agarose (0,8 %, w/v mélangé dans du PBS 1X, pH 7,4). Des lamelles sont déposées sur les lames contenant le mélange cellule-agarose. Dès lors, toutes les étapes qui ont suivi, ont été effectuées dans le noir sous une lampe inactinique afin de prévenir d'éventuelles additions de dommages à l'ADN (i.e. dégradation UV de la lumière naturelle). Les lames sont placées à 4°C pendant 10 minutes afin de permettre la solidification du gel. Après avoir retiré la lamelle avec précaution une troisième couche d'agarose est ajoutée. Les lames sont alors immergées dans un tampon de lyse (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 0,001 M et Triton X-100 à 1 %), et maintenues à 4°C à l'obscurité toute une nuit. Après la lyse cellulaire, les lames sont nettoyées trois fois 5 minutes au PBS 1X, puis ont été mises à l'horizontal dans une cuve à électrophorèse contenant un tampon (NaOH 0,3 M, EDTA 0,001 M, pH 13) dans l'objectif d'effectuer une dénaturation (i.e. déroulement de la molécule d'ADN : 15 min).

Une fois décondensé et dénaturé, l'ADN est mis à migrer (électrophorèse) pendant 10 minutes à 300 mA. A l'issue de la migration, les lames sont nettoyées trois fois 5 minutes avec un tampon de neutralisation (Tris-base 0,4 M à pH 7,5). Elles sont ensuite déshydratées avec de l'éthanol à 70 % pendant 10 minutes. L'ADN est révélé en déposant 30 µL de Bromure d'Ethidium (BET), intercalant de l'ADN, sur la lame. L'observation s'effectue au microscope optique à fluorescence couplé à une caméra Andor et à un système d'analyse d'image (Komet 6, Kinetic Imaging Ltd.). Pour le contrôle positif (H₂O₂), 40 comètes individualisées sont observées et analysées et 150 comètes pour les échantillons. Les dommages de l'ADN sont exprimés en pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (% ADN).

5.7 Détermination des BAC (Background Assessment Criteria) et des EAC (Environmental Assessment Criteria)

De la même manière que pour les réserves énergétiques, les facteurs de confusion et les valeurs des biomarqueurs des vers collectés dans le site de référence (Authie) ont été utilisés pour identifier la formule mathématique décrivant la relation entre chaque biomarqueur (CAT, GST, AChE et TBARS) et les facteurs de confusion (Barrick et al., 2018).

Les facteurs de confusions influençant le plus les valeurs des biomarqueurs sont : le poids des individus, la salinité et la température de l'eau interstitielle.

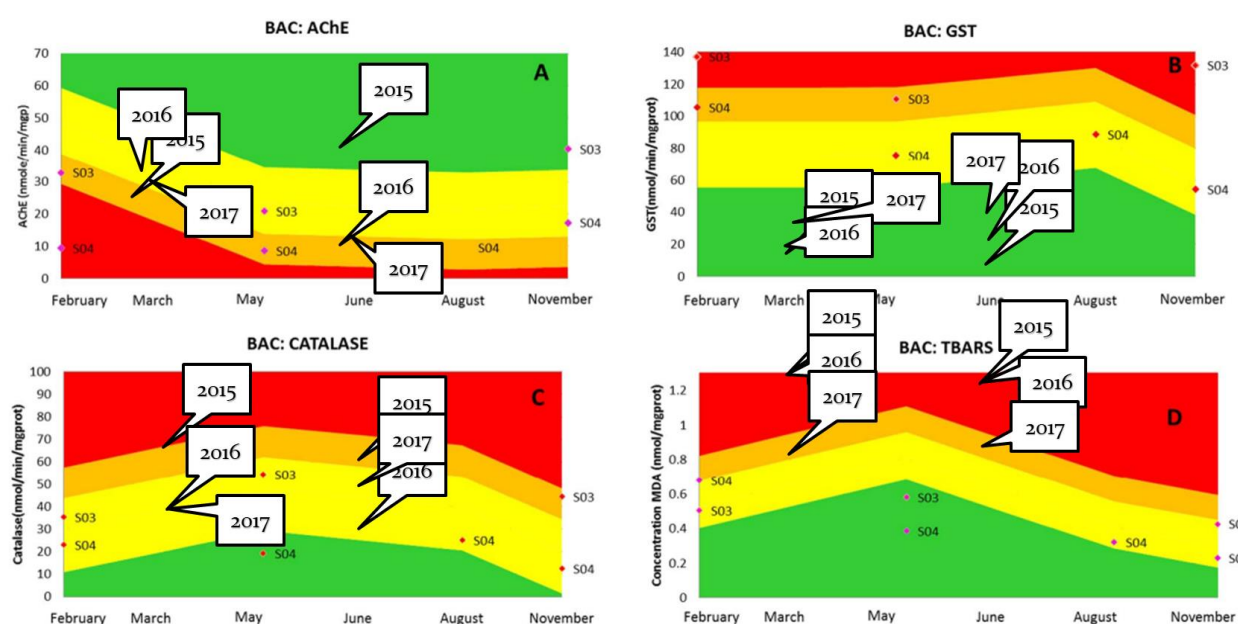


Figure 10 Positionnement des niveaux d'activité d'AChE (A), GST (B), catalase (C) et TBARS (D) chez *H. diversicolor* prélevés dans l'estuaire de la Seine (2015, 2016, 2017 ; mars et Juin/juillet) par rapport aux niveaux de base (BAC) établis avec les données historiques du site de référence l'Authie.

Les résultats montrent des niveaux d'AChE entre la zone sublétale et la zone BAC pour les 3 années (Fig.10A). Les niveaux de GST sont également situés dans la zone BAC (Fig.10B). Au contraire, les résultats montrent une peroxydation lipidique (TBARS) importante pour les individus collectés en Seine en 2015, 2016 et 2017 (zone sub-létale et létale). En revanche, il est noté que les niveaux de TBARS sont plus faibles en Mars et Juin 2017 par rapport à 2015, ce qui suggère une amélioration de l'état de santé des vers en 2017 (Fig.10D).

Pour l'activité de la catalase, elle est plus faible en 2016 et 2017 (zone BAC) comparativement à 2015 (zone sub-létale) (Fig.10C).

Compte tenu de l'absence de données historiques de référence concernant la SOD ainsi que les taux de cassures de l'ADN chez *H. diversicolor*, il n'a pas été possible d'appliquer de modèle de BAC. Cependant les mesures réalisées sur les vers collectés pendant les différentes campagnes sont présentées dans les figures 11 et 12.

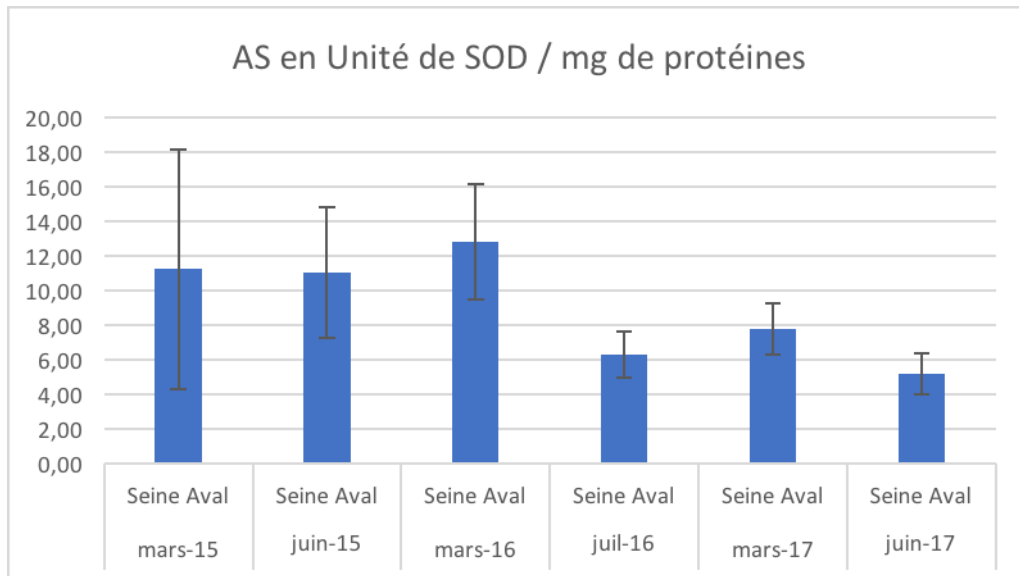


Figure 11 Activité de la SOD chez les vers *H. diversicolor* collectés en Mai et Juin 2015, 2016, 2017 en Seine.

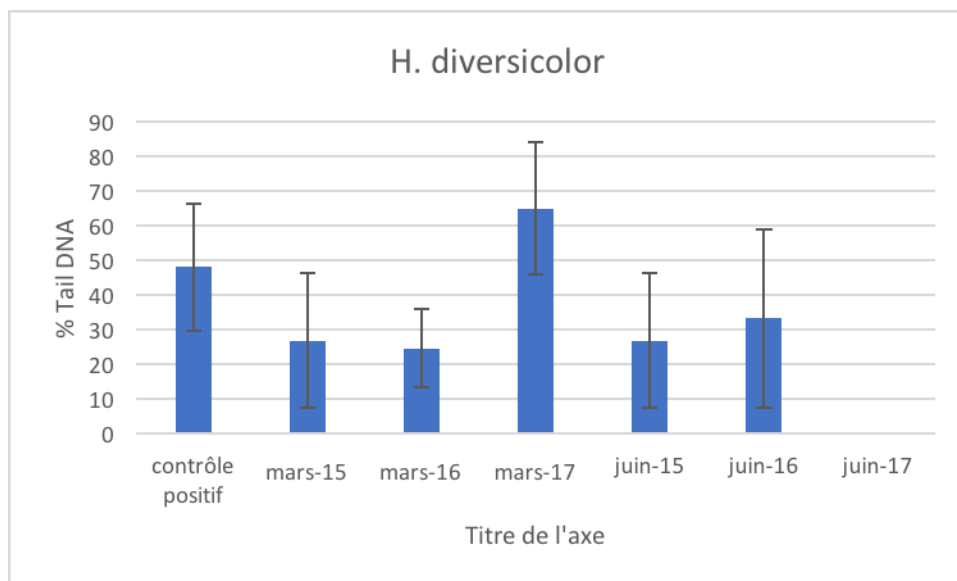


Figure 12 Taux de cassures de l'ADN chez les vers *H. diversicolor* collectés en Mai et Juin 2015, 2016, 2017 en Seine.

Pour ces deux marqueurs, aucune différence significative n'est observée entre les 3 années de prélèvement ni entre les saisons. En revanche, une légère diminution de l'activité de la SOD est observée chez les vers collectés dans les trois dernières campagnes, comparativement à 2015 et Mars 2016 (Fig. 11 et 12). En Juin 2017, une perte des

échantillons suite à la migration d'ADN n'a pas permis d'obtenir de résultats concernant le taux de cassures.

6 Valorisation des travaux

Publications

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., Châtel A., Marion J.-M. Perrein-Ettajani H., Bruneau M., 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. *Marine Pollution Bulletin*. 129, 81-85.

Communications

Barrick A., Perrein-Ettajani H., Châtel A., Mouloud M., Gillet P., Bruneau M., Mouneyrac C. Environmental health assessment of the Seine estuary using a battery of indicators at different levels of biological organization. SETAC Europe 26th Annual Meeting. Nantes, 22-26 mai 2016.

Barrick A., Châtel A., Perrein-Ettajani H., Marion J.M., Mouloud M., Gillet P., Bruneau M., Métais I., Mouneyrac C. 2015. Environmental health assessment on the Seine estuary using multiple levels of biological organization. 3eme Colloque Zones Ateliers. 14-16 Octobre 2015, Paris.

Bibliographie

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., George, I., Labadie, P., Levi, Y., Munoz, G., Noury, P., Oziol, L., Quéau, H., Servais, P., Uher, E., Urien, N., Geffard, A. (2016). Application of a multidisciplinary and integrative weight-of-evidence approach to a 1-year monitoring survey of the Seine River. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-26.

Boldina-Cosqueric I, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Dedourge-Geffard O, Métais I, Mouneyrac C, Moutel B, Berthet B (2010). Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality. *Ecotox Environ Safe*, 73 (7): 1733-41.

Carr RS, Neff JM (1984). Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comp Biochem Physiol Part B*, 77 (3): 447-49.

Chatelain HE, Breton S, Lemieux H, Blier PU (2008). Epitoky in *Nereis* (Neanthes) *virens* (Polychaeta: Nereididae): A story about sex and death. *Comp Biochem Physiol Part B*, 149 (1): 202-8.

Dagnino A, Allen JI, Moore MN, 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 (2): 155-72.

Diez G, Soto M, Canton L, Vaquero MC, Marigomez I (2000). *Hediste* (Nereis) *diversicolor* as bioindicator of metal and organic chemical bioavailability: a field study. *Ecotox Environ Restor*, 3: 7-15.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7 (2): 88-95.

Galgani F, Bocquene G (1991). Semi-automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate readers. *Water Res*, 25 (2): 147-50.

- Galloway, T. S., Brown, R. J., Browne, M. A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M. B. et Depledge, M. H. (2004). Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project – a multi-biomarker approach to ecosystem management. *Marine Environmental Research* 58: 233-237.
- Durou C, Mouneyrac C (2007). Linking steroid hormone levels to sexual maturity index and energy reserves in *Nereis diversicolor* from clean and polluted estuaries. *Gen Comp Endocr*, 150 (1): 106-13.
- Frings CS, Fendley TW, Dunn RT, Queen CA (1972). Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clin Chem*, 18 (7): 673-74.
- Geracitano L, Monserrat JM, Bianchini A (2002). Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. *J Exp Mar Biol Ecol*, 277 (2): 145-56.
- Gillet P, Torresani S (2003). Structure of the population and secondary production of *Hediste diversicolor* (O.F. Müller, 1776) (Polychaeta, Nereidae) in the Loire estuary, Atlantic Coast, France. *Estuar Coast Shelf S*, 56 (3-4): 621-28.
- Gillet P, Mouloud M, Durou C, Deutsch B (2008). Response of *Nereis diversicolor* population (Polychaeta, Nereididae) to the pollution impact – Authie and Seine estuaries (France). *Estuar Coast Shelf S*, 76 (2): 201-10.
- Knight JA, Pieper RK, McClellan L (1988). Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem*, 34 (12): 2433-38.
- Piva, F., Ciaprini, 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(4), 475-485.
- Roméo M, Bennani N, Gnassia-Barelli M, Lafaurie M, Girard JP (2000). Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat Toxicol*, 48 (2-3): 185-94.
- Siah A, Pellerin J, Amiard JC, Pelletier E, Viglino L (2003). Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to in situ contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada). *Comp Biochem Physiol Part C*, 135 (2): 145-56.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175 (1): 184-91.



Annexes 2

Rapport Seine-Aval 5

Acronyme du projet : ECOTONES

Coordinateur : Benoit Xuereb

Tache 1. Evaluation des effets de la contamination sur la faune aquatique (responsable Benoit Xuereb)

Approche multi-marqueurs sur invertébrés endobenthiques : le mollusque lamellibranche *Scrobicularia plana*

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

1 Contexte

Le mollusque bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) appartient à la classe des bivalves, famille des Semelidae et constitue avec *S. cottardi* (Payraudeau, 1826) le genre *Scrobicularia*. La répartition de l'espèce s'étend des mers de Norvège et Baltique au Sénégal, en passant par la côte Atlantique et la mer Méditerranée. *S. plana* vit dans les estrans vaseux riches en matière organique, en zone intertidale. À marée basse, ces bivalves s'enfouissent verticalement dans le sédiment de 5 à 20 cm et se nourrissent en aspirant le sédiment alentour à l'aide de ses deux longs siphons (déposivore). Lors des périodes d'immersion, *S. plana* filtre la matière en suspension dans la colonne d'eau (suspensivore) (Santos et al., 2011a). *S. plana* joue donc un rôle clé dans le transfert des contaminants du sédiment vers les niveaux trophiques supérieurs (Coehlo et al 2008) et via la bioturbation des sédiments sur la distribution des autres espèces de leur habitat.

S. plana est considérée comme une espèce gonochorique avec une maturité sexuelle atteinte en 2 et 3 ans (coquille > 20 mm) (Santos et al., 2011a). Le déclenchement de la maturation des gamètes ainsi que celui de la ponte sont corrélés à la température et à la nourriture disponible. Le cycle gamétogénique est plus court dans les pays nordiques et le nord de la France (3 à 6 mois) avec généralement une seule période de ponte, entre mai et

juillet pour le nord de la France (Mouneyrac et al., 2008) alors que plus au sud les périodes de gamétogénèse et de ponte sont plus longues avec parfois plusieurs périodes de ponte (Santos et al., 2011b)

S. plana est une espèce euryhaline et eurytherme très tolérante aux fluctuations des conditions environnementales (salinité, température, oxygène dissous) lui permettant de s'implanter dans les estuaires (Guelorget et Mazoyer-Mayere, 1983 ; Kourradi, 2007). Ces caractéristiques, ainsi que son abondance et son importance dans la chaîne trophique estuarienne, en font une espèce sentinelle clé (Santos et al., 2011a). De ce fait, la pertinence d'inclure cette espèce a précédemment été démontrée dans le cadre de projets utilisant des biomarqueurs pour évaluer la qualité du sédiment (Fossi Tankoua et al., 2013) ou également pour analyser l'effets de contaminants (Silva et al., 2012), ce qui explique le choix de cette espèce pour cette étude sur l'état de santé de la faune de l'estuaire de la Seine.

2 Sites d'étude et campagnes de prélèvements

Dans le cadre du projet ECOTONES (2015 à 2017), les deux campagnes annuelles de prélèvements sur lesquelles repose cette étude, sont réalisées en Mars pour la première et en Juin/Juillet pour la seconde. Cette répartition temporelle permet d'évaluer l'impact de la contamination sur les organismes hors période de reproduction (i.e. en Mars) et pendant celle-ci (i.e. durant les mois de Juin/Juillet). Le site d'échantillonnage est localisé au niveau de l'estuaire de la Seine, entre les radiales 3 et 5 de la zone de suivi par la Cellule de Suivi du Littoral Normand (49°27'17.52"N, 0°11'19.57"E) (Figure 2).



Figure 2 Sites de prélèvement de *S. plana*.

Au cours des prélèvements, des mesures de salinité et de température sont effectuées dans l'eau interstitielle. Les bivalves utilisés pour l'analyse de la densité et de la biomasse ont été prélevés en réalisant 4 quadrats de 25x25x20 cm. 45 individus ont été prélevés à même le sédiment pour l'analyse des biomarqueurs (15), et des réserves énergétiques (20), rincés puis congelés dans de l'azote liquide sur le site avant d'être transférés à -80°C au laboratoire. 35 autres individus ont été prélevés dans le sédiment et maintenus sous oxygénation dans un peu de sédiment, d'eau de mer recouvert d'algues du site. Vingt de ces organismes ont été utilisés pour réaliser le test d'enfouissement.

3 Analyses statistiques

Le traitement statistique (XLSTAT version 2015.5.01.23293 pour Microsoft Excel et R version 3.3.2) a pour but de comparer l'ensemble des données d'observation relatives à chaque biomarqueur entre les différentes campagnes de prélèvement sur le site de la Seine (mars 2015, juin 2015, mars 2016, juin 2016, mars 2017, juin 2017). Un test paramétrique (comparaison de moyenne ou test multivarié) est réalisé si les données suivent une loi normale (test de Shapiro) ou sont approximées ($n > 30$) et si les variances sont similaires (test de variance ou test de Bartlett pour test multivarié). Les données sont alors comparées avec le test t de Student (comparaison de moyenne) ou l'ANOVA (test multivarié) suivi du test post-hoc de Tuckey. Dans le cas contraire, une approche non paramétrique est appliquée par l'intermédiaire du test U de Mann-Whitney ou du test des sommes des rangs de Wilcoxon (comparaison de moyenne) ou du test de Kruskal Wallis (test multivarié) suivi du test post-hoc de comparaison des rangs de Nemenyi. Les tests statistiques donnant une p -value $< 0,05$ considèrent les valeurs comparées comme significativement différentes.

4 Marqueurs au niveau populationnel - Densité, biomasse et indice de condition

Les animaux retrouvés dans chaque cadrat de sédiment ont d'abord été dénombrés. Après 36h de dépuration, la taille (longueur) et la masse (avec et sans coquille) de chaque individu ont été mesurées afin de calculer la densité, la biomasse et l'indice de condition.

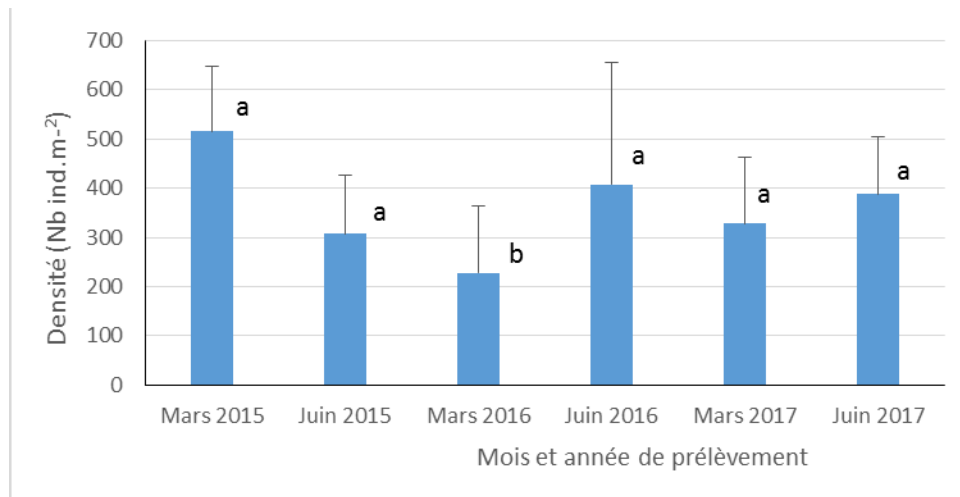


Figure 3 Densité de *S. plana* (Nombre d'individus.m⁻²) à chaque prélèvement (de mars 2015 à juin 2017). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les résultats (t-test).

Les densités de *S. plana* sur le site ne varient pas significativement entre mars 2015 et juin 2017 excepté en mars 2016 où la densité est plus faible par rapport aux autres prélèvements (Fig.3).

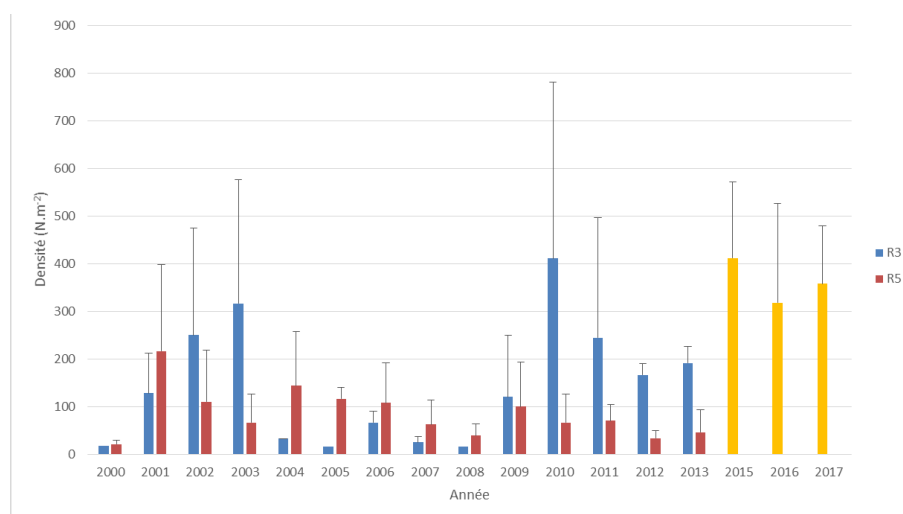


Figure 4 Comparaison des moyennes de densité de *S. plana* (Nombre d'individus.m⁻²) par année de prélèvement (2015, 2016, 2017) avec les données historiques de la CSLN (radiales R3 et R5 de 2000 à 2013).

La densité moyenne de *S. plana* des 3 années 2015, 2016 et 2017 a été comparée avec les valeurs issues des données historiques de la CSLN (valeurs moyennes sur des sites proches du site échantillonné, les radiales R3 et R5). Les densités sont plus élevées en 2015, 2016 et 2017 que les années précédentes. La densité moyenne sur ces trois dernières années est

significativement plus élevée que les densités moyennes observées sur les radiales 3 et 5 sur l'ensemble des années (2000 à 2013) (Fig.4).

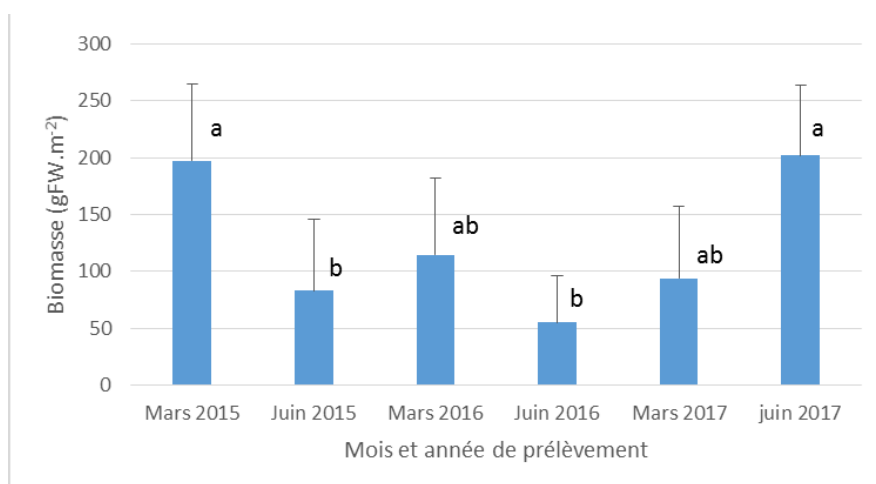


Figure 5 Biomasse de *S. plana* (gFW.m⁻²) à chaque prélèvement (de mars 2015 à juin 2017). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les résultats (t-test).

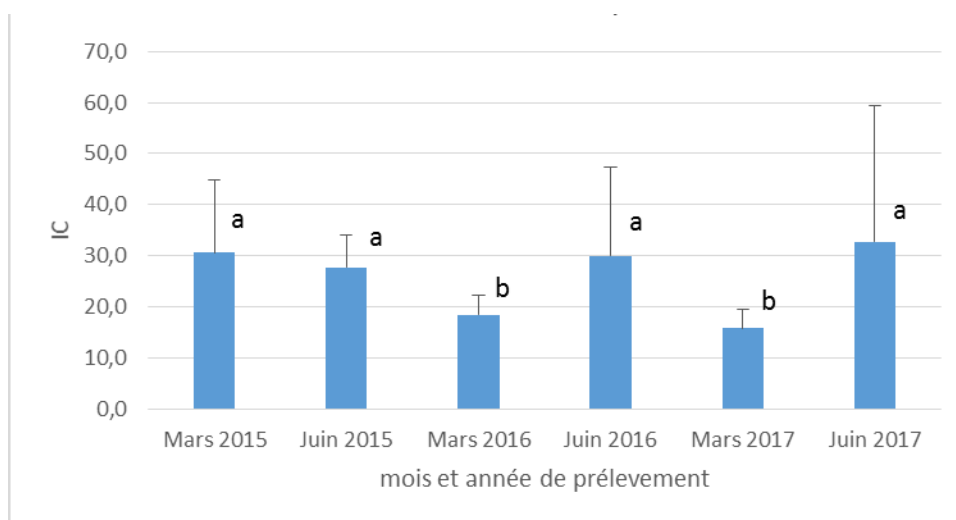


Figure 6. Indice de condition (poids frais tissus*100/poids frais total) de *S. plana* à chaque prélèvement (de mars 2015 à juin 2017).

Concernant la biomasse (Fig.5) et l'indice de condition (Fig.6), les valeurs observées en mars 2015 sont équivalentes à celles de juin 2017. Les biomasses sont significativement plus faibles en juin 2015 et 2016, les indices de condition en mars 2016 et 2017.

5 Marqueurs au niveau individuel

5.1 Test d'enfouissement

Le test d'enfouissement est réalisé selon la méthode décrite initialement par Boldina-Cosqueric *et al.*, (2010). Vingt organismes sont placés individuellement dans un bécher contenant environ 10 cm d'épaisseur de sédiment provenant des quadrats et 1 cm d'eau de mer. Cette expérience s'effectue dans une pièce thermo-régulée (environ 14°C) et obscure. Le nombre de bivalves présent à la surface du sédiment est relevé rapidement à l'aide d'une lampe toutes les 2 min pendant 30 min.

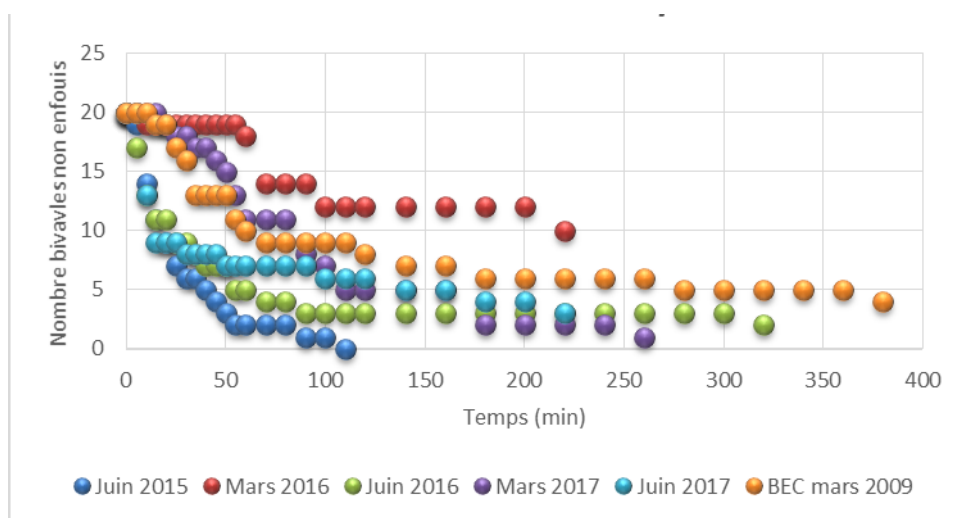


Figure 7 Test d'enfouissement *S. plana* selon la période de prélèvement (de mars 2015 à juin 2017) par comparaison aux données historiques obtenues pour le site Port du Bec (Loire) en 2009.

Tableau 1 Test de Dunnett (ANCOVA) sur les données du test d'enfouissement.

Site / Dunnett (bilatéral) / Analyse des différences entre la modalité témoin BEC mars 2009 et les autres modalités avec un intervalle de confiance à 95% :						
Modalité	Différence	rence standar	Valeur critique	fférence critiq	Pr > Diff	Significatif
BEC mars 2009 vs Seine Aval mars 2015	1,423	9,125	2,617	0,408	0,000	Oui
BEC mars 2009 vs Seine Aval juin 2015	1,399	8,968	2,617	0,408	0,000	Oui
BEC mars 2009 vs Seine Aval juil 2016	0,732	5,597	2,617	0,342	0,000	Oui
BEC mars 2009 vs Seine Aval juin 2017	0,585	4,170	2,617	0,367	0,000	Oui
BEC mars 2009 vs Seine Aval mars 2017	0,369	2,710	2,617	0,356	0,039	Oui
BEC mars 2009 vs Seine Aval mars 2016	-0,163	-1,162	2,617	0,367	0,743	Non

L'analyse statistique (Test bilatéral de Dunnet, ANCOVA, XLSTAT) montre que la vitesse d'enfouissement pour les bivalves issus de la Seine est significativement inférieure à celle des individus de Bourgneuf (site de référence Port du Bec mars 2009) sauf pour la campagne de prélèvement de mars 2016.

5.2 Réserves énergétiques

Le dosage des réserves énergétiques (glycogène, lipides) est réalisé sur la glande digestive disséquée de 20 individus de *S. plana*. Après avoir pesé pour chaque individu la masse totale et la glande digestive, ces dernières sont broyées dans de l'azote liquide jusqu'à obtention d'une poudre. Celle-ci est ensuite homogénéisée avec 1 mL de tampon citrate (0,1 M, pH 5). 100 µL d'homogénat réservés au dosage des lipides sont congelés rapidement à -80°C. L'homogénat restant servira au dosage du glycogène après avoir été incubé pendant 4 min à 95°C puis congelé à -80°C. Faire bouillir les échantillons permet, en dénaturant l'enzyme mise en jeu, d'éviter que le glycogène se sépare en glucose.

5.3 Dosage des lipides

La concentration en lipides est déterminée selon la méthode de Frings *et al.* (1972). Une gamme étalon d'huile d'olive (solution mère à 5 mg.mL⁻¹) est réalisée de 0 à 5 mg.mL⁻¹. 200 µL d'acide sulfurique à 96% sont placés au contact de 20 µL de solution de gamme étalon ou d'échantillon. Une fois mélangés, les échantillons sont placés 10 minutes à 95°C. Après 5 minutes à température ambiante, 1 mL de phosphovanilline est ajouté dans chaque tube, placé ensuite 15 min à 37°C. Après 5 min à température ambiante, la lecture est réalisée en triplicat à 540 nm sur microplaque. La concentration en lipides est exprimée en mg.g⁻¹ de glande digestive.

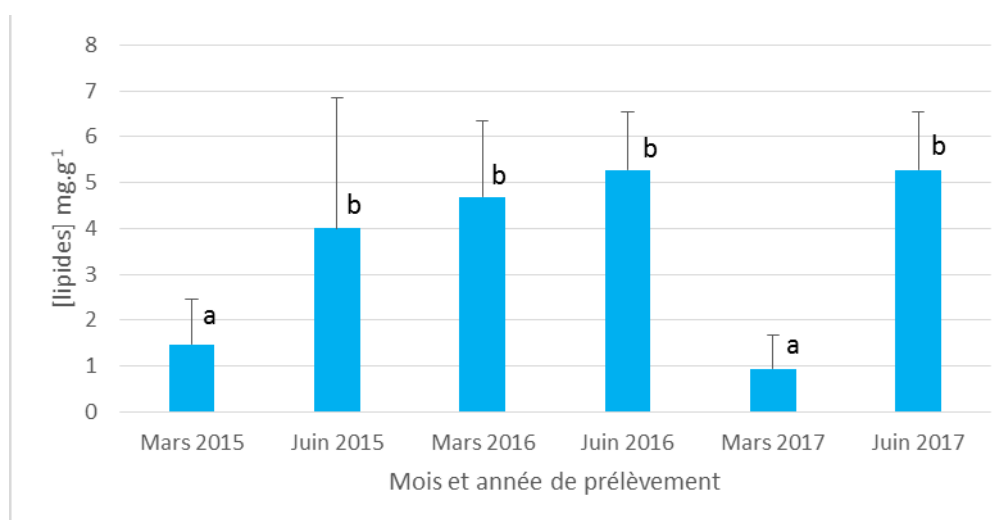


Figure 8 Concentration en lipides dans les glandes digestives de *S. plana* (en mg.g⁻¹ de tissu) à chaque prélèvement (de mars 2015 à juin 2017).

La concentration en lipides dans les glandes digestives de *S. plana* est pour chaque année plus élevée dans les animaux prélevés en juin par comparaison aux bivalves prélevés en mars (différence significative entre mars et juin 2015 ; et entre mars et juin 2017).

5.4 Dosage du glycogène

Le dosage du glycogène est réalisé suivant le protocole de Carr et al. (1984). Une gamme étalon de glycogène (6 mg.mL^{-1}) est préparée de 0 à 6 mg.mL^{-1} . Une solution de glucose (3 mg/mL) servira de contrôle. Deux séries d'échantillons sont réalisés en introduisant pour chacune $400 \mu\text{L}$ d'échantillon. La première série est soumise à $10 \mu\text{L}$ d'amyloglucosidase ($6000 \text{ unités.mL}^{-1}$), y compris la gamme étalon puis incubée 2 h à 55°C . La deuxième série, non soumise à l'enzyme, est placée à 4°C pendant 2h. Toutes les solutions sont ensuite centrifugées pendant 10 min à 12 000 tours/min. $200 \mu\text{L}$ de tampon citrate ($0,1 \text{ M}$) et $20 \mu\text{L}$ de solution de gamme, de standard ou de surnageant d'échantillon sont mélangés. Enfin, $1,6 \text{ mL}$ de GOD-POD pré-filtrée (peroxydase de type 1 + glucose oxydase de type 2 + O-Dianisine-di-HCl) sont introduits dans chaque tuve. Après agitation et incubation à 20°C durant 40 min, la réaction est stoppée par l'ajout de $60 \mu\text{L}$ de HCl 5N . Le dosage en microplaque est réalisé à 420 nm et la concentration en glycogène en mg.g^{-1} de glande digestive.

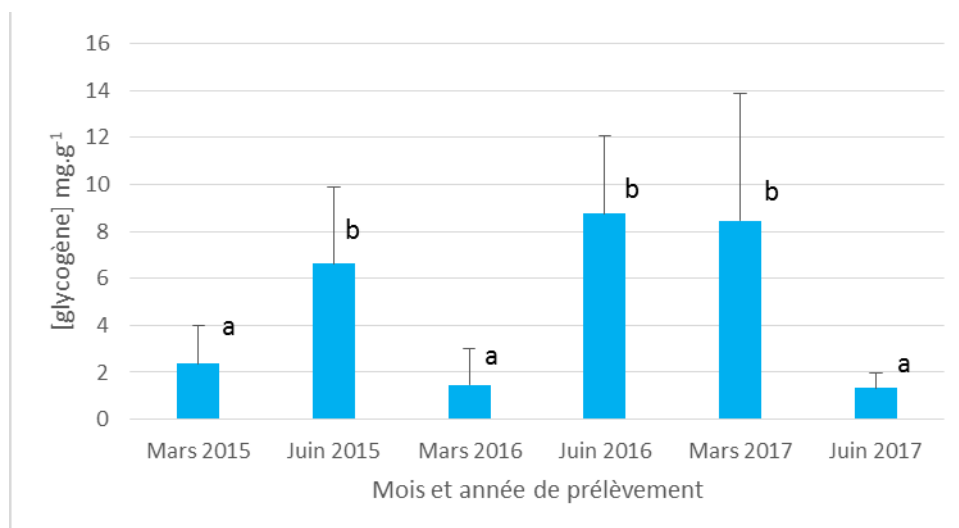


Figure 9 Concentration en glycogène dans les glandes digestives de *S. plana* (en mg.g^{-1} de tissu) à chaque prélèvement (de mars 2015 à juin 2017).

La concentration en glycogène est plus élevée dans les glandes digestives de *S. plana* en juin 2015 et juin 2016 par comparaison respectivement à mars 2015 et mars 2016. Une faible valeur de concentration en glycogène est mesurée en juin 2017.

Les réserves énergétiques telles que le glycogène et les lipides sont majoritairement mobilisées lors de la gamétogénèse mais aussi lors de la croissance ou pour la survie de l'animal. Un environnement contaminé peut néanmoins affecter l'équilibre énergétique des individus car une partie de l'énergie sera attribuée à l'activation de mécanismes de défense au détriment de la reproduction (Palais et al., 2011). La concentration en lipides plus élevée en juin par rapport à mars pourrait correspondre au moment où le glycogène est converti en lipides au début de la gamétogénèse (Mouneyrac et al., 2008). Cette même période correspond également à l'abondance de nourriture pour *S. plana* et au moment où l'espèce stocke ses réserves destinées à la reproduction, ce qui pourrait expliquer les valeurs de concentration également plus élevées en glycogène en juin par rapport à mars. Les résultats concernant la concentration en glycogène en 2017 sont étonnants : la faible concentration en glycogène mesurée en juin 2017 pourrait s'expliquer par une reproduction plus précoce et une conversion du glycogène en lipides réalisée avant la période de prélèvement.

6 Marqueurs au niveau sub-individuel

Après avoir mesuré la taille (longueur, largeur) et la masse (avec et sans coquille) de chaque individu, l'homogénat est obtenu en broyant la chair de chaque échantillon avec le tampon d'homogénéisation (3 volumes par gramme de chair) : Tris-HCl (0,8M ; pH 7,2), NaCl (2M), Cocktail Inhibiteur de Proteases (CIP) et DTT (100mM) à 4°C. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 9000g à 4°C pendant 30 minutes. Les surnageants sont aliquotés et conservés à -80°C jusqu'à analyse.

6.1 Dosage des protéines : méthode de Bradford

Le dosage des protéines est issu du protocole modifié décrit à l'origine par Bocquené & Galgani (1998). Une gamme étalon de γ -globuline (solution mère 1,34 mg.mL⁻¹) est préparée à des concentrations comprises entre 0 et 1 mg.mL⁻¹. En microplaque, 10 μ L de chaque standard ou d'échantillons dilués au 40^{ème} sont mélangés dans chaque puits (triplicats) avec

200µL de réactif de Bradford dilué au 5^{ème}. Après 15min d'agitation, la densité optique (DO) est mesurée à 595nm. Le dosage des protéines permet d'exprimer l'activité spécifique des enzymes étudiées par gramme de protéines.

6.2 Activité de la Catalase (CAT)

L'activité de la catalase est mesurée selon la méthode de Roméo *et al.* (2000). La solution réactionnelle est composée de H₂O₂ (9,78 M) et de tampon phosphate 100 mM, pH 7,4 ($0,520 < DO_{240nm} < 0,550$). Entre 5µL et 20µL d'échantillon non dilué sont placés dans une cuve en quartz dans un volume total d'1mL de solution réactionnelle (triplicat). L'activité spécifique de la CAT, exprimée en µmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines, se détermine en suivant la cinétique de disparition de H₂O₂ pendant 1 min à 240 nm.

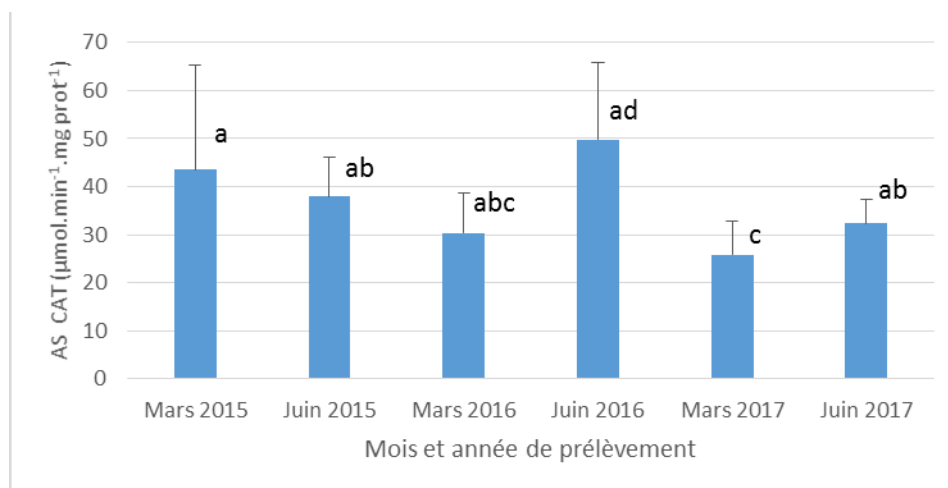


Figure 10 Activité spécifique de la catalase (CAT) chez *S. plana* (en µmol.min⁻¹.mg de protéines⁻¹) à chaque prélèvement (de mars 2015 à juin 2017).

Sauf en juin 2016, une diminution de l'activité de la CAT est observée de mars 2015 à mars 2017.

6.3 Activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)

Le protocole décrit par Chatelain *et al.* (2008) est appliqué pour quantifier l'activité de la SOD avec des modifications pour l'ajuster à l'étude de *S. plana*. Une gamme étalon de SOD (30 unités.mL⁻¹) est préparée, de 0 à 3,15 U.mL⁻¹. La solution réactionnelle est composée de 1 volume de Xanthine 0,7 mM pour 10 volumes de Cytochrome³⁺ C 0,03 M, dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7,8) et de l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA 1mM). En

microplaque, 50 μL d'échantillon dilué au 10^{ème} ou de solution de gamme étalon sont ajoutés à 200 μL de solution réactionnelle et à 50 μL de Xanthine oxydase 0,03 unité.mL⁻¹. L'activité spécifique de la SOD, exprimée en U.mg⁻¹ de protéines, est mesurée à travers la cinétique d'apparition du Cytochrome²⁺ C.

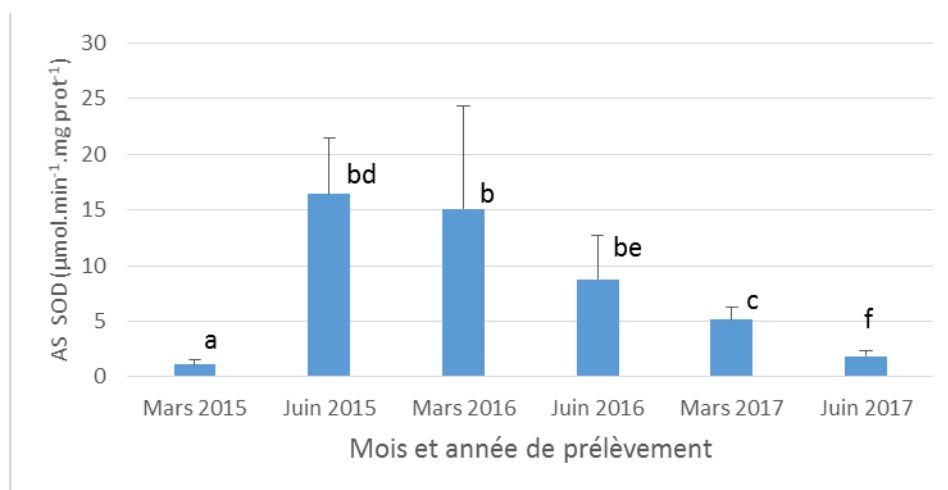


Figure 11 Activité spécifique de la Superoxyde dismutase (SOD) chez *S. plana* (en $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg de protéines}^{-1}$) à chaque prélèvement (de mars 2015 à juin 2017).

De juin 2015 à juin 2017, une diminution significative de l'activité spécifique de la SOD est observée.

6.4 Activité de la Glutathion-S-Transférase (GST)

Le dosage de l'activité de la GST est réalisé en suivant le protocole décrit par Geracitano *et al.* (2002). La solution réactionnelle photosensible est composée de 1 chloro-2-4-dinitrobenzène – CDNB (60 mM), de tampon phosphate (100 mM, pH 6,5) et de GSH (10 mM). Dans chaque puits, 100 μL d'échantillon dilué au 40^{ème} sont déposés et la réaction est déclenchée en ajoutant 200 μL de solution réactionnelle. En parallèle, 300 μL de solution réactionnelle sont déposés en triplicat. L'activité spécifique de la GST, exprimée en $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines, est déterminée en dosant la quantité de CDNB s'étant lié au GSH (GS-CDNB). La cinétique d'apparition du GS-CDNB est suivie à 340 nm pendant 2 min à 25°C.

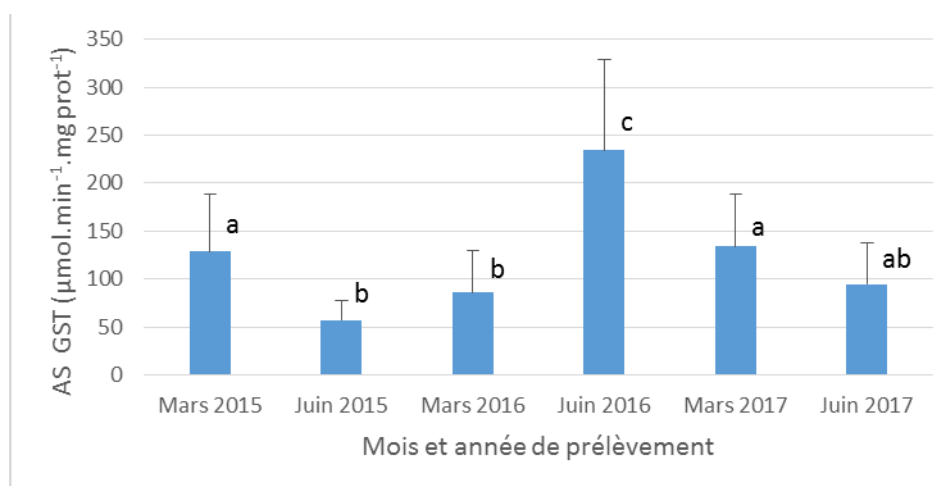


Figure 11 Activité spécifique de la Glutathion-S-Transférase (GST) chez *S. plana* (en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$) à chaque prélèvement (de mars 2015 à juin 2017).

L'activité spécifique de la GST de mars 2015 est égale à celle mesurée dans les prélèvements de 2017. Une valeur significativement plus élevée est observée en juin 2016 par rapport aux autres prélèvements.

6.5 Analyse des Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARS)

La concentration en TBARS est déterminée en suivant le protocole de Knight *et al.* (1988). Cette mesure repose sur la propriété du MDA (malondialdéhyde) à produire une coloration rose lue à 532 nm (Sunderman, 1985). Le MDA est issu de la réaction du TBA (acide thiobarbiturique) avec les lipides peroxydés. Une gamme étalon de TMP (tétraméthoxypropane, $11,82 \cdot 10^{-2}$ mM diluée dans l'éthanol 40%) est préparée à des concentrations allant de 0 à $11,82 \cdot 10^{-2}$ mM. 200 μL d'échantillon sont mélangés à 1,2 mL d'acide phosphorique (1,2%), 300 μL de KCl (154 mM) et 500 μL de TBA (30 mM). Les tubes sont agités et incubés 45 min à 90°C. Après 5 min de refroidissement à température ambiante, 300 μL de solution sont placés en triplicats sur microplaque. La concentration en lipides peroxydés est exprimée en nmol MDA. mg^{-1} de protéines.

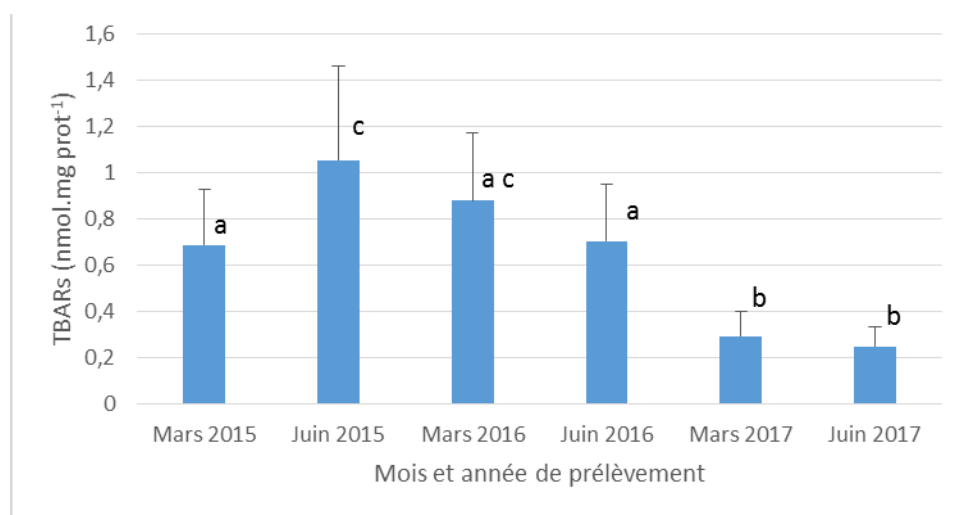


Figure 12 Concentration en Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARS) chez *S. plana* (en nmol.mg⁻¹ de protéines) à chaque prélèvement (de mars 2015 à juin 2017)

Une diminution significative de la concentration en TBARS est observée entre juin 2015 et juin 2017.

Les enzymes CAT et SOD sont des enzymes de phase I intervenant les premières dans la lutte métabolique contre le stress oxydant et dont les activités ont pour rôle de limiter la peroxydation lipidique (quantifiée par les TBARS). Lors de cette étude, l'activité de ces enzymes diminue parallèlement à la concentration en TBARS en 2016 et 2017

En réponse au stress oxydant, l'organisme active un système de défense antioxydant dans lequel interviennent plusieurs enzymes telles que la SOD et la CAT, enzymes de phase I intervenant les premières dans la lutte métabolique contre le stress oxydant ou la GST, enzyme de phase II. Ces enzymes ont pour rôle de limiter la peroxydation lipidique, quantifiée par les TBARS, biomarqueur de dommage.

Dans cette étude, entre les premiers prélèvements de 2015 et ceux de 2017, une diminution conjointe des activités CAT et SOD est observée, parallèle à une diminution de la concentration en TBARS. Cela peut traduire une diminution progressive sur les 3 années du stress oxydant se traduisant au niveau cellulaire par une diminution des dommages membranaires et une amélioration de la santé des bivalves.

Enfin, il est important de souligner qu'un phénomène de crue a eu lieu en juin 2016 juste avant le prélèvement, facteur de stress additionnel qui pourrait être en relation avec les activités spécifiques plus élevées de la GST et de la CAT à cette date. Goncalves et al (2017) ont montré que des événements imprévus comme des crues ou des sécheresses peuvent modifier les activités enzymatiques chez les bivalves marins.

6.6 Activité de l'Acétylcholinestérase (AChE)

Le dosage de l'AChE a été réalisé selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961) adaptée en microplaque par Galgani et Bocquene (1991). Dans chaque puits sont placés : 10 μL d'échantillons (triplicats), 190 μL de DTNB (0,01 M) et 100 μL d'acétylthiocholine (0,1 M) pour déclencher la réaction. L'AChE présente dans la fraction S9 des tissus étudiés réagit avec l'acétylthiocholine en libérant de la thiocholine réagissant elle-même avec le DTNB en formant du TNB (Thionitrobenzoate). L'activité spécifique de l'AChE, exprimée en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines, se détermine donc par l'apparition du TNB lue à 412 nm pendant 3 min.

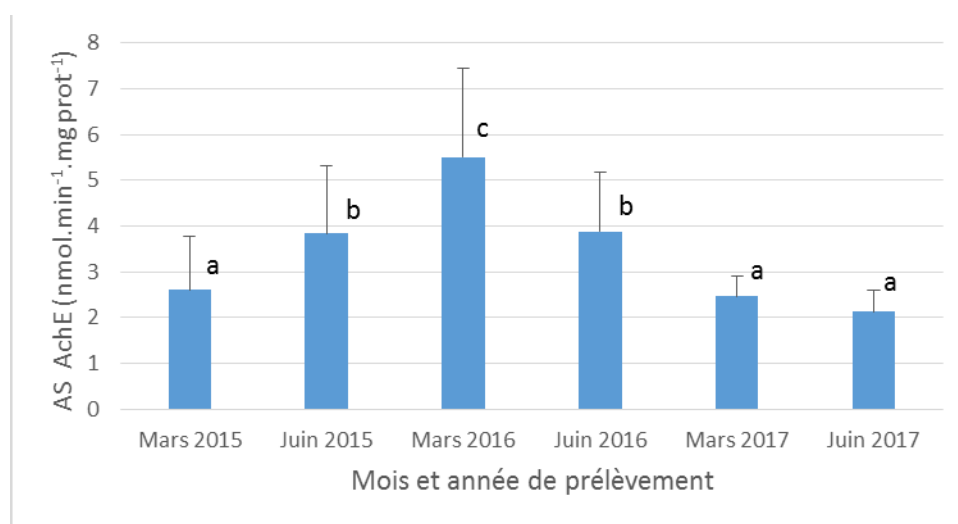


Figure 13 Activité spécifique de l'Acétylcholinestérase (AChE) chez *S. plana* (en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$) à chaque prélèvement (de mars 2015 à juin 2017).

L'activité spécifique de l'AChE augmente de façon significative de mars 2015 à mars 2016 puis diminue en 2017. Les valeurs d'activité spécifique de l'AChE dosées chez *S. plana* dans le cadre de cette étude sont plus faibles que les valeurs de données historiques obtenues chez *S. plana* prélevées en 2009 au site de référence Port du Bec – Baie de Bourgneuf dans l'estuaire de Loire (AS AChE Bourgneuf mars 2008 $10,11 \pm 2,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéines ; AS AChE Bourgneuf mars 2009 $9,90 \pm 2,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéines).

L'activité de l'AChE est reconnue comme un biomarqueur de dommage dont l'inhibition est synonyme de neurotoxicité, engendrant une perturbation de l'influx nerveux capable d'altérer le comportement de l'individu (Boldina-Cosqueric *et al.*, 2010 ; Peric *et al.*, 2017). La comparaison des valeurs d'activité spécifique mesurées dans cette étude par rapport au site de référence de la baie de Bourgneuf montre une inhibition de l'AChE et donc

potentiellement la présence d'agents neurotoxiques (organochlorés, carbamates, PCBs ou métaux traces) en plus grande quantité dans l'estuaire de la Seine.

De plus, il a été démontré une relation entre la diminution de l'AS de l'AChE et des troubles du comportement tels que des difficultés à s'enfouir dans le substrat (Boldina-Cosqueric et al., 2010). Il est par conséquent intéressant dans cette étude de mettre en parallèle les variations d'activité observées pour l'AChE et les données des tests d'enfouissement. Ainsi, l'étude de la neurotoxicité révèle une diminution du stress neurotoxique jusqu'en mars 2016 suivie d'une augmentation de ce stress sur le bivalve jusqu'en mars 2017. La vitesse d'enfouissement pour les bivalves issus de la Seine est significativement inférieure à celle des individus de Bourgneuf (site de référence Port du Bec mars 2009) sauf pour la campagne de prélèvement de mars 2016. En mars 2016, la valeur maximum d'activité de l'AChE signe de moindre stress neurotoxique correspond à un enfouissement plus rapide des individus.

6.7 Génotoxicité

La génotoxicité a été déterminée chez *S. plana* au niveau des glandes digestives pour les différents prélèvements mais également au niveau des spermatozoïdes dans les périodes de reproduction (Juin/Juillet).

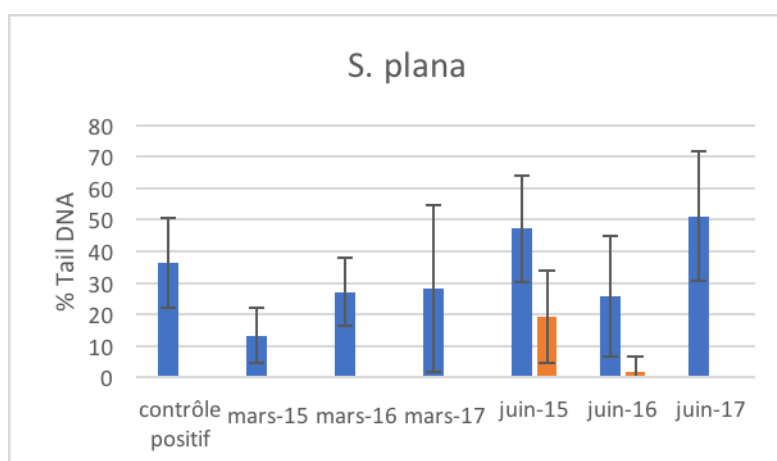


Figure 14 Taux de cassures de l'ADN mesuré chez *S. plana* collecté en Mars et Juin 2015, 2016 et 2017.

Les résultats ne montrent pas d'évolution significative des taux de cassure à l'ADN entre les 3 années de prélèvement. Pour Juin 2017, comme pour *H. diversicolor*, il n'a pas été possible d'analyser les échantillons de spermatozoïde en raison d'une perte des cellules lors de la migration électrophorétique.

7 Conclusion

En conclusion, il n'est pas possible de comparer les valeurs obtenues pour les différents marqueurs chez *S. plana* au cours de cette étude avec des valeurs de référence (données non utilisables) mais l'ensemble des résultats montre que des profils de réponses similaires à *H. diversicolor* sont retrouvés entre 2015 et 2017, avec globalement une amélioration de l'état de santé de la population. Dans l'optique de déterminer des BAC et EAC afin de pouvoir utiliser l'approche WOE, il sera nécessaire de disposer de bases de données utilisables ou de réaliser des expositions en laboratoire pour générer des données de référence chez cette espèce.

Bibliographie

- Bocquené G., Galgani F., 1998, Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate compounds, *Techniques in Marine Environmental Science*, 22, 1-12.
- Boldina-Cosqueric I., Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Dedourge-Geffard O., Métais I., Mouneyrac C., Moutel B., Berthet B., 2010, Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 1733-1741.
- Carr, R.S., Neff, J.M., 1984. Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comp. Biochem. Physiol.* B77,447-449.
- Chatelain E., Breton S., Lemieux H., Blier P., 2008, Epitoky in *Nereis (Nereis) virens* (Polychaeta: Nereididae): a story about sex and death, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149, 202-208.
- Coelho J.P., Duarte A.C., Pardal M.A., Pereira M.E., 2014. *Scrobicularia plana* (Mollusca, Bivalvia) as a biomonitor for mercury contamination in Portuguese estuaries. *Ecological Indicators*. 46: 447-453.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.jr, Featherstone R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7(2):88-90.
- Fossi Tankoua O., Buffet PE, Amiard J.C, Berthet B., Mouneyrac C., Amiard-Triquet C., 2013. Integrated assessment of estuarine sediment quality based on a multi-biomarker approach in the bivalve *Scrobicularia plana*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88, 117-125.
- Frings C.S., Fendley T.W., Dunn R.T., Queen C.A., 1972. Improved determination of total serum lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clinical Chemistry*. 18:673-674.
- Geracitano L., Monserrat J., Bianchini A., 2002, Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure to *Laonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 277, 145-156.
- Gonçalves A.M.M., Barrosoa D.V., Serafimc T.L., Verdelhosa T., Marquesa J.C., Gonçalvesb F., 2017. The biochemical response of two commercial bivalve species to exposure to strong salinity changes illustrated by selected biomarkers. *Ecological Indicators* 77:59-66.
- Guelorget O., Mazoyer-Mayere C., 1983. Croissance, biomasse et production de *Scrobicularia plana* dans une lagune méditerranéenne: l'étang du Prévost à Palavas (Hérault, France). *Multilingue*. 5, 13-22.

- Knight, J.A., Pieper, R.K., McClellan, L., 1988. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clinical Chemistry*, 34, 2433–2438.
- Kourradi R., 2007. Evaluation du degré de la pollution anthropique de l'estuaire de Bou Regreg et impact sur la biologie et dynamique de *Scrobicularia plana* (Linné, 1758) et *Solen marginatus* (Linné, 1767) Rabat: Université Mohammed V – Agdal. 300 pages.
- Mouneyrac C., Linot S., Amiard J.-C., Amiard-Triquet C., Métais I., Durou C., Minier C., Pellerin J., 2008. Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination, *General and Comparative Endocrinology* 157, 133–133.
- Peric L., Nerlovic V., Zurga P., Zilic L., Ramsak A., 2017, Variations of biomarkers response in mussels *Mytilus galloprovincialis* to low, moderate and high concentrations of organic chemicals and metals, *Chemosphere*, 174, 554-562.
- Palais F., Mouneyrac C., Dedourge-Geffard O., Giambérini L., Biagianti- Risbourg S., Geffard A., 2011. One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83, 1062-1073.
- Roméo M, Bennani N, Gnassi-Barelli M, Lafaurie M, Girard JP, 2000, Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*, *Aquatic Toxicology*. 48, 185-194.
- Santos S., Luttikhuisen P.C., Campos J., Heip C.H.R, van der Veer H. W., 2011a. Spatial distribution patterns of the peppery furrow shell *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) along the European coast: A review, *Journal of Sea Research*, 66, 238–247.
- Santos S., Cardoso J.F.M.F., Carvalho C., Luttikhuisen P.C, van der Veer H. W., 2011b, Seasonal variability in somatic and reproductive investment of the bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) along a latitudinal gradient, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 92, 19-26.
- Silva C., Mattioli M., Fabbri E., Yáñez E., DelValls T. A., Martín-Díaz M. L., 2012, Benthic community structure and biomarker responses of the clam *Scrobicularia plana* in a shallow tidal creek affected by fish farm effluents (Rio San Pedro, SW Spain), *Environment International*, 47, 86–98.
- Sunderman, F. W., Abubkr, M., Hopfer, S. M., Zaharia, O. And Reid, M. C., 1985, Increased lipid peroxide in tissues of nickel chloride treated rats. *Ann Clin Lab Sci*, 15, 229–236.



Annexes 3

Rapport Seine-Aval 5

Acronyme du projet : ECOTONES

Coordinateur : Benoit Xuereb

Tache 1. Evaluation des effets de la contamination sur la faune aquatique (responsable Benoit Xuereb)

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

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

1 Présentation du modèle

Le copépode *E. affinis* (Poppe) est un copépode de l'ordre des calanoïdes. Il vit sous forme libre pouvant ainsi évoluer dans la colonne d'eau en fonction de migrations journalières (Hough & Naylor, 1992 ; Morgan et al, 1997). Cette espèce euryhaline est capable de s'adapter à une forte variabilité de salinité. Elle est donc particulièrement bien adaptée au milieu estuarien, où elle est majoritairement présente dans l'hémisphère Nord (Baie de Chesapeake, USA ; estuaire de la Gironde, France, Estuaire de l'Elbe Allemagne (Peitsch et al, 2000 ; Kimmel & Roman, 2004 ; David et al, 2005). En estuaire de Seine, comme dans d'autres estuaires, *E. affinis* constitue l'espèce dominante du zooplancton (entre 52 et 99,9 % en zone mésohaline et entre 73 et 99,9 % en zone oligohaline (Mouny & Dauvin, 2002). À ce titre, sa dynamique des populations a été étudiée. Ainsi, la structure de la population d'*E. affinis* varie au cours du processus de marée. En surface, les adultes et pré-adultes sont présents majoritaires au début de jusant. Au cours du jusant, ils laissent place progressivement aux copépodites et nauplii, pour être très minoritaires en période de flot (Devreker et al, 2008). D'autres facteurs abiotiques, tels que la température et la salinité, influent sur la dynamique de la population d'*E. affinis* en estuaire de Seine. La plus forte

abondance des copépodes, tous stades confondus, a été relevée à une température de 15-16 °C correspondant au printemps et à l'automne (Devreker et al, 2010). De plus, les nauplii sont majoritairement présents à de faibles salinités (< 5) contrairement aux adultes et pré-adultes qui supportent une large gamme de salinité, jusqu'à 15 à 15°C ou 20 à des températures inférieures (13°C ;Devreker et al, 2008). Récemment Dur & Souissi (2018) ont proposé une modélisation des habitats fonctionnels des principaux stades de développement (nauplii, copépodites et adultes) d'*E. affinis* dans l'estuaire de la Seine. Leur approche s'est fortement appuyée sur la synthèse de plusieurs campagnes d'échantillonnage réalisées entre 2002 et 2010 à proximité du Pont de Normandie et selon le même protocole (point fixe et prélèvement à haute fréquence en fonction de la marée). Les différentes études de terrain ont confirmé que des différences d'abondance existent entre mâles et femelles. Ainsi, en estuaire de Seine, le sex-ratio d'*E. affinis* est déséquilibré, avec une prédominance des mâles (3: 1 , mâles : femelles ; Devreker et al, 2008). Les femelles sont cependant prédominantes à l'étape de basse mer. Les copépodes *E. affinis* au stade adulte mesurent 1 à 1,5 mm de longueur totale. Comme tous les arthropodes, les copépodes sont constitués d'un exosquelette rigide composé principalement de protéines de cuticule et de chitine. Leur morphologie est celle d'un copépode calanoïde. Les mâles et les femelles possèdent des caractères sexuels secondaires différents permettant leur différenciation (Figure 1).

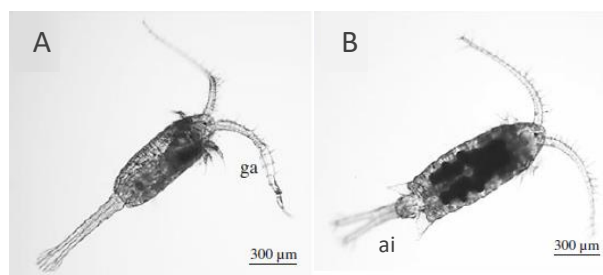


Figure 1 Photographie d'un mâle (A) et d'une femelle (B) adultes *E. affinis* d'après (Boulangé-Lecomte et al., 2014) ga : antenne géniculée, ai : ailettes.

Reproduction : *E. affinis* possède exclusivement une reproduction sexuée (oviparité) entre mâles et femelles. Le mâle, avant toute rencontre, produit des spermatophores (sp) contenant les spermatozoïdes. La recherche d'un partenaire est guidée par la présence de phéromones solubles, excrétés par la femelle (Katona, 1973 ; Snell and Morris, 1993 ; Buskey, 1998 ; Lonsdale et al., 1998). Les antennules et pattes natatoires permettent aux

copépodes de se mouvoir par une succession de sauts jusqu'à la femelle. Le mâle saisit alors la femelle grâce à son antennule géniculée (Katona, 1975). Une fois accroché, le mâle transfère son spermatophore (sp) au niveau du segment génital de la femelle immature (stade 1) grâce à sa 5ème paire de patte modifiée en forme de pince (Figure 2 A). Bien qu'un seul accouplement n'ait lieu au même moment, une femelle copépode peut conserver plusieurs spermatophores provenant de différents mâles permettant ainsi un brassage génétique (Katona, 1975 ; Titelman et al., 2007). Plusieurs stades de maturation peuvent être identifiés chez la femelle. Le stade 2A correspond au début de la maturation et se caractérise par l'apparition, dans les gonades, d'ovocytes (Figure 2 B) qui s'accumulent puis gagnent les oviductes (stade 2B : Figure 2 C). En fin de maturation, ils sont excrétés pour former le sac ovigère accroché près du segment génital (Figure 2 D). La femelle est alors qualifiée d'ovigère (stade 3). Un sac ovigère peut contenir de 20 à 60 œufs selon les conditions environnementales rencontrées.

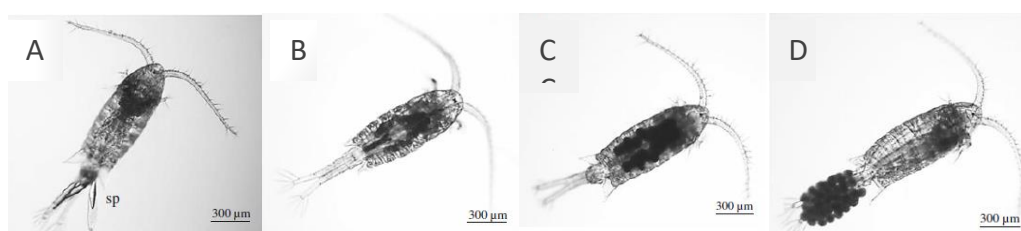


Figure 2 Photographie des différents stades de femelles copépodes, d'après (Boulangé-Lecomte et al., 2014). A, stade 1, immature (sp : spermatophore), B, stade 2A, début de maturation, C, stade 2B, fin de maturation, D, stade 3, ovigère.

Cycle de développement : chez *E. affinis*, il se divise en trois phases : une phase nauplienne, une phase copépodite et une phase adulte. Il est caractérisé par des mues successives et dure entre 18 et 21 jours selon les conditions abiotiques (Katona, 1971) (Figure 3). La durée du développement embryonnaire, entre l'apparition du sac ovigère et l'éclosion des œufs, varie également selon les conditions abiotiques. Il est de 2 jours à une salinité de 15 et à 15°C. (Devreker et al., 2009). Après éclosion des œufs, la première phase larvaire des copépodes est appelée nauplius. Elle comporte 6 stades de développement (N1 à N6). Ces stades sont morphologiquement éloignés des stades adultes. Après le stade N6, une métamorphose permet d'entrer dans la phase de développement juvénile dite copépodite (C1 à C5), morphologiquement proche des adultes. Le nombre de paires de pattes et de

segments augmente entre les stades C1 et C4. La différenciation sexuelle débute dès le stade C5, encore appelé pré-adulte, mais la maturité sexuelle n'est atteinte qu'au stade adulte. Le cycle de reproduction et de développement peut reprendre après un temps appelé temps de latence. En effet, après éclosion, la femelle peut produire un nouveau sac ovigère après 1 jour à une salinité de 15 et 15°C (Devreker et al., 2009).

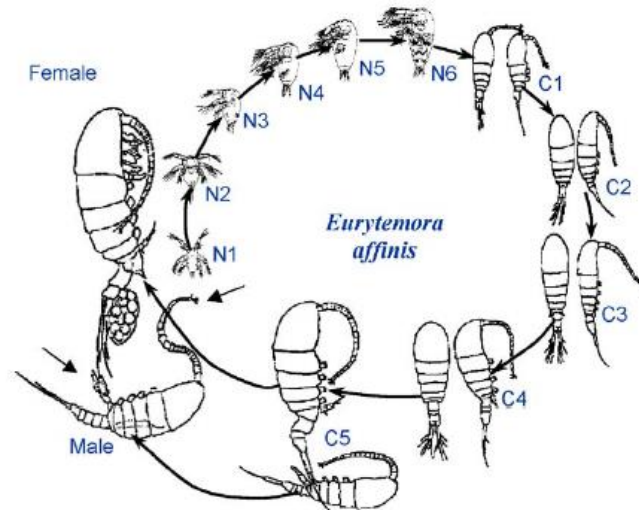


Figure 3 Cycle de développement d'*E. affinis* (d'après (Katona, 1971) et modifié par Soussi S. N : stade nauplien, C : stade copépodite.

Régime alimentaire : Le copépode *E. affinis* possède un régime alimentaire de type omnivore (phytoplancton, protozoaires, bactéries, débris organiques) opportuniste, mais pourrait cependant avoir une alimentation sélective en fonction des concentrations des proies disponibles dans le milieu (Tackx et al., 2003 ; David et al., 2006 ; Modéran et al., 2012). Les antennes et parties mandibulaires contribuent en grande partie à l'alimentation des copépodes en créant un courant permettant d'amener les proies au niveau des pièces buccales du copépode (Yen and Strickler, 1996).

Tests de toxicité et biomarqueurs chez les copépodes : Du fait de leur distribution ubiquitaire dans les eaux autour du globe et leur rôle écologique, les copépodes représentent des espèces non-cibles d'intérêt. Leurs cycles de vie courts, leurs taux de fécondité élevés ou encore leurs stades de développement distincts sont des atouts à leur utilisation comme espèces modèles en écotoxicologie (Lee et al., 2007; Raisuddin et al., 2007; Kwok et al., 2015). Les copépodes estuariens comme *Acartia tonsa* et *Eurytemora affinis* représentent également des espèces d'intérêts. Ainsi, des protocoles sont, depuis ces

dernières années, optimisés et standardisés. Certains d'entre eux sont préconisés par l'OCDE (ISO14669, 1999 ; Gourmelon and Ahtiainen, 2007 ; Gissi et al., 2013). L'impact des contaminants sur la survie des copépodes n'est pas le seul critère étudié. Des effets neurotoxiques via l'activité de l'acétylcholinestérase, la mise en place de mécanismes de défense via l'activité de la Glutathion-S-Transférase (GST), peuvent être mesurés chez ces espèces (Cailleaud et al., 2007 ; Forget-Leray et al., 2005 ; Souza et al., 2013). Des dommages à l'ADN ont également été étudiés par des tests de comètes chez plusieurs espèces de copépodes estuariens (Goswami et al., 2014). Des perturbations du comportement natatoire ou alimentaire peuvent également être observées (Cailleaud et al., 2011b ; Michalec et al., 2013 ; Gong et al., 2016). En outre, les copépodes sont particulièrement adaptés pour l'étude des effets sur le développement, la croissance et la reproduction. Ainsi, une augmentation du temps de développement a été observée chez plusieurs espèces de copépodes après exposition à des pesticides (fipronil, aldicarbe ; (Thomas Chandler et al., 2004 ; Di Marzio et al., 2013). Plusieurs molécules (benzo-a-pyrène, 4-nonylphénol, di(ethyl-hexyl)-phthalate et des muscs synthétiques) sont capables d'inhiber le développement des stades naupliens (Wollenberger et al., 2003; Forget-Leray et al., 2005). Un bioessai a également été développé afin d'évaluer la toxicité des sédiments sur la croissance des nauplii d'*E. affinis* (Lesueur et al., 2013 ; Lesueur et al., 2015). De plus, le nombre de mue a été significativement réduit après une exposition des nauplii *Tigriopus fulvus* au cuivre et au pentachlorophénol (Rinna et al., 2011). D'autres critères tels que le sex-ratio, la fertilité (développement ovarien), la fécondité (nombre d'œufs, taux d'éclosion, teneur des œufs en protéines), le nombre d'intersexués, permettent d'évaluer l'effet des polluants sur la reproduction. Certains contaminants (Ag, Cd, Hg ; PCB 126 ; Ni respectivement) sont connus pour altérer fertilité et/ou fécondité chez le copépode (Hook and Fisher, 2001 ; Mohammed et al., 2010 ; Guo et al., 2012).

2 Sites d'étude et campagne de prélèvements

2.1 Prélèvements des copépodes *Eurytemora affinis*

Les copépodes ont été prélevés en zone oligo-haline à Tancarville au niveau du point kilométrique 337 (pk 337 ; 49°28'19.24"/0°27'55.303'; Haute-Normandie, France ; Figure 4,

Tableau 1). Les prélèvements ont été effectués avec une périodicité saisonnière en 2015, 2016, et 2017 avec un prélèvement plus soutenu de mars à juin 2015. Depuis les pontons, plusieurs traits horizontaux (sub-surface), de 15 minutes chacun, ont été effectués à l'aide de filets WP2 (maille 200 μm). Ces prélèvements se sont opérés durant le jusant, après l'étale de haute mer. Les échantillons ont été filtrés sur place à l'aide de deux tamis de maillage au diamètre de 500 μm et 100 μm , le premier tamis permettant d'éliminer les débris et prédateurs adultes (Mysidacés, Gammaridés etc..) et le deuxième de récupérer les copépodes. Deux échantillons d'1L sont formolés à 2 %**0** directement sur place pour l'étude des marqueurs populationnels (densité, structure de population, sexe ratio, fécondité et taux de fécondation) Pour déterminer des valeurs de référence pour les différents biomarqueurs individuels et sub-individuels dans des conditions optimales d'élevage et pour les dosages de VTG et des acides nucléiques, les individus ont été transportés jusqu'au laboratoire dans une glacière remplie d'eau de Seine de surface pour y être triés dès leur arrivée puis congelés à -80°C . Pour le dosage des lipides, de la GST et des activités AChE et phenoloxydase, les individus ont été congelés sur site par immersion dans l'azote liquide puis stockés à -80°C au laboratoire.

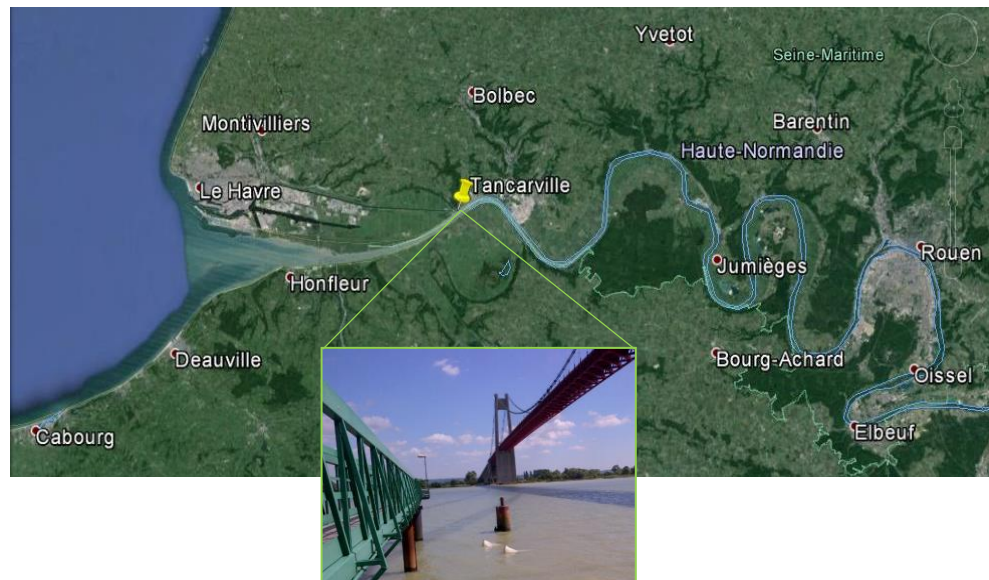


Figure 4 Carte de l'estuaire de Seine (photo, Google Earth). Un repère accompagné d'un zoom photographique ont été placés au point de prélèvement de Tancarville (photo : E. Legrand).

Tableau 1 Dates de prélèvements et paramètres abiotiques.

Date		coefficient	température	salinité	pH
04/05/15	terrain	84	16,4	2	8
30/07/15	terrain	78	20	2	8-9
13/10/15	terrain	85	14,9	7	7-8
13/10/15	terrain	85	14,9	7	7-8
10/11/15	terrain	75	13,4	10	8
03/05/16	terrain	63	13,1	7	6
04/11/16	terrain	76	12,6	10	7
09/02/17	terrain	80	5,9	8	7
09/05/17	terrain	78	13,8	7	6,7
16/11/17	terrain	77	11,7	7	7
21/02/18	terrain	77	6	3	6-7

3 Méthodologie

3.1 Comptage des individus.

Le comptage des individus est effectué à partir de chaque échantillon formolé. L'échantillon est homogénéisé filtré sur une maille de 33µm, et nettoyé à l'eau distillée. L'échantillon nettoyé est dilué dans 1L d'eau et ¼ est prélevé avec une poire afin de réaliser le comptage *in situ*. Quand l'échantillon est peu dense le comptage est réalisé sur la totalité sans dilution au préalable (années 2017-2018). Par la suite une différenciation de chaque stade (nauplii, copépodites (C1-C4 groupés), C5 mâle, C5 femelle, adulte mâle, adulte femelle et femelle ovigère) est opérée sous une loupe binoculaire.

3.2 Morphologie et fécondité.

Afin de déterminer un impact sur la productivité et la taille des individus, 20-40 femelles ovigères par échantillon sont prélevées (quand elles sont disponibles), puis photographiées via un microscope inversé (type Olympus) équipé d'une caméra pour mesurer ultérieurement les traits morphométriques et compter le nombre œufs présents à l'aide du logiciel ImageJ selon le protocole de Souissi et al. (2016). La longueur et la largeur du prosome ainsi que la longueur et la largeur de l'urosome ont été mesurées chez les femelles ovigères. Pour évaluer la fécondité, le sac d'œufs est d'abord examiné visuellement, puis une photo du sac est prise pour mesurer ultérieurement ses dimensions avant de l'ouvrir délicatement pour compter le nombre d'œufs et mesurer le diamètre de 5 œufs pris au

hasard. Ainsi la fécondité des femelles, les changements et/ou anomalies morphologiques sont déterminés.

Lors du tri des individus, le comptage sous loupe binoculaire et lors des observations sous microscope, toute anomalie morphologique et/ou présence d'épibionte (ou parasite) est notée.

3.3 Détermination de valeurs de référence et valeurs seuils au laboratoire (GST/lipides/acides nucléiques)

En l'absence de site de référence, les valeurs de référence et valeurs seuils des nouveaux biomarqueurs (i.e. AChE, GST, lipides, acides nucléiques) ont été déterminées au laboratoire après stabulation des organismes à 15 psu, 15 °C, pH 8 sous oxygénation pendant 48 h, en faisant varier pendant 48 h les principaux facteurs confondants dans les gammes rencontrées dans le milieu naturel de cette espèce en estuaire de Seine i.e. la température (5, 10, 20 °C), la salinité (2,5-5-10 psu) et le pH (7, 9). La moyenne des indices a été définie comme valeur de référence et les intervalles de confiance à 95 comme valeurs seuils.

3.4 Détermination de valeurs de référence du cas particulier de l'AChE

Une étude antérieure datant de 2001 financé dans le cadre du programme Seine Aval 2 a pu être valorisée et exploitée pour déterminer de manière plus robuste la valeur de référence et les valeurs seuils pour le biomarqueur AChE. De janvier 2001 à Décembre 2001, chaque mois des copépodes ont été prélevés dans l'estuaire, une partie a été congelée directement sur place comme décrit précédemment et une partie a été ramenée au laboratoire pour déterminer l'activité AChE après 7 jours et 14 jours de récupération en eau propre (15°C ; 15 PSU).

3.5 Dosage des biomarqueurs

3.5.1 Dosage de l'AChE

L'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme essentielle impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux. De nombreuses molécules qualifiées de neurotoxiques peuvent interagir avec l'AChE en se liant au niveau de son site actif ou non et de ce fait induire une inhibition de cette enzyme. L'activité enzymatique acétylcholinestérase est mesurée à partir de l'extrait protéique cytosolique d'un pool de 50 copépodes par la

méthode colorimétrique d'Ellman (1961) modifiée par Bocquené et Galgani (1998) pour la lecture en microplaques 96 puits.

3.5.2 Dosage de la GST

Les glutathion-S-transférases (GST) font partie des mécanismes de défense des cellules contre des stress chimiques et sont qualifiées d'enzymes de phase II parce qu'elles interviennent généralement à la suite des enzymes de phase I (cytochrome P450) qui oxydent les xénobiotiques les rendant parfois plus actif biologiquement. L'activité enzymatique glutathion-S-transférase est mesurée à partir de l'extrait protéique cytosolique d'un pool de copépodes par la méthode colorimétrique de Habig et al. (1974).

3.5.3 Lipides totaux

Les lipides totaux sont considérés comme la principale source d'énergie des organismes. Ils ont été mesurés dans des pools de 10 individus adultes selon la méthode sulfo-phospho-vanilline décrite par Knotz et al, 2006. Ils ont ainsi été dosés au spectrophotomètre (530 nm) à partir d'une gamme de phosphatidylcholine, après traitement des copépodes à l'acide sulfurique à haute température puis à la vanilline en présence d'acide phosphorique.

3.5.4 Ratio ARN/ADN

Le ratio ARN:ADN reflète le niveau d'activité métabolique d'un organisme et peut être utilisé comme un indice de l'état de santé de l'individu et de son niveau nutritionnel.

Les acides nucléiques ont été dosés selon la méthode décrite par Pommier et al (2010). Ils ont été extraits à partir de réplicats (3 à 4) de 10 individus adultes broyés dans un broyeur/homogénéisateur Precellys puis par sonication dans une solution de N-lauroylsarcosine. Les acides nucléiques ont ensuite été marqués avec une cyanine fluorescente, le RiboGreen, qui se lie de manière non spécifique aux bases azotées des acides nucléiques. Les concentrations en ARN et ADN des échantillons ont été déterminées à l'aide d'un spectrofluoromètre (530 nm excitation, 590 nm émission) à partir d'une gamme étalon avant (acides nucléiques totaux) et après traitement à la RNase (ADN).

3.5.5 Transcrits VTG

La vitellogénine (Vtg) ou les vitellogénine-like (Vtg-like) sont des protéines précurseurs du vitellus (réserve énergétique nécessaire aux organismes au cours de leur développement embryonnaire) et par conséquent fortement impliquées dans la reproduction. L'induction de Vtg chez les mâles et les juvéniles de poissons est un effet bien connu des contaminants oestrogéniques et est ainsi considéré comme un biomarqueur de perturbation endocrinienne (PE).

Le dosage des transcrits Vtg a été réalisé par RT-PCR quantitative en temps réel. Les niveaux d'expression ont été calculés selon la méthode de quantification absolue, le manque de connaissance du transcriptome d'*E. affinis* ne permettant pas de disposer d'un nombre suffisant de gènes de référence pour permettre une analyse relative. Afin de déterminer les niveaux de base de l'expression de la Vtg, le dosage des transcrits a été réalisé chez le mâle et la femelle à différents stades du cycle de reproduction, après exposition à des perturbateurs endocriniens modèles (4-nonylphenol et methyl-farnesoate) et chez des organismes prélevés *in situ* à 2 saisons différentes (novembre 2015 et mai 2016).

3.5.6 Phenoloxydase

Le dosage spectrophotométrique du système prophenoloxydase (Propo), marqueur d'immunotoxicité a été envisagé chez ces organismes à immunité non acquise, afin d'évaluer les effets de produits chimiques et de bactéries sur le système immunitaire du copépode. La prophénoloxidase (Propo) est une enzyme importante du système immunitaire chez les invertébrés et notamment chez les crustacés (Aladaileh et al, 2007). Elle permet entre autres la nodulation, l'encapsulation et la macrophagie. La prophénoloxidase est activée en présence de faibles concentrations de marqueurs de pathogènes. L'activation de la prophénoloxidase en phénoloxidase (PO) (l'enzyme réellement active) est réalisée par une enzyme la PO activating enzyme (PPA). La PO est une enzyme qui intervient fréquemment pour lutter contre les infections par des pathogènes chez les mollusques ou encore les bivalves. Toutefois peu de données sont disponibles quant à l'utilisation de cette enzyme chez des espèces plus petites telles que les copépodes par exemple. Les masses de copépodes nécessaires pour ce dosage nous ont amené à abandonner la détermination de valeurs de référence et seuils ainsi que le suivi de ce marqueur *in situ* chez *Eurytemora affinis*.

4 Résultats

4.1 Marqueurs Populationnels

4.1.1 Densité et structure de la population

Les copépodites ont été retrouvés en grande majorité dans tous les échantillons, les stades copépodites sont particulièrement abondants en mai 2015 et en mai 2016 (figure 5A). A l'inverse peu de nauplii étaient présents dans les échantillons, une quantité non négligeable en mai et juillet 2015 a pu être dénombrée. Une forte diminution du nombre d'individus (tous stades confondus) a été observée en novembre 2016 comme dans tous les prélèvements réalisés en 2017 et 2018. Ceci pourrait indiquer une baisse réelle de la densité de la population mais aussi un effet de la marée et/ou des conditions d'échantillonnage (Devreker et al., 2008).

Au niveau du stade adulte, nous observons plus de mâles que de femelles dans quasiment tous les échantillons sauf en mars 2015. La figure 5B montre une diminution progressive du nombre de mâles entre mai 2015 et mai 2016, suivie par une chute drastique des densités des mâles.

Analyses des paramètres morphométriques des femelles ovigères

La mesure morphométrique principale très utilisée dans la littérature a été mesurée sur un certain nombre d'individus i.e. la longueur du prosome. Une fluctuation de la longueur du prosome est observée selon les années, avec des femelles de grande taille principalement en mars et octobre 2015, et de tailles plus petites en juillet 2015 et novembre 2017 (figure 6). La variabilité naturelle mesurée lors de cette étude correspond à nos observations antérieures.

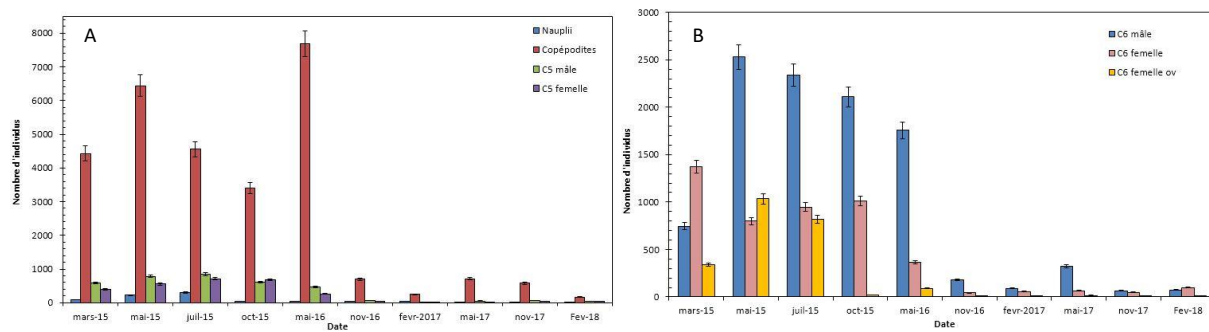


Figure 5 A) Evolution de la densité des différents stades de développement (nauplii en bleu, copépodites en rouge, C5 mâle en vert et C5 femelle en violet) par échantillon en fonction des différentes dates d'échantillonnage de mars 2015 à février 2018. Les effectifs représentent le nombre d'individus contenus dans l'échantillon (équivalent à un trait au filet à plancton en mode passif durant 15 minutes). B) Nombre d'individus de différents stades adultes (C6 mâle en bleu, C6 femelle en rose et C6 femelle ovigère en orange) par échantillons en fonction des différentes dates de mars 2015 à février 2018.

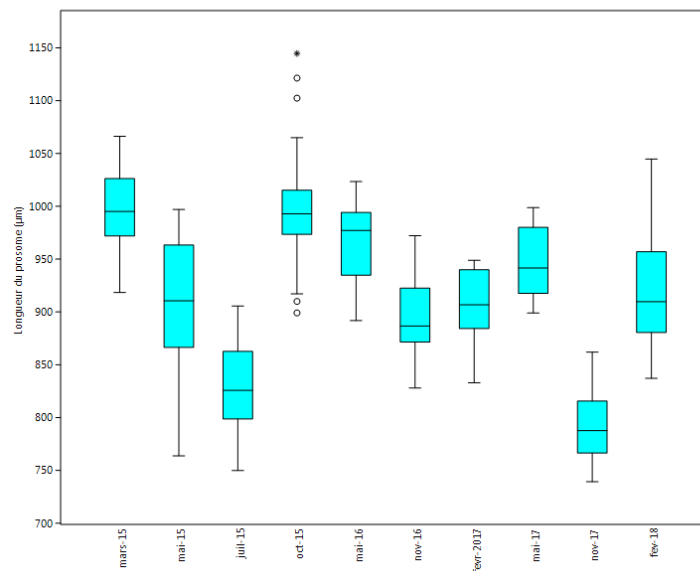


Figure 6 Distribution des valeurs de la longueur du prosome (µm) chez les femelles en fonction des différentes dates de mai 2015 à février 2018.

Evaluation de l'indice de conditions reliant la longueur et la largeur des femelles.

La figure 7 montre que la relation allométrique entre la longueur et largeur du Prosome des femelles est située en dessous de la courbe de référence combinant les mesures *in situ* et laboratoire. Ceci confirme que les individus observés dans le suivi ECOTONES présentent un indice de condition légèrement en dessous de la courbe de référence.

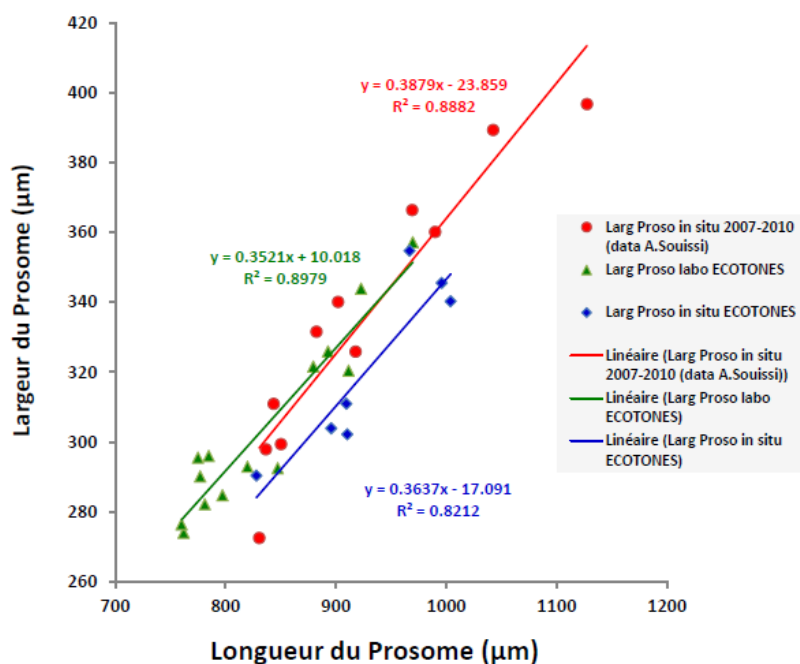


Figure 7 : Relations allométriques reliant la longueur du Prosome à la largeur du Prosome obtenues à partir de 3 jeux de données différents : i) une compilation des données in situ entre les années 2007 et 2010 ; ii) les données obtenues au laboratoire durant el suivi du stock de culture en masse d'*Eurytemora* ainsi que 3 expériences d'exposition d'une cohorte (une génération) de la population d'E. affinis au Cd, Ni et Cu ; et iii) les données du suivi in situ ECOTONES. Les ajustements linéaires sont également affichés. Un ajustement de référence des points obtenus in situ et dans le laboratoire (hors suivi ECOTONES) donne une relation de référence $Y=0.366X-2.436$ avec $R^2=0.911$.

4.1.2 Sex-ratio, fécondité, taux de fécondation

A noter que malgré le faible pourcentage de femelles ovigères en octobre 2015, la forte densité de la population nous a permis de bien isoler 40 femelles ovigères pour examiner les autres indicateurs. Malheureusement, le très faible effectif des femelles ovigères après 2015 (figure 8) ne nous a pas permis d'estimer les indicateurs liés à la fécondité et qualité des œufs.

Le pourcentage de femelles ovigères est un bon indicateur de l'intensité de reproduction au sein de la population. Ce pourcentage est très variable, avec des valeurs maximales observées en mai et juillet 2015. La valeur minimale (<5%) a été enregistrée en octobre 2015. Par la suite, le pourcentage de femelles ovigères est resté relativement faible (<20%). Ce suivi ECOTONES confirme nos observations antérieures sur le fait que globalement le sex-ratio d'E. affinis dans la seine est déséquilibré en faveur des mâles. Nous constatons toutefois la présence de valeurs basses en mars 2015 et février 2018, mais également des

valeurs proches de 80% de mâles adultes observées en 2016 et 2017 (figure 9). Ceci pourrait affecter la fitness de la population *via* le succès reproducteur.

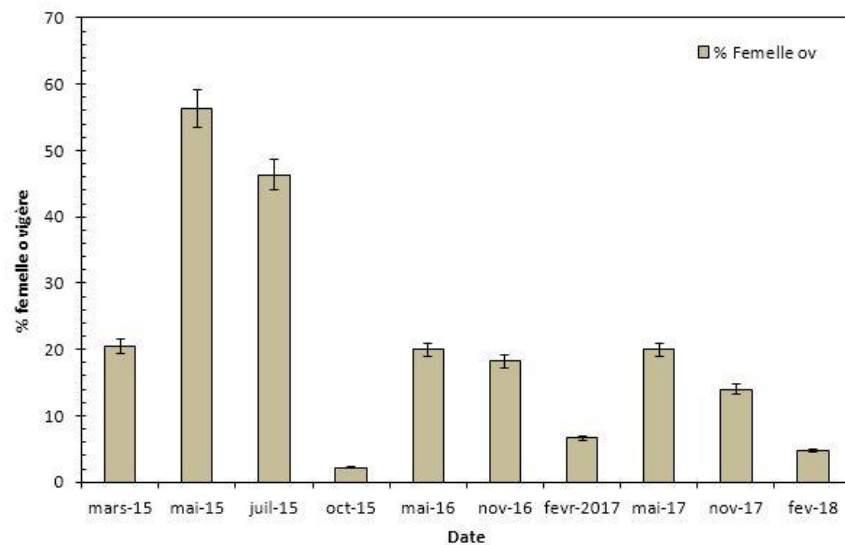


Figure 8 Evolution en pourcentage de femelles ovigères de mars 2015 à février 2018.

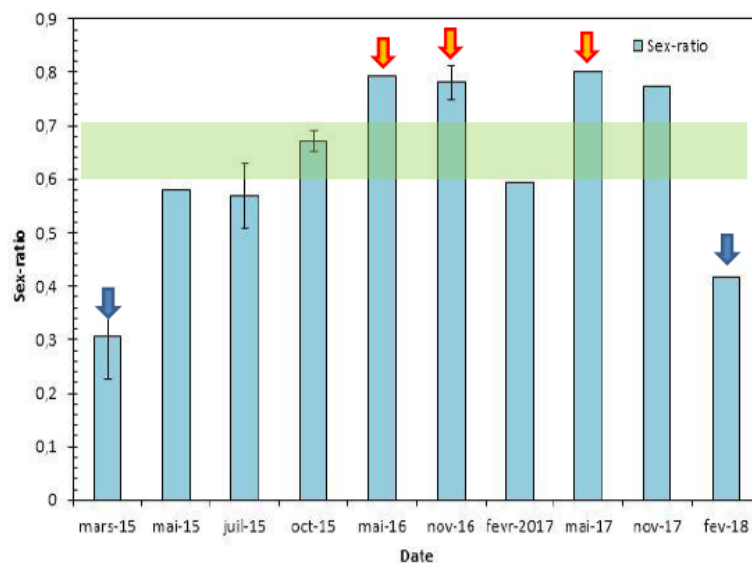


Figure 9 Variabilité temporelle du sex-ratio (M/M+F) durant la période d'étude. La bande verte indique les valeurs 'normales' selon nos observations *in situ* et au laboratoire. Les flèches indiquent les valeurs anormales du sex-ratio.

Fécondité des femelles début 2015 à début 2018 :

Le nombre d'œufs par femelle est quasiment identique en mars et mai 2015 (figure 10). Ensuite il est élevé en octobre 2015 avec environ 25 œufs par femelle. Malheureusement le peu de femelles ovigères isolées des échantillons ont été soit sans sac d'œufs ou bien le sac a été ouvert (impossible d'estimer la fécondité réelle). Néanmoins nous avons estimé le diamètre sphérique équivalent des

œufs même en absence de femelles ovigères porteuses de sacs intacts. La figure 11 montre que la variabilité de la taille des œufs indique une fluctuation de la qualité de la descendance (de la fitness).

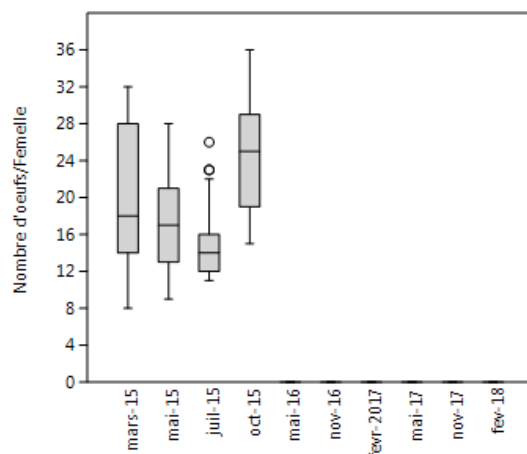


Figure 10 Nombre d'œufs par femelle en fonction des différentes dates de mars 2015 à février 2018.

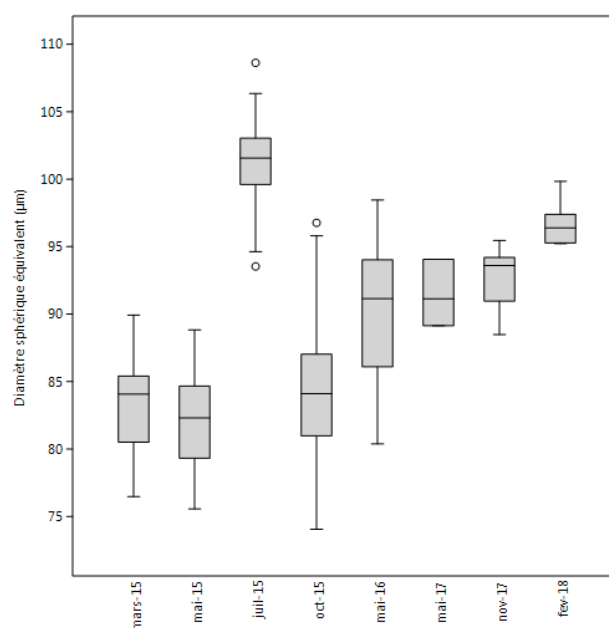


Figure 11 Diamètre sphérique équivalent des œufs par femelle en fonction des différentes dates de mars 2015 à février 2018.

4.2 Marqueurs individuels

4.2.1 Ratio ARN/ADN

Les dosages d'acides nucléiques, et notamment du ratio ARN/ADN, sont largement utilisés comme indicateurs de la condition nutritionnelle et du bien-être des organismes en

particulier en milieu marin. Ils constituent des indicateurs utiles pour évaluer les impacts naturels ou anthropiques sur les organismes. Ils présentent l'avantage de rendre compte de l'état général des individus en évitant un travail laborieux de comptage et de mesure, notamment chez les organismes de petite taille. Cet index rend compte de la capacité de synthèse des cellules et est ainsi corrélé au statut nutritionnel des organismes : la quantité d'ADN étant stable dans les cellules somatiques, les organismes lorsqu'ils se trouvent dans de bonnes conditions, présentent des ratios ARN : ADN élevés. Un ratio minimum de 1 est requis pour assurer la survie des individus, quelle que soit l'espèce considérée (Chicharo & Chicharo, 2008). La technique de détection des acides nucléiques par fluorescence a été choisie pour sa sensibilité. Des différences de ratios entre mâles et femelles chez plusieurs espèces nous ont conduits à ne considérer le ratio que chez les mâles (Pommier et al, 2010). Dans un premier temps, la technique de dosage a dû être adaptée au copépode *E. affinis*. Elle a présenté une bonne répétabilité puisque les écarts à la moyenne entre réplicats biologiques étaient compris entre 0,05 et 0,9.

Dans un second temps, en l'absence de site de référence, une valeur de référence et une valeur seuil ont été déterminées en faisant varier, en milieu contrôlé, les principaux facteurs confondants dans les gammes rencontrées en estuaire de Seine i.e. la température (5, 10, 20 °C), la salinité (2,5-5-10 psu) et le pH (7, 9) (figure 12 A). Les ratios étaient compris entre 2,5 et 10,4, en accord avec les données de la littérature qui rapportent des valeurs comprises entre 2 et 10,3 selon la localisation géographique ou les conditions d'élevage d'*E. affinis* (Pommier et al, 2010 ; Gorokhova et al, 2013). Le ratio est apparu particulièrement sensible aux variations de pH et aux faibles températures (5°C). Les variations de salinité (diminution de 5 à 12,5 psu par rapport au témoin) et de température modérées (+/- 5 °C par rapport au témoin) n'ont quant à elles que peu impacté les indices. La valeur de référence retenue était de 5 alors que la valeur seuil était de 1,9. Ce seuil faible du fait d'une part, de l'impact des variations de pH et des températures basses et d'autre part, de la variabilité observée pour les échantillons contrôles, limite la mise en évidence d'éventuels effets d'une contamination sur l'état de santé d'individus prélevés *in situ* pour un suivi saisonnier (figure 12 B). Dans ce sens, aucun point de mesure saisonnier n'est apparu en deçà du seuil dans la présente étude.

En conclusion, même si la méthode de dosage est apparue fiable et reproductible, l'impact des facteurs abiotiques sur ce marqueur rend complexe son opérationnalité dans un milieu

fluctuant comme un estuaire. Cependant, les ratios étant apparus relativement stables aux températures comprises entre 10 et 20 °C à pH 8 quelle que soit la salinité, il pourrait être envisagé de calculer un nouveau seuil restreint à ces conditions. Celui-ci serait alors plus élevé et donc plus discriminant pour évaluer les impacts naturels et anthropiques sur l'état de santé d'*E. affinis*. Cette stratégie imposerait toutefois un cadrage des conditions de prélèvement dans ces gammes, n'autorisant pas des prélèvements tout au long de l'année.

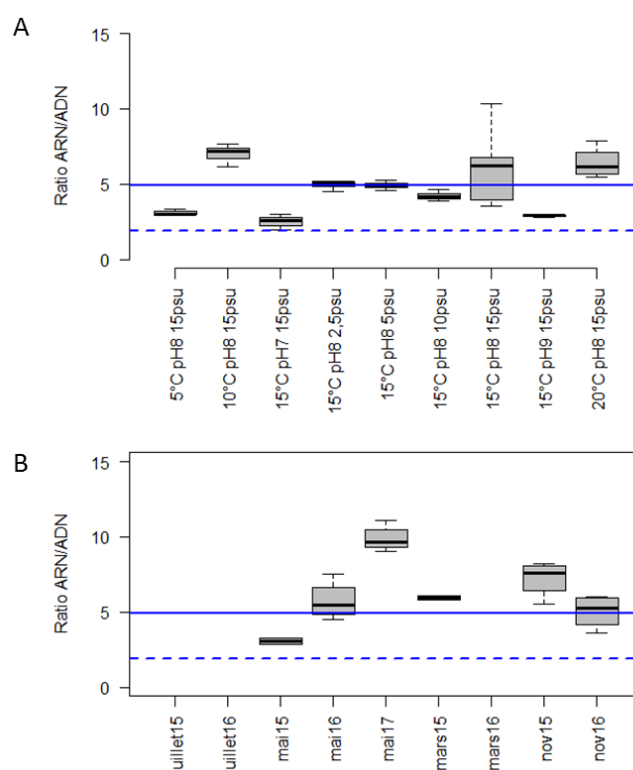


Figure 12 Développement du dosage des acides nucléiques chez *E. affinis* comme marqueur de condition. **A-** Variations du ratio ARN/ADN chez *E. affinis* en milieu contrôlé en fonction de la température, la salinité et le pH. Les conditions témoins correspondent au point 7 i.e. 15 °C, 15 psu, pH 8. La ligne pleine correspond à la moyenne des valeurs de ratio. La ligne pointillée représente l'IC95 unilatéral correspondant au seuil retenu. **B-** Suivi saisonnier du ratio ARN : ADN chez *E. affinis* prélevés en estuaire de Seine.

4.2.2 Lipides

Les lipides totaux sont considérés comme la principale source d'énergie des organismes. Après avoir mis en point de la technique de dosage chez *E. affinis*, comme pour le ratio ARN : ADN, une valeur de référence et des valeurs seuils ont été déterminées en faisant varier, en milieu contrôlé, les principaux facteurs confondants dans les gammes rencontrées en estuaire de Seine i.e. la température (5, 10, 20 °C), la salinité (2,5-5-10 psu) et le pH (7, 9) (Figure 13 A). Les taux variaient entre 37,7 et 157,8 µg par copépode, en accord avec les

données de la littérature qui rapportent des valeurs comprises entre 105 et 600 selon l'espèce de copépodes considérée (Lee et al, 2005). Les taux de lipides sont apparus particulièrement sensibles aux variations de salinité contrairement aux variations de pH et de température. La valeur de référence retenue était de 91,7 μg alors que les valeurs seuils, correspondant aux intervalles de confiance à 95, étaient de 36,3 et 147,1 μg . Ces valeurs ont été utilisées pour analyser les taux de lipides chez des individus prélevés en estuaire de Seine à différentes saisons en 2015 et 2016 : les réserves lipidiques sont apparues impactées pour l'ensemble des prélèvements saisonniers réalisés en 2015 et 2016 excepté en mars 2016. Toutefois, la grande variabilité entre réplicats biologiques, probablement due à un biais méthodologique lié à la méthode d'échantillonnage/conservation des organismes, nous a conduits à ne pas intégrer ces données dans l'approche WOE.

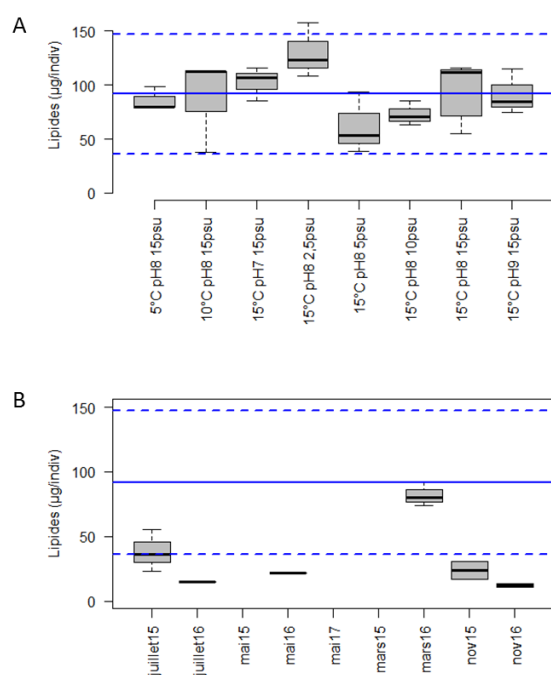


Figure 13 Développement du dosage des réserves énergétiques chez *E. affinis*. A- Variations des taux de lipides totaux en milieu contrôlé en fonction de la température, la salinité et le pH. Le témoin correspond aux conditions 15 °C, pH8 15 psu. La ligne pleine représente la moyenne des valeurs des réserves énergétiques. Les lignes pointillées représentent les IC95 bilatéraux correspondant aux seuils retenus. B- Suivi saisonnier des taux de lipides totaux chez *E. affinis* prélevés en estuaire de Seine.

4.3 Marqueurs sub-individuels

4.3.1 Acétylcholinestérase (AChE)

Les dosages de l'activité AChE ont déjà été utilisés comme marqueur d'exposition aux neurotoxiques, chez cette espèce *Eurytemora affinis*, (Forget-Leray et al., 2005, Cailleaud et al., 2007). Aucune différence significative d'activité AChE entre les copépodes adultes males et femelles nous ont permis de valider le dosage sur un pool de 50 adultes (figure 14). Dans

un premier temps, en l'absence de site de référence, une valeur de référence et une valeur seuil ont été déterminées en faisant varier, en milieu contrôlé, les principaux facteurs confondants dans les gammes rencontrées en estuaire de Seine i.e. la température (5, 10, 20 °C), la salinité (2,5-5-10 psu) et le pH (7, 9) (figure 15A). Les activités AChE étaient comprises entre 250 et 450 nmoles d'ACTC/min/mg de protéine, en accord avec les données de la littérature sur l'estuaire de Seine et d'élevage d'*E. affinis* (Cailleaud et al., 2006, Forget-Leray et al., 2005). Les activités AChE semblent sensibles aux variations de pH et de température. Les variations de salinité n'ont quant à elles que peu impacté les activités AChE. La valeur de référence retenue était de 362 nmoles d'ACTC/min/mg de protéine alors que la valeur seuil était de 266 nmoles d'ACTC/min/mg de protéine. Ce seuil intégrant les effets des facteurs confondants et la variabilité observée pour les échantillons contrôles, met en évidence d'éventuels effets d'une contamination sur l'état de santé d'individus prélevés *in situ* pour un suivi saisonnier (figure 15B), notamment sur l'activité de locomotion de ces organismes vitale pour leur alimentation et leur reproduction. Une diminution significative de l'activité AChE en deçà du seuil a été observée en novembre 2015, en février, juillet et mai 2016 et en mai 2017.

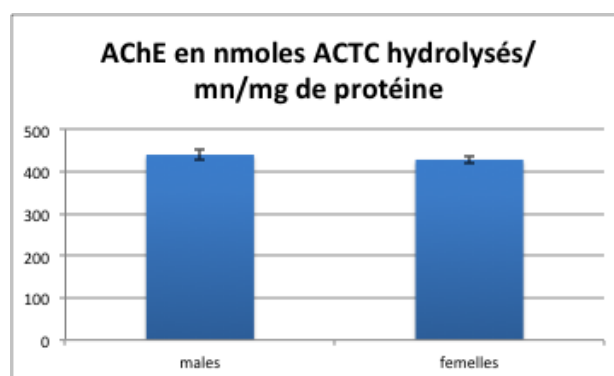


Figure 14 : dosage de l'activité AChE chez *E. affinis*. Variations de l'activité AChE en milieu contrôlé en fonction du sexe (conditions 15 °C, pH8 15 psu).

En conclusion, même si la méthode de dosage est apparue fiable et reproductible, qu'une valeur seuil et de référence a pu être déterminée en conditions contrôlées, il nous a paru nécessaire pour rendre plus robuste la détermination d'une valeur de référence et d'une valeur seuil d'ajouter les résultats d'une étude antérieure menée sur une année dans le cadre de Seine aval 2 (figure 16). Ce nouveau seuil à 373 nmoles d'ACTC/min/mg de protéine et cette nouvelle valeur de référence à 399 nmoles d'ACTC/min/mg de protéine nous a

permis de mettre en évidence une inhibition significative de cette enzyme lors du suivi in situ de 2015 à 2017, les activités AChE étant toutes en dessous du seuil quelque soit le mois et l'année. Ces résultats indiquent un effet important des contaminants présents en estuaire de Seine sur ce biomarqueur, enzyme nécessaire à la transmission de l'influx nerveux et donc impliquée dans la locomotion de cet organisme. Ces derniers résultats nous ont amené à intégrer ce biomarqueur dans l'approche WOE.

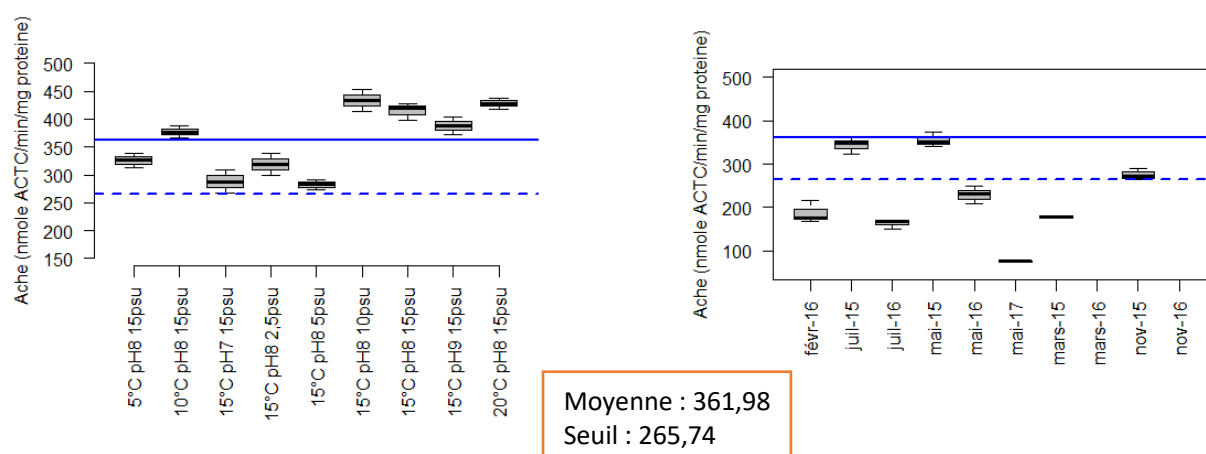


Figure 15 : dosage de l'activité AChE chez *E. affinis*. **A-** Variations de l'activité AChE en milieu contrôlé en fonction de la température, la salinité et le pH. Le témoin correspond aux conditions 15 °C, pH8 15 psu. La ligne pleine représente la moyenne des valeurs des activités AChE. La ligne pointillée représente IC95 unilatéral correspondant au seuil retenu. **B-** Suivi saisonnier de l'activité AChE chez *E. affinis* prélevés en estuaire de Seine.

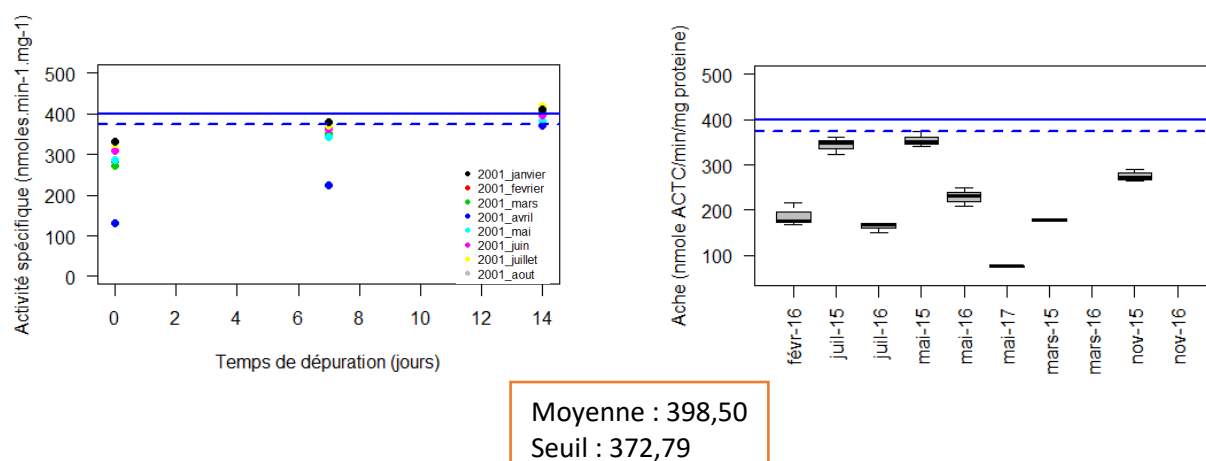


Figure 16 : dosage de l'activité AChE chez *E. affinis*. **A-** Récupération de l'activité AChE en milieu contrôlé sur 7 et 14 jours. La ligne pleine représente la moyenne des valeurs des activités AChE. Les lignes pointillées représentent les IC95 unilatéral correspondant aux seuils retenus. **B-** Suivi saisonnier de l'activité AChE chez *E. affinis* prélevés en estuaire de Seine.

4.3.2 Glutathion S-Transférase

Les GST sont considérés comme des enzymes de phase II, dont l'augmentation met en évidence la mise en place d'un système de défense face à un stress comme la contamination. Aucune différence significative d'activité AChE entre les copépodes adultes mâles et femelles nous ont permis de valider le dosage sur un pool de 50 adultes (figure 17). Une valeur de référence et des valeurs seuils ont été déterminées en faisant varier, en milieu contrôlé, les principaux facteurs confondants dans les gammes rencontrées en estuaire de Seine i.e. la température (5, 10, 20 °C), la salinité (2,5-5-10 psu) et le pH (7, 9) (Figure 18 A). Les activités GST variaient entre 81 et 226 nmoles /min/mg de protéine, en accord avec les données de la littérature qui rapportent des valeurs comprises entre et selon l'espèce de copépodes considérée (Cailleaud et al., 2007). Les activités GST sont apparues particulièrement sensibles aux variations de salinité et de température contrairement aux variations de pH. La valeur de référence retenue était de 144 nmoles /min/mg de protéine alors que la valeur seuil unilatéral IC 95%, correspondant à 233 nmoles /min/mg de protéine, Ces valeurs ont été utilisées pour analyser les activités GST chez des individus prélevés en estuaire de Seine à différentes saisons en 2015, 2016 et 2017 : les activités GST sont apparues non impactées pour l'ensemble des prélèvements saisonniers réalisés excepté en mai 2015. Toutefois, la grande variabilité de réponse des activités GST dans la gamme de température et salinité testé au laboratoire nous a conduits à ne pas intégrer ces données dans l'approche WoE.

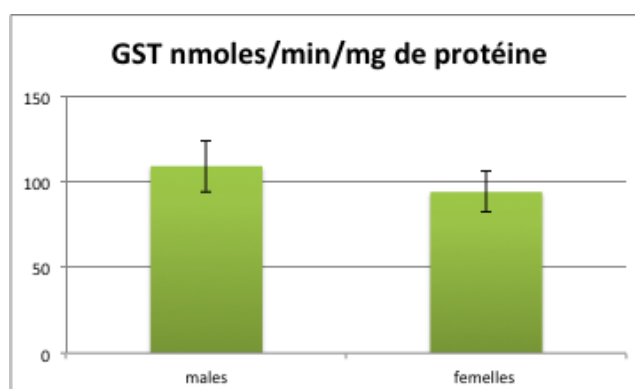


Figure 17 : Dosage de l'activité GST chez *E. affinis*. Variations de l'activité AChE en milieu contrôlé en fonction du sexe (conditions 15 °C, pH 8 15 psu).

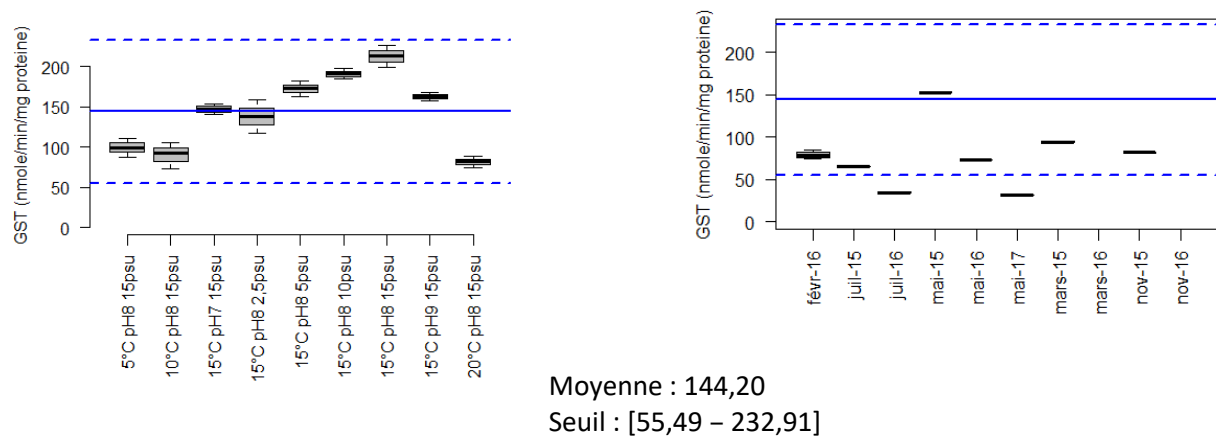


Figure 18 : dosage de l'activité GST chez *E. affinis*. A- Variations de l'activité GST en milieu contrôlé en fonction de la température, la salinité et le pH. Le témoin correspond aux conditions 15 °C, pH8 15 psu. La ligne pleine représente la moyenne des valeurs des activités GST. Les lignes pointillées représentent les IC95 unilatéral correspondant aux seuils retenus. B- Suivi saisonnier de l'activité GST chez *E. affinis* prélevés en estuaire de Seine.

4.3.3 Vitellogénine

Cette partie du projet avait pour but de développer, chez *E. affinis*, un outil de diagnostic pertinent permettant non seulement la détection des PE dans les milieux aquatiques mais également la caractérisation de leurs effets, en lien avec la reproduction. L'objectif de l'étude était ainsi d'explorer la possibilité d'utiliser l'induction de la VTG comme biomarqueur de PE. Nous avons choisi d'étudier l'induction chez les mâles en considérant l'utilisation de l'induction de la VTG comme un biomarqueur « on-off » rendant l'interprétation non ambiguë, notamment pour les approches in-situ. En effet, les fluctuations chez les femelles, qui expriment la VTG, posent la question du seuil au-delà duquel considérer une variation comme délétère. Dans un premier temps, l'analyse de l'expression du gène Ea-VTG2 par qPCR chez les mâles et les femelles en fonction de leur stade de reproduction a permis de déterminer des niveaux de base (figure 19). Le patron d'expression a révélé une augmentation progressive des taux de transcrits au cours de la maturation chez les femelles. Comme attendu, des différences inter-sexes importantes ont pu être mises en évidence puisque le niveau d'expression chez les mâles était 1 900 à 6 800 fois moins élevé que chez les femelles selon leur stade.

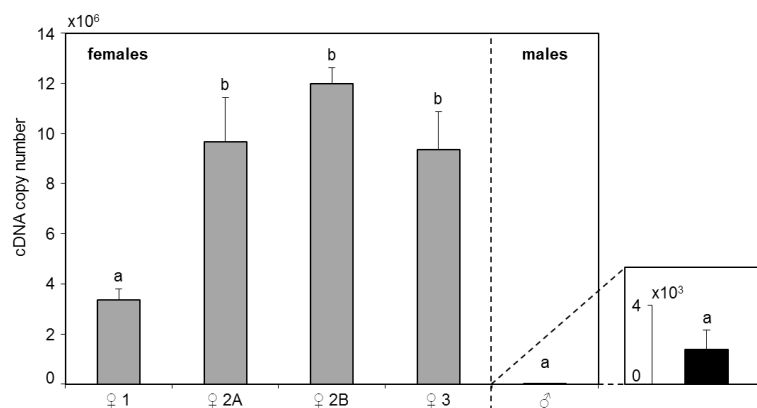


Figure 19 Expression du gène Ea-VTG2 chez *E. affinis* selon le stade de vie. (♂ : mâle - ♀ : femelle - stade 1, immature - stade 2A, initiation de la maturation - stade 2B, mature - stade 3, ovigère).

Dans un second temps, le caractère inducible chez les mâles par des composés modèles a été étudié (Figure 20). Le 4-nonylphenol (4-NP) a été choisi comme modèle de PE chez les vertébrés alors que le méthyl farnesoate (MF) a été choisi en tant qu'hormone de crustacé. Aucune induction n'a été mise en évidence.

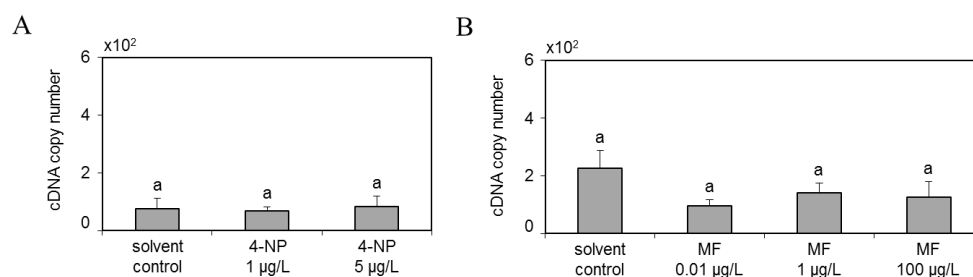


Figure 20 : Niveaux de transcrits Ea-VTG2 mesurés chez les mâles après exposition au 4-NP (24 h, A) et au MF (96 h, B)

Enfin, l'induction a également été étudiée chez des organismes mâles prélevés *in situ* (contexte de multi-contamination) à 2 saisons différentes (profils de contamination différents) (Figure 21). Aucune induction n'a été détectée.

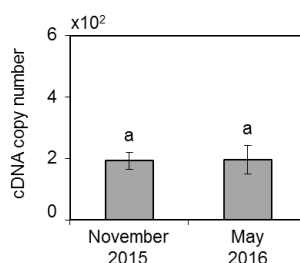


Figure 21 : Niveaux de transcrits Ea-VTG2 mesurés chez les mâles prélevés *in situ* à 2 saisons différentes

En conclusion, l'absence d'induction d'Ea-VTG2 en milieu contrôlé et in situ suggère que l'induction de la VTG pourrait ne pas constituer un biomarqueur pertinent chez cette espèce et, plus largement, chez les crustacés comme suggéré par d'autres études (Short et al., 2004). L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de la publication (Boulangé et al., 2017).

4.3.4 Phénoloxydase

Le dosage de ce nouveau biomarqueur n'a pu être réalisé, le nombre d'individus nécessaire s'est révélé trop important.

5 Opérationnalité des outils (Tache 3 bancarisation et interprétation des données)

5.1 Détermination des valeurs seuils et grille de lecture arbitraire

Une grille de lecture du niveau de gravité des effets observés sur l'activité AChE du copépode *Eurytemora affinis* en estuaire de Seine a été établie de façon arbitraire, sur la base du pourcentage d'inhibition de l'activité AChE observée, relativement au seuil de significativité de 25 % représentée sur la figure 22.

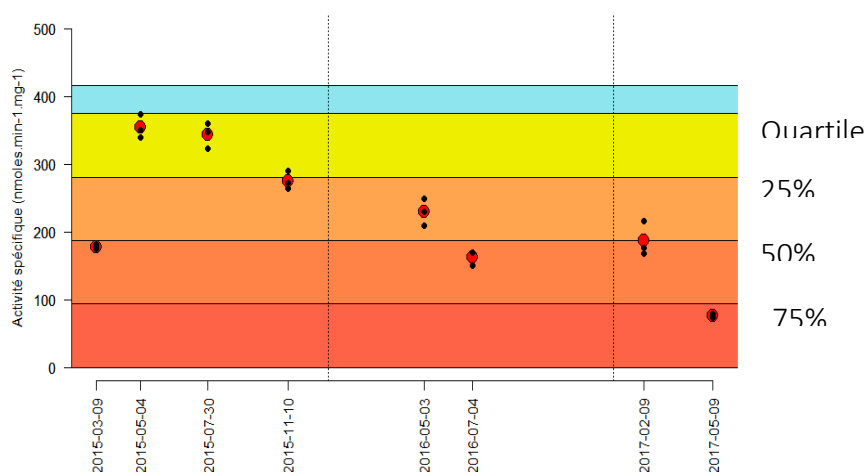


Figure 22 : Suivi saisonnier de l'activité AChE chez *E. affinis* prélevés en estuaire de Seine au niveau du pont de Tancarville et grille de lecture du niveau de gravité

6 Conclusion

L'objectif ici était d'évaluer l'état de santé de ce modèle grâce à une approche intégrée reposant sur l'application d'une batterie d'indicateurs biologiques à différents niveaux de l'organisation biologique (i.e. sub-individu, individu, population).

Le dosage des nouveaux biomarqueurs (i.e. l'expression du gène de la vitéllogénine, le dosage des lipides totaux et la détermination du ratio ARN/ADN), ont été mis au point chez ce microcrustacé. Des valeurs seuils ont été déterminées pour un certain nombre de biomarqueurs (i.e. AChE, GST, lipides, ARN/ADN). L'analyse des prélèvements saisonniers effectués au niveau du pont de Tancarville au printemps et à l'automne 2015, 2016, 2017, nous a permis de mettre en évidence les effets de la contamination de l'estuaire de Seine sur un certain nombre de biomarqueurs sub-individuels comme l'AChE, individuel comme le taux de lipides, et populationnels comme la densité, l'indice de condition, le sexe ratio et l'intensité de reproduction, avec un effet plus marqué en 2016 et 2017 par rapport à l'année 2015. Ces différents outils déployés sont applicables en milieu estuarien sous certaines conditions de (T° , S, pH), leur pertinence écotoxicologique et écologique lien avec la *fitness* permet d'envisager leur déploiement dans un réseau de biosurveillance en estuaire de Seine.

A noter également que l'application pour la première fois sur ce modèle biologique de l'approche WOE confirme la sévérité des risques encourus par la population de ce copépode dans l'estuaire de la Seine. Ces risques sévères se traduisent par une diminution nette de la densité de la population et surtout après mai 2016. Toutefois, d'autres facteurs trophiques (qualité de la nourriture et/ou intensité de prédation) pourraient contribuer à la baisse de la densité de la population. Bien que l'application de la méthode WoE ait été limitée par la difficulté d'avoir des valeurs seuils (à l'exception de l'AChE) des biomarqueurs, la tendance générale témoigne des mauvaises conditions de la population à tous les niveaux d'organisation. Les seuls mois dont le risque ne semble pas être sévère sont mai et juillet 2015. Or, ces mois correspondent aux meilleurs indicateurs populationnels, notamment un très bon indice de recrutement des nauplii (voir Figure 5A), un sex-ratio 'normal' ainsi qu'un taux de reproduction important (fortes valeurs du pourcentage de femelles ovigères). Nous avons essayé de relier la variabilité des biomarqueurs mesurés par l'équipe du Havre (SEBIO) avec les indicateurs développés par l'équipe de Wimereux (LOG). Malheureusement le faible

nombre de données *in situ* ne nous a pas permis d'obtenir des relations statistiquement significatives. Toutefois, nous pouvons souligner que l'activité AChE semble être corrélée positivement au pourcentage de femelles ovigères ($r=0,75$ mais $p=0,086$). La même tendance semble exister entre le pourcentage de femelles ovigères et le biomarqueur des réserves lipidiques (mais sur seulement 4 points).

Perspectives

La combinaison du suivi aux échelles sub-individuelle, individuelle et populationnelle semble être une approche à poursuivre dans de futurs suivis *in situ*, pour continuer de comprendre les liens entre bio-marqueurs d'exposition et la fitness chez les copépodes.

Nous avons besoin de ce couplage biomarqueurs-fitness afin de poursuivre le développement du modèle individu-centré sur *E. affinis* dans l'estuaire de la Seine (Dur et al., 2013). En marge de ce projet Dur et Souissi (2016) ont proposé une analyse comparative de l'approche AOP (Adverse Outcome Pathways) et l'approche de modélisation individu-centrée. En effet, l'avantage de ce type de modélisation est la possibilité de tester plusieurs scénarios combinant des effets de la pollution et des facteurs confondants. Mais des travaux au laboratoire basés sur la souche de référence isolée de l'estuaire de la Seine (disponible à Wimereux) peuvent confirmer (ou pas) les liens potentiels entre les biomarqueurs et les traits de vie (et la fitness). De même, la forte plasticité de ce copépode face à plusieurs sources de stress doit être prise en compte.

7 Valorisations des travaux

Article

Boulange-Lecomte, C., Xuereb, B., Tremolet, G., Duflot, A., Giusti, N., Olivier, S., Legrand, E., Forget-Leray, J., 2017. Controversial use of vitellogenin as a biomarker of endocrine disruption in crustaceans: New adverse pieces of evidence in the copepod *Eurytemora affinis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 201, 66-75.

Bibliographie

- Aladaileh S, Rodney P, Nair SV, Raftos DA (2007) Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 148:470-480.
- 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.
- Bocquené, G., Galgani, F., 1998. Biological effect contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES. Tech. Mar. Environ. Sci.* 22, 1-12.
- Bocquené, G., Galgani, F., 1998. Biological effect contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES. Tech. Mar. Environ. Sci.* 22, 1-12.
- Boulangé-Lecomte C, Forget-Leray J, Xuereb B (2014). Sexual dimorphism in Grp78 and Hsp90A heat shock protein expression in the estuarine copepod *Eurytemora affinis*. *Cell Stress and Chaperones* 19: 591-597.
- Boulangé-Lecomte, C., Xuereb, B., Tremolet, G., Duflot, A., Giusti, N., Olivier, S., Legrand, E., Forget-Leray, J., 2017. Controversial use of vitellogenin as a biomarker of endocrine disruption in crustaceans: New adverse pieces of evidence in the copepod *Eurytemora affinis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 201, 66-75
- Burgeot T., Gagné M ; Forget-Leray J., Bocquené G., 2011 Acetylcholinesterase : Methodology development of a biomarker and challenges of its application for biomonitoring. *ICES CM Code: F-25*
- Buskey EJ (1998). Components of mating behavior in planktonic copepods. *Journal of Marine Systems* 15: 13 - 21.
- Cailleaud K, Michalec F-G, Forget-Leray J, Budzinski H, Hwang J-S, Schmitt FG *et al* (2011b). Changes in the swimming behavior of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) in response to a sub-lethal exposure to nonylphenols. *Aquatic toxicology* 102: 228-231.
- Cailleaud K, Michalec F-G, Forget-Leray J, Budzinski H, Hwang J-S, Schmitt FG *et al* (2011). Changes in the swimming behavior of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) in response to a sub-lethal exposure to nonylphenols. *Aquatic toxicology* 102: 228-231.
- Chícharo MA, Chícharo L, Amaral A, Morais P. Sex effect on ratios and concentrations of DNA and RNA three in marine organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2007: 332:241–245.
- Chicharo, M. A., Chicharo, L., 2008. RNA:DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology. *Int J Mol Sci.* 9, 1453-71.
- David V, Sautour B, Chardy P, Leconte M (2005). Long-term changes of the zooplankton variability in a turbid environment: The Gironde estuary (France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 64: 171-184
- David V, Sautour B, Galois R, Chardy P (2006). The paradox high zooplankton biomass–low vegetal particulate organic matter in high turbidity zones: What way for energy transfer? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 333: 202-218.
- Devreker D, Souissi S, Molinero JC, Beyrend-Dur D, Gomez F, Forget-Leray J (2010). Tidal and annual variability of the population structure of *Eurytemora affinis* in the middle part of the Seine Estuary during 2005. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 89: 245-255.
- Devreker D, Souissi S, Molinero JC, Nkubito F (2008). Trade-offs of the copepod *Eurytemora affinis* in mega-tidal estuaries: insights from high frequency sampling in the Seine estuary. *Journal of plankton research* 30: 1329-1342.
- Devreker D, Souissi S, Winkler G, Forget-Leray J, Leboulenger F (2009). Effects of salinity, temperature and individual variability on the reproduction of *Eurytemora affinis* (Copepoda; Calanoida) from the Seine estuary: A laboratory study. *J Exp Mar Biol Ecol* 368: 113-123.
- Di Marzio WD, Castaldo D, Di Lorenzo T, Di Cioccio A, Saenz ME, Galassi DMP (2013). Developmental endpoints of chronic exposure to suspected endocrine disrupting chemicals on benthic and hyporheic freshwater copepods. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*
- Dur, G., Jiménez-Melero, R., Beyrend-Dur, D., Hwang, J.-S., Souissi, S. (2013) Individual-based model of the phenology of egg-bearing copepods: Application to *Eurytemora affinis* from the Seine estuary, France. *Ecological Modelling*, 269 : 21-36.
- Ellman, G., Courtney, K., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.

- Forget-Leray J, Landriau I, Minier C, Leboulenger F (2005). Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Ecotoxicol Environ Saf* 60: 288-294
- Gissi F, Binet MT, Adams MS (2013). Acute toxicity testing with the tropical marine copepod *Acartia sinjiensis* : Optimisation and application. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- Gong W, Zhu L, Hao Y (2016). Lethal and Sublethal Toxicity Comparison of BFRs to Three Marine Planktonic Copepods: Effects on Survival, Metabolism and Ingestion. *Plos one* 11: e0147790.
- Gorokhova, E., Lehtiniemi, M., Motwani, N. H., 2013. Trade-offs between predation risk and growth benefits in the copepod *Eurytemora affinis* with contrasting pigmentation. *PLoS One*. 8, e71385
- Goswami P, Thirunavukkarasu S, Godhantaraman N, Munuswamy N (2014). Monitoring of genotoxicity in marine zooplankton induced by toxic metals in Ennore estuary, Southeast coast of India. *Marine Pollution Bulletin* 88: 70-80.
- Gourmelon A, Ahtiainen J (2007). Developing Test Guidelines on invertebrate development and reproduction for the assessment of chemicals, including potential endocrine active substances—The OECD perspective. *Ecotoxicology* 16: 161-167.
- Guo F, Wang L, Wang W-X (2012). Acute and chronic toxicity of polychlorinated biphenyl 126 to *Tigriopus japonicus*: Effects on survival, growth, reproduction, and intrinsic rate of population growth. *Environ Toxicol Chem* 31: 639-645.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hook SE, Fisher NS (2001). Reproductive toxicity of metals in calanoid copepods. *Marine Biology* 138: 1131-1140.
- Hough AR, Naylor E (1992). Endogenous rhythms of circatidal swimming activity in the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *J Exp Biol Ecol* 161: 27-32.
- ISO14669 (1999). *ISO 14669. Water quality - Determination of Acute Lethal Toxicity to Marine Copepods (Copepod, Crustacea)* Reviewed in 2010: Geneva, Switzerland.
- Katona SK (1971). The developmental stages of *Eurytemora affinis* (POPPE, 1880) (Copepoda, calanoida) raised in laboratory cultures, including a comparison with the larvae of *Eurytemora americana* Williams, 1906, and *Eurytemora herdmanni* Thompson & Scott, 1897.
- Katona SK (1973). Evidence for sex pheromones in planktonic copepods. *Limnology and Oceanography* 18.
- Katona SK (1975). Copulation in the copepod *Eurytemora affinis* (POPPE,1880). *Crustaceana* 28.
- Kimmel DG, Roman MR (2004). Long-term trends in mesozooplankton abundance in Chesapeake Bay, USA: influence of freshwater input. *Marine Ecology Progress Series* 267: 71-83.
- Knotz, S., Boersma, M., Saborowski, R., 2006. Microassays for a set of enzymes in individual small marine copepods. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 145, 406-11.
- Kwok K.W.H, Souissi S., Dur G., Won E.J., Lee J.S. (2015) Copepods as references species in estuarine and marine waters. In *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Amiard-Triquet C., Amaird J.C. & Mouneyrac C. (Eds.) Elsevier, pp 281-308.
- Lee KW, Raisuddin S, Hwang DS, Park HG, Lee JS (2007). Acute toxicities of trace metals and common xenobiotics to the marine copepod *Tigriopus japonicus*: Evaluation of its use as a benchmark species for routine ecotoxicity tests in Western Pacific coastal regions. *Environmental Toxicology* 22: 532-538.
- Lee R, Hagen W, Kattner G. 2006. Lipid storage in marine zooplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 307: 273–306
- Lesueur T, Boulangé-Lecomte C, Restoux G, Deloffre J, Xuereb B, Le Menach K *et al* (2015). Toxicity of sediment-bound pollutants in the Seine estuary, France, using a *Eurytemora affinis* larval bioassay. *Ecotoxicol Environ Saf* 113: 169-175.
- Lesueur T, Boulangé-Lecomte C, Xuereb B, Budzinski H, Cachot J, Vicquelin L *et al* (2013). Development of a larval bioassay using the calanoid copepod, *Eurytemora affinis* to assess the toxicity of sediment-bound pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 94: 60-66.

- Lonsdale DJ, Frey MA, Snell TW (1998). The role of chemical signals in copepod reproduction. *Journal of Marine Systems* 12: 1-12.
- Michalec F-G, Holzner M, Menu D, Hwang J-S, Souissi S (2013). Behavioral responses of the estuarine calanoid copepod *Eurytemora affinis* to sub-lethal concentrations of waterborne pollutants. *Aquatic toxicology* 138-139: 129-138.
- Modéran J, David V, Bouvais P, Richard P, Fichet D (2012). Organic matter exploitation in a highly turbid environment: Planktonic food web in the Charente estuary, France. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 98: 126-137.
- Mohammed EH, Wang G, Jiang J (2010). The effects of nickel on the reproductive ability of three different marine copepods. *Ecotoxicology* 19: 911-916.
- Morgan CA, Cordell JR, Simenstad CA (1997). Sink or swim ? Copepod population maintenance in the Columbia River estuarine turbidity-maxima region. *Marine Biology* 129: 309-317.
- Mouny P, Dauvin J-C (2002). Environmental control of mesozooplankton community structure in the Seine estuary (English Channel). *Oceanologica Acta* 25: 13-22.
- Peitsch A, Köpcke B, Bernat N (2000). Long-term investigation of the distribution of *Eurytemora affinis* (Calanoida; Copepoda) in the Elbe Estuary. *Limnologia* 30: 175- 182.
- Piva, F., Ciaprini, 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.
- Pommier, J., Frenette, J. J., Glémet, H., 2010. Relating RNA:DNA ratio in *Eurytemora affinis* to seston fatty acids in a highly dynamic environment. *Marine Ecology Progress Series*. 400, 143-154
- Raisuddin S, Kwok KWH, Leung KMY, Schlenk D, Lee J-S (2007). The copepod *Tigriopus*: Apromising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquatic Toxicology* 83: 161-173.
- Rinna F, Prete FD, Vitiello V, Sansone G, Langellotti AL (2011). Toxicity assessment of copper, pentachlorophenol and phenanthrene by lethal and sublethal endpoints on nauplii of *Tigriopus fulvus*. *Chemistry and Ecology* 27: 77-85.
- Short, S., Yang, G., Kille, P., Ford, A. T., 2014. Vitellogenin is not an appropriate biomarker of feminisation in a crustacean. *Aquat Toxicol.* 153, 89-97.
- Snell TW, Morris PD (1993). Sexual communication in copepods and rotifers. *Hydrobiologia* 255/256: 109-116.
- Souissi A., Souissi S., Hansen B.W. (2016) Physiological improvement in the copepod *Eurytemora affinis* through thermal and multigenerational selection. *Aquaculture Research*, 47:2227-2242
- Souza MS, Hallgren P, Balseiro E, Hansson L-A (2013). Low concentrations, potential ecological consequences: Synthetic estrogens alter life-history and demographic structures of aquatic invertebrates. *Environmental Pollution* 178: 237-243.
- Tackx MLM, Herman PJM, Gasparini S, Irigoien X, Billiones R, Daro MH (2003). Selective feeding of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) in temperate estuaries: model and field observations. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 56: 305-311.
- Thomas Chandler G, Cary TL, Volz DC, Walse SS, Ferry JL, Klosterhaus SL (2004). Fipronil Effects on Estuarine Copepod (*Amphiascus tenuiremis*) Development, Fertility, and Reproduction: A Rapid Life-Cycle Assay in 96-Well Microplate Format. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 117.
- Titelman J, Varpe O, Eliassen S, Fiksen O (2007). Copepod mating: chance or choice? *Journal of Plankton Research* 29: 1023-1030.
- Wollenberger L, Breitholtz M, Ole Kusk K, Bengtsson B-E (2003). Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances. *Science of The Total Environment* 305: 53-64.
- Yen J, Strickler JR (1996). Advertisement and concealment in the plankton: what makes a copepod hydrodynamically conspicuous? *Invertebrate Biology* 115: 191 - 205.



Annexes 4

Rapport Seine-Aval 5

Acronyme du projet : ECOTONES
Coordinateur : Benoit Xuereb

Tache 1. Evaluation des effets de la contamination
sur la faune aquatique (responsable Benoit Xuereb)

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

Jérôme Couteau, Géraldine Maillet, Géraldine Loppion – SARL TOXEM

1 Contexte

Dans le cadre du projet ECOTONES, TOXEM s'est chargée de l'analyse de différents indicateurs biologiques et ou biomarqueurs sur différentes espèces représentatives de l'estuaire de la Seine :

- Moule (*Mytilus sp.*),
- Eperlan (*Osmerus eperlanus*),
- Sole (*Solea solea*),
- Flet (*Platichthys flesus*).

2 Présentation des modèles

2.1 *Edulis sp.*

Certaines espèces dites " sentinelles " sont considérées comme de bons bio-indicateurs et sont utilisées en surveillance environnementale. En milieu aquatique marin, les mollusques bivalves sont ainsi communément utilisés comme espèce sentinelle du fait, notamment, de leur mode de vie sessile, leur alimentation par filtration et leur capacité à bioaccumuler les polluants.

Ainsi, dans le cadre du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO) dont le principal objectif est d'évaluer la contamination chimique du milieu marin littoral, les mollusques bivalves, moules et huîtres, sont utilisés comme des indicateurs quantitatifs. Ce volet du RNO constitue, depuis 1979, le principal outil de connaissance systématique des niveaux de contamination du littoral français.

Ainsi, les moules du genre *edulis*, constituent un modèle de choix pour les études en écotoxicologie et font parties des espèces recommandées par le CIEM (Conseil International pour l'Exploitation de la Mer) pour la mesure de biomarqueurs et/ou d'indicateurs biologiques. C'est donc pour cela que dans le cadre du projet ECOTONES le choix de cette espèce s'est imposé pour évaluer l'état de santé de la faune en estuaire de Seine.

Plan de prélèvement

La mesure des indicateurs biologiques chez la moule a été réalisée une fois par an pendant toute la durée du projet c.a.d. de 2015 à 2017 sur des individus prélevés au niveau de la digue Sud de l'estuaire de la Seine (49°25'44,8"N ; 000°11'59,1"E) et au nord de l'estuaire de la Seine au niveau de Saint Andrieux (49°32'51.23"N ; 0°4'51.62"E) (figure 1, page 2).

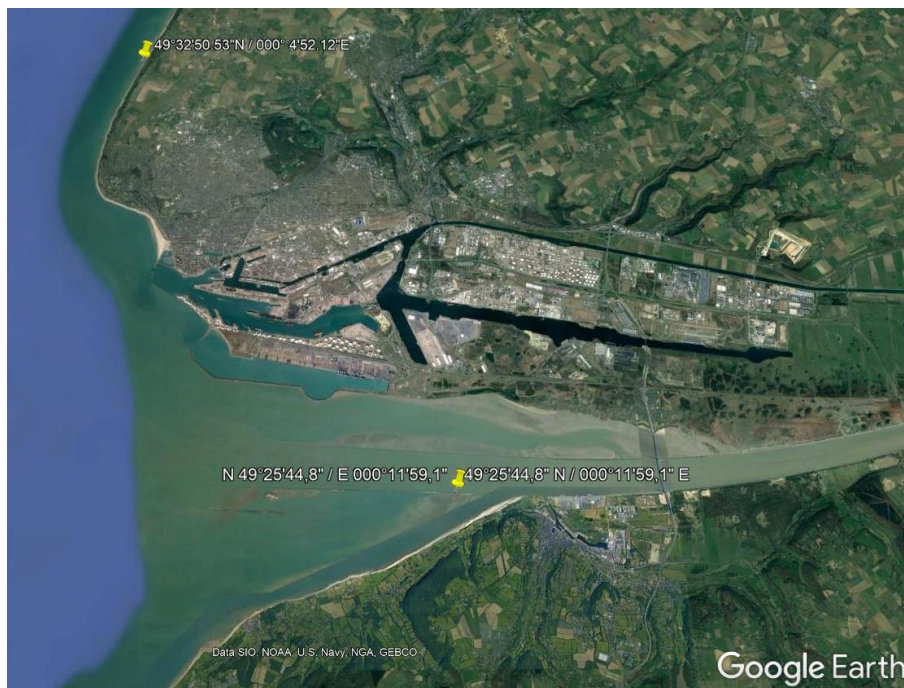


Figure 1 Points de prélèvements des moules du genre *edulis* échantillonnés de 2015 à 2017 (1 prélèvement par an pendant 3 années consécutives) dans le cadre du projet ECOTONES.

2.2 Flet : *Platichthys flesus*

Le flet est un poisson marin benthique et côtier appartenant à la famille des pleuronectidés, très abondant sur les côtes françaises et plus largement en Atlantique nord est. Affectionnant les fonds sableux et sablo-vaseux des estuaires et des zones marines côtières, le flet est de ce fait particulièrement exposé aux rejets industriels et urbains. Le flet est une espèce euryhaline qui supporte aussi bien les eaux douces lorsqu'il est juvénile qu'une salinité de 35‰ à l'âge adulte. Le flet est une espèce préconisée dans le cadre de la convention OSPAR (Commission de Oslo et PARIS du 22 septembre 1992) pour la surveillance et la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est. Ainsi la mesure de biomarqueurs sur cette espèce est largement documentée depuis plus de 20 ans et recommandée par le CIEM.

2.3 Sole commune : *Solea solea*

La sole commune, *Solea solea*, est un poisson de la famille des soléidés dont l'aire de répartition s'étend de la Norvège jusqu'au nord de l'Afrique ainsi qu'en Méditerranée. C'est un poisson benthique vivant sur les fonds de sable, sablo-vaseux ou vaseux et qui présente également une bonne tolérance à la dessalure des eaux ce qui permet de le rencontrer toute l'année en zone côtière et dans les estuaires.

La sole de par son mode de vie, sa répartition géographique et son intérêt économique est un excellent modèle pour la surveillance des milieux potentiellement impactés.

2.4 Eperlan : *Osmerus eperlanus*

L'éperlan est un petit poisson (<20 cm) osseux pélagique de la famille des Osméridés. Il est présent dans les eaux côtières européennes mais on le trouve également dans les estuaires et les eaux douces. C'est un poisson à chair grasse qui présente de fortes concentrations en contaminants organiques (données AESN) d'où son intérêt potentiel comme espèce bioindicatrice.

Plan de prélèvement

Les poissons ont été collectés par la Cellule de Suivi du Littoral Normand (CSLN) au mois de juin et/ou de juillet de 2015 à 2017 (figure 2, page 3). Les individus de deux pêches complémentaires réalisées en juillet 2018 (2 fois 30 individus, Flets ; Projet HQFISH) à la fois

en Seine et en Canche ont été analysés. Les données obtenues ont été intégrées à ce projet ECOTONES dans la mesure où elles permettent d'optimiser la maîtrise des biomarqueurs utilisés.

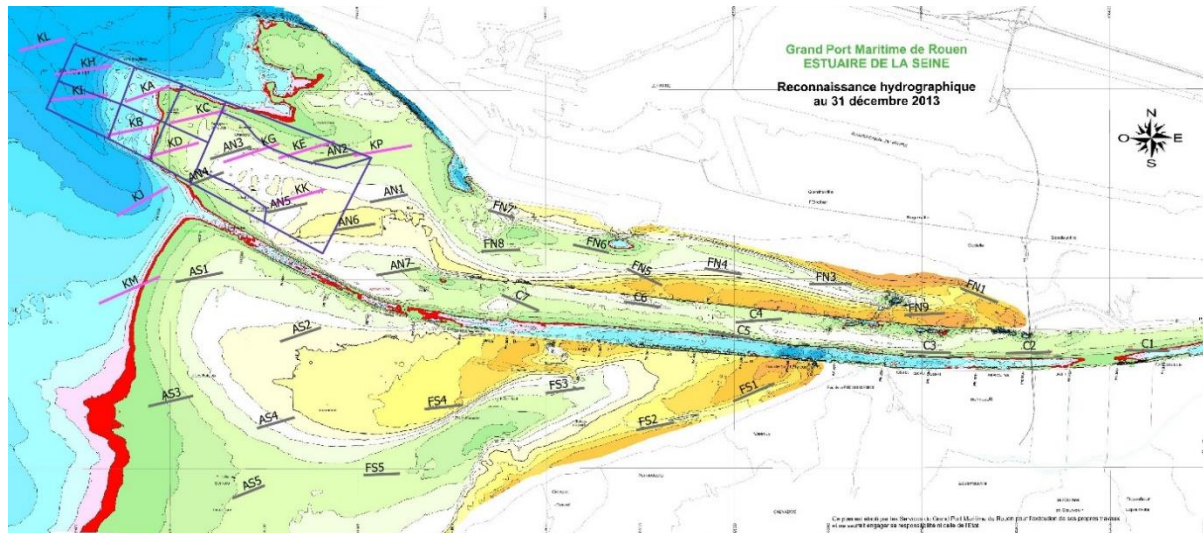


Figure 2 Localisation des traits de chalut pour l'échantillonnage en poissons du projet ECOTONES.

3 Indicateurs mesurés chez la moule

3.1 Stabilité de la membrane lysosomale.

Chez la moule la mesure de la stabilité lysosomale est un indicateur de stress général (Moore *et al*, 1976) dont l'application est recommandée par arrêté du ministère de l'Écologie et du Développement Durable et de l'Énergie du 17 décembre 2012 quant à la définition du « Bon état Ecologique » des eaux marines.

Une façon simple de l'évaluer chez la moule, consiste à mesurer la perméabilité de cette membrane à un colorant lyphophyle : Méthode NRR (Neutral Red Retention). La méthodologie pour la mesure de cet indicateur consiste à prélever à l'aide d'une seringue les hémocytes, de les déposer en présence de rouge neutre sur une lame de microscopie et de visualiser toutes les 15 minutes au microscope (Gx100) les lysosomes et d'estimer leurs capacités de rétention vis-à-vis de ce composé lyphophyle. Au cours des trois années du projet ECOTONES, nous avons optimisé cette méthodologie afin de permettre l'analyse de 10 individus sur une même lame.

3.2 Numération des micronoyaux

Les **micronoyaux** se définissent comme des fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers perdus par le noyau cellulaire au cours de la mitose et formant de petites entités bien individualisées dans le cytoplasme des cellules. Ils proviennent de cassures chromosomiques ou d'anomalies du fuseau mitotique et reflètent une action génotoxique directe ou indirecte qui aboutissent tous deux à l'apparition de mutations chromosomiques **stables et héréditaires**.

Les critères de détermination des micronoyaux sont les suivants (Med Pol Biomonitoring Programme, 1999) :

- La taille du micronoyau doit être inférieure à 1/3 de la taille du noyau principal,
- La forme du micronoyau doit être ronde et/ou ovoïde,
- Le micronoyau doit en être parfaitement dissocié du noyau principal.

Dans le cadre du projet ECOTONES les hémocytes une fois prélevés ont été aussitôt fixés sur une lame de microscopie avant d'être colorés au DAPI. Le comptage semi-automatisé des micronoyaux a été réalisé à l'aide d'une plateforme HCS CellInsight CX5 (Thermo).

3.3 Test des COMETES

Lors de la troisième et dernière année du projet ECOTONES, une analyse de la dégradation de l'ADN au niveau des hémocytes a été réalisée à l'aide du test des Comètes. Il était important de proposer en complément du test de numération des micronoyaux un outil plus sensible et capable de fournir une réponse précoce suite à l'exposition des organismes aquatiques à des agents génotoxiques.

Les hémocytes ont été ponctionnés sur des individus vivants 24 heures après leurs échantillonnages (stockage +4°C). Les hémocytes, une fois prélevés ont été collectés dans un microtube de 1,5 ml pour être analysés extemporanément suivant un protocole adapté de Halldórsson *et al.* (2004) et Singh *et al.* (1988). L'analyse automatisée des Comètes est ensuite réalisée grâce à une plateforme HCS CellInsight CX5 (Thermo).

La comparaison des dommages à l'ADN entre des moules prélevées sur la digue sud et des moules prélevées à Saint Andrieux met en évidence une différence significative du % DNA tail chez les individus prélevés en Seine (29,64% vs 20,38% ; Résultats hors projet ECOTONES).

L'analyse des biomarqueurs chez la moule met en évidence une problématique environnementale au niveau du site « Digue Sud ». En effet, l'ensemble des mesures réalisées sur les individus prélevés au niveau de ce site sont supérieures à celles obtenues sur le site de référence. Ces mesures indiquent que les moules situées au niveau de l'estuaire de la Seine sont soumises à un ou plusieurs stress conduisant notamment à des dommages génotoxiques.

Afin d'optimiser l'utilisation de ces mesures dans de futures actions de surveillance, il est important de déterminer des valeurs seuils (travail collaboratif en cours avec l'IFREMER).

Il est également nécessaire pour mener de telles actions de surveillance d'estimer en parallèle de ces mesures de biomarqueurs, les niveaux de contamination dans le milieu et dans les organismes afin de :

- Ne pas attribuer les réponses biologiques uniquement à l'exposition des organismes à des contaminants,
- Répondre aux exigences du programme de surveillance DCSMM-D8 planifiés avec la Direction de l'Eau et de la Biodiversité (DEB) sur le descripteur 8.

4 Indicateurs mesurés chez les « Poissons »

La mesure d'indicateurs biologiques chez les « Poissons » a été réalisée une fois par an hors période de reproduction (juin/juillet) pendant toute la durée du projet sur des individus prélevés dans l'estuaire de la Seine (Cellule de Suivi du littoral Normand ; PRELEV'MAR).

Les 3 espèces *O. eperlanus*, *S. solea* et *P. flesus* ont été étudiées en 2015. Cette première campagne a démontré la faisabilité ou non de travailler sur ces 3 espèces. Ainsi, il s'est avéré qu'il n'y a aucun problème de mener ce genre d'étude sur des poissons comme le flet ou la sole. Par contre, la difficulté de maintenir les éperlans vivants une fois pêchés rend pratiquement impossible l'utilisation de cette espèce pour les études de *biomonitoring*. Ainsi, en 2016 et 2017 les analyses ont été réalisées uniquement sur la sole et sur le flet.

4.1 Numération des micronoyaux

Une prise de sang a été réalisée sur les poissons vivants et 10µl ont été déposés sur une lame de microscopie puis étalés à l'aide d'une lamelle. Après séchage à température

ambiante les cellules sanguines sont fixées dans un bain d'éthanol absolu pendant 10 minutes. Les cellules une fois fixées, ont été colorées au DAPI. Le comptage semi-automatisé des micronoyaux a été réalisé à l'aide d'une plateforme HCS CellInsight CX5 (Thermo).

4.2 Test des COMETES

Suite à la prise de sang, 10 µl ont été ajoutés à un liquide de cryoconservation dans un cryotube de 2 ml. Après une congélation rapide dans l'azote liquide, les tubes ont été conservés dans à -80°C jusqu'à analyse selon les recommandations de Tice *et al.* (1988) et Azqueta et Collins (2013). L'analyse automatisée des Comètes a ensuite été réalisée grâce à une plateforme HCS CellInsight CX5 (Thermo).

4.3 Mesure de l'activité AChE

La mesure de l'activité acétylcholinestérase (AChE) chez les organismes marins permet de d'évaluer leur exposition à des contaminants neurotoxiques. L'AChE est responsable chez de nombreux animaux de la rapide dégradation d'un neurotransmetteur, l'acétylcholine (ACh), en produits inactifs. Il a été démontré que l'activité AChE était inhibé suite à l'exposition des organismes à de nombreuses molécules chimiques organiques et métalliques (Zinkl *et al.*, 1991 ; Brown *et al.*, 2004). Les activités AChE les plus importantes chez les poissons ont été mesurées dans le cerveau et le muscle (Habig & Di Giulio, 1991). Dans le cadre du projet ECOTONES, la mesure de l'activité AChE a été réalisée sur le cerveau. Le cerveau de chaque individu a été prélevé puis conservé à -80°C jusqu'à analyse selon le protocole de référence publié par Bocquené & Galgani en 1998.

4.4 Mesure de l'activité EROD

Les complexes enzymatiques de biotransformation interviennent, entre autres, dans la métabolisation des molécules xénobiotiques en vue d'augmenter leur hydrosolubilité et donc leur élimination. Les cytochromes P450 de la faille 1A sont des enzymes interveant dans ce métabolisme qui dans certains cas conduit à l'activation des procancérogènes. L'activité 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) de ces cytochromes P450 1A est mesurée par l'utilisation substrat artificiel (7-éthoxyrésorufine) permettant d'évaluer l'exposition des organismes à des xénobiotiques susceptibles d'induire leur expression.

Rapidement après le sacrifice de l'animal, une partie du foie a été prélevé puis placé à -80°C jusqu'à analyse. La mesure de l'activité EROD a été réalisée selon les recommandations de la norme expérimentale XP ISO/TS 23893-2.

4.5 Dosage de la VTG

La vitellogénine (VTG) est phospholipoglycoprotéine naturellement produite au niveau du foie par les femelles en réponse aux œstrogènes endogènes. Elle est ensuite transportée par voie sanguine jusqu'aux ovaires où elle est incorporée aux ovocytes en croissance. Cependant, les gènes de la VTG sont aussi présents chez les mâles. L'exposition des mâles et des juvéniles à des perturbateurs endocriniens peut induire la synthèse de VTG et augmenter sa concentration plasmatique. Ainsi, le dosage de la VTG est un biomarqueur d'intérêt utilisé dans de nombreuses études environnementales permettant notamment de caractériser la contamination des milieux aquatiques et ses effets sur les organismes (Sanchez *et al.*, 2008).

Le dosage de la VTG a été effectué sur le plasma des soles et flets mâles. Ce dosage réalisé via un ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indirect, utilisant pour le flet un anticorps polyclonal anti-VTG de Turbot et de la VTG purifiée de cette espèce (gamme étalon), et pour la sole avec un anticorps polyclonal anti-VTG de sole sénégalaise et plasma d'une femelle de concentration connue en VTG (gamme étalon).

4.6 Mesure de l'intersexualité (ovotestis)

De nombreuses études scientifiques ont montrés l'implication des perturbateurs endocriniens dans la baisse de la fertilité, du développement, de la croissance et du métabolisme de nombreuses espèces animales (Colborn *et al.*, 1996). L'exposition des poissons à de telles molécules induit chez les poissons une perturbation de la maturation gonadique, une augmentation de la concentration plasmatique de la vitellogénine (VTG) chez les mâles ainsi que la présence de gonades intersexuées (Gimeno *et al.*, 1996). L'analyse histologique des gonades mâles permet donc d'évaluer les pourcentages d'individus intersexués c'est-à dire le pourcentage d'individus mâles présentant des ovocytes dans le tissu gonadique.

Les gonades une fois prélevées ont été sectionnées en 4 parties distinctes puis placées dans une cassette histologique avant d'être conservées dans un liquide fixateur (formol à 4%).

Après déshydratations et inclusions en paraffine, des sections de 3 à 5µm des différentes parties de la gonade ont été placées sur une lame de microscopie avant coloration hématoxyline/Eosine (H/E). Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique avec analyse de 3 sections par gonade mâle.

4.7 Histopathologie hépatique

L'analyse histologique des dommages hépatiques est largement utilisée depuis plusieurs années comme une réponse intégrée pour la surveillance des effets biologiques généraux, pour l'évaluation de l'état de santé général aussi bien au niveau individuel qu'au niveau populationnel. L'intercalibration et la standardisation méthodologique de l'analyse histologique des pathologies hépatiques chez les poissons marins a permis l'application de cette analyse dans le monitoring des effets biologiques (Feist *et al.*, 2004).

Pour chaque individu un morceau de foie de 5mm x 5mm a été prélevé puis placé dans une cassette histologique avant d'être conservées dans un liquide fixateur (formol à 4%). Après déshydratations et inclusions en paraffine, 1 à 2 sections de 3 à 5µm du tissu ont été placées sur une lame de microscopie avant coloration hématoxyline/Eosine (H/E). Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique.

5 Interprétation des résultats

Dans le cadre du projet ECOTONES, trois approches ont été utilisées afin d'interpréter les résultats obtenus :

- Une approche basée sur l'utilisation des EAC/BAC quand elles existent,
- Une approche basée sur des données issues de la littérature,
- Une approche basée sur la comparaison des résultats obtenus sur l'estuaire de la Seine avec ceux obtenus sur un estuaire (La Canche) ou un site de « Référence ».

Le CIEM préconise une liste de biomarqueurs pour évaluer les effets de la contamination sur les organismes marins. L'utilisation en routine de biomarqueurs dans un programme de surveillance est conditionnée selon l'OSPAR par l'existence de trois critères :

- Une méthodologie de référence,

- Une démarche d'assurance qualité (BEQUALM : Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes),
- Des critères d'interprétations déterminés (EAC = Environmental Assessment Criteria ; BAC = Background Assessment Criteria) et spécifiques des espèces étudiées.

Pour *P. flesus*, l'ensemble des biomarqueurs préconisés par le CIEM respecte généralement les deux premiers critères présentés ci-dessus mais il n'existe pas les seuils nécessaires à leurs utilisations en routine. En effet, les seuils de stress significatif (EAC) ne sont pas tous déterminés les rendant ainsi peu enclin à une utilisation en routine par les gestionnaires (Tableau 2, page 11). Pour la moule, seule la stabilité lysosomale est pourvue d'une grille de lecture permettant de caractériser le niveau de stress mesuré.

Afin de pouvoir utiliser les différents critères mesurés comme outils de gestion, il est possible également de comparer les résultats avec ceux obtenues sur des sites de référence dans la mesure où les méthodologies utilisées sont identiques (tableau 3 page 11).

Enfin, quand les biomarqueurs mesurés font l'objet d'une innovation méthodologique, une comparaison avec des valeurs obtenues sur un site de référence, en l'occurrence l'estuaire de la Canche, a été réalisée (Tableau 4, page 11, Projet HQFISH). Cette démarche est principalement valable pour le test des COMETES et la mesure de l'activité AChE.

5.1 Moule

Tableau 1 Liste des biomarqueurs recommandés par le CIEM chez la moule et mesurés dans le cadre du projet ECOTONES. *Background Assessment Criteria (BAC) et Environmental Assessment Criteria (EAC).*

Effet biologique chez <i>Mytilus edulis</i>	BAC	EAC
Micronoyaux	2,5‰	-
Test des comètes	-	-
Stabilité lysosomale	120 min	50 min

Tableau 2 Valeurs issues de la littérature pour les différents biomarqueurs mesurés chez la moule.

Effet biologique chez <i>Mytilus edulis</i>	Site de référence	Site contaminé	Référence
Micronoyaux	0.81‰ ± 0,36	2,90 ± 0,40	Lyons, 1998 J. Barsiené (pers. Comm.)
Test des comètes	-	-	
Stabilité lysosomale	120	50	Cajaraville <i>et al.</i> , 2000 ; Moore <i>et al.</i> , 2006.

5.1.1 Numération des micronoyaux (Figure 3, page 12)

Chez la moule, la numération des micronoyaux sur hémocytes est préconisée sur un nombre allant de 10 à 20 individus. Les sites les plus pollués doivent en effet faire l'objet d'un échantillonnage plus important à cause de l'augmentation de la variabilité individuelle.

L'ensemble des données collectées par le CIEM (ICES 2012) a permis de d'établir une BAC (Background Assessment Criteria) chez *M. edulis* et chez *M. galloprovincialis* calculées comme les P90 empiriques : 2,5‰ et 3,9‰.

La numération des micronoyaux sur hémocytes de moules montre une grande variabilité interindividuelle et des résultats moyens extrêmement variables d'une année à l'autre. Cependant quelle que soit l'année, le taux moyen de micronoyaux observés chez les moules prélevées au niveau de la digue sud est toujours supérieur à celui observé chez les moules prélevées au niveau de Saint Andrieux tout en suivant la même évolution. Cependant, seul en 2017, le taux moyen de micronoyaux observé chez les moules prélevées sur la digue sud est statistiquement différent de celui observé chez les moules prélevées à de Saint Andrieux (4,9‰ ± 1,54 vs 0,43‰ ± 0,28). Hormis les moules prélevées sur la digue sud de 2017, l'ensemble des taux moyens mesurés dans le cadre de ce projet sont en dessous de la BAC définie par le CIEM (2,5‰) (tableau 1, page 10).

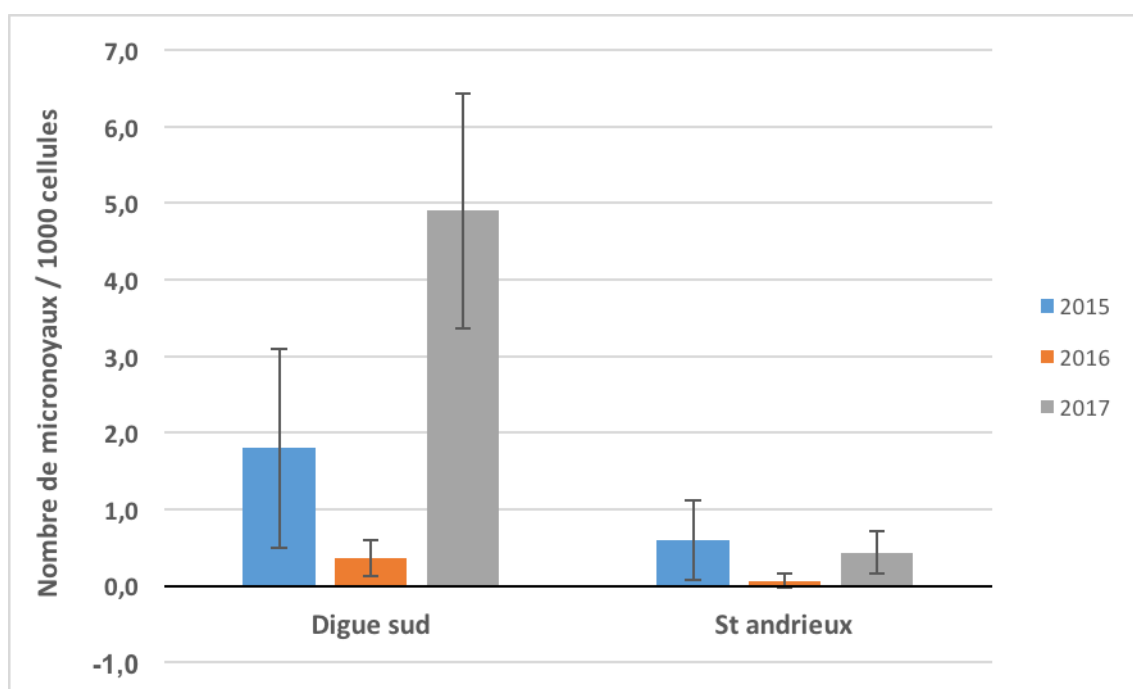


Figure 3 Nombres de micronoyaux moyens mesurés sur des moules prélevées au niveau de la digue sud de l'estuaire de la Seine et au niveau de Saint Andrieux.

De la même manière, au regard des études menées sur différents sites de références et contaminés, ce taux observé en 2017 sur les moules de la digue sud est largement supérieur à celui mentionné comme étant caractéristique d'un site contaminé (2,9‰ ; tableau 2, page 10). A l'aide du tableau 2 page 10, on constate également que les taux moyens de μ noyaux observés sur les moules prélevées à Saint Andrieux sont toujours inférieurs à celui observé sur un site considéré de référence : 0,81‰.

5.1.2 Mesure de la stabilité lysosomale (figure 4, page 13)

Les seuils de stress général pour les moules du genre *Mytilus*, ont été déterminés sur la base d'études réalisées en Grande-Bretagne (Cajarville *et al.*, 2000 ; Moore *et al.*, 2006) et sont les suivants :

- Individu « Sain » : Rétention du rouge neutre dans les lysosomes supérieure à 120 minutes,
- Individu « Stressé » : Rétention du rouge neutre dans les lysosomes comprise entre 120 et 50 minutes,
- Individu « Sévèrement stressé » : Rétention du rouge neutre dans les lysosomes inférieure à 50 minutes.

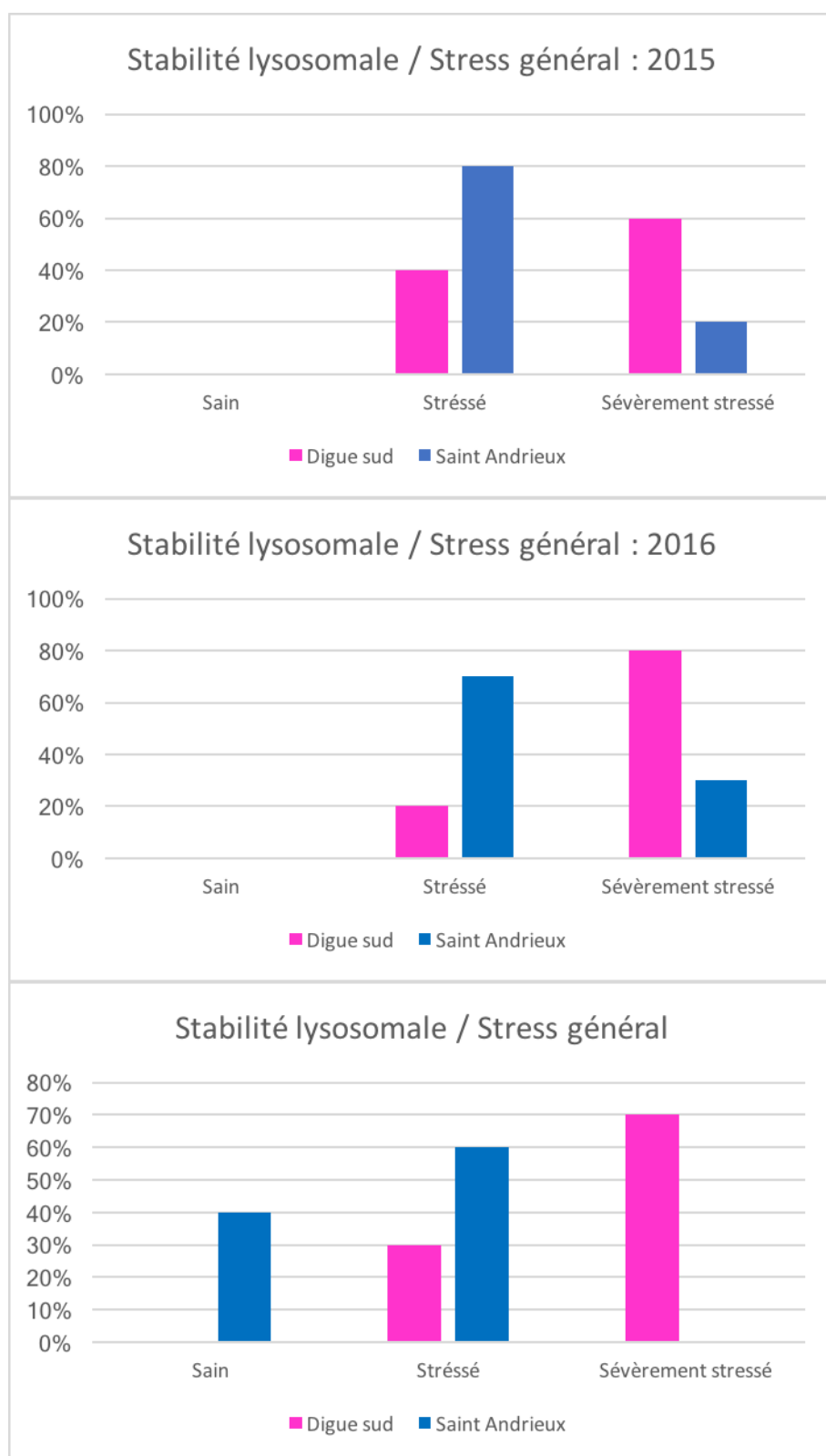


Figure 4 Mesure de la stabilité lysosomale sur des moules prélevées au niveau de la digue sud de l'estuaire de la Seine et au niveau de Saint Andrieux en 2015, 2016 et 2017.

Les mesures réalisées dans le cadre du projet ECOTONES, montre une plus grande fragilité de l'intégrité cellulaire des moules prélevées au niveau de la digue sud du canal de

navigation de l'estuaire de la Seine. L'application des seuils d'effets déterminés par le CIEM sur cette analyse cytochimique révèle que les moules de la digue sud sont majoritairement dans un état sévèrement stressé (≤ 45 minutes) alors que les moules de Saint Andrieux sont dans un état moins stressé ($120 \leq x \leq 45$ minutes) mais nécessitant tout de même un effort métabolique de compensation pour le maintien de l'homéostasie. Cette conclusion est valable pour les 3 campagnes d'échantillonnage du projet ECOTONES.

5.2 Poissons

Tableau 3 Liste des biomarqueurs recommandés par le CIEM chez le flet et mesurés dans le cadre du projet ECOTONES. *Background Assessment Criteria (BAC) et Environmental Assessment Criteria (EAC).*

Effet biologique chez le Flet	BAC	EAC
Micronoyaux	0,3‰	
EROD	24 pmol/min/mg prot	-
AChE (cerveau)	235 nmol/min/mg prot	165 nmol/min/mg prot
Test des comètes	-	-
Ovo testis	5%	-
Histologie hépatique	-	-
Vtg	0,13 µg/ml	-

Tableau 4 Valeurs issues de la littérature pour les différents biomarqueurs mesurés chez le flet.

Effet biologique chez le Flet	Site de référence	Site contaminé	Référence
Vtg	0,13 µg/ml	42 mg/ml (± 15607)	Allen <i>et al.</i> , 1999
EROD	14 pmol/min/mg prot	24 pmol/min/mg prot	ICES, 2007
Micronoyaux	0,04‰ \pm 0,03	0,27‰ \pm 0,66	Barsiené et al., 2008 Lyons (pers. Comm.)
AChE			
Test des comètes		-	
Ovo testis	5%	8%	Stentiford et al., 2003 ; Minier et al., 2000.
Histologie hépatique		-	

Tableau 5 Valeurs obtenues sur un estuaire de référence (Canche) et sur l'estuaire de la Seine en juillet 2018.

Effet biologique chez le Flet	Canche	Seine
Vtg	23,53 ± 1,09 ng/ml	25,15 ± 2,99 ng/ml
EROD	3,56 ± 0,9 pmol/min/mg prot	6,82 ± 1,8 pmol/min/mg prot
Micronoyaux	0,05‰ ± 0,09	0,07‰ ± 0,1
AChE	56 ± 10 nmol/min/mg prot	55 ± 5 nmol/min/mg prot
Test des comètes	49,56 ± 3,1 % DNA Tail	44,09 ± 2,95 % DNA Tail
Ovo testis	0%	0%
Histologie hépatique		-

5.2.1 Numération des micronoyaux

Sur l'ensemble des années du projet ECOTONES, des individus présentant des micronoyaux (MN) au niveau des cellules circulantes ont été observés uniquement en 2017 (2/30). En effet, en 2017 le taux moyen de micronoyaux était de 0,53‰ ± 0,7 (n = 30 individus) contre 0‰ en 2015 et 2016. Cette valeur, largement supérieur à la BAC définie pour ce biomarqueur (0,3‰), est également supérieure à celle observée sur un milieu contaminé (Tableau 4 page 13). Ainsi, l'estuaire de la Seine, sur la base de la mesure de ce biomarqueur en 2017, peut être considéré comme impacté.

En 2018, la comparaison des valeurs obtenues entre l'estuaire de la Seine et un estuaire de référence (estuaire de la Canche) ne met pas en évidence de différence significative entre ces sites (0,07‰ ± 0,1 vs 0,05‰ ± 0,09).

Concernant les valeurs obtenues chez la sole, il est difficile de les interpréter à l'heure actuelle dans la mesure où il n'existe pas de données concernant cette espèce. Des tissus de soles G1 devraient être disponibles dans la cadre du projet Plastic Seine et pourraient nous permettre de comparer les résultats obtenus sur des organismes prélevés *in situ* avec ceux obtenu sur des individus élevés en conditions contrôlées. Quoiqu'il en soit sur l'ensemble du projet ECOTONES, le taux de micronoyaux observés chez la sole ne dépasse pas 0,3‰ (0‰/0,23‰ ± 0,02/0,10‰ ± 0,11‰).

La fréquence de base du nombre de MN représente la principale limitation pour l'utilisation de cet outil appliqué aux érythrocytes de poisson (Bolognesi *et al.*, 2006). Cependant, l'analyse d'un grand nombre de cellules et d'un nombre constant d'animaux font de cette analyse un *outil important pour l'évaluation du risque d'exposition aux xénobiotiques*

(Machado Da Rocha *et al.*, 2009), ce qui explique son utilisation pour la mise en place de la DCSMM (2008/CE/56, DCSMM).

5.2.2 Test des COMETES (figures 8 et 15)

L'analyse des dommages à l'ADN par le test des COMETES a été initiée en 2016 sur la sole et le flet dans le cadre de ce projet. On constate qu'entre le flet et la sole les valeurs de % DNA Tail sont très proches entre les deux espèces que ce soit en 2016 ou en 2017. Il n'existe pas d'EAC ni de BAC pour la mesure de ce biomarqueur dans la mesure où il n'existe pas encore de méthodologie de référence et où les valeurs basales sont extrêmement dépendantes du protocole mis en place.

La comparaison des valeurs obtenues entre l'estuaire de Seine et l'estuaire de la Canche montre une différence statistique faisant de la Canche le milieu le plus impacté : 44,09% vs 49,56 % DNA Tail (tableau 5). Ces résultats obtenus dans le cadre du projet HQFISH montrent que les dommages à l'ADN mesurés avec le test des COMETES ne résultent pas spécifiquement de l'exposition des organismes à des molécules génotoxiques mais peuvent également résulter de stress de natures diverses. En l'occurrence, le % DNA Tail élevé observé chez les individus prélevés en Canche s'expliquerait par le stress oxydant généré par une température de l'eau importante à laquelle seraient soumis les individus à marée basse (HQFISFH).

5.2.3 Activité AChE (figures 10 et 17)

Chez le flet, les activités AChE mesurées en 2016 et 2017, montrent une inhibition significative dans l'estuaire de la Seine entre ces deux années (101,25 vs 75,31. nmol/min/mg prot) : diminution de 25% de l'activité AChE.

La comparaison de l'activité AChE en 2018 entre des flets pêchés en Seine et des Flets pêchés en Canche ne montre pas de différence significative (55 vs 56 nmol/min/mg prot) entre ces deux sites ce qui semble indiqué que l'estuaire de Seine n'est pas impacté par cette problématique (tableau 5).

Les activités mesurées en 2016 et 2017 chez les soles montrent la même tendance que chez le flet : diminution de 40% de l'activité AChE.

5.2.4 Activité EROD (figures 9 et 16)

Les résultats EROD obtenus en estuaire de Seine sur le flet montrent une activité moyenne très élevée en 2015 : >90 pmol/min/mg prot. Dès 2016 et cela jusqu'en 2018, les activités EROD mesurées sont inférieures au niveau de base défini par le SGIMC en 2011 (24 pmol/min/mg de prot) : 13,97/9,47/6,82 pmol/min/mg de prot.

D'après les données de la littérature (ICES, 2007) les valeurs obtenues chez le flet concernant ce biomarqueur permettent de considérer l'estuaire de la Seine comme un milieu contaminé en 2015 (Tableau 4).

La comparaison des activités moyennes entre des individus prélevés en Seine avec des individus prélevés en Canche en 2018, montre que l'activité mesurée en Seine est 2 fois plus importante que celle mesurée en Canche (6,82 vs 3,56 pmol/min/mg de prot) tout en restant inférieure au niveau de base (tableau 5).

On constate que les valeurs obtenues chez la sole suivent la même évolution que celles obtenues chez le flet tout en étant deux fois plus faibles.

5.2.5 Dosage de la VTG chez les mâles (figures 7 et 14)

Au début des années 2000, les concentrations plasmatiques moyennes de VTG chez les flets mâles étaient de l'ordre de 125 µg/mL avec 45 % des individus qui présentaient des concentrations proches de 1 µg/mL (Minier & Amara, 2008). Ces valeurs permettaient de classer à l'époque l'estuaire de la Seine parmi les estuaires les plus pollués d'Europe avec les estuaires de Mersey et de Tyne (Angleterre). Le dosage de la VTG chez les mâles au cours du projet ECOTONES met en évidence des concentrations plasmatiques relativement faibles ≤ 25 ng/mL. Ces niveaux sont cependant en augmentation constante entre 2015 et 2018 passant ainsi de 3 ng/mL à 25 ng/mL. De 2015 à 2018 aucun male analysé ne présentait une concentration plasmatique de VTG supérieure à 35 ng/mL. Ces résultats montrent que l'estuaire de la Seine est nettement moins impacté en 2018 qu'il y a 10 ans et que les mâles analysés dans le cadre du projet ECOTONES montrent tous des concentrations plasmatiques en VTG largement inférieures au niveau de base mentionné par le CIEM (130ng/mL ; tableau 3).

Les concentrations plasmatiques moyennes chez les mâles prélevés en Seine et en Canche en 2018 sont relativement proche (25,15 vs 23,53 ng/mL) et non statistiquement différentes.

Les valeurs obtenues chez les soles mâles suivent là encore la même évolution que chez le flet mais avec des niveaux plasmatiques nettement plus importants (10 à 30 fois plus).

5.2.6 Ovotestis ou Intersexualité

La présence d'individus intersexués traduisant une exposition précoce des individus à des perturbateurs endocriniens est un phénomène couramment observé lors d'expositions en laboratoire mais finalement peu répandu *in natura*. En effet, historiquement seuls quelques sites ont révélé la présence de poissons intersexués notamment chez le flet (Vethaak *et al.* 2005, Ferreira *et al.*, 2004). L'estuaire de la Seine présentait en 1997/98 un taux d'individus mâles intersexués proche de 8 % et de 5,5% en 2008/09 (Minier *et al.*, 2000). Au cours des 3 ans du projet ECOTONES, seule l'année 2016 a permis de mettre en évidence la présence d'individus intersexués. En effet, cette année-là, 21% des mâles analysés présentaient des signes d'intersexualité. Ce résultat largement supérieure à l'EAC défini par le CIEM (tableau 3, page 13) montre que de ce phénomène est toujours bien présent en estuaire de Seine. Cependant, la mise en évidence de l'intersexualité nécessite un effort d'échantillonnage important. Dans le cadre de ce projet 30 individus par espèce étaient échantillonnés chaque année. Sur ces 30 individus il y avait respectivement 14, 19 et 16 flets mâles en 2015, 2016 et 2017. Une incidence basale de 5% du phénomène d'intersexualité mériterait une analyse d'au moins 50 mâles.

Sur 9, 8 et 16 soles mâles prélevés respectivement en 2015, 2016 et 2017, aucun signe d'intersexualité n'a été mis en évidence.

5.2.7 Histopathologie hépatique (figures 11 et 18)

Dans le but d'harmoniser et d'intercalibrer la méthodologie d'évaluation des histopathologies hépatiques, le programme BEQUALM a développé une grille d'évaluation des différents dommages hépatiques (tableau 6, page 18). En donnant une note de gravité pour chaque catégorie de pathologie nous avons déterminé une note globale pour chaque site échantillonné permettant d'avoir une vision populationnelle. Cette note globale correspond à un FDI (Fish Diseases Index) spécifique aux dommages hépatiques.

L'analyse histologique des foies des poissons prélevés dans le cadre du projet ECOTONES montre que ce soit chez la sole ou chez le flet une prédominance de lésions non spécifiques. En 2016 et en 2017 plus de 65 % des individus (soles et flets confondus) sont impactés par ce

type de lésions. Ces lésions sont majoritairement des infiltrations hémocytaires et/ou une surcharge lipidique au niveau des hépatocytes (lipidose). A noter que seuls les flets présentent des lésions non néoplasiques et des FCA (Foyers de Cellules Altérées) que ce soit en 2016 ou en 2017.

Tableau 6 Catégorisation des lésions hépatiques proposée par le programme BELQUAM.

Catégories histopathologiques	Lésions histopathologiques correspondantes	Note de gravité
Lésions non spécifiques	Nécrose, apoptose, lipidose, variabilité du contenu en glycogène, augmentation du nombre et/ou de la taille des agrégats mélanomacrophagiques, infiltrations lymphocytaires, granulome, fibrose	1
Lésions non néoplasiques	Phospholipidose, spongieuse, inclusion fibrillaire, dégénération hydropique	2
Lésions non-néoplasiques	Phospholipidose, Inclusion fibrillaire, polymorphisme nucléaire, polymorphisme cellulaire, hydropique dégénération, Spongieuse	3
Foyers de Cellules Altérées (FCA)	Foyer éosinophile, Foyer basophile, Foyer de cellules claires	4
Néoplasmes bénins	Adénome hépatocellulaire, Cholangiome	5
Néoplasmes malins	Carcinome hépatocellulaire, Cholangiocarcinome, Hemangiocarcinome,	6

De manière globale, le niveau de réponse des marqueurs biologiques mesurés chez le flet et chez la sole sont 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).

Sur l'ensemble des marqueurs biologiques suivis chez les poissons dans le cadre du projet ECOTONES, il paraît important de souligner l'intérêt des analyses histologiques pour intégrer les effets biologiques des contaminants sur des organes et fonctions vitales. Ainsi, les analyses hépatiques permettent d'identifier des signatures histopathologiques, les analyses gonadiques mettant en évidence de possibles perturbations de la biologie de la reproduction. Concernant, l'analyse de l'intersexualité (ovo-testis), il est nécessaire de mener cette analyse sur un nombre important d'individus mâles, au vu de la faible incidence de cette réponse dans la population. L'observation des gonades femelles met en évidence des perturbations de la maturation ovocytaire qu'il serait intéressant d'explorer, non

seulement en lien avec la pression des polluants, mais aussi avec de possibles effets du réchauffement climatique qui se traduit notamment par des hivers particulièrement doux. Notons que le flet est une espèce à affinité boréale qui se reproduit en hiver ; les hivers doux pouvant conduire à une ponte retardée, voire à un possible blocage de la maturation sexuelle.

Afin de maîtriser au mieux l'interprétation des réponses observées, il convient, au même titre que pour les biomarqueurs mesurés chez la moule, d'estimer les niveaux de contamination dans les sédiments et dans les organismes, pour appréhender leur niveau d'exposition aux contaminants chimiques.

Une analyse des données biomarqueurs sur la Seine (2016-2018) et la Canche (2018) a été réalisée à partir de l'application CalIBRI© (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, LIEC, Université de Lorraine - CNRS UMR 7360). La réponse intégrée de biomarqueurs (IBR) (Devin et al., 2014) est une approche multi-biomarqueurs aisée à intégrer dans le cadre des politiques environnementales. Elle peut être utilisée pour évaluer in situ les effets écotoxicologiques des contaminants et pour comprendre les relations entre les biomarqueurs, mais également entre les biomarqueurs et les niveaux de contamination. La méthode IBR présente l'avantage de fournir une synthèse graphique des différentes réponses de biomarqueurs (Figure 5) et une valeur numérique qui intègre l'ensemble des réponses.

Grace à cette approche on constate que la Seine 07/2018 se différencie de tous les autres échantillons de la Seine ($p < 0.05$) mais également de la Canche à la même date ($p < 0.05$). La Canche et la Seine en 01/2018 présentent aussi des valeurs d'IBR différentes ($p = 0.022$), par contre les réponses ne varient pas sur la Canche entre janvier et juillet ($p = 0.13$).

La synthèse graphique de la figure 5 montre une grande stabilité des patrons de réponse sur la Canche, ce qui témoigne d'un système peu stressé. Sur la Seine, on observe au contraire une grande variabilité du profil entre années, indicatrice d'un milieu stressé. En Seine 2018, les patrons de réponse sont relativement semblables entre les deux saisons, avec des valeurs systématiquement plus élevées pour les biomarqueurs en juillet et une augmentation particulièrement forte au niveau du bmk4 (COMET).

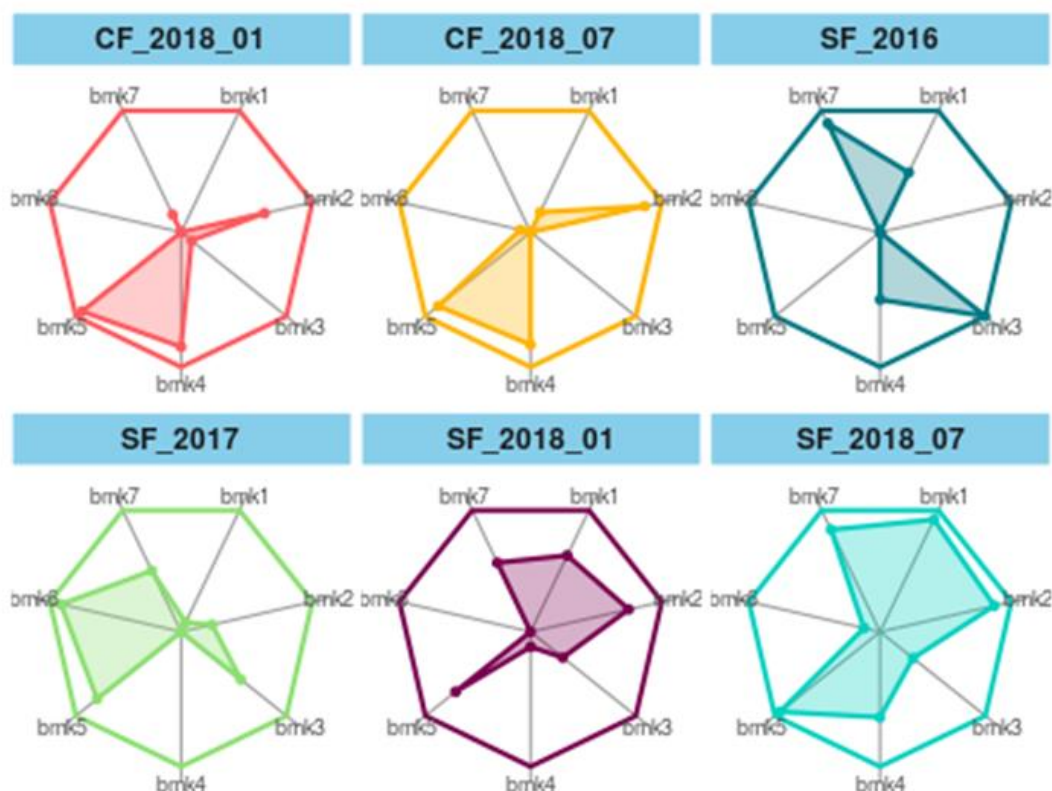


Figure 5. Synthèse graphique de l'approche IBR menée sur sept biomarqueurs du flet, pour le projet ECOTONES en Canche (CF) et en Seine (SF), suit l'année et le mois d'échantillonnage.

Différents éléments conduisent à penser que la population de flets en Seine pourrait avoir développé une certaine adaptation locale face aux polluants chimiques ; cette adaptation se traduisant très probablement par un coût physiologique fort. Pour consolider notre approche sur les biomarqueurs flet mis en œuvre dans le projet ECOTONES, il nous paraît pertinent de mesurer en parallèle des proxies du métabolisme énergétique et de l'état des réserves musculaires du poisson en Seine vs Canche (HQFish).

Enfin, l'outil de biosurveillance basé sur l'approche IBR nous paraît d'un intérêt majeur pour effectuer un monitoring à long terme du système Seine, pour qualifier l'évolution écologique temporelle de ce grand système estuarien (dégradation vs maintien vs restauration ?).

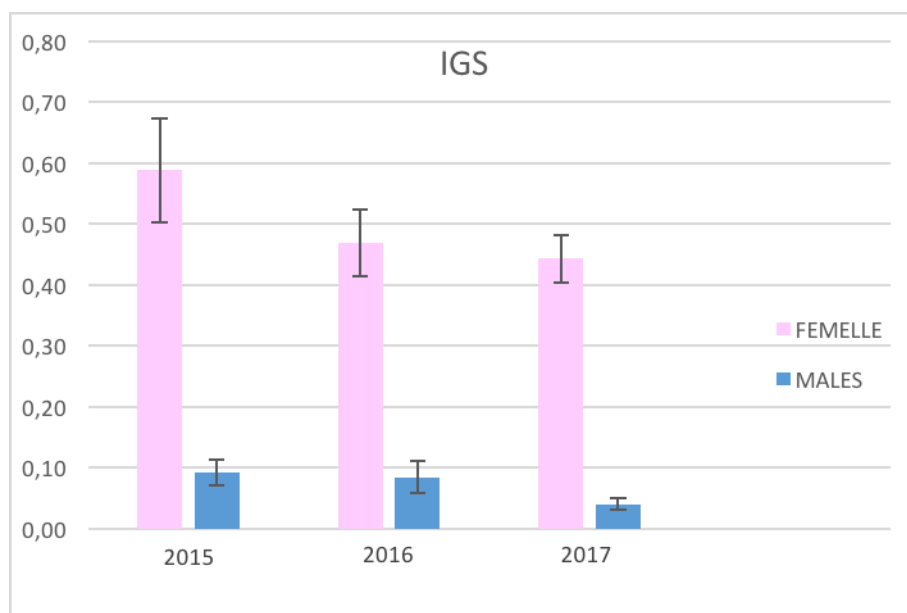


Figure 5 Indices Gonado-Somatiques obtenus sur les différents prélèvements de flets du projet ECOTONES.

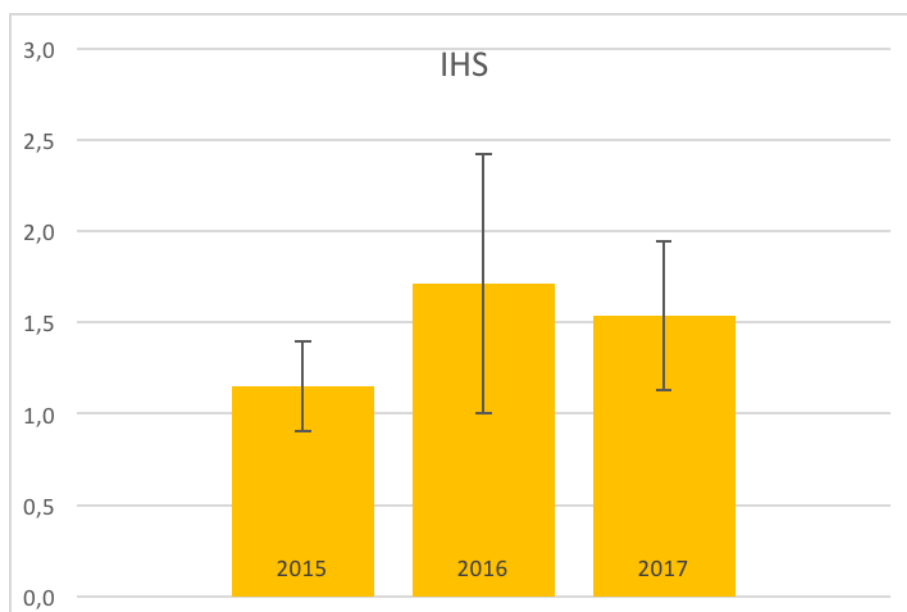


Figure 6 Indices Hépato-Somatiques obtenus sur les différents prélèvements de flets du projet ECOTONES.

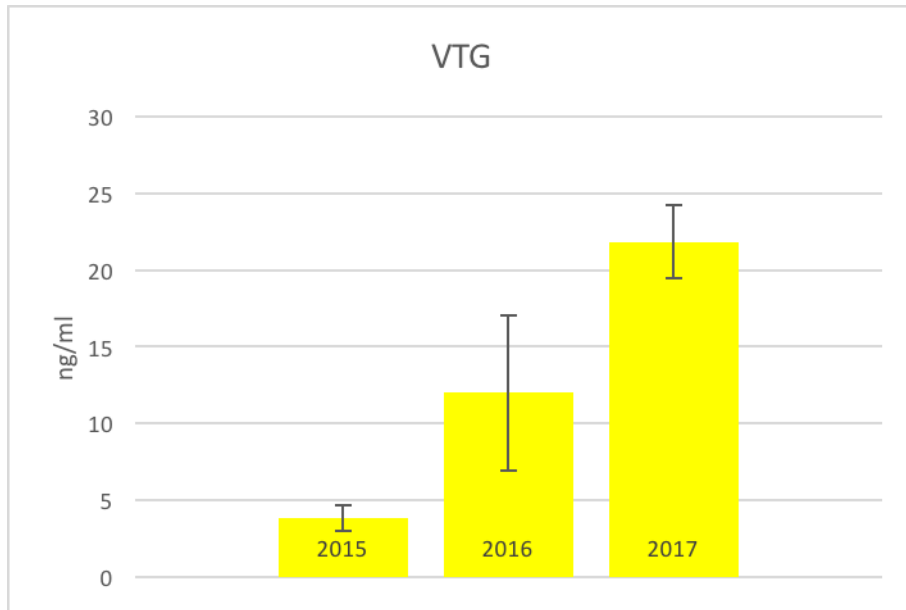


Figure 7 Evolution de la concentration plasmatique de VTG chez les flets males.

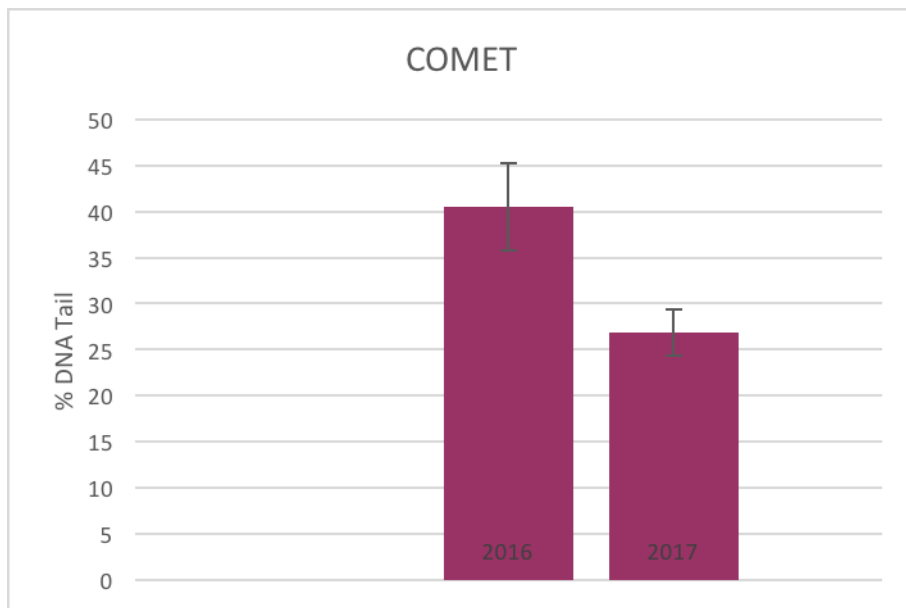


Figure 8 Evolution de la dégradation de l'ADN sur érythrocytes de flets mesurée par le test des comètes.

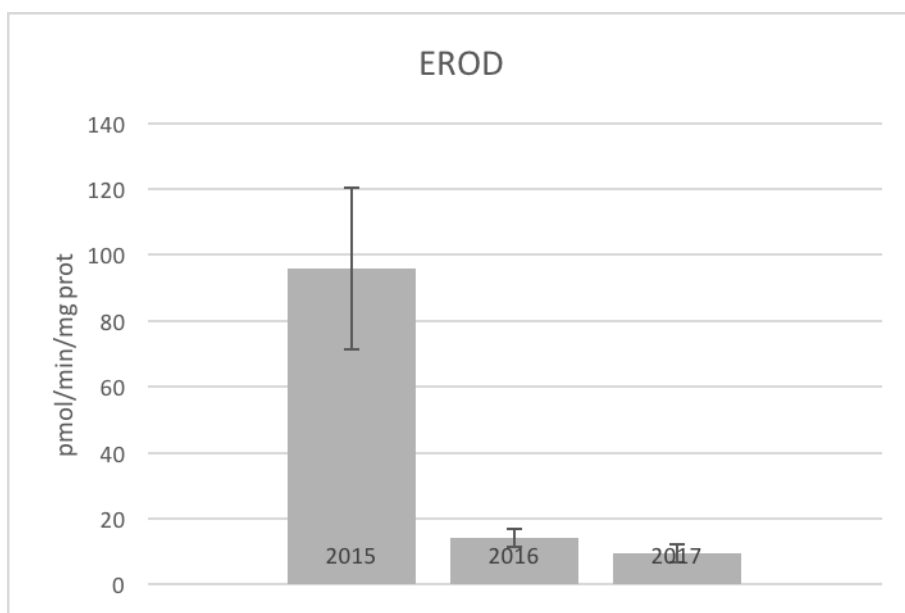


Figure 9 Evolution de l'activité EROD mesurée sur les différents prélèvements de flets du projet ECOTONES.

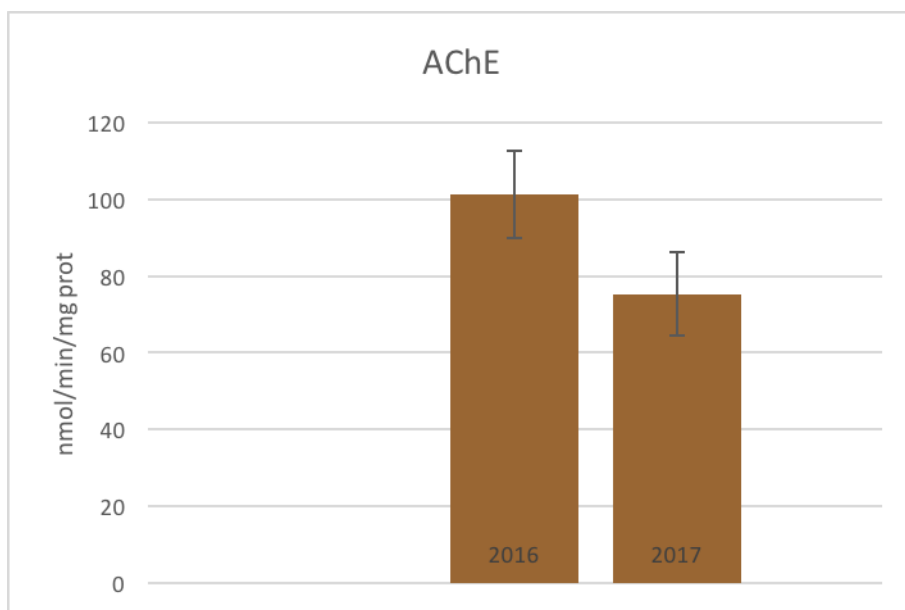


Figure 10 Evolution de l'activité AChE mesurée sur les différents prélèvements de flets du projet ECOTONES.

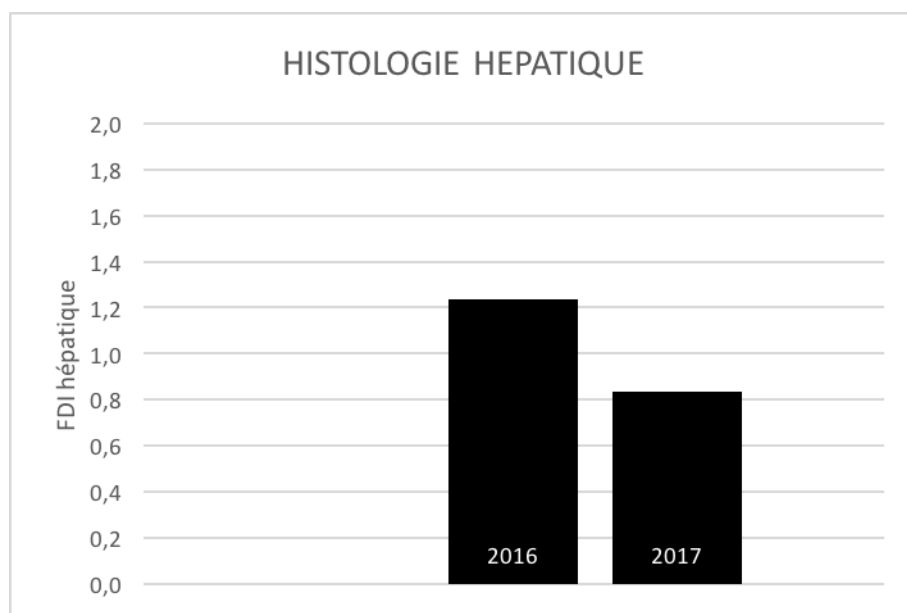


Figure 11 Fish Diseases Index obtenus sur les différents prélèvements de flets du projet ECOTONES.

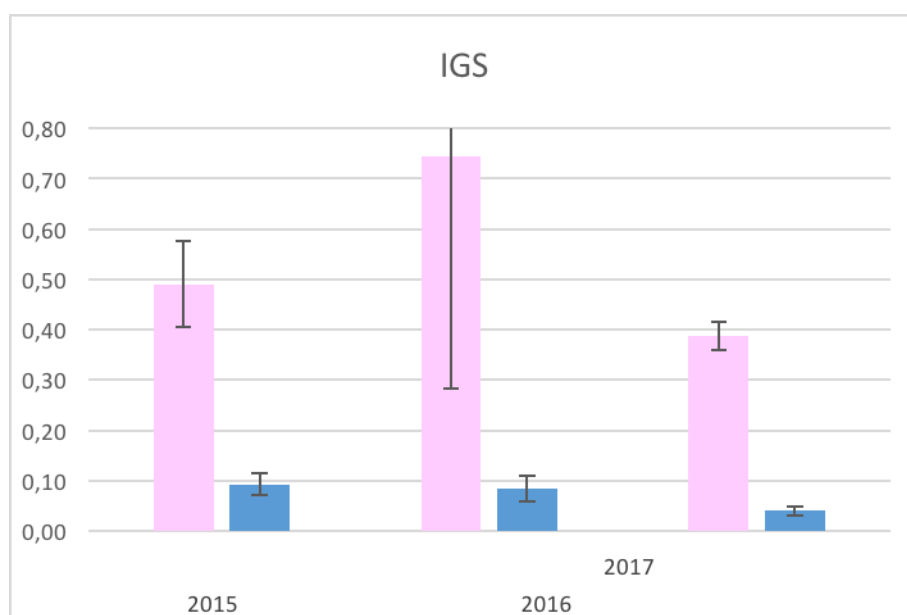


Figure 12 Indices Gonado-Somatiques obtenus sur les différents prélèvements de soles du projet ECOTONES.

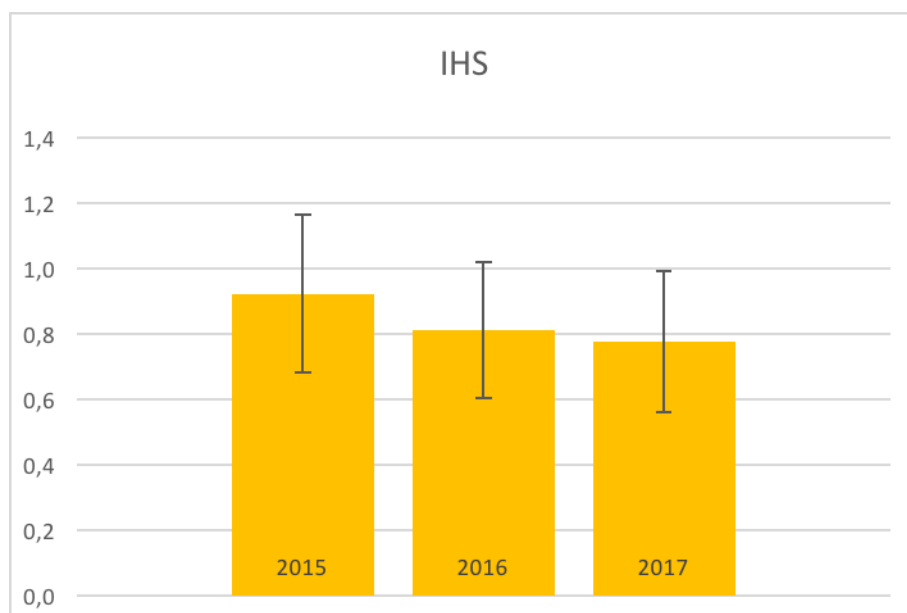


Figure 13 Indices Hépat-Somatiques obtenus sur les différents prélèvements de soles du projet ECOTONES.

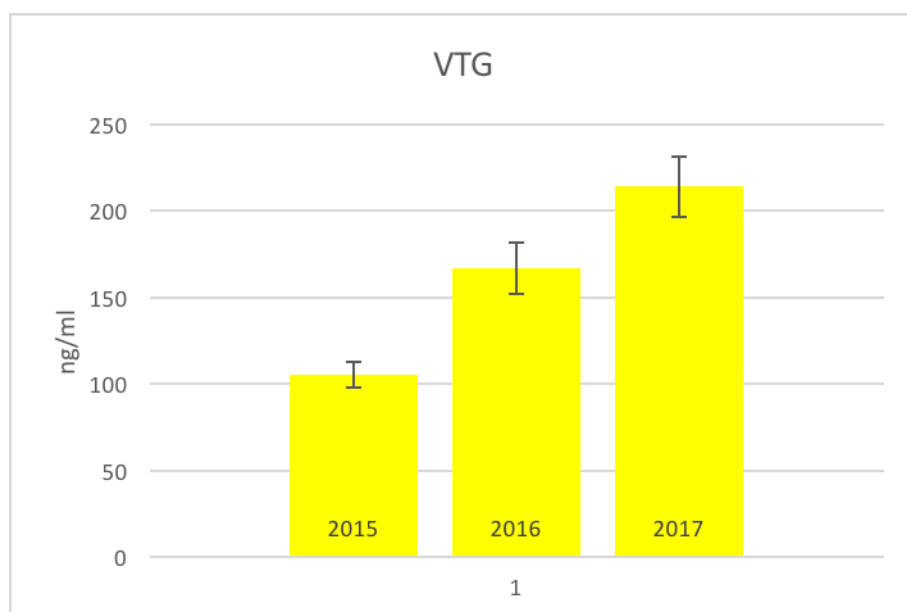


Figure 14 Evolution de la concentration plasmatique de VTG chez les soles males.

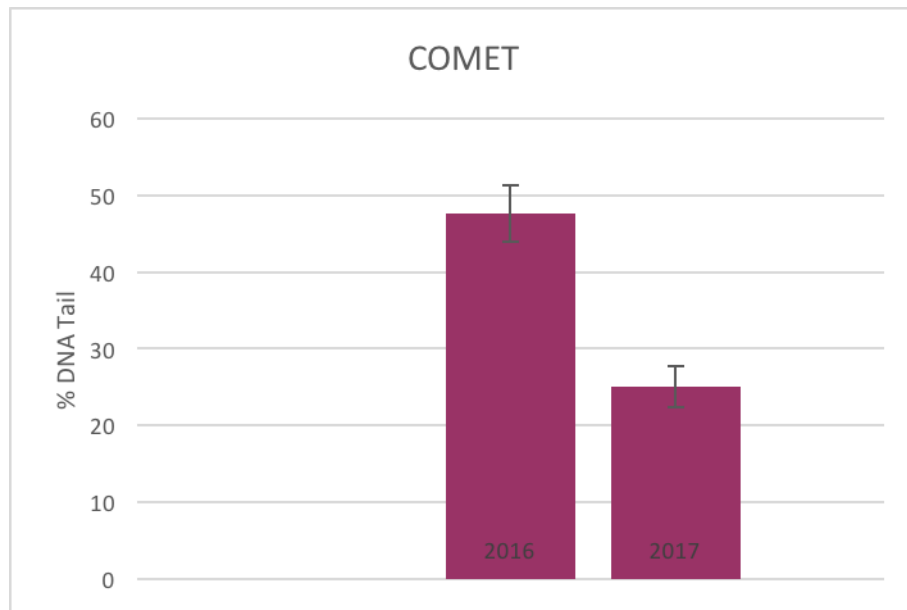


Figure 15 Evolution de la dégradation de l'ADN sur érythrocytes de flets mesurée par le test des comètes.

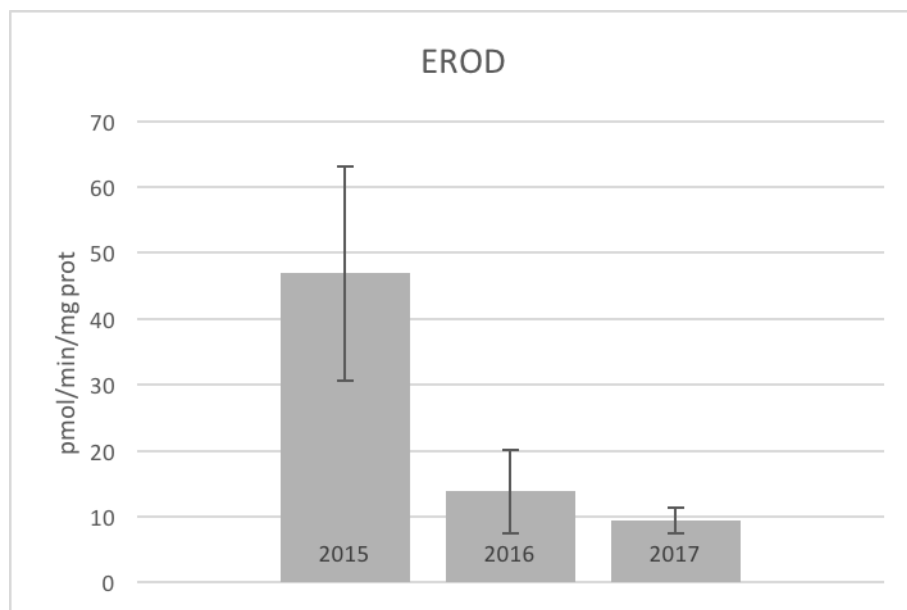


Figure 16 Evolution de l'activité EROD mesurée sur les différents prélèvements de soles du projet ECOTONES.

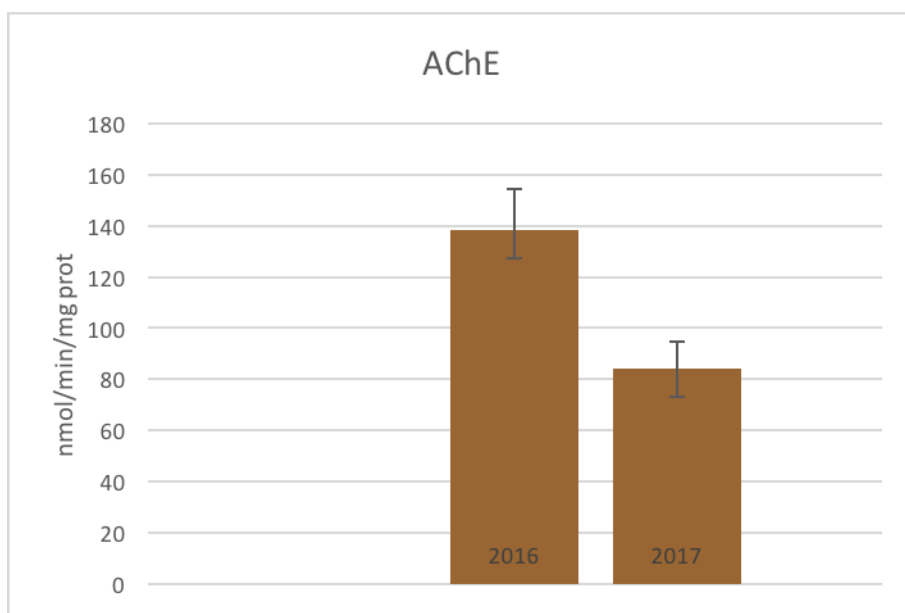


Figure 17 Evolution de l'activité AChE mesurée sur les différents prélèvements de soles du projet ECOTONES.

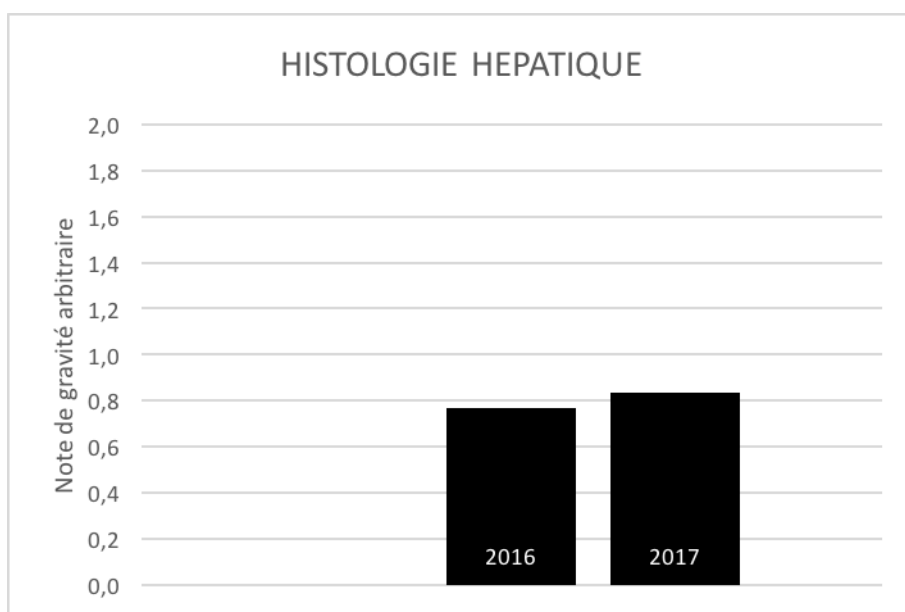


Figure 18 Fish Diseases Index obtenus sur les différents prélèvements de soles du projet ECOTONES.

6 Caractérisation de l'exposition et de la contamination des organismes

Dans le cadre du projet ECOTONES en vue d'estimer l'exposition et la contamination des organismes à des molécules ayant des profils toxicologiques divers, une batterie de bioessais a été utilisée afin d'évaluer les activités génotoxiques et certaines activités de perturbations

endocriniennes. Ces activités ont été mesurées dans différents tissus et/ou organes de décontamination (ou d'accumulation potentielle) des différentes espèces du projet :

- *Mytilus* sp. & *S. plana* : Hépatopancréas,
- *H. diversicolor* : Organismes entiers,
- *P. longirostris* : Hépatopancréas & Œufs,
- *S. solea*, *O. eperlanus* et *P. flesus* : Foies.

Ainsi, ces différents tissus ont été lyophilisés avant la réalisation d'une extraction ASE utilisant un mélange dichlorométhane/Acétone (1/1 ; V/V). L'extrait évaporé à sec est remis en suspension de manière à obtenir un facteur d'enrichissement de 20X. Différentes concentrations de ces extraits ont été testées en triplicat avec différents outils biologiques :

- SOS-Chromotest,
- Test YES et YAS,
- Test Anti-YES et Anti YAS.

Un test statistique (test de STUDENT) a été réalisé ensuite pour déterminer les différences significatives entre réponses obtenues et les témoins négatifs (DMSO).

6.1 SOS-Chromotest

Le SOS Chromotest est un test colorimétrique qui met en œuvre une souche génétiquement modifiée d'E. Coli (PQ37), chez laquelle a été réalisée une délétion partielle de la région portant le gène lacZ de la β -galactosidase ainsi qu'une fusion entre le gène *sfiA* et un gène lacZ rapporté (Quillardet & Hofnung, 1985). Chez E. coli, le système dit « SOS » est mis en action lors de dommages à l'ADN. Ainsi, si un défaut sur l'ADN entraîne un blocage de la fourche de réplication, la protéine RecA se lie à la zone monocaténaire bloquée et passe à l'état activé. A l'état activé, RecA déclenche l'hydrolyse de la protéine LexA qui le répresseur de toute une batterie de gènes intervenant dans la réparation d'ADN dont le gène *sfiA*. De ce fait, le principe du SOS Chromotest est le suivant : plus un composé est génotoxique, plus le taux d'altérations de l'ADN de la souche sera élevé, plus le système de réparation « SOS » sera induit et plus l'activité enzymatique β -galactosidase de la bactérie sera importante (figure 3, page 23). Ainsi, à l'aide de réactifs spécifiques l'induction de cette activité enzymatique est mesurée et relativisée par rapport à celle de l'alkaline phosphatase (contrôle de l'expression protéique) afin de déterminer le SOS Induction Factor (SIF)

(Quillardet & Hofnung, 1985). L'évaluation de la génotoxicité à l'aide du SOS Chromotest a été réalisée sans et avec activation métabolique (S9). L'activation métabolique permettant d'évaluer la génotoxicité de molécules nécessitant une bioactivation par les enzymes de détoxification.

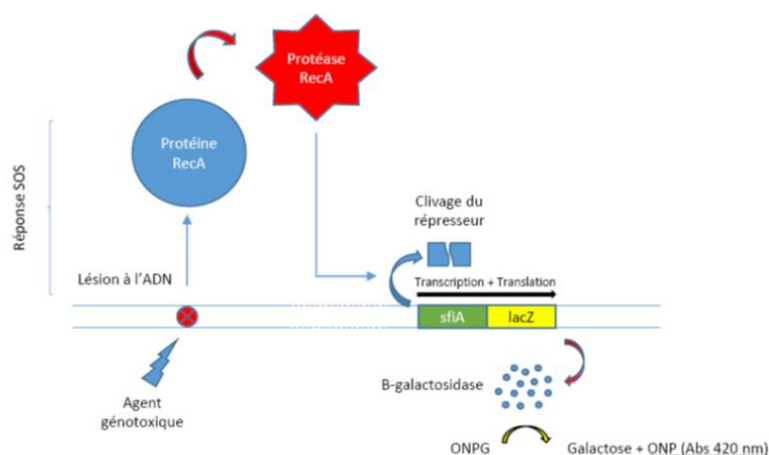


Figure 3 Principe du SOS-Chromotest.

6.2 Test YES, YAS, Anti-YES et Anti-YAS

Les bioessais YES, YAS, Anti-YES et Anti-YAS sont appliqués pour quantifier respectivement les activités agonistes œstrogéniques, androgéniques ainsi que les activités antagonistes œstrogéniques et androgéniques.

Ces bioessais reposent sur l'utilisation de levures *Saccharomyces Cerevisia* génétiquement modifiées, permettant d'identifier les composés interagissant avec les récepteurs humains des œstrogènes (hER α) et androgènes (hAR). Pour cela, les séquences génomiques hER α et hAR ont été introduites dans le chromosome principal des levures avec un plasmide d'expression portant le gène rapporteur lacZ codant pour l'enzyme β -gal. Dès la liaison au ligand, les récepteurs interagissent avec le domaine de liaison présent sur le plasmide et déclenchent la transcription du gène rapporteur lacZ (figure 4, page 20). La β -gal est sécrétée dans le milieu et convertit le substrat jaune (le chlorophenol red β -D-gala CPRG) en produit de dégradation rouge (chlorophénol rouge). Les résultats sont interprétés comme activités agonistes ou antagonistes aux œstrogènes et androgènes, la réponse œstrogénique (RE) ou androgénique (RA) de la souche étant proportionnelle à l'activité β -galactosidase (570 nm) et la croissance (690 nm) de la levure (Routledge *et al.*, 1996). Selon la réponse mesurée et lorsque le calcul d'une CE₅₀ est possible, des équivalents aux molécules de références sont alors déterminés. Les réponses obtenues avec des concentrations

d'échantillons induisant plus de 50% de mortalité des cellules fongiques ne sont pas prises en compte dans les résultats.

La molécule testée est considérée comme œstrogéno-mimétique lorsque la réponse obtenue dépasse 10% (RE_{10}) de la réponse obtenue avec un œstrogène de référence: l'œstradiol ($RE_{éch} \geq RE_{10}$). De la même manière, la molécule testée est considérée comme androgéno-mimétique lorsque la réponse obtenue dépasse 10% (RA_{10}) de la réponse obtenue avec un androgène de référence: la dihydrotestostérone (DHT) ($RA_{éch} \geq RA_{10}$).

Pour évaluer le potentiel anti-œstrogénique d'une molécule, cette dernière est ajoutée au milieu réactionnel en présence d'une molécule reconnue pour ses propriétés œstrogéniques (œstradiol). Le potentiel anti-œstrogénique de la molécule testée est reconnue lorsque l'inhibition de la réponse à l'œstradiol est supérieure à 50% de celle obtenue avec un anti-œstrogène de référence: le 4-hydroxi-tamoxifène ($RE_{éch} \leq RE_{50}$).

Pour évaluer le potentiel anti-androgénique d'une molécule, cette dernière est ajoutée au milieu réactionnel en présence d'une molécule reconnue pour ses propriétés androgéniques: le DHT. Le potentiel anti-androgénique de la molécule testée est reconnue lorsque l'inhibition de la réponse au DHT est supérieure à 50% de celle obtenue avec un anti-androgénique de référence: le flutamide ($RA_{éch} \leq RA_{50}$).

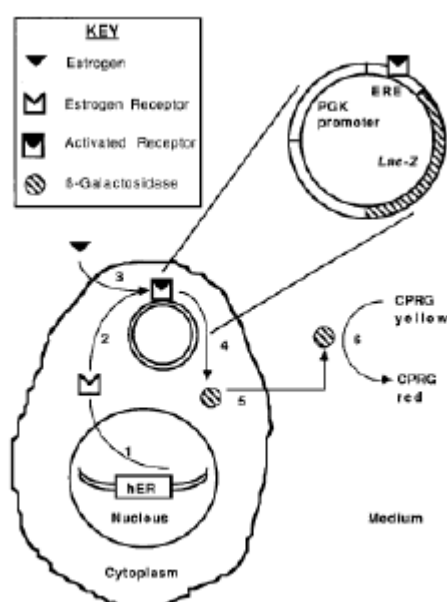


Figure 4 Principe du test YES.

6.3 Interprétation des résultats

Dans le cadre de ce projet, le **SOS Chromotest** n'a pas permis de mettre en évidence un quelconque potentiel génotoxique sur les tissus de *Mytilus* sp., *S. plana* & *H. diversicolor* que ce soit en 2015 et en 2016.

Les expérimentations réalisées sur *P. longirostris* ont montré en 2015 un potentiel génotoxique relativement faible (SIF = 1,5) aussi bien au niveau des œufs qu'au niveau des hépatopancréas (pools). L'expérimentation réalisée en 2016 sur des pools d'œufs d'individus prélevés au niveau du pont de Normandie et du pont de Tancarville n'a pas mis en évidence de potentiel génotoxique. L'absence de résultats en 2016 ainsi que la dépendance de l'expérimentation à la présence de femelles dites grainées ont conduit au non-renouvellement de l'expérimentation en 2017.

Les expérimentations réalisées sur des extraits organiques de foies des différentes espèces de poissons ont mis en évidence le potentiel génotoxique des molécules organiques contenues dans cet organe. Ces résultats confirment ceux déjà obtenus dans le cadre du projet **BCG**.

En 2015, le potentiel génotoxique de l'extrait organique réalisé sur un pool de foies de soles était plus important que ceux obtenus sur des pools de foies de flets et d'éperlan que ce soit avec (+S9) ou sans activation métabolique (-S9). En 2016, on constate une diminution globale des SIF obtenus et ce quelle que soit l'espèce analysée. De plus, cette même année, seule une génotoxicité avec activation métabolique (+S9) a été mise en évidence. A noter également, que le SIF le plus élevé l'a été pour l'extrait organique réalisé sur un pool de foies de soles comme en 2015.

Concernant les différentes versions du test YES et YAS, les expérimentations réalisées sur *P. longirostris* (œufs ou hépatopancréas) n'ont montré aucun effet qu'il soit agoniste ou antagoniste aux œstrogènes ou aux androgènes.

De manière globale, le potentiel anti-oestrogénique des extraits organiques des foies de flets, d'éperlans, de moules (que ce soit de la digue sud ou de St Andrieux) et de *S. Plana*, diminue entre 2015 et 2016. Au contraire, le potentiel anti-oestrogénique augmente durant cette période pour les extraits organiques réalisés sur les foies de soles et sur les organismes entiers de *H. diversicolor*.

Tous les extraits obtenus sur « poissons » et « Moules » présentent entre 2015 et 2017 un potentiel anti-androgénique qui diminue entre 2015 et 2017.

A noter qu'il n'y a aucun effet anti-androgénique des extraits obtenus à partir de *S. Plana* que ce soit en 2015 et 2016. Un tel effet a été observé chez *H. diversicolor* mais uniquement en 2016.

Bibliographie

- Allen Y., Scott A. P., Matthiessen P., Haworth S., Thain J. E. & Feist S., 1999. A survey of oestrogenic activity in UK estuaries and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environ. Tox. And Chem.*, 58 : 227-232.
- Azqueta, A., & Collins, A. R., 2013. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of toxicology*, 87(6), 949-968.
- Barsienė J., Rybakovas A., Forlin L. & Syvokiene J., 2008. Environmental genotoxicity studies in mussels and fish from Goteborg area of the north sea. *Acta Zoologica Lituanica*, 18 : 240-247.
- Bocquené G. & Galgani F., 1998. Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate bcompounds. *Tech. Mar. Environ. Sci.*, 22 : 1-12.
- Bolognesi C., Perrone E., Roggieri P., Pampanin D. M. & Sciutto A., 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*, 78 : 93-98.
- Brown R. J., Galloway T. S., Low D., Browne M. A., Dissanayake A., Jones M. B. & Depledge M. A., 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 66 : 267-278.
- Cajarville M. P., Bebianno M. J., Blasco J., Porte C., Sarasquete C. & Viarengo A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ.*, 247 : 295-311.
- Colborn T., Dumanoski D. & Petersen J., 1996. Our stolen Future : Are we threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival ? A scientific Detective Story. Plume, New York.
- Feist S.W., T. Lang, G.D., Stentiford, A.Köhler, A. 2004. Biological effects of contaminants: use of liver pathology of the European flatfish dab (*Limanda limanda* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.) for monitoring. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, 38. 42 pp.
- Ferreira M., Antunes P., Gil O., Vale C. & Reis-Henriques M. A., 2004. Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. *Aquat Toxicol.* 69 : 347–357
- Gimeno S., Gerritsen A., Bowmer T. & Komen H., 1996. Feminization of male carp. *Nature*, 384 : 221-222.
- Halldórsson, H. P., Ericson, G., & Svavarsson, J., 2004. DNA strand breakage in mussels (*Mytilus edulis* L.) deployed in intertidal and subtidal zone in Reykjavik harbour. *Marine environmental research*, 58(2-5), 763-767.
- Habig C. & Di Giulio R., 1991. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In: Mineau P (ed) *Cholinesteraseinhibiting insecticides: Their impact on wildlife and the environment*. Elsevier Science Publishers, New York, pp 19–33

- ICES, 2007. Report of the ICES/OSPAR Workshop on Integrated Monitoring of Contaminants and their Effects in Coastal and OPEN6Sea Areas (WKIMON III), 16-18 January 2007, ICES Headquarters. ICES Document CM 2007/ACME : 01. 209pp.
- ICES, 2012. ICES Cooperative Research Report N°315, Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects : 71pp.
- Lyons, B. P. 1998. Methods for detecting genotoxic exposure in the aquatic environment. PhD thesis. Centre for Molecular Genetics and Toxicology, University of Wales Swansea.
- Machado Da Rocha C. A., Dos Santos R. A., De Oliveira Bahia M., Araújo Da Cunha .L., Ferreira Ribeiro H. & Rodríguez Burbano R. M., 2009. The Micronucleus Assay in Fish Species as an Important Tool for Xenobiotic Exposure Risk Assessment—A Brief Review and an Example Using Neotropical Fish Exposed To Methylmercury. *Fisheries Science & Aquaculture*, 17 : 478-484.
- Minier C., Caltot G., Leboulenger F. & Hill E. M., 2000. An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex regions. *Analysis*, 28 : 801-806.
- Minier, C., Amara R. 2008. From pollution to altered fish physiological performance; the case of flatfish in the Seine estuary. In *Amiard-Triquet Environmental assessment of estuarine ecosystems*. Taylor and francis. Boca Raton. 227-240.
- Moore M. N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. *Cell Tissue Res.*, 175 : 279-87.
- Quillardet P. & Hofnung M., 1993. . The SOS chromotest, a review. *Mutation Research*. 297:235-279.
- Routledge E. J. & Sumpter J. P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and som of their degradation productis assessd using a recombinant yeastr screen, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 : 241–248.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.
- Sanchez W., Katsiadaki I., Piccini B., Ditche J. M., Porcher J.M., 2008. Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a usefull tool for freshwater biomonitoring : a multiparametric approach. *Environment International*, 34 : 490-498
- Stentiford G. D., Longshaw M., Lyons B. P., Jones G. Green M. & Feist S. W., 2003. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Env. Research*, 55 : 137-159.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., ... & Sasaki, Y. F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 206-221.
- Vethaak, A.D., J. Lahr, S.M. Schrap, A.C. Belfroid, G.B.J. Rijs, A. Gerritsen, J. de Boer, A.S. Bulder, G.C.M. Grinwis, R.V. Kuiper, J. Legler, T.A.J. Murk, W. Peijnenburg, H.J.M. Verhaar and P. de Voogt. 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere*. 59: 511–524. Ferreira et al, 2004.
- Zinkl J. G., Lockhart W. L., Kenny S. A. & Ward F. J., 1991. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fishP. Mineau (Ed.), *Cholinesterase Inhibiting Insecticides*, Elsevier, Amsterdam (1991), pp. 233-254



Annexes 5

Rapport Seine-Aval 5

Acronyme du projet : ECOTONES

Coordinateur : Benoit Xuereb

Tache 1. Evaluation des effets de la contamination sur la faune aquatique (responsable Benoit Xuereb)

Altération de l'ADN spermatique chez la crevette blanche *Palaemonetes longirostris*

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

1 Contexte

Les effets de la contamination chimique sur la qualité de la lignée spermatique chez la faune sauvage ont été adressés comme une problématique d'intérêt en écotoxicologie. Cela découle naturellement du rôle clé de ces cellules dans l'accomplissement de la reproduction et la transmission du patrimoine génétique paternel, et par conséquent des répercussions en termes de fitness pouvant être suspectées en cas d'altération. Par ailleurs, contrairement aux cellules somatiques ou à la lignée ovogénétique, les spermatozoïdes sont connus pour avoir des systèmes de défense au stress et des capacités de réparation des dommages cellulaires très limités (*e.g.* Aitken *et al.*, 2004). Les quelques études conduites chez les crustacés ont démontré l'intérêt de considérer la problématique d'atteinte à la fertilité mâle chez ce groupe taxonomique dans un contexte d'évaluation du risque environnemental, soulignant, par la même occasion, la pertinence de certains marqueurs spermatiques pour la surveillance de la qualité du milieu (*e.g.* Ford *et al.*, 2012 ; Lacaze *et al.*, 2011b ; Yang *et al.*, 2008).

Au sein des crustacés, les crevettes Palaemonidae ont souvent été présentées comme des espèces d'intérêt en écotoxicologie (*e.g.* Key *et al.*, 2006). Bien que la majorité des travaux les concernant, dans ce domaine, a été conduite en laboratoire, ces crevettes répondent à

de nombreux critères de sélection d'une espèce sentinelle (*e.g.* Berthet et al., 2015) ; ce qui rend ce modèle particulièrement intéressant pour les investigations de terrain. En effet, ces organismes épibenthiques sont relativement simples à collecter, identifier, manipuler et maintenir tant pour une application *in situ* qu'en laboratoire. Le genre *Palaemon* est largement réparti et commun le long des côtes, ainsi que dans les estuaires d'Europe de l'Ouest, où les individus sont souvent retrouvés en grande densité (Campillo, 1975). Ces crevettes constituent généralement un maillon trophique important, en tant que proie pour de nombreuses espèces de poissons ou pour d'autres macroinvertébrés (incluant des espèces à haute valeur commerciale), mais également de par leur implication dans la décomposition et la redistribution de la matière organique (Anderson, 1985).

Au regard de ce contexte et pour répondre aux objectifs de la tâche 1 du projet ECTONES (*i.e.* Evaluation des effets de la contamination sur les organismes aquatiques en estuaire de Seine), le laboratoire SEBIO-ULH s'est proposé de développer des marqueurs de qualité spermatique chez un modèle de crevettes Palaemonidae présent en estuaire, *Palaemon longirostris*. Ces travaux ont fait l'objet d'une partie d'un travail de thèse (Erraud, 2018) qui visait plus largement au développement de biomarqueurs de la qualité spermatiques chez deux espèces de Palaemonidae (*i.e.* *P. longirostris* et l'espèce côtière *P. serratus*), dans une perspective d'évaluer la qualité des masses d'eau le long du continuum estuaire / littoral de la Seine.

2 Matériel & Méthodes

2.1 Présentation du modèle *Palaemon longirostris*



Figure 1 Photographie d'un spécimen de crevette blanche, *Palaemon longirostris*, prélevé dans l'estuaire de la Seine (Erraud, 2018).

La crevette blanche (*i.e.* bouquetin), *P. longirostris*, est un crustacés décapode de l'infra-ordre des Caridae, famille des Palaemonidae. Elle est parfaitement adaptée à la vie en estuaire où elle effectue la totalité de son cycle de vie (*e.g.* décrit dans Arousseau, 1984 ; Béguer et al., 2010).

Cette espèce a été recensée dans de nombreux estuaires de la façade Atlantique Est (*i.e.* du Maroc jusqu'au îles Britanniques) et de la Manche. Sa présence dans les embouchures du pourtour du bassin méditerranéen a été ponctuellement rapportée mais elle reste à confirmer. Les études menées sur l'estuaire de la Gironde montrent que sa répartition le long du gradient de salinité est dépendante du sexe des individus et de la saison. En effet, les mâles se retrouvent préférentiellement dans la zone mésohaline (*i.e.* salinités de 5 à 18), alors que les femelles peuplent d'avantage les eaux oligohalines à douces (*i.e.* salinités de 0 à 5). Il peut être souligné que les femelles migrent à la rencontre des mâles en zone mésohaline, entre mars et avril (*i.e.* fin d'ovogénèse), pour la ponte et l'accouplement. Les femelles regagnent ensuite l'estuaire amont. Les embryons restent accrochés sous l'abdomen de la femelle durant le développement. Les larves zoés éclosent entre Juin et Juillet. Il faut moins de 6 mois pour que la nouvelle cohorte atteigne la maturité sexuelle. La durée de vie de l'espèce a été estimée à 2 ans pour une taille maximale d'environ 70 mm.

Sur le plan morphologique, les individus sont translucides avec quelques chromatophores bleutés et brunâtres sur l'exosquelette (Fig 1). Le rostre est surmonté de 8 à 10 dents pointées de rouge, est relativement droit chez les individus peuplant l'Atlantique nord et plus recourbé chez les organismes sud Atlantique. Les spécimens mâles se différencient des femelles par la présence d'un appendice *masculina* situé sur la seconde paire de pléopodes (*i.e.* communément pattes natatoires), observable sous loupe binoculaire (Fig 2).

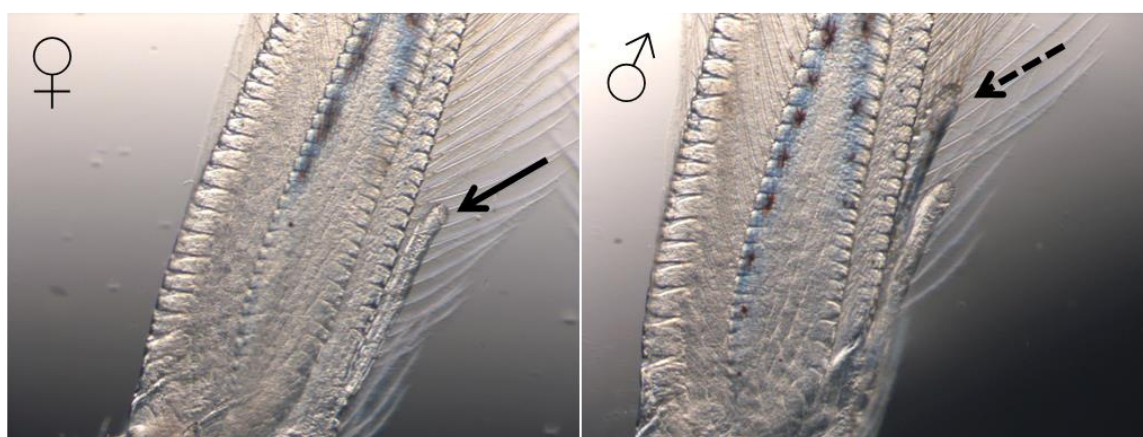


Figure 2 Photographies de la seconde paire de pléopodes de *Palaemon longirostris*, en grossissement x8. A droite, l'appendice *masculina* (trait pointillé), spécifique des mâles, lui-même, surplombant l'appendice *interna* (indiqué par le trait plein sur la photographie de gauche) (Erraud, 2018).

Sur le plan anatomique, chez les spécimens mâles, des testicules bilobés sont enveloppés dans une capsule qui s'étend sur toute la longueur du céphalothorax surplombant ainsi l'hépatopancréas (Poljaroen et al., 2010 ; Fig 3A). Chaque lobe testiculaire est composé de

nombreux tubules séminifères (*i.e.* siège principale de la spermatogénèse) qui fusionnent les uns avec les autres pour former un canal collecteur qui se jettent dans le canal déférent, lui-même situé dans la région médio-latérale de chaque testicule et qui s'étend postéro-ventralement. Ce dernier s'achève par une ampoule terminale qui se situe juste sous le bulbe éjaculateur, au niveau du 5^{ème} périopode (*i.e.* communément pattes ambulatrices). Une fois mature, les spermatozoïdes migrent dans le *vas deferens* et s'enrobent au cours de leur progression dans une matrice de protection, puis dans une matrice adhésive, pour finir par former une masse stockée dans l'ampoule terminale, le spermatophore (Chow, 1982).

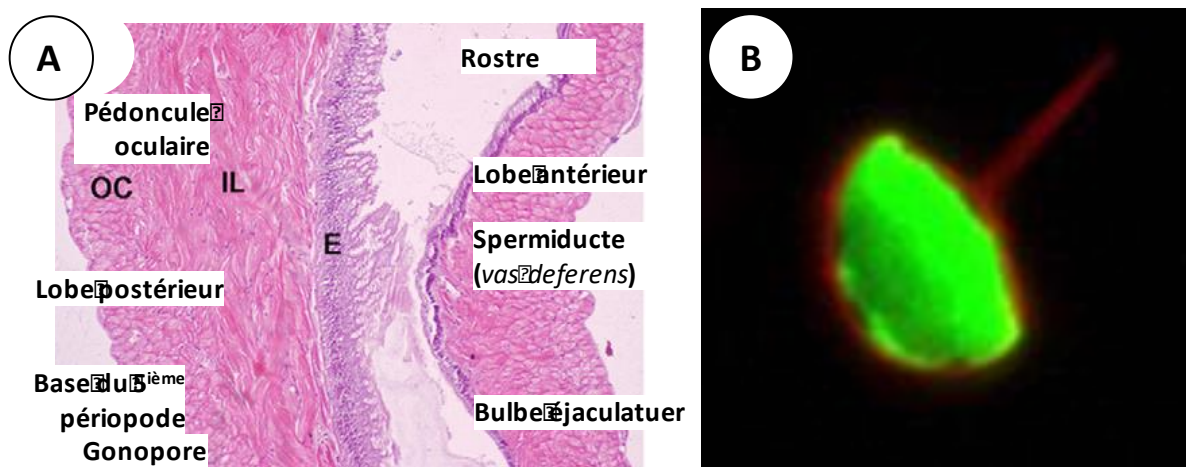


Figure 3 A – Représentation schématisée du système reproducteur mâle des crevettes Palaemonidae (Poljaroen et al., 2010) B - Photographie d'un spermatozoïde de *Palaemon* sp en microscopie confocale à super-résolution après double marquage au WGA (*i.e.* membrane plasmique en rouge) et Syto11 (*i.e.* noyau en vert) (Erraud, 2018).

Les spermatozoïdes de crustacés, présentent une morphologie et une fonctionnalité très différentes et beaucoup plus diversifiée que celle usuellement retrouvée chez d'autres groupes tels que les mollusques ou les vertébrés (revue par Braga et al., 2013 ; Fig 3B). Ainsi, les spermatozoïdes de Palaemonidae sont aflagellés et non mobiles ; ils ne portent pas systématiquement de mitochondries et leur système acrosomal (s'ils en détiennent) n'a pas été clairement décrit. Leur noyau est décondensé (*i.e.* absence de protamines) et ils sont coiffés d'un spicule sur leur face apicale qui intervient dans le processus de pénétration dans l'ovocyte.

2.2 Sites d'étude et campagnes de prélèvements

Des spécimens de *P. longirostris* adultes ont été collectés le long du gradient de salinité dans la zone mésohaline de l'estuaire de la Seine entre les ponts de Normandie et de Tancarville,

en avril 2015, janvier 2016, mai 2016, octobre 2016, avril 2017 et octobre 2017 (Normandie, France ; Fig. 4). Compte tenu du mouvement migratoire de l'espèce en lien avec les mouvements du gradient de salinité et de l'activité sexuelle, aux différentes saisons, plusieurs stations ont été suivies à chaque campagne d'échantillonnage afin d'assurer la collecte de spécimens mâles (Fig.1) : trois traits de drague à proximité du pont Normandie (NB1 = pont Normandie ; NB2 = abbaye de Grestain ; NB3 = Grestain) ; deux à l'embouchure de la Risle (Ri1 = Berville-sur-mer, Ri2 = Blanc banc) ; une dans la rivière Risle (RiR) ; deux à proximité du pont de Tancarville (TB1 = Pointe de la Roque, TB2 = Pont de Tancarville).

A l'exception des 2 premiers prélèvements récupérés par l'intermédiaire de la Cellule de Suivi du Littoral Normand, les échantillonnages ont tous été effectués par Mr Patrice Cauchois, pêcheur professionnel de la société Prelev'Mar, à bord de son embarcation, le JU-AD-LO (immatriculé CH 933 808). Ces prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une drague à crevette d'une largeur de 80 cm et d'un maillage de 11 mm. Les crevettes étaient conditionnées dans des bidons (*i.e.* 1 bidon / trait de drague) de 25 litres contenant 20 litres d'eau du milieu (*i.e.* collectée au début de chaque trait de drague) et maintenue sous oxygénation. La température de l'eau, la salinité, le pH et l'oxygène dissous ont été systématiquement mesurés à chaque prélèvement. Les organismes étaient ramenés au laboratoire dès le retour à quai (*i.e.* 3 – 4 heures après le premier prélèvement).

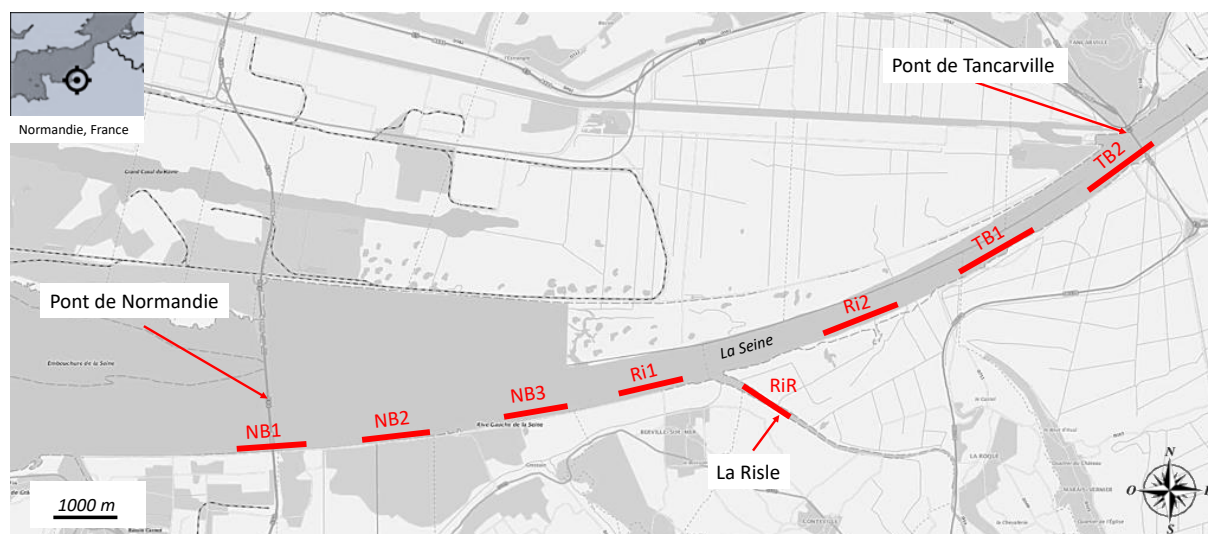


Figure 4 Localisation des stations d'échantillonnage de *Palaemon longirostris* le long de l'estuaire de la Seine entre le pont de Normandie et le pont de Tancarville (Normandie, France). NB1 = Pont de Normandie ; NB2 = abbaye de Grestain ; NB3 = Grestain ; Ri1 = Berville sur mer ; RiR = rivière Risle ; Ri2 = Blanc banc ; TB1 = Pointe de la Roque et TB2 = Pont de Tancarville (Erraud, 2018).

2.3 Obtention des suspensions spermatiques

Lors de cette étude, les échantillons ont toujours été conditionnés en suivant la procédure mise au point et optimisée par Erraud et al. (2018a ; Fig 5). Les spécimens mâles étaient pesés et les longueurs totales et céphalothoracique étaient mesurées. Un fragment d'uropode était prélevé et observé sous un microscope photonique (*i.e.* système d'imagerie cellulaire EVOS® FL, grossissements x100 puis x400) afin de déterminer le stade de mue sur la base de la morphogenèse inter-tégumentaire de l'uropode selon la classification de Drach (1944). Les spermatophores ont ensuite été extraits par une légère pression entre la cinquième paire de périopodes, ce qui a permis l'expulsion des spermatophores des ampoules terminales. Les spermatophores étaient alors transférés dans un microtube de 1,5 ml puis pesés, immergés dans 300 μ L d'eau de mer artificielle (*i.e.* ajustée à l'osmolarité hémolympatique de *P. longirostris* 350 mOsmol.kg⁻¹) et dilacérés par pipetage jusqu'à lacération entière des spermatophores. La mortalité de la suspension de spermatozoïdes a été évaluée par un test de perméabilité membranaire après mélange des cellules 1 : 1 (v / v) avec une solution de colorant de bleu de Trypan isotonique (*i.e.* 0,4 % en poids / volume). La lecture était effectuée sur lames KOVA®, au moyen d'un microscope photonique (x400). Cette étape permettait également de déterminer la densité cellulaire. Les suspensions cellulaires étaient maintenues à 4°C jusqu'à l'analyse des dommages à l'ADN *via* le test Comet (*i.e.* ≤ 2 h).

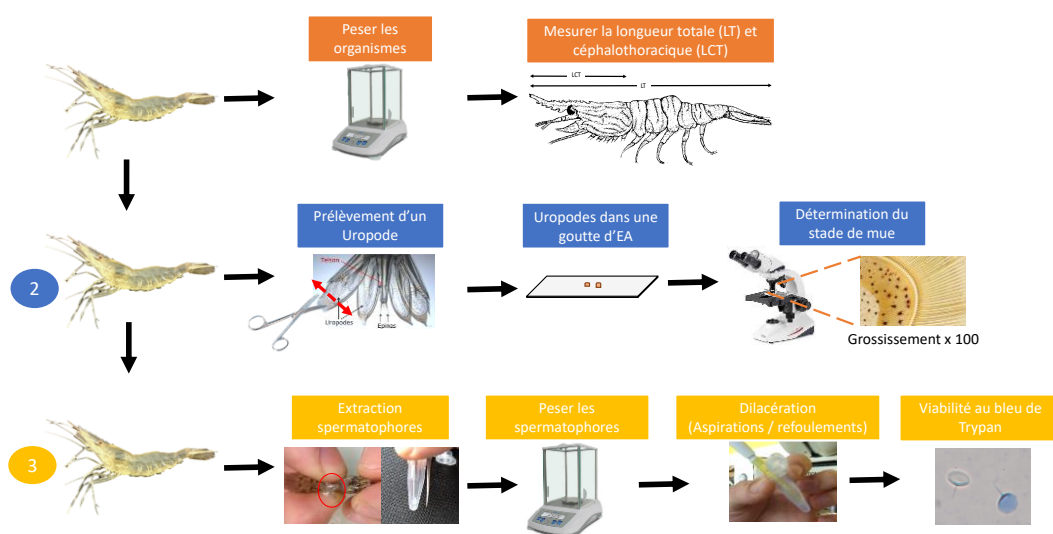


Figure 5 Représentation schématique de la procédure d'obtention des suspensions spermatiques chez *Palaemon sp.* (Erraud, 2018).

2.4 Mesure de l'intégrité de l'ADN au moyen du test Comet

Les données bibliographiques et les résultats de l'étude prospective réalisée durant les phases préliminaires de ce travail (Erraud, 2018), ont indiqué que les particularités ultrastructurelles et morphologiques des spermatozoïdes de Palaemonidae limitaient les possibilités de transfert d'outils classiquement utilisés en spermatologie pour diagnostiquer des problèmes de fertilité (*e.g.* mobilité, activité mitochondriale, intégrité de l'acrosome). Par conséquent, les efforts ont très rapidement été recentrés sur la mesure de l'intégrité de l'ADN au moyen du test Comet. Le test des Comet est une technique d'électrophorèse de noyaux de cellules isolées dans du gel d'agarose sur lame de microscope. Ce test, dans la version alcaline de Singh et al. (1988), permet la détection de cassures simple et double-brin ainsi que des sites alcali-labiles. L'application de ce test sur les spermatozoïdes de Palaemonidae a fait l'objet d'une phase d'optimisation méthodologique (Erraud et al., 2018a).

Brièvement, préalablement au test, des lames de microscopie étaient recouvertes d'une fine couche d'agarose-type I 0,8 % (*i.e.* m/V dans du tampon phosphate salin 10 mM, pH 7,4). Le jour J, après extraction des spermatozoïdes, 60 μ L de suspension cellulaire (*i.e.* 10^6 spermatozoïdes.mL⁻¹) étaient mélangés dans 60 μ L d'agarose-type VII 1 % (*i.e.* m/V dans du tampon phosphate salin 10 mM, pH 7,4, 37 °C). Seules les suspensions cellulaires présentant un taux de survie > 85 % étaient utilisées, pour écarter la prise en compte de dommages à l'ADN issue de l'apoptose ou de la nécrose cellulaire. Le mélange était immédiatement déposé sur une lame pré-cotée, recouvert d'une lamelle (*i.e.* 24 mm \times 60 mm) pour assurer une répartition homogène. La suite de la procédure était effectuée dans l'obscurité, sous lumière inactinique, pour prévenir l'addition de dommages à l'ADN du fait de l'éclairage. Les lames étaient refroidies à 4°C pendant 10 min pour que l'agarose prenne en masse. Après retrait des lamelles, les lames étaient plongées dans une solution de lyse fraîchement préparée (*i.e.* 2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, 1 % Triton X-100 et 10 % DMSO, pH 10) à 4°C durant 1 h. Les lames étaient alors transférées dans une chambre d'électrophorèse (*i.e.* 24 cm \times 27 cm \times 7 cm ; 20 lames) remplie de 1050 mL de solution alcaline (*i.e.* 300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH > 13). Après 15 min d'incubation assurant la relaxation et la dénaturation de l'ADN, un courant de 0.83 V.cm⁻¹ était appliqué durant 24 min pour assurer la migration électrophorétique des noyaux. Les lames étaient ensuite

placées dans un bain de tampon de neutralisation (*i.e.* 0.4 M Tris–HCl, pH 7.5) à 4°C pendant 20 min pour permettre le rapprochement des brins d'ADN. Enfin, les lames étaient déshydratées dans un bain d'éthanol absolu durant 15 min, pour assurer une meilleure conservation dans l'attente de leur lecture. La lecture des lames était réalisée à un grossissement x600 au moyen d'un microscope à épifluorescence (Eclipse TE2000-U, Nikon®). L'ADN des noyaux était révélé par un marquage au 4',6-diamidino-2-phénylindole (*i.e.* DAPI ; 30 µL par lame d'une solution à 2 µg.mL⁻¹).

Dans la présente étude, les dommages à l'ADN ont été mesurés en utilisant la notation visuelle malgré l'existence de systèmes d'analyse d'images. En effet, celle-ci est autant reproductible que les méthodes quantitatives et semi-automatisées et n'est pas plus sujette au biais de l'opérateur (Azqueta et al., 2011 ; Collins, 2004 ; García et al., 2004). De plus, la notation visuelle est un moyen rapide, simple et peu coûteux pour évaluer une rupture de brin d'ADN (Kumaravel et al., 2009) et elle se prête donc bien à des études de biosurveillance (Moller et al., 2000). La notation des lames a donc été évaluée selon une grille de lecture définie par nos soins selon la méthode de Collins et al. (1997). Un minimum de 150 spermatozoïdes par lame était compté et classé en cinq catégories de Comet en fonction du degré de dommage à l'ADN (Fig 5), de 0 (pas de queue) à 4 (presque tout l'ADN dans la queue de Comet indiquant un ADN fortement endommagé). Les niveaux de dommages étaient ensuite calculés par la formule ci-dessous :

$$UA = \frac{N0 \times 0 + N1 \times 1 + N2 \times 2 + N3 \times 3 + N4 \times 4}{Nt} \times 100$$

avec Ni indiquant le nombre de noyaux comptabilisés dans chaque classe (l'indice i indiquant la classe) et Nt correspondant au nombre total de noyaux analysés. Les résultats étaient exprimés en unité arbitraire (UA) sur une échelle de 0 à 400.

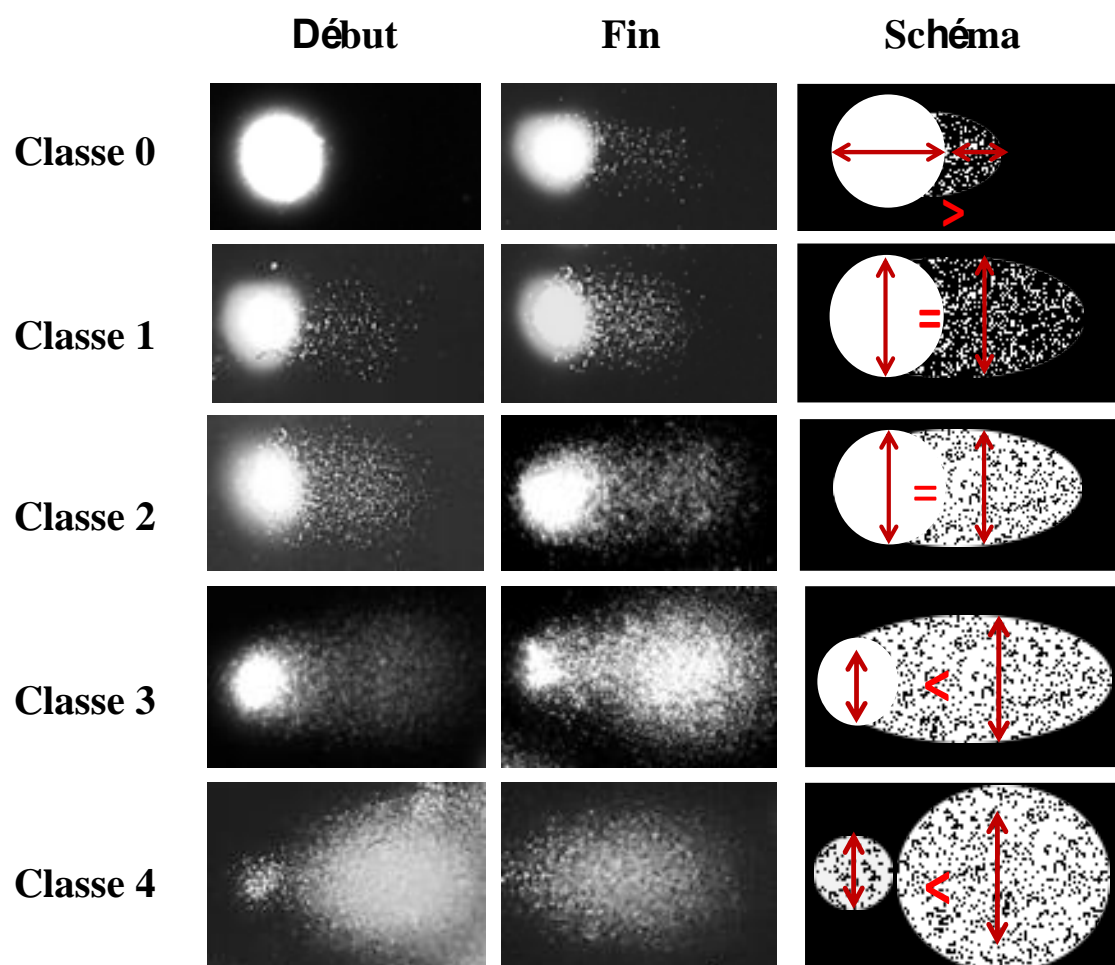


Figure 5 Classification visuelle de l'endommagement de l'ADN spermatique de Palaemonidae mesuré par le test Comet après marquage au DAPI, adaptée de Collins (1997) : classe 0 : aucun dommage à très faibles dommages ; classe 1 : faibles dommages ; classe 2 : dommages moyens ; classe 3 : dommages élevés ; classe 4 : totalement endommagés (Erraud, 2018 ; Source : A. Duflot & A. Erraud).

3 Résultats & discussion

3.1 Recul sur l'intérêt du modèle *Palaemon sp*

Les crevettes du genre *Palaemon* ont été retenues comme modèle d'étude dans le cadre de ces travaux, sur la base de connaissances *a priori*. En effet, celles-ci répondaient à de nombreux critères de sélection d'une espèce sentinelle (*e.g.* Berthet et al., 2015). Toutefois, si des études ont rapporté l'utilisation de crevettes Palaemonidae dans le cadre d'expositions contrôlées en laboratoire, très peu, finalement, ont éprouvé leur potentiel d'application pour des approches de surveillance *in situ*. Le recul et l'expérience nous permettent aujourd'hui de mesurer plus précisément les avantages et les limites de l'utilisation de ces organismes pour évaluer la qualité écotoxicologique des masses d'eau.

La caractérisation des spécimens prélevés, en termes d'espèce, de sexe et de stade de mue (*i.e.* indice de condition physiologique fondamentale chez les crustacés), a été maîtrisée sans difficulté. Elle repose sur des analyses macro ou microscopiques très simples à mettre en œuvre. Si cela peut sembler anodin, une telle caractérisation n'est pas toujours aussi facilement réalisable, et peut représenter un frein important à la compréhension des réponses biologiques et donc au développement des biomarqueurs.

En complément, viennent s'ajouter quelques observations qui appuient plus spécifiquement l'intérêt des crevettes Palaemonidae pour l'étude de la qualité spermatique chez les crustacés. Comme cité précédemment, chez la majorité des crustacés, le transfert des spermatozoïdes se fait encapsulé dans un spermatophore. Nous avons montré que le spermatophore de *Palaemon* sp pouvait être obtenu par une simple extraction manuelle. Cette particularité a plusieurs avantages sur le plan méthodologique. Elle a permis une obtention rapide des échantillons, évitant des phases préliminaires de dissection du tractus génital et d'isolement cellulaire susceptibles d'occasionner des dommages artéfactuels et ainsi augmenter le bruit de fond. Le fait de travailler sur le spermatophore a assuré également l'analyse sur une population homogène de spermatozoïdes matures, et en conséquence, a permis d'éviter les biais pouvant être liés aux différences de sensibilité entre stades de la lignée spermatogénétique (Lacaze et al. 2011a). Cette méthode, non-létale, quand elle a été bien maîtrisée, a également offert l'opportunité de suivre différents lots de spermatozoïdes par individu, *via* une succession d'extractions/reformations des spermatophores (*c.f.* section 3.3.1). Enfin, l'expérience a montré que les spécimens mâles présentaient des spermatophores (contenant des spermatozoïdes) dans leurs ampoules terminales quelle que soit la période de l'année durant laquelle ils étaient prélevés, indépendamment des pics de reproduction et des potentielles périodes de ralentissement ou d'arrêt de la spermatogénèse. Sur le plan logistique, cela signifie que les biomarqueurs spermatiques sont potentiellement déployables toute l'année chez ces espèces. En contrepartie, l'étude du spermatophore ne permet bien évidemment pas de suivre le déroulement de la spermatocytogénèse et de la spermiogénèse et, n'est sans doute pas non plus la méthode la plus adaptée pour évaluer la fertilité sur la base de la densité spermatique ; l'étude de ces phénomènes nécessitant irrémédiablement une étude plus approfondie au niveau du tractus génital.

3.2 Signification des dommages à l'ADN des spermatozoïdes de *Palaemon sp*

L'interprétation d'une réponse biologique en tant que biomarqueur requière une description, au moins partielle, de sa toxicodynamique. La compréhension, a minima, (i) de la cinétique d'apparition de la réponse en fonction du temps et de la dose, (ii) de son temps de rémanence une fois la source de stress passée et (iii) éventuellement de ses répercussions à des niveaux d'organisation supérieurs, constitue un préalable essentiel à son interprétation en tant que biomarqueur en biosurveillance. Aussi, une fois l'optimisation méthodologique validée, nous nous sommes attachés à investiguer chacune de ces questions. En parallèles des suivis réalisés dans le cadre du projet ECOTONES, des expérimentations ont été conduites sur des spécimens d'une espèce cryptique, *Palaemon serratus*, récupérés à moindre coût auprès d'un pêcheur du Havre, durant les périodes hivernales de 2016 et 2017. Les résultats de ces travaux ont été détaillés dans le manuscrit de thèse d'Alexandre Erraud (Erraud, 2018) et ont fait l'objet de 2 publications scientifiques (Erraud et al., 2018a,b). Il ne s'agira ici que d'en présenter les grandes lignes.

Brièvement, la sensibilité des spermatozoïdes de *Palaemon sp* vis-à-vis de différents modes d'actions toxiques a été évaluée lors d'expositions *ex vivo* à des agents génotoxiques directs (*i.e.* le méthyle méthane sulfonâtes en tant qu'agent alkylant, le peroxyde d'hydrogène en tant qu'agent oxydant et les UV-C). Des cinétiques de réponses sensibles et cohérentes ont été observées pour tous ces composés génotoxiques en dépit de leurs divers modes d'actions. La cinétique d'apparition des dommages sur les spermatozoïdes maintenus au sein de l'organisme a été évaluée dans le cadre d'expositions *in vivo*¹. Cela a permis de caractériser la relation dose réponse dans un contexte plus réaliste, permettant d'intégrer entre autres les modulations de sensibilité (*i.e.* entre *ex vivo* et *in vivo*) liées au phénomène de bioaccumulation, redistribution ou métabolisation des composés. Les résultats ont démontré que les spermatozoïdes matures de *Palaemon sp* contenus dans l'ampoule terminale étaient très sensibles et rapidement affectés. Ces résultats étaient très similaires à ceux rapporté chez l'amphipode *Gammarus pulex* exposés dans les mêmes conditions (Lacaze et al. 2010). Les expositions *in vivo* répétées ont souligné une très bonne répétabilité de la réponse biologique avec des CV % compris entre 1 et 10 % en dépit du fait que les expérimentations aient été conduites sur des lots d'organismes différents (Fig 6).

¹ L'alkylant méthyle méthane sulfonâtes (MMS) a été conservé pour ces expérimentations en raison de son mode d'action direct.

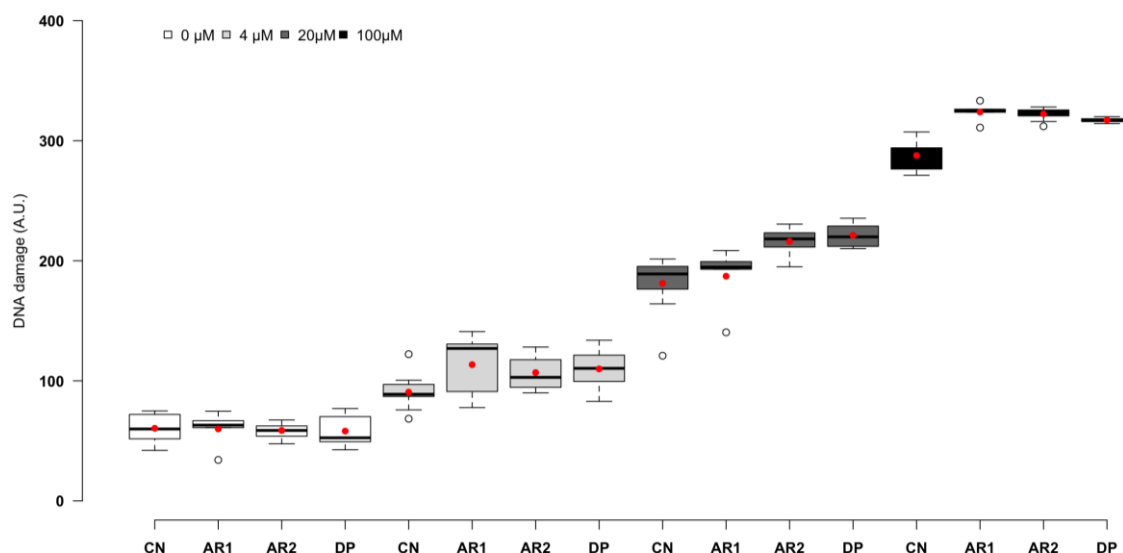


Figure 6 Répétabilité des mesures de l'intégrité de l'ADN spermatique mesurée par le test Comet chez *Palaemon serratus* exposés *in vivo* durant 2 jours à un gradient de concentration en MMS (*i.e.* 0, 4, 20 et 100 µM). Ce graphique est une compilation des données obtenues durant 4 expérimentations indépendantes identifiées : CN = cinétique de réponse (2016) ; AR1 = altération de la reproduction n°1 (2017) ; AR2 = altération de la reproduction n°2 (2017) ; DP = dépuraction (2017). Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles. La moyenne (point rouge) a été ajoutée ($n = 10$) (Erraud, 2018).

Dans un second temps nous nous sommes intéressés à la rémanence de la réponse en l'absence de stress génotoxique. Les résultats ont montré qu'après transfert en milieux sain l'imprégnation génotoxique restait constante sur une durée d'au moins 20 jours. Ces résultats ont été constatés chez *Palaemon serratus* exposés artificiellement en laboratoire mais également chez des spécimens de *P. longirostris* naturellement exposés en estuaire de Seine (Fig 7). Ce constat souligne le potentiel intégrateur de la mesure des dommages à l'ADN spermatique, qui ne se limite pas seulement à retranscrire un épisode toxique récent.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux répercussions qu'un ADN spermatique endommagé pouvait occasionner sur le succès de reproduction des crevettes. Pour cela des crevettes mâles ont été exposées à un gradient de méthyle méthane sulfonâtes, puis mises en présence de femelles jusqu'à l'accouplement. Le taux de fécondation ainsi que la phase de développement pré-éclosion ont été suivis chez chacune des femelles fécondées. Aucune altération n'a été mise en évidence en dépit des niveaux extrêmes de dommages à l'ADN enregistrés chez les mâles exposés à la plus forte concentration (*i.e.* 322 U.A. soit 78 % de noyaux en stade 3 et 22 % en stade 4). Par conséquent, un spermatozoïde fortement endommagé est en capacité de transmettre un patrimoine génétique complètement altéré ;

observation qui corrobore des résultats obtenus chez d'autres espèces telles que des poissons (Devaux et al., 2011), crustacés (Lacaze et al., 2011c), mollusques ou annélides (Lewis et Galloway, 2009). Par ailleurs, l'absence d'effets remarquables sur la phase précoce du développement (*i.e.* pré-éclosion) est moins consensuelle mais a déjà été reportée chez les poissons (Devaux et al., 2011). *In fine*, le caractère prédictif de l'application du Comet sur spermatozoïdes de *Palaemon* sp n'a pas pu être établi. Bien que des répercussions d'un endommagement de l'ADN sur la progéniture puissent être suspectées (Devaux et al., 2011 ; Lacaze et al., 2011c ; Lewis et Galloway, 2009 ; Santos et al., 2013), nous n'avons pas été en mesure de décrire un seuil effectif. De futures investigations devront être menées pour évaluer si des effets délétères peuvent être observés sur des stades de développements plus tardifs (*i.e.* larvaire et juvénile). En attendant, un seuil effectif théorique a été fixé à 100 UA, à partir d'une extrapolation de données disponibles dans la littérature.

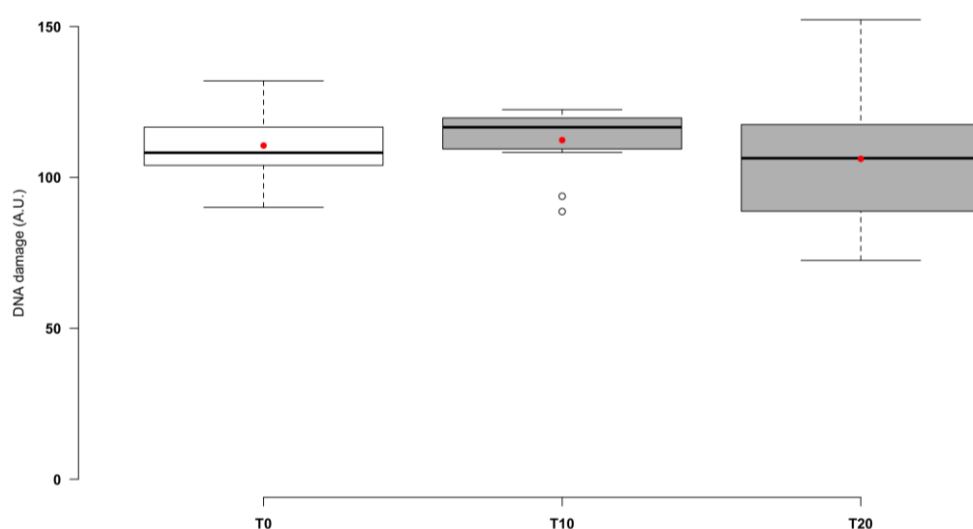


Figure 7 Dommages à l'ADN spermatique mesurés par le test Comet chez des spécimens de *Palaemon longirostris* échantillonnés dans l'estuaire de la Seine, immédiatement après rapatriement au laboratoire (*i.e.* T0; $n = 17$) et après 10 et 20 jours de stabulation dans un milieu sain (T10 and T20; $n = 12$ and 14). Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles. La moyenne (point rouge) a été ajoutée ($n = 10$) (Erraud, 2018).

3.3 Opérationnalité pour de la surveillance environnementale : variabilité naturelle et niveau de base

Un des principaux verrous au déploiement à large échelle des biomarqueurs, dans le cadre de réseaux de surveillance environnementale, réside dans la difficulté de discriminer les effets d'un stress chimique, du bruit de fond lié à la modulation naturelle de la réponse biologique. La variabilité naturelle 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). Il est donc indispensable avant de promouvoir l'utilisation d'un biomarqueur de comprendre cette variabilité naturelle pour pouvoir définir les conditions d'application de l'outil et produire un référentiel (*i.e.* une distribution de données) qui assurera une interprétation claire et sûre de la réponse mesurée. Pour y parvenir, une des solutions consiste à établir un jeu de données chronologiques à partir d'un suivi d'une ou plusieurs populations dites de référence (*i.e.* pas ou peu exposée à la contamination) 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). 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 lesquelles il n'est pas garanti de trouver l'espèce d'intérêt. Pour répondre à cette problématique, Webb et Gagnon (2013) ont proposé une stratégie alternative basée sur la restauration d'une réponse basale après une phase de dépuraction dans des conditions saines en laboratoire. Cette stratégie leur a permis de déterminer des référentiels pour quelques biomarqueurs (*e.g.* EROD, intégrité de l'ADN des cellules somatiques) chez la brème noire, *Acanthopagrus butcheri*.

Une part importante de nos investigations a ainsi été centrée sur la compréhension de la variabilité naturelle des niveaux de dommages à l'ADN spermatique de *Palaemon* sp, avec pour objectif de produire un référentiel assurant l'interprétation du biomarqueur lors d'application *in situ*. Pour y parvenir, une double stratégie a été adoptée, reposant une nouvelle fois sur la comparaison avec l'espèce littorale *P. serratus* pour tenter de surmonter l'absence de population de référence pour l'espèce estuarienne d'intérêt *P. longirostris*. D'une part, le suivi régulier d'une population de référence de l'espèce littorale, *P. serratus* a donc été réalisé afin d'apprécier l'amplitude de la variabilité interindividuelle et temporelle au regard de facteurs tels que la taille, le stade de mue et la température. D'autre part, des expérimentations de dépuraction active ont été menées, chez l'espèce estuarienne, *P. longirostris*, pour tenter de définir le niveau basal de la réponse.

3.3.1 Définition d'un référentiel

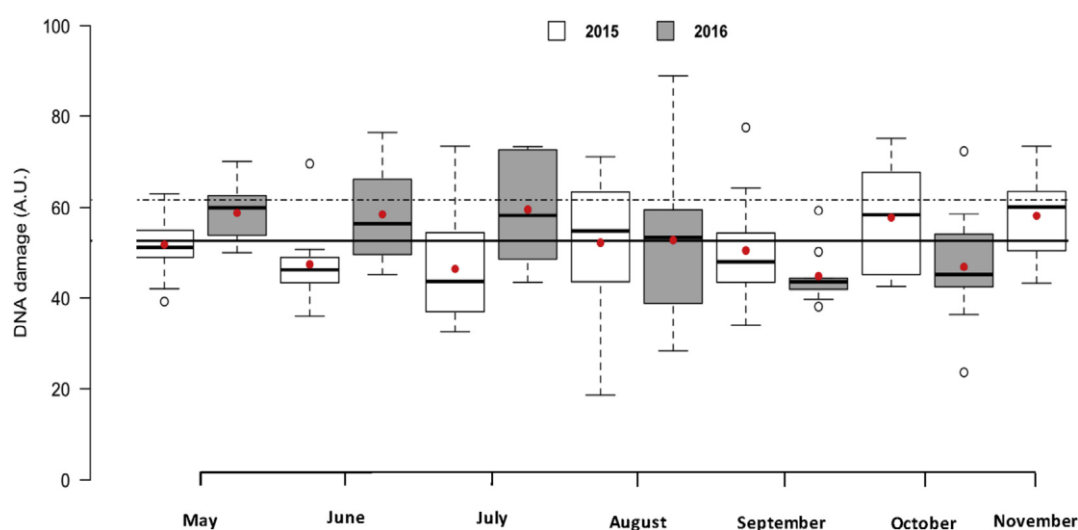


Figure 8. Variabilité naturelle du niveau de dommages à l'ADN spermatique (exprimé en unité arbitraire AU) mesuré chez des spécimens de *Palaemon serratus*, durant la période de fréquentation de la zone intertidale de Mai à Novembre, en 2015 et 2016, sur le site d'Yport. Les résultats sont exprimés en box plot (*i.e.* 2015 en blanc et 2016 en gris) comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles. La moyenne (point rouge) a été ajoutée ($n = 10$). Le trait plein et le trait discontinu représentent respectivement la moyenne et l'intervalle de confiance unilatéral à 95% de l'ensemble des données (Erraud et al., 2018b).

Chez *P. serratus*, le niveau de dommages à l'ADN spermatique a été suivi mensuellement sur des spécimens échantillonnés sur le site d'Yport (*i.e.* une station considérée comme peu contaminée), sur la période de mai à novembre, en 2015 et 2016 (Erraud et al., 2018b ; Fig 8). Les résultats ont révélé une faible variabilité ; ce qui a permis de construire, sur la base de ces données, une distribution de référence décrite par un niveau moyen de dommage de $52,6 \pm 5,6$ U.A. et un intervalle de confiance 95% unilatérale à 61,7 U.A. (pour un $n = 130$). La valeur de l'intervalle de confiance a été proposée comme seuil maximal au-delà duquel un niveau de dommage peut être considéré comme significatif. L'absence de variabilité significative du niveau d'endommagement de l'ADN spermatique avait été rapportée par Lacaze et al. (2011b) chez *Gammarus fossarum*, à l'issue d'un suivi d'un an des deux stations de référence caractérisées par des conditions physicochimiques différentes. Cette étude est, à notre connaissance, la seule qui a étudié la variabilité naturelle de la réponse du test Comet appliqué sur spermatozoïdes. Une absence de variabilité du niveau de dommages au cours de l'année a pareillement été soulignée, mais au sein des hémocytes, chez la moule *Dresseina polymorpha* (Bonnard, communication personnelle). Inversement, d'importantes variations spatio-temporelles du niveau d'endommagement de l'ADN ont été observées au sein des cellules branchiales et/ou des cellules hémolympatiques ou sanguines, chez les

moules du genre *Mytilus*, (Frenzilli et al., 2001 ; Magni et al., 2006 ; Pisanelli et al., 2009) ainsi que chez la limande commune *Limanda limanda* (Akcha et al., 2004 ; Dévier et al., 2013).

Chez l'espèce estuarienne *P. longirostris*, les niveaux de dommages ont été mesurés, sur un même lot d'individus en provenance de la Seine, immédiatement après rapatriement au laboratoire, puis après reformation des spermatophores en milieu sain. Jusqu'à 2 cycles d'extraction/reformation successifs ont pu être ainsi testés. Ces expérimentations ont été qualifiées de 'dépuractive active' (Fig 9). Ces expérimentations ont été menées en période de repos sexuel pour favoriser le renouvellement du spermatophore à partir de spermatozoïdes néoformés (*i.e.* non-exposés à l'état mature suite à un stockage dans le vas déferent). Les résultats ont montré qu'après une première extraction/reformation des spermatophores, le niveau de dommages des spermatozoïdes est passé de 97.5 ± 7.4 à 53.4 ± 8.9 U.A. et est resté constant à l'issue de la seconde extraction/reformation (*i.e.* 57.0 ± 9.1 U.A. ; Fig 10). Le niveau de base atteint chez *P. longirostris* (*i.e.* moyenne de 54.9 U.A. et IC95% de 69.7 UA pour un $n = 29$) était donc parfaitement en accord avec la distribution de référence précédemment décrite chez *P. serratus*. L'intervalle de confiance 95% mesuré chez *P. longirostris* était légèrement supérieur (*i.e.* 8 U.A. soit 5 %) ; ce qui s'explique aisément par le fait qu'il ait été construit à partir d'un nombre d'observations beaucoup plus faible. Aucune démarche équivalente de comparaison inter-espèces du niveau de base des dommages à l'ADN spermatique n'a été décrite dans la littérature. En revanche, Sahlmann et al. (2017) ont comparé les niveaux de la réponse basale du test Comet appliqué de façon standardisée sur des cellules circulatoires de la moule *Mytilus edulis*, du crabe vert *Carcinus maenas*, d'une ascidie marine *Ciona intestinalis*, d'une étoile de mer *Asterias rubens* et de la morue de l'atlantique *Gadus morua*. Ce groupe d'auteurs n'a observé

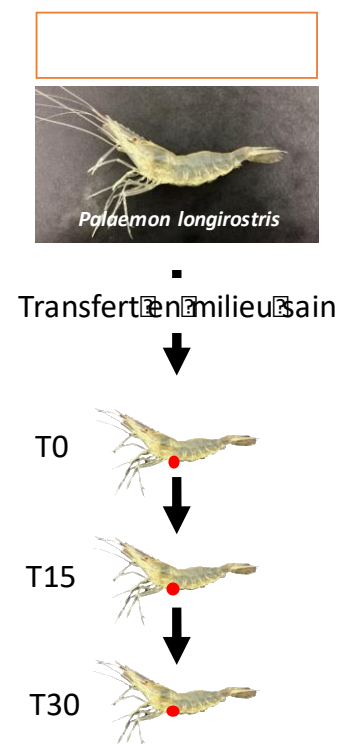


Figure 9 Procédure de dépuractive active de spécimens de *P. longirostris* en provenance la Seine, par renouvellement forcé du spermatophore en milieu contrôlé de laboratoire. **T0** : 1^{ière} extraction pour tous les organismes dès le retour au laboratoire ; **T15** : seconde extraction après la reformation des spermatophores dans l'ampoule terminale après 15 j de maintien en milieu sain ; **T30** : troisième extraction suite à une seconde reformation des spermatophores dans l'ampoule terminale (*i.e.* 30 j de maintien en milieu sain). • : Extraction des spermatophores et test Comet.

aucune différence statistique des niveaux basaux entre les cellules de toutes les espèces étudiées, exceptée l'étoile de mer *A. rubens* qui présentait un niveau basal plus élevé que *G. morhua* et *C. intestinalis*. Les auteurs suggèrent donc qu'une grande partie des variations des niveaux basaux de dommage à l'ADN reflète surtout l'absence d'un protocole standardisé pour la plupart des invertébrés (Dixon, 2002). Leur constat crédibilise d'autant plus la démarche de validation d'un référentiel inter-espèces entreprise dans le cadre de notre étude chez les crevettes *Palaemon* sp.

A l'issue de ces expérimentations, nous avons pris le parti de n'utiliser qu'un seul et même référentiel pour interpréter les niveaux de dommages à l'ADN spermatiques qui pourraient être mesurés chez les deux espèces de Palaemonidae dans le cadre d'un déploiement du marqueur en biosurveillance. Cette stratégie de lecture interspécifique des biomarqueurs est d'autant plus intéressante qu'elle permet de couvrir différentes masses d'eau. Dans le cas présent, elle nous a permis d'établir un diagnostic le long du continuum estuaire-littoral. Il sera toutefois nécessaire de continuer la collecte de 'données références' en favorisant une approche multi-sites (*i.e.* plusieurs populations de référence), tout en continuant d'explorer les possibilités d'inter-comparaisons de la réponse entre espèces.

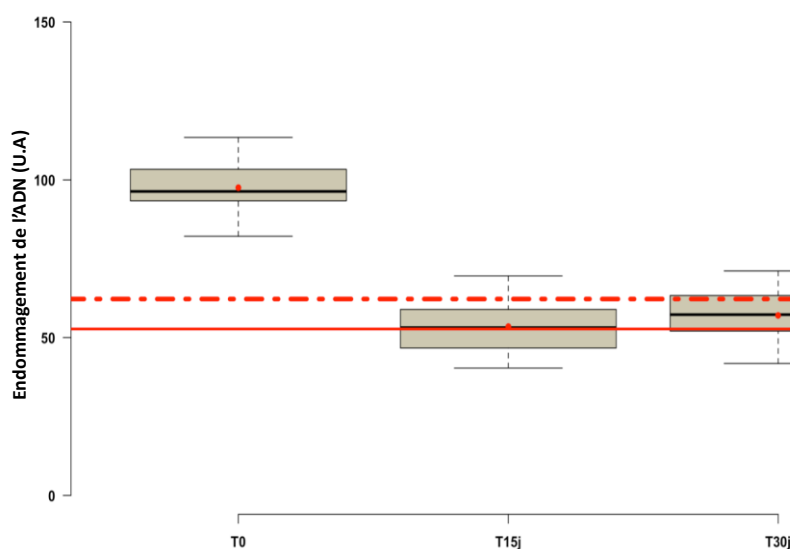


Figure 10 Dommages à l'ADN des spermatozoïdes mesurés à l'aide du test Comet chez des spécimens *Palaemon longirostris* prélevés dans l'estuaire de la Seine après 3 extractions successives de spermatophores réalisées juste avant (T0 ; $n = 17$) et après 15 et 30 jours de stabulations en milieu non contaminé (T15 et T30 ; $n = 17$ et 12). Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles. La moyenne (point rouge) a été ajoutée. La ligne continue et la ligne hachurée représente respectivement la valeur basal et l'intervalle de confiance unilatéral à 95 % déterminée à partir d'une distribution de référence chez *P. serratus* (Erraud, 2018).

3.3.2 Incidence des facteurs confondants

Il pourrait être suspecté que, dans le milieu naturel, et particulièrement dans le biotope de l'estuaire qui présente des fluctuations physico-chimiques considérables, les conditions environnementales puissent avoir une incidence sur le niveau de base d'une réponse biologique ; ce qui pourrait porter à confusion lors de l'interprétation des biomarqueurs. Ces considérations concernent, toutefois, d'avantage les mécanismes de maintien de l'homéostasie (*e.g.* biomarqueurs de défense), que les véritables dommages (*e.g.* les dommages à l'ADN) qui n'apparaissent généralement aux valeurs extrêmes du gradient environnemental. Dans le cas présent, l'effet direct des principaux facteurs de confusion rencontré dans le milieu, tels que la température, la salinité ou l'oxygène dissous, ont été exclu. En effet, l'analyse des données obtenues chez l'espèce littorale *P. serratus* a montré que l'intervalle de température mesuré dans le milieu de vie des crevettes ne semble pas avoir d'influence sur le niveau de base des dommages à l'ADN spermatique (Erraud et al., 2018b ; Fig 11). Un constat similaire a été rapporté chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum* (Lacaze et al., 2011b), excepté durant les pics de chaleur estivaux

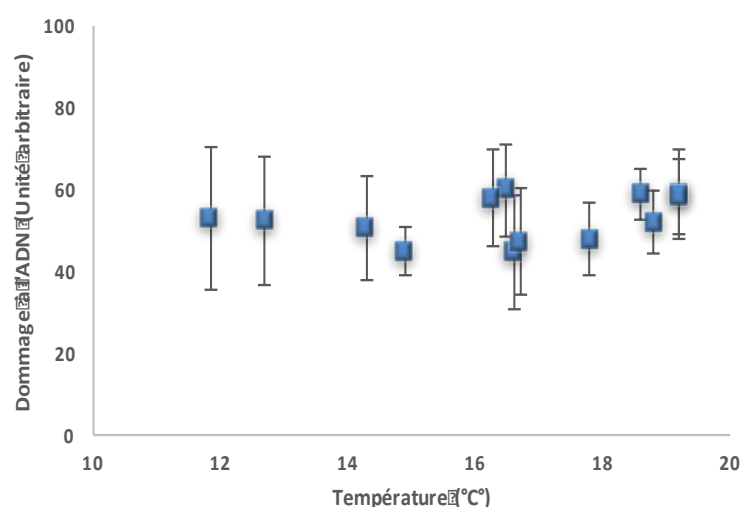


Figure 11 Relation entre la température et les dommages à l'ADN des spermatozoïdes de *Palaemon serratus* échantillonnés à Yport de mai à novembre 2015 et 2016 ($n = 130$) (Erraud et al., 2018b).

durant lesquels la température de l'eau dépasse les 25°C. Concernant la salinité ou le niveau d'oxygène dissous, il n'existe, à notre connaissance, aucune information quant à leur incidence vis-à-vis de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes. Considérant d'autres types cellulaires, Sing et Harlt (2012) n'ont observé aucune influence significative de la salinité sur le

maintien de l'intégrité de l'ADN de cellules branchiales et d'hémocytes de moules *Mytilus edulis* exposées en laboratoire entre 8 et 32 g.L⁻¹. Le niveau d'oxygène dissous a déjà été relié à des dommages à l'ADN au sein de cellules branchiales chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (Liepelt et al., 1995) et de la carpe commune *Cyprinus carpio* (Mustafa et al., 2011) mais seulement au stade hypoxique (*i.e.* < 3 mg.L⁻¹). Au cours de nos différentes

campagnes d'échantillonnage, la plus faible concentration d'oxygène dissous a été observée au printemps (*i.e.* mai 2016) avec des valeurs comprises entre 5,2 et 6,5 mg.L⁻¹, qui ne sont pas considérées comme des valeurs faibles. Ces mesures ponctuelles sont corroborées par les données d'oxygène dissous collectées par le réseau SYNAPSE (*i.e.* surveillance continue des paramètres physico-chimiques de la Seine) qui soulignent l'absence d'épisodes anoxiques au cours des années d'étude (*i.e.* valeurs supérieures à 5 mg.L⁻¹ ; Fig 12).

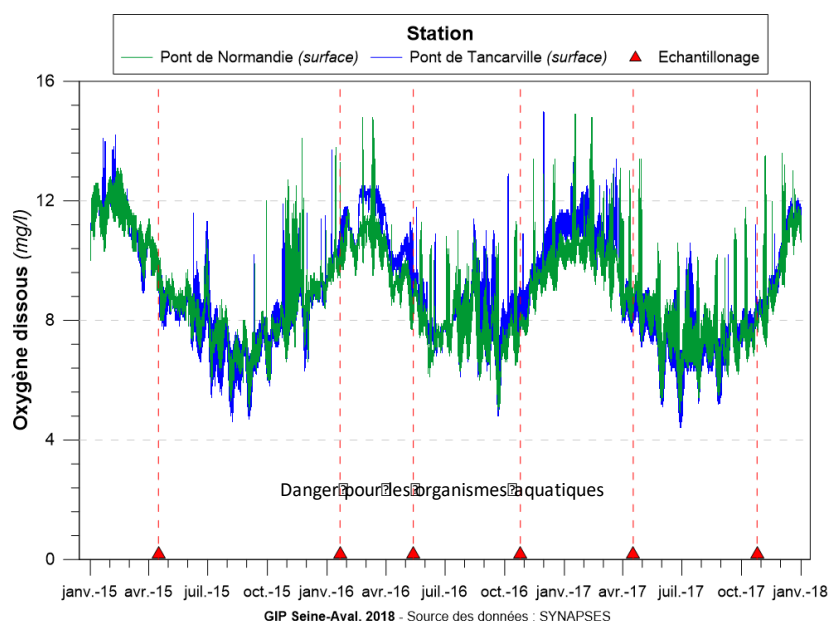


Figure 12 Variabilité de la salinité sur la zone de présence de la crevette *Palaemon longirostris* en estuaire de Seine durant les campagnes d'échantillonnage du printemps 2015 à l'automne 2017. Les données sont issues du programme SYNAPSE (Source C. Fisson).

Par ailleurs, l'analyse des données que nous avons pu collectées au cours de ces dernières années, nous permettent d'écarter l'influence de caractères intrinsèques aux organismes tels que l'âge/la taille des organismes ou encore du stade de mue (Fig 13,14).

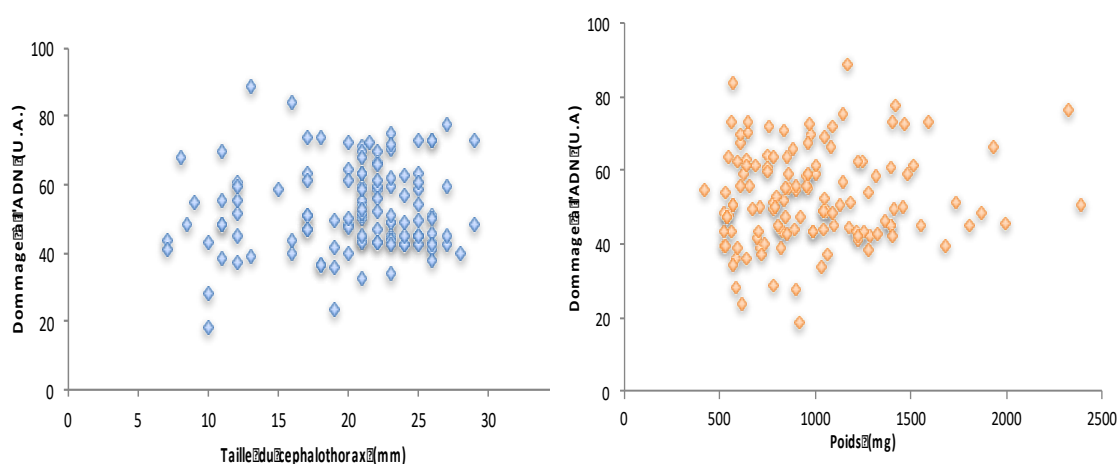


Figure 13 Relation entre la taille du céphalothorax (à gauche), le poids (à droite) et l'intégrité de l'ADN spermatique de crevettes mâles *Palaemon serratus* provenant d'Yport (*i.e.* site de référence) prélevées de mai à novembre 2015 et 2016 ($n = 130$) (Erraud et al., 2018b).

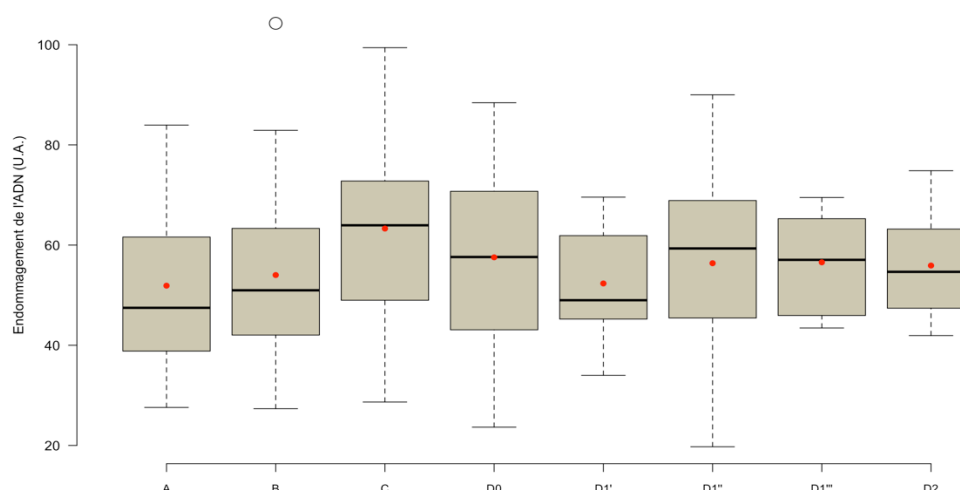


Figure 14 Relation entre le stade de mue et l'intégrité de l'ADN spermatique de crevettes *Palaemon serratus* échantillonnées de mai à novembre 2015 et 2016 ($n = 130$ organismes). Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles. La moyenne (point rouge) a été ajoutée (Erraud et al., 2018b).

3.4 Focus sur l'intégrité de l'ADN spermatique au sein de la population de *Palaemon longirostris* de l'estuaire de la Seine.

Il était indispensable de s'attarder sur les prérequis précédemment énoncés (*c.f.* sections 3.1, 3.2 et 3.3) pour apprécier pleinement les résultats du suivi effectué dans le cadre du projet ECOTONES. Pour rappel, les niveaux de dommage à l'ADN ont été mesurés sur des spécimens de *P. longirostris* collectés sur un maximum de 7 stations le long du gradient de salinité de l'estuaire de la Seine, entre le pont de Normandie et le pont de Tancarville, en avril 2015, janvier 2016, juin 2016, octobre 2016, avril 2017, et octobre 2017 (*c.f.* section 2.2). Les résultats de ce suivi sont illustrés par la figure 15. De forts niveaux de dommages à l'ADN spermatiques des crevettes ont été caractérisés sur l'ensemble des stations étudiées durant les 6 campagnes. Les niveaux d'endommagements les plus faibles ont été observés au printemps 2015, et au automnes 2016 et 2017, avec des moyennes respectives de 96.8 ± 16.8 , 99.0 ± 7.7 et 88.7 ± 21.7 U.A. (*i.e.* 56.8, 60.5 et 43.8 % au-dessus du seuil de significativité de 61.7 U.A. décrit en section 3.3.1). A l'inverse, les plus forts niveaux d'endommagements ont été observés en hiver 2016 et aux printemps 2016 et 2017 avec des moyennes respectives de 135.2 ± 11.1 , 137.4 ± 28.2 et 129.3 ± 21.7 U.A., (*i.e.* 119.1, 122.7 et 109.6 % au-dessus du seuil de significativité). Par ailleurs, une variabilité significative entre les stations de prélèvement a été observée à chaque printemps, ce qui n'était pas le cas

durant le prélèvement d'hivers et en automne. Globalement, l'effet de la saisonnalité sur les niveaux de dommages est ressorti de façon très significative (*i.e.* test de Scheirer-Ray-Hare ; $p = 2.220446 \times 10^{-16}$). Dans l'état actuel des connaissances relatives à l'hydro-sédimentologie et à la contamination de l'estuaire de la Seine (*i.e.* données générées à des fréquences spatiales et temporelles plus grandes), l'interprétation fine de ces fluctuations reste quelque peu spéculative. A titre d'exemple, les niveaux les plus élevés d'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes de *P. longirostris* observés en janvier 2016, mai 2016 et avril 2017 pourraient s'expliquer par la période des hautes eaux (*i.e.* de décembre à avril) et par conséquent par une charge accrue de contaminant drainés par le lessivage des sols. Quoiqu'il en soit, il semble important de considérer la saison et la localisation des stations étudiées. L'acquisition de données sur le long terme pourrait permettre d'acquérir une meilleure compréhension de ces variations spatiales et temporelles et conduire vers une stratégie de surveillance la plus pertinente possible.

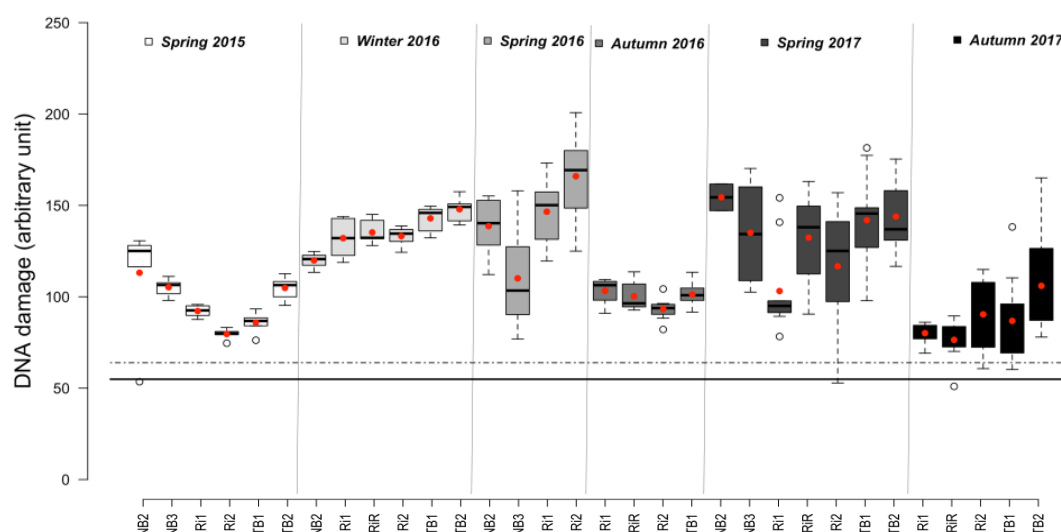


Figure 15 Dommage à l'ADN des spermatozoïdes mesurés à l'aide du test Comet chez des spécimens *Palaemon longirostris* prélevés sur un maximum de 7 stations, le long de la partie aval de l'estuaire de la Seine (*i.e.* entre le pont de Normandie et le pont de Tancarville) durant 6 campagnes (*i.e.* Avril 2015, Janvier 2016, Juin 2016, Octobre 2016, Avril 2017, et Octobre 2017). Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles. La moyenne (point rouge) a été ajoutée. La ligne continue et la ligne hachurée représente respectivement la valeur basal et l'intervalle de confiance unilatéral à 95 % déterminée à partir d'une distribution de référence (*c.f.* section 3.3.1) (Erraud, 2018).

In fine, disposant d'une valeur de base (*i.e.* 52.6 U.A.), d'un seuil de significativité (*i.e.* 61.7 U.A.) et d'un seuil effectif théorique (*i.e.* 100 U.A.), et ayant évalué l'influence des principaux facteurs confondant, nous disposons de tous les prérequis pour intégrer nos

données dans une approche *Weight-Of-Evidence* (WOE ; détaillée en Annexe 11). Cette approche permet de définir un quotient de risque et une classe de risque pour chaque variable considérée ; ce qui permet d'apprécier de façon très pragmatique le niveau d'effet retranscrit par la réponse du biomarqueur sur une échelle de 5 (*i.e.* absent, léger, modéré, majeur et sévère). Il devient alors possible d'intégrer les mesures de différents biomarqueurs, avec celles de bioessais, d'indices biocénotiques et/ou d'analyses chimiques pour une évaluation globale du risque environnemental, tout aussi claire et rapide à apprécier. Si l'on considère, ici, uniquement les dommages à l'ADN spermatique chez la crevette blanche, il en ressort en moyenne un effet sévère pour chacune des 6 campagnes réalisées.

3.5 Au-delà d'ECOTONES - La mesure de l'intégrité de l'ADN spermatique chez les *Palaemonidae* le long du continuum estuaire / littoral de la Baie de Seine

Parallèlement au suivi de la population de *Palaemon longirostris* de l'estuaire de Seine orchestré par ECOTONES, des campagnes de suivi de l'espèce littorale *P. serratus* ont été menées chaque automne le long du littoral de la Baie de Seine. Plus ponctuellement, l'occasion nous a été donnée de suivre la population de *P. longirostris* de l'Orne ou encore une population de *Palaemonetes varians* des Havres du Cotentin. Toutes ces données ont été interprétées au regard des valeurs de référence (*i.e.* valeur de base, seuil de significativité et seuil effectif), avec une classification des niveaux de gravité selon l'approche *Weight-Of-Evidence*, comme précédemment cité. Les cartes suivantes retranscrivent une compilation des données (Fig 16). La cartographie de l'imprégnation génotoxique retranscrit par ces résultats est très cohérente avec le gradient géographique de contamination de la Baie de Seine, bien marqué et relativement bien caractérisé (*i.e.* notamment par le Réseau d'Observation de la Contamination CHimique piloté par l'Ifremer). Globalement, les niveaux d'endommagement maximums ont été observés chez l'espèce estuarienne, *P. longirostris* (*c.f.* section 3.4), avec des valeurs relativement équivalentes entre l'estuaire de la Seine et l'estuaire de l'Orne (*i.e.* prélèvement de septembre 2017 ; 109.4 ± 31.5 U.A.). Chez *P. serratus*, les stations les moins exposées au panache sédimentaire de la Seine (*i.e.* Senneville-sur-Fécamp, Yport au Nord, Vers-sur-mer et Longues-sur-mer au Sud), ont présenté des niveaux de dommages sous le seuil de significativité, en 2016 et 2017, démontrant rétrospectivement la robustesse spatiale de la distribution de référence. En

revanche, les stations sous l'influence du panache sédimentaire, situées au nord entre l'embouchure de l'estuaire et la digue d'Antifer (*i.e.* Cap de la Hève ; Octeville-sur-mer et Antifer Sud), ont révélé des dommages relativement importants de l'ADN allant de 17.0 à 37.7 % d'induction au-delà du seuil de significativité, en 2016 et 2017. Un niveau record de 156.63 ± 56.0 U.A. (*i.e.* 153.8 % au-dessus du seuil de significativité) a toutefois été enregistré au niveau du site du Cap de la Hève en 2017. En effet, en considérant plus spécifiquement la tendance chronologique entre les 3 années, il peut être constaté que 2015 et 2016 présente sensiblement le même profil. En revanche, l'empreinte génotoxique enregistrée en 2017 au niveau du littoral de la Baie était plus prononcée que les années précédentes. Même les sites les plus excentrés ont présenté un signal positif cette année-là. En revanche, cette tendance n'a pas été mise en évidence au sein de la population de *P. longirostris* de l'estuaire de la Seine qui présente des niveaux d'altération plus ou moins constant sur les 3 automnes.

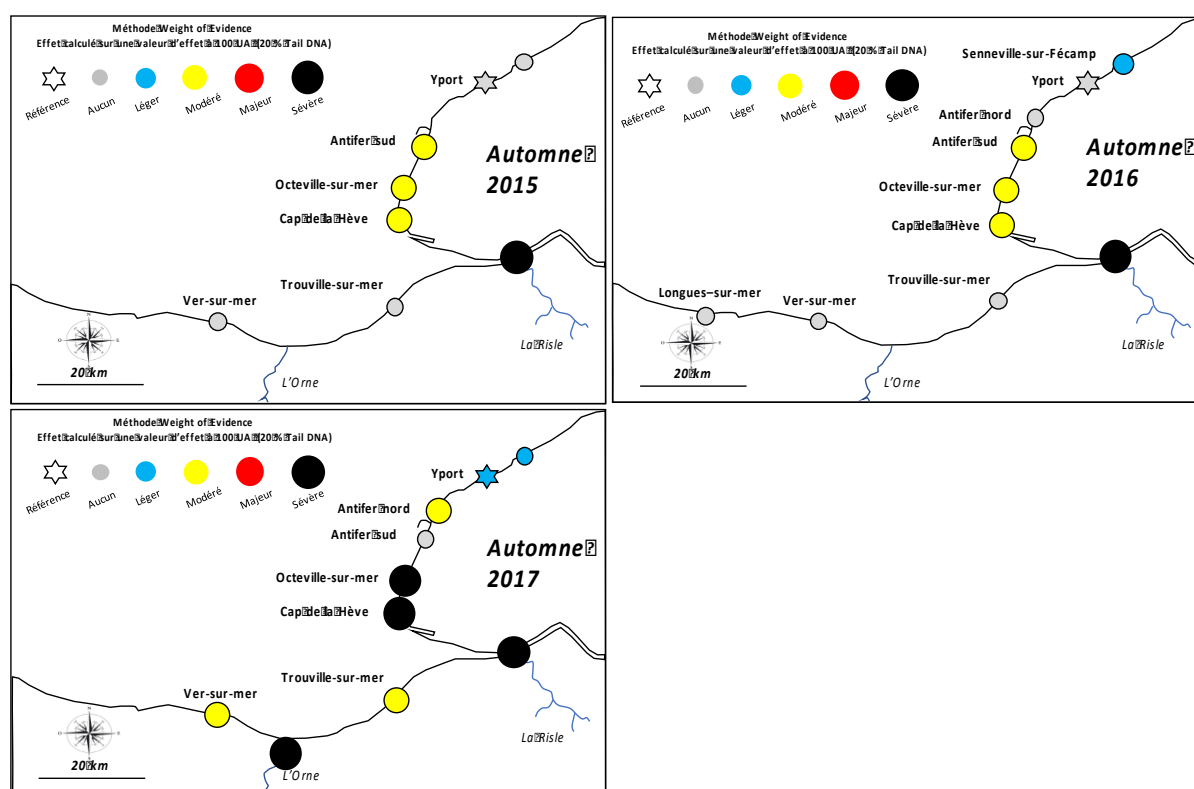


Figure 16 Cartographie du niveau d'empreinte génotoxique de l'ADN spermatique de *Palaemon* sp (*i.e.* *P. serratus*) sur le littoral et *P. longirostris* en estuaire de Seine et de l'Orne) enregistré le long du continuum estuaire / littoral en 2015, 2016 et 2017. Les niveaux de gravité ont été obtenus via l'approche WOE (*c.f.* Annexe 11).

De façon plus anecdotique, les spécimens de *Palaemonetes varians* prélevés au printemps 2017 dans les Havre du Cotentin, atteignaient le degré d'endommagement 'sévère' avec une moyenne de 141.3 ± 33.4 U.A. (*i.e.* 119.0 % au-dessus du seuil de significativité ; résultats non illustrés).

4 Conclusion

En définitive, la mesure de l'intégrité à l'ADN spermatique chez les Palaemonidea présente un très fort potentiel pour l'application en surveillance environnementale. Le recul sur expérience a montré, que la méthodologie était relativement simple à déployer. La toxodynamique de la réponse a bien été décrite soulignant le caractère intégrateur et par conséquent informatif du marqueur. Des valeurs de références (*i.e.* ligne de base, seuil de significativité, seuil théorique effectif) ont été caractérisées. Le marqueur répond ainsi à l'ensemble des prérequis nécessaires pour garantir une interprétation claire de sa réponse. Par ailleurs, la transférabilité de l'outil entre espèces de différentes masses d'eau lui confère une véritable plus-value, dans une perspective de surveillance du continuum continent/littoral.

Bien évidemment, l'effort d'investigation doit être maintenu pour continuer d'affiner l'interprétation du marqueur. La compréhension de la variabilité naturelle de la réponse et de l'influence des facteurs confondant pourra être précisée. La pertinence des valeurs de références doit être éprouvée à une échelle plus grande que la Baie de Seine. Enfin, les répercussions d'une altération de l'ADN spermatique sur la qualité du recrutement doivent être étudiées pour permettre de définir un seuil effectif plus précis.

Par ailleurs, il serait intéressant d'évaluer le potentiel de transférabilité de la méthode vers d'autres espèces de crevettes représentatives de biotopes variés (*e.g.* *Palaemonetes varians* présente dans les petits canaux de faible salinité, ou *Crangon crangon* qui peuple les étendus de sable, notamment en sortie d'estuaires). Cette réflexion de comparaison inter-espèce pourrait également être abordée dans une perspective de repositionnement du modèle crevette Palaemonidae, vis-à-vis d'autres modèles régulièrement proposés dans le cadre d'actions de surveillance environnementale. Il pourrait notamment être pertinent d'inter-comparer la sensibilité et d'inter-calibrer les niveaux de réponse, en laboratoire,

entre différents groupes taxonomiques (*e.g.* crevettes, bivalves, poissons) rattachés aux mêmes masses d'eau (*i.e.* estuariennes, littorales). Cela permettrait dans un second temps, dans le cadre d'approches de terrain, d'estimer le degré de complémentarité entre les modèles ou, au contraire, de choisir le modèle le plus représentatif pour évaluer le potentiel génotoxique du milieu. Dans une autre perspective, un travail d'inter-comparaison et d'inter-calibration mené vis-à-vis du gammare (*i.e.* actuellement, le modèle crustacé le plus utilisé en milieu continental) permettrait potentiellement de proposer une méthodologie d'évaluation de la génotoxicité des masses d'eau le long du continuum bassin versant / estuaire / littoral. Ces dernières questions ont été adressées dans le cadre de deux nouveaux projets : le projet SASHIMI (*i.e.* Surveillance active de l'impact de la pression chimique par des biomarqueurs) financé par l'Agence Française de la Biodiversité et le projet Biosurveillance (*i.e.* Proposition d'un pilote basé sur l'utilisation de biomarqueurs pour un appui à la surveillance de la qualité des masses d'eau du district Seine-Normandie) en cours d'évaluation par l'Agence de l'Eau Seine-Normandie.

5 Valorisations des travaux

Manuscrit de thèse

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).

Publications scientifiques de rang A

Erraud A., Bonnard M., Duflot A., Geffard A., Danger J. M., Forget-Leray J., Xuereb B. (2017). Assessment of sperm quality in palaemonid prawns using Comet assay: methodological optimization. *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (12), 11226-11237.

Erraud A., Bonnard M., Chaumot A., Geffard O., Duflot A., Forget-Leray J., Le Foll F., Geffard A., Xuereb B. (2018). 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 research*. 132, 124 – 134.

Erraud A., Bonnard M., Geffard O., Coulaud R., Poret A., Duflot A., Le Foll F., Geffard A., Forget-Leray J., Xuereb B. Signification of DNA integrity in sperm of *Palaemon serratus* (Pennant 1777) : kinetic responses and reproduction impairment (in submission).

Erraud A., Bonnard M., Geffard O., Chaumot A., Duflot A., Geffard A., Forget-Leray J., Xuereb B. Assessment of sperm DNA integrity within the *Palaemon longirostris* (H. Milne-Edward, 1837) population of the Seine Estuary (under review in *Environmental Pollution*).

Communications orales

- Erraud A., Xuereb B., Duflot A., Danger J.-M., Geffard A., Forget-Leray J., Bonnard M. Évaluation de l'atteinte à la fertilité chez les crustacés mâles en milieux anthropisés. – Colloque international Franco-Quebecois ECOBIM – 30 juin-1er Mars, 2016 – Le Havre, France.
- Erraud A., Bonnard M., Duflot A., Geffard A., Geffard O., Forget-Leray J., Xuereb B. Assesment of DNA integrity of Palaemonidae spermatozoa using the alkaline Comet assay: a pertinent tool for environmental biomonitoring – SETAC Europe – 27th annual meeting, 7 – 11 May 2017 – Brussels, Belgium.
- Erraud A., Bonnard M., Geffard O., Chaumot A., Geffard A., Forget-Leray J., Xuereb B. Développement d'un biomarqueur de qualité spermatique chez les crevettes Palaemonidae : État des lieux en Baie de Seine. Colloque annuel du GIP Seine aval – 22-23 Juin, 2017 Rouen, France.
- Erraud A., Bonnard M., Geffard O., Chaumot A., Geffard A., Forget-Leray J., Xuereb B. Développement d'un biomarqueur de qualité spermatique chez les crevettes Palaemonidae : État des lieux en Baie de Seine. Colloque annuel de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée - 29-30 Juin, 2017 - Reims, France.
- Erraud A., Bonnard M., Geffard O., Chaumot A., Geffard A., Forget-Leray J., Xuereb B. Développement d'un biomarqueur de qualité spermatique chez les crevettes Palaemonidae : État des lieux en Baie de Seine. Colloque annuel de la Fédération de recherche SCALE – 27 Septembre, 2017 – Le Havre, France.

Posters

- Erraud A., Bonnard M., Duflot A., Forget-Leray J., Xuereb B. Évaluation de l'atteinte à la fertilité chez les crustacés mâles en milieux anthropisés. Séminaire annuel de la Fédération de Recherche SCALE - 23 juin, 2015 - Le Havre, France.
- Erraud A., Bonnard M., Duflot A., Danger J.-M., Forget-Leray J., Xuereb B. Evaluation de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes de crevettes *Palaemon* sp au moyen du test Comet : développement. Séminaire annuel de la Fédération de Recherche SCALE – 10 Mars, 2016 - Rouen, France.
- Erraud A., Bonnard M., Danger J.-M., Forget-Leray J., Xuereb B. Evaluation de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes de crevettes *Palaemon* sp au moyen du test Comet : un outil pertinent pour la surveillance environnementale. Séminaire annuel de la Fédération de Recherche SCALE – 10 Mars, 2016 - Rouen, France.
- Erraud A., Xuereb B., Duflot A., Danger J.-M., Forget-Leray J., Bonnard M. Genotoxicity assessment in the spermatozoa of the common prawn *Palaemon serratus* using the alkaline Comet assay - SETAC Europe – 26th annual meeting, 22-26 May 2016 - Nantes, France.
- Erraud A., Bonnard M., Duflot A., Danger J.-M., Forget-Leray J., Xuereb B. Evaluation de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes de crevette *Palaemon* sp au moyen du test Comet : développement. Séminaire annuel de la Fédération de Recherche SCALE - 23 juin, 2016 - Rouen, France.
- Erraud A., Bonnard M., Duflot A., Danger J.-M., Forget-Leray J., Xuereb B. Evaluation de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes de crevettes *Palaemon* sp au moyen du test Comet : développement. Colloque annuel de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée – 29-30 Juin, 2016 - Reims, France.
- Erraud A., Bonnard M., Danger J.-M., Forget-Leray J., Xuereb B. Evaluation de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes de crevettes *Palaemon* sp au moyen du test Comet : un outil pertinent pour la surveillance environnementale. Colloque annuel de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée – 29-30 Juin, 2016 - Reims, France.
- Erraud A., Xuereb B., Duflot A., Danger J.-M., Forget-Leray J., Bonnard M. Assessment of sperm quality in palaemonid prawns using Comet assay: methodological optimization. – SETAC Europe – 27th annual meeting, 7 – 11 May 2017 – Brussels, Belgium.
- Erraud A., Bonnard M., Chaumot Arnaud., Geffard Alain., Geffard Olivier., Forget-Leray J., Xuereb B. Assessment of sperm quality using the Comet assay: from its optimization until its deployment on the field. – PRIMO Japan – 19th annual meeting, 30 June – 3 July 2017 – Matsuyama, Japan.

Bibliographie

- Aitken, R.J., Koopman, P., Lewis, S.E.M., 2004. Seeds of concern. *Nature*. 432, 48–52.
- 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.
- Anderson, G., 1985. Species Profiles. Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fishes and Invertebrates (Gulf of Mexico). Grass Shrimp. US Fish Wild Serv Biol Rep. 82, 11–35.
- Aurousseau, J. M., 1984. Éléments d'écologie de la crevette blanche, *Palaemon longirostris*, dans l'estuaire de la Gironde. Dynamique de la population et de la production (Thèse de doctorat, Biologie Animale mention Écologie, Université Paris VI, Paris, France).
- Azqueta, A., Meier, S., Priestley, C., Gutzkow, K.B., Brunborg, G., Collins, A., 2011. The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. *Mutagenesis*. 26, 393–399.
- Béguer, M., Bergé, J., Girardin, M., Boët, P., 2010. Reproductive Biology of *Palaemon longirostris* (Decapoda: Palaemonidae) from Gironde Estuary (France), with a Comparison with Other European Populations. *J. Crustac. Biol.* 30, 175–185.
- Braga, A., Nakayama, C.L., Poersch, L., Wasielesky, W., 2013. Unistellate spermatozoa of decapods: Comparative evaluation and evolution of the morphology. *Zoomorphology*. 132, 261–284.
- Campillo, A., 1979. Contribution a l'étude de l'élevage de la crevette rose *Palaemon serratus* (Pennant) en captivité. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.* 39, 381–393.
- Chow, S., 1982. Artificial insemination using preserved spermatophores in the palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 48(12), 1693–1695.
- Collins, A., Dušinská, M., Franklin, M., Somorovská, M., Petrovská, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Rašlová, K., Vaughan, N., 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. *Environ. Mol. Mutagen.* 30, 139–146.
- Collins, A., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26, 249–261.
- 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.
- Devaux, A., Fiat, L., Gillet, C., Bony, S., 2011. Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquat. Toxicol.* 101, 405–411.
- Dévier, M.H., Le Dû-Lacoste, M., Akcha, F., Morin, B., Peluhet, L., Le Menach, K., Burgeot, T., Budzinski, H., 2013. Biliary PAH metabolites, EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from Seine Estuary (France). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 708–722.
- Dixon, D.R., 2002. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis*. 17, 495–507.
- Drach, P., 1944. Étude préliminaire sur le cycle d'inter mue et son conditionnement hormonal chez *Leander serratus* (Pennant). *Bull. Biol. Fr. Belg.* 78, 40–62.
- 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., Duflot, A., Geffard, A., Danger, J.-M., Forget-Leray, J., Xuereb, B., 2018a. Assessment of sperm quality in palaemonid prawns using Comet assay: methodological optimization. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25 (12), 11226–11237.
- Erraud, A., Bonnard, M., Chaumot, A., Geffard, O., Duflot, 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.
- Ford, A.T., Martins, I., Dunn, A.M., 2012. Insights into sperm-fertilisation relationships in the Arthropoda with ecological significance modelled in an amphipod. *Invertebr. Reprod. Dev.* 56, 50–56.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat. Res.* 681, 80–92.
- García, O., Mandina, T., Lamadrid, A.I., Diaz, A., Remigio, A., Gonzalez, Y., Piloto, J., Gonzalez, J.E., Alvarez, A., 2004. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 556, 25–34.
- 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.
- Key, P.B., Wirth, E.F., Fulton, M.H., 2006. A review of grass shrimp, *Palaemonetes* sp., as a bioindicator of anthropogenic impacts. *Environ. Bioindic.* 1, 115–128.
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Jha, A.N., 2009. Comet Assay measurements: A perspective. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 53–64.
- Lacaze, E., Geffard, O., Bony, S., Devaux, A., 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 700, 32–38.
- Lacaze, E., Devaux, A., Jubeaux, G., Mons, R., Gardette, M., Bony, S., Garric, J., Geffard, O., 2011a. DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure: Intrinsic variability and reference level. *Sci. Total Environ.* 409, 3230–3236.
- 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.
- Lacaze, E., Geffard, O., Goyet, D., Bony, S., Devaux, A., 2011c. Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. *Environ. Res.* 111, 626–634.
- Lewis, C., Galloway, T., 2009. Reproductive consequences of paternal genotoxin exposure in marine invertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 43, 928–933.
- Liepelt, A., Karbe, L., Westendorf, J., 1995. Induction of DNA strand breaks in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under hypoxic and hyperoxic conditions. *Aquat. Toxicol.* 33, 177–181.
- Magni, P., De Falco, G., Falugi, C., Franzoni, M., Monteverde, M., Perrone, E., Sgro, M., Bolognesi, C., 2006. Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). *Environ. Pollut.* 142, 65–72.
- Moller, P., Knudsen, L.E., Loft, S., 2000. The Comet Assay as a Rapid Test in Biomonitoring Occupational Exposure to DNA-damaging Agents and Effect of Confounding Factors. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers.* 9(10), 1005–1015.
- Mustafa, S.A., Al-Subiai, S.N., Davies, S.J., Jha, A.N., 2011. Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Ecotoxicology.* 20, 1455–1466.
- Pisanelli, B., Benedetti, M., Fattorini, D., Regoli, F., 2009. Seasonal and inter-annual variability of DNA integrity in mussels *Mytilus galloprovincialis*: A possible role for natural fluctuations of trace metal concentrations and oxidative biomarkers. *Chemosphere.* 77, 1551–1557.
- Poljaroen, J., Vanichviriyakit, R., Tinikul, Y., Phoungpetchara, I., Linthong, V., Weerachatanukul, W., Sobhon,

- P., 2010. Spermatogenesis and distinctive mature sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Zool. Anz.* 249, 81–94.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Sahlmann, A., Wolf, R., Holth, T.F., Titelman, J., Hylland, K., 2017. Baseline and oxidative DNA damage in marine invertebrates. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A.* 80, 807–819.
- Santos, R., Palos-Ladeiro, M., Besnard, A., Reggio, J., Vulliet, E., Porcher, J.M., Bony, S., Sanchez, W., Devaux, A., 2013. Parental exposure to methyl methane sulfonate of three-spined stickleback: Contribution of DNA damage in male and female germ cells to further development impairment in progeny. *Ecotoxicology.* 22, 815–824.
- Singh, R., Hartl, M.G.J., 2012. Fluctuating estuarine conditions are not confounding factors for the Comet assay assessment of DNA damage in the mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology.* 21, 1998–2003.
- Yang, G., Kille, P., Ford, A.T., 2008. Infertility in a marine crustacean: Have we been ignoring pollution impacts on male invertebrates? *Aquatic Toxicology.* 88, 81–87.
- Webb, D., Gagnon, M.M., 2013. Depurated fish as an alternative reference for field-based biomarker monitoring. *Environ. Monit. Assess.* 185, 1331–1340.
- 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.



Annexes 6

Rapport Seine-Aval 5

Acronyme du projet : ECOTONES

Coordinateur : Benoit Xuereb

Tache 1. Evaluation des effets de la contamination sur la faune aquatique (responsable Benoit Xuereb)

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

Frank Le Foll, Tiphaine Monsinjon, Matthieu Paiola, Aurélie Duflot,
Houssem Chalghmi, Agnès Poret - UMR-I02 / SEBIO-ULHN

1 Contexte

L'immunité est particulièrement sensible aux facteurs environnementaux (Wong et al. 1992, Fournier et al. 2000). Des perturbations d'origine anthropique, à modalité d'action chimique ou physique, peuvent altérer les fonctions immunitaires et être à l'origine d'une augmentation de la sensibilité des hôtes aux maladies virales, bactériennes et parasitaires ainsi qu'aux tumeurs (Wong et al. 1992, Krzystyniak et al. 1995, Zelikoff et al. 2000). Les perturbations majeures de l'immunité provoquent rapidement une augmentation de la morbidité pouvant aller jusqu'à la mortalité. Ils sont néanmoins souvent précédés de changements subtils des fonctions immunitaires pouvant être utilisés comme des biomarqueurs précoces d'atteinte immunotoxique (Galloway and Depledge 2001, Van der Oost et al. 2003). Parmi l'ensemble des immunomarqueurs existant, l'activité de phagocytose, mécanisme cellulaire central d'élimination bactéries chez les poissons (à travers les leucocytes) et les bivalves (à travers les hémocytes), apparaît comme centrale car fortement modifiée par les xénobiotiques (Bols et al. 2001).

2 Présentation des modèles biologiques

2.1 Le bar *Dicentrarchus labrax*

Taxinomie et répartition. Le bar commun ou bar européen (*Dicentrarchus labrax*), surnommé loup de mer, est une espèce de poissons principalement marins qui entrent parfois en eau saumâtre et en eau douce, appartenant à la famille des moronidés. On le trouve tout autour et à l'intérieur de l'Europe, y compris à l'est de l'océan Atlantique, en mer Méditerranée et en mer Noire. Le bar est présent sur la totalité du littoral français, Mer du Nord, Manche, Atlantique et Méditerranée et dans les cours d'eau communiquant avec la mer.

Le bar est une espèce à la fois benthique et pélagique qui fréquente les plages, les zones rocheuses, battues par les vagues, riches en oxygène et en nourriture. C'est un poisson très résistant aux variations de salinité : c'est pourquoi on le trouve aussi dans les anses ou les ports et même très loin dans les eaux saumâtres des estuaires.

Physiologie. Le bar est ovipare. Il n'existe aucune caractéristique permettant de différencier les 2 sexes par une simple observation en l'absence d'un dimorphisme sexuel apparent. On le trouve dans des zones plus au large en période de reproduction. La femelle des populations de l'Atlantique atteint sa maturité sexuelle vers 5-6 ans. Elle mesure alors environ 40-42 cm selon les zones. Les mâles sont matures autour de 36-38 cm. En Méditerranée, la maturité sexuelle est plus précoce : au cours de la 3e année pour les femelles (37 à 40 cm) et au cours de la 2e année pour les mâles (28 à 30 cm).

En France, les pontes se déroulent de décembre à mars en Méditerranée, de janvier à mars sur la côte Atlantique, mars à mai pour la Manche, et avril à mai/juin pour la mer du Nord. La ponte a lieu en pleine eau. Les femelles sont à ce moment le plus souvent accompagnées par 2 mâles qui fécondent les œufs. Une femelle ne pond qu'une seule fois par an. Une femelle ne pond pas systématiquement chaque année.

Des stocks en danger critique Le bar se regroupe en frayère au large des côtes et plus en profondeur, de janvier à mars dans le golfe de Gascogne, d'avril à juin dans le sud de la mer du Nord et de mars à mai dans les zones intermédiaires. Pendant cette période, en raison de ces concentrations, cette espèce est particulièrement ciblée par les pêcheurs. Les

scientifiques considèrent que 4 stocks de bar évoluent en Atlantique Nord-Est (Nord du 48^e parallèle, Sud du 48^e parallèle, eaux ibériques et Ouest Écosse).

Le stock Nord, couvrant la mer Celtique, la Manche, la mer d'Irlande et la mer du Nord présente, depuis 2005, des signes de décroissance de la biomasse reproductive due à une surexploitation intensive dans la zone (effort de pêche deux fois et demi supérieur au niveau optimum). Une évaluation scientifique en 2014 a mis en évidence le besoin de diminuer drastiquement l'effort de pêche pour assurer un retour à des conditions d'exploitation durable. 1 295 tonnes de prises commerciales ont été débarquées en 2016 et les prises issues de la pêche récréative sont estimées à 1 627 tonnes supplémentaires. Le stock est susceptible de continuer à diminuer à court terme en raison d'un recrutement faible de juvéniles dans le stock de reproducteurs ce qui va diminuer les capacités de reproduction du stock dans les années à venir. Les scientifiques ont recommandé depuis 2014 l'arrêt de la pêche du bar dans cette zone. En janvier 2016, l'Union Européenne, qui s'appuie sur le rapport du *Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM)*, a mis en place une nouvelle réglementation sévère depuis janvier 2016, qui s'applique en Normandie. En pêche loisir, il était interdit de pêcher le bar du 1^{er} janvier au 30 juin 2016. De juillet à décembre 2016, les pêcheurs sont autorisés à prendre un bar par pêcheur et par jour seulement, avec une taille minimale de 42 cm.

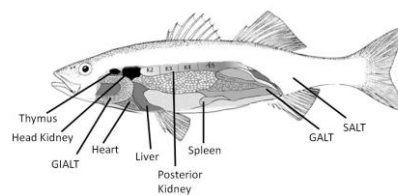
Intérêt en biosurveillance. *D. labrax*, ou bar commun, est un modèle de choix en biosurveillance car (i) de par ses traits de vie, le bar juvénile a la particularité de passer près de 3 ans en milieu estuarien, milieu fortement impacté par les activités d'anthropisation comme celui de la Seine. De plus, (ii) avec une production aquacole de près de 126 000 tonnes en 2010 (Sanchez-Vasquez et al, 2015), et dans le contexte d'une diminution des stocks de ce poisson non uniquement imputable à une surpêche, le bar représente un intérêt économique très important. Enfin, (iii) au regard de sa position dans l'échelle trophique, ce poisson qui est principalement carnivore a une forte capacité de bioaccumulation des polluants.

Immunocompétence. Le système immunitaire exerce la fonction physiologique de défense, d'une part contre des agents étrangers à l'organisme, en se basant sur sa capacité de discriminer le « soi » et du « non-soi », mais aussi en assurant une surveillance interne et en contrôlant des cellules anormales (*e.g.* endommagées ou mourant de façon incontrôlée). Le

système immunitaire de *D. labrax*, s'appuie sur une composante innée ancestrale et une composante adaptative, de façon très similaire à ce qui existe chez l'Homme.

L'immunité innée, décrite comme rapide et non spécifique, est la première ligne de défense contre les pathogènes. Elle est à l'origine des premières réponses immunitaires menant à la destruction du pathogène (e.g. activation du complément, mise en place de l'inflammation, activation de la phagocytose et burst oxydatif). L'immunité innée est dite non-spécifique car seuls les motifs pathogènes généraux et ayant été conservés au cours de l'évolution sont reconnus. Lorsque l'immunité innée n'est plus suffisante pour enrayer l'infection, l'immunité adaptative est activée par les cytokines libérées lors de l'inflammation.

L'efficacité accrue de cette seconde composante immunitaire repose sur les principaux acteurs de l'immunité adaptative que sont les lymphocytes, les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et les cytokines. Les lymphocytes, piliers de l'immunité adaptative, sont divisés en deux catégories : les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT). Les LB sont responsables de la production des anticorps solubles et interviennent notamment dans l'élimination des pathogènes extracellulaires. La production et la maturation des lymphocytes se déroulent dans les organes lymphoïdes primaires. Chez *D. labrax*, il s'agit du thymus et du HK (maturation des LT et des LB respectivement). Les cellules matures rejoignent ensuite les organes lymphoïdes secondaires (e.g. la rate, le rein antérieur) qui représentent le lieu d'initiation de la réponse adaptative.



Organes de l'immunité chez le bar

Pour l'évaluation de l'immunocompétence du bar nous avons mesuré différents paramètres dont le premier est la bouffée oxydative qui permet à l'animal de produire des radicaux libres oxygénés nécessaires à l'élimination de bactéries (par exemple mais aussi tout autre microorganismes), le second étant la phagocytose qui assure l'élimination de ces mêmes bactéries. Ces deux paramètres ont été complétés par des mesures de viabilité cellulaire et ont fait l'objet d'une étude discriminante des différentes populations cellulaires (les

lymphocytes et cellules myéloïdes) du SI afin de cibler les performances de ces différents acteurs cellulaires impliqués.

Par ailleurs, il est à noter que les performances immunitaires chez le bar diffèrent entre le mâle et la femelle comme ce qui existe chez l'Homme, la femelle ayant des performances immunitaires plus importantes.

2.2 La moule marine *Mytilus sp.*

Taxinomie et répartition. Les moules sont des animaux sessiles gonochoriques présentant globalement un *sex ratio* de 1:1. La moule *M. edulis* atteint la maturité sexuelle dès la première année. Son cycle de reproduction annuel a été étudié de manière extensive (Seed et al., 1992). Le groupe des moules bleues (*Mytilus trossulus*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis*) constitue un complexe d'organismes frères caractérisés par leur conspécificité, capacité d'inter-reproduction à l'origine de la production d'hybrides variés colonisant de larges territoires en superposition (Gosling, 2003). Ces organismes morphologiquement semblables présentent néanmoins des physiologies distinctes leur conférant des niveaux de tolérance différents. Ce point est notamment illustré par la distribution biogéographique des moules selon une série continue de substitutions progressives conditionnées par la température, *M. trossulus* étant une espèce boréale vivant dans l'Atlantique nord et l'océan Pacifique, *M. edulis* se répartissant dans les eaux froides tempérées des côtes est et ouest de l'océan Atlantique et *M. galloprovincialis* étant native de la mer Méditerranée mais colonisant progressivement les côtes ouest de l'Amérique du Nord, le littoral de l'Afrique du Sud, de l'Asie, de l'Australie et du Chili.

Physiologie. Ces animaux ont la capacité de supporter de larges fluctuations de salinité, de dessiccation, de température et de teneur en oxygène, ce qui fait qu'ils occupent une grande variété de micro habitats, des régions intertidales les plus élevées aux régions subtidales, ainsi que des zones paraliques aux eaux de mer entièrement océaniques. Tolérant à un large éventail de conditions environnementales, le système *Mytilus sp.* est un groupe euryhalin, qui se retrouve aussi bien dans les eaux marines (34 ppt) que saumâtres (5 à 18 ppt), et eurytherme, pouvant supporter des conditions glaciales pendant plusieurs mois, mais aussi des températures élevées pour des organismes marins (la température létale est estimée à 29°C environ en immersion, Bayne et al. 1979). Les animaux vivent au niveau de l'éstran

doivent développer de remarquables processus d'adaptation aux stress hypoxiques, mécaniques et thermiques.

Episodes de surmortalité. Des phénomènes de mortalité estivale sont régulièrement rapportés chez *Crassostrea gigas* et, fait nouveau depuis 2011, chez *Mytilus sp* (François et al. 2013). Pour répondre aux interrogations des mytiliculteurs, l'Ifremer a mis en place le dispositif Mytilobs en 2012 (Robert et al., 2013). Ces épisodes de mortalité estivale sont supposés à étiologie multifactorielle. Ils interviennent à la conjonction de conditions défavorables incluant des températures en moyenne 1 à 2°C plus élevées que la normale, une salinité décriue, d'importants pics de turbidité, de faibles teneurs en oxygène dissous, des contaminations chimiques et biologiques (Robert et al., 2007). Les investigations histopathologiques indiquent cependant que la présence de pathogènes est très fréquemment associée aux hausses de mortalité estivales. En France, la bactérie *Vibrio splendidus* est en particulier incriminée (Lacoste et al., 2001).

Intérêt en biosurveillance. En tant qu'animaux filtreurs, les mollusques bivalves sont considérés comme d'excellents bio-indicateurs de contamination des eaux marines et continentales. Leur forte capacité de bioaccumulation a d'abord été mise en évidence pour les métaux bivalents, puis pour les substances chimiques organiques comme par exemple les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP, Baumard et al., 1999). Les moules ont été utilisées avec succès pour la surveillance de la contamination des milieux côtiers en polluants organiques et des programmes de surveillance : pour exemple Mussel Watch (Kimbrough et al., 2008) aux Etats Unis depuis 1986 ou encore le Réseau d'Observation de la Contamination CHimique du littoral ; ROCCH, dont les données sont archivées dans la base Quadriga (IFREMER, 2014). Récemment, l'étude de la bioaccumulation s'est étendue aux perturbateurs endocriniens (Janer et al., 2005), aux pesticides (Berney et al., 2002), aux médicaments (Le Bris et al., 2004) et autres contaminants émergents comme les nanoparticules (Canesi et al., 2012).

Immunocompétence. La moule *Mytilus sp.* est dotée d'un système vasculaire semi-ouvert. Ce système est constitué d'un compartiment hémolympatique comportant des éléments figurés en suspension, les hémocytes. Ces cellules immunocompétentes sont un élément clé de l'immunité exclusivement innée de ces organismes, responsables de la lutte antimicrobienne et de la sécrétion de peptides antibactériens. Les hémocytes infiltrent les tissus et migrent vers les zones infectées. Des travaux récents effectués au laboratoire avec

l'appui de la Plateforme de Recherche en Sciences de l'Environnement (PRESEN) de la SFR Scale ont permis d'identifier des fonctions cellulaires permettant d'évaluer la réponse immunitaire aux bactéries du genre *Vibrio*. Parmi ceux-ci figurent la numération-formule hémoducytaire, la viabilité et l'activité de phagocytose.

3 Sites d'étude et campagne de prélèvements

3.1 *Dicentrarchus labrax*

Calendrier prévu. Le calendrier de prélèvement tablait sur deux prélèvements par an couvrant deux saisons bien distinctes en termes de reproduction et de sollicitation immunitaire, l'une autour de mai-juin et l'autre entre octobre et novembre en 2015, 2016 et 2017 et ceci en Estuaire de Seine. La classe de taille correspondait à 10-20 cm avec 15 individus par prélèvement, le bar étant soumis à des restrictions de pêche.

Prélèvements réalisés.

Nous n'avons reçu la première année (2015) aucun prélèvement. Par la suite, nous avons adopté *via* un autre prestataire de pêche une campagne de prélèvement sur des individus de de 10 à 20 cm) afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec d'autres prélèvements effectués sur d'autres programmes de recherche. Les prélèvements ont tous été réalisés au même site grâce à un chalutier de pêche démersale disposant d'une maille de filet de 25 mm dans la partie principale et de 12 mm dans la partie postérieure du filet.



Filet et bateau JU-AD-LO de la société Prelev'Mar. From Patrice Cauchois et site de sa société <http://www.prelevmar.fr/>.

Ainsi en **2016** (2 prélèvements en juin (22.06.16) et octobre (24.10.2016)) et en **2017** (3 campagnes avril (13.04), juin (13.06) et octobre (25.10)) des mesures de performance immunitaire ont pu être effectuées. En 2016, le changement de matériel pour les mesures de phagocytose et burst oxydatif a rendu difficile les mesures avec notamment des valeurs mesurées différentes d'un appareil à un autre et difficilement comparable. Le faible nombre de poissons prélevés associés à une forte variabilité interindividuelle et de sexe rendent les résultats statistiquement plus fragiles. Toutefois nos résultats sont encourageants et tendent à penser du bien fondé de persévérer dans l'analyse des performances immunitaires de ce poisson.

3.2 *Mytilus sp.*

Calendrier prévu. Le calendrier de prélèvement prévoyait deux prélèvements de 50 individus en 2015, 2016 et 2017, l'un entre janvier et mars, l'autre entre juillet et septembre, sur deux sites : Digue Sud et Cap de la Hève, une moulière de référence étant nécessairement été incluse dans le programme (Les trois sources, Yport). La classe de taille visée correspondait à une longueur de valve de 3 à 4 cm. Il n'était pas prévu de sexer les organismes. Les approches retenues pour l'évaluation des immunomarqueurs imposaient des analyses extemporanées d'hémolymphe fraîche prélevée sur animaux vivants. Une période de stabulation d'une durée maximale de 4 jours au retour du terrain était envisagée.

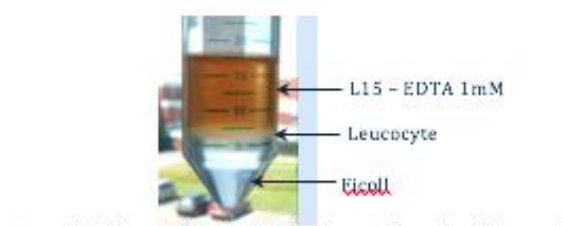
Prélèvements réalisés. La campagne de prélèvement du 3 septembre 2015 "Digue Sud" a été analysée selon les paramètres prévus : numération hémodocytaire, viabilité, motilité, capacité phagocytaire et bouffée oxydative, avec un niveau de réplicat correspondant à 5 individus. En 2016, le cytomètre en flux initialement utilisé, Beckman-Coulter Cell Lab Quanta MPL, a dû être remplacé par un appareil de nouvelle génération ACEA Novocyte 3000, ce qui a entraîné une interruption des analyses. En octobre 2017, un seul prélèvement effectué au niveau du Cap de la Hève a été analysé. Ainsi, en bilan, les échéances initialement prévues n'ont pas pu être respectées. Ce constat remet en question la capacité à tirer des conclusions à partir de l'analyse des immunomarqueurs sur *Mytilus sp.*

4 Méthodes

4.1 *D. labrax*

4.1.1 Prélèvement de la rate et du rein antérieur (HK)

Les organes sont prélevés rapidement et immédiatement écrasés manuellement sur tamis de 100 μm en milieu L15. Après plusieurs centrifugations le culot repris en L15 est déposé sur un gradient de ficoll puis après centrifugation, l'anneau contenant les leucocytes à l'interphase est récupéré et est utilisé par la suite pour les mesures de phagocytose, viabilité cellulaire et burst oxydatif.



Photographie d'un gradient de ficoll

4.1.2 Evaluation de la viabilité cellulaire

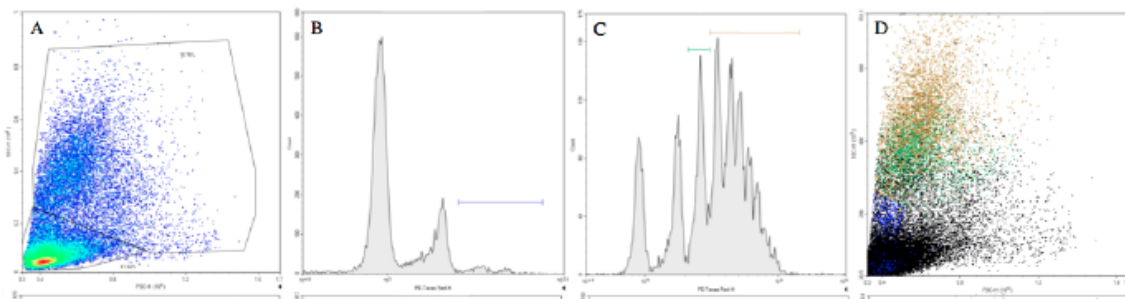
Tous les tests sont réalisés en milieu de culture Leibovitz (L15, Sigma, St. Louis, USA) ajusté à 360-370 mOsm/kg. La viabilité des leucocytes du rein antérieur et de la rate est évaluée en utilisant de l'iodure de propidium. Après incubation de 50 $\mu\text{g/ml}$ pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité, la fluorescence émise est mesurée sur le canal PE-Texas Red, en collectant les photons d'émission entre 615 et 620 nm. Les cellules ayant une forte fluorescence sont en apoptose ou nécrose (Bado-Nilles et al., 2014). Pour quantifier la proportion de chaque type de leucocyte (myéloïde ou lymphoïde), une « gate » est dessinée pour chaque population leucocytaire.

4.1.3 Evaluation de la phagocytose et du burst oxydatif

La capacité de burst oxydatif est évaluée en routine en utilisant la sonde fluorescente 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) à 5 μM pendant 1 heure. Après 30 min d'incubation, Les cellules sont stimulées avec du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) à une concentration de 2 $\mu\text{g/ml}$. La fluorescence à 530 nm (FL1 channel) est mesurée pour chaque population leucocytaire. Les résultats sont comparés à la fluorescence des cellules non stimulées. Deux méthodes d'évaluation des capacités de burst oxydatif ont été utilisées:

(1) le ratio de la moyenne d'intensité de fluorescence (cellules stimulées / cellules non stimulées) et (2) les « gates » qui quantifient les cellules qui dépassent une fluorescence donnée. La seconde méthode quantifie seulement les cellules qui font en apparemment réellement un vrai burst oxydatif.

De plus puisque les résultats changent avec la sensibilité du détecteur en utilisant la première méthode, et puisque le cytomètre de flux a été changé durant ce projet, la méthode de « gating » permet une meilleure comparaison entre différents cytomètres.



Exemple de résultats d'analyse de phagocytose par cytométrie en flux avec la visualisation.

La phagocytose a été réalisée en utilisant des billes fluorescentes: FluoSpheres® Carboxylate-Modified Microspheres, 1.0 μm , yellow-green fluorescent (505/515) (F8823, Thermo Fisher Scientific, USA).

Une solution de cellules immunitaires a une concentration de 10^6 cellules/ml a été incubée à l'obscurité avec 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PMA et billes (ratio cellules/billes:1/50) pendant 2 heures à 16°C . La fluorescence des cellules est mesurée dans le canal PE-Texas Red-H. Le nombre de pics fluorescents avec la plus forte intensité est relié au nombre de billes détectées dans chaque cellule. Les cellules avec plus de trois billes sont considérées comme des cellules phagocytant (Seemann et al., 2016).

4.2 *Mytilus* sp.

4.2.1 Prélèvement de l'hémolymphe

L'hémolymphe est ponctionnée dans le muscle adducteur postérieur par aspiration douce à l'aide d'une seringue de 1 mL montée d'une aiguille 22G. La qualité des échantillons est vérifiée par observation microscopique.

4.2.2 Numération-formule de l'hémolymphe, viabilité

Un volume de 200 μL d'hémolymphe est dilué avec un volume égal de solution antiagrégative isotonique de type Alsever à 4°C additionnée d'iodure de propidium à la concentration finale de 75 μM et immédiatement analysée au cytomètre. Un comptage absolu est réalisé. La morphologie des hémocytes est déterminée selon leur taille (paramètre FSC) et leur complexité (paramètre SSC). Le gating pré-établi qui permet de déterminer les proportions relatives de basophile, d'éosinophiles et de hyalinocytes. La viabilité est mesurée en déterminant le nombre de cellules mortes, marquées à l'iodure de propidium, dans le canal PE-Cy7-H.

4.2.3 Détermination de l'activité phagocytaire

Un volume d'hémolymphe est incubé dans le noir pendant 4h à 15°C avec des microbilles de polystyrène fluorescent de 2 μm , à raison de 10 billes par hémocytes. Après incubation, le milieu est aspiré et les cellules sont décollées en ajoutant de la solution d'Alsever à 4°C. La suspension cellulaire est analysée au cytomètre dans le canal PE. La capacité phagocytaire correspond au pourcentage de cellules ayant incorporé au moins une bille. L'efficacité phagocytaire correspond au pourcentage de cellules ayant incorporé au moins trois billes. L'avidité correspond au nombre moyen de billes phagocytées par les cellules efficaces.

4.2.4 Analyses statistiques

Le traitement statistique est effectué avec SigmaPlot 12 (Systat Software Inc, Chicago, IL). Un test Shapiro-Wilk ($p < 0.05$) est utilisé pour estimer si les données sont distribuées selon la loi normale. Si c'est le cas et si les variances sont comparables, le test multivarié ANOVA est utilisé pour comparer les données, suivi d'un test posthoc de type Holm-Sidak. Dans le cas contraire, le test non paramétrique multivarié de Kruskal-Wallis est employé, suivi du test posthoc de comparaison des rangs de Dunn. Les données sont considérées significativement différentes pour $p < 0.05$.

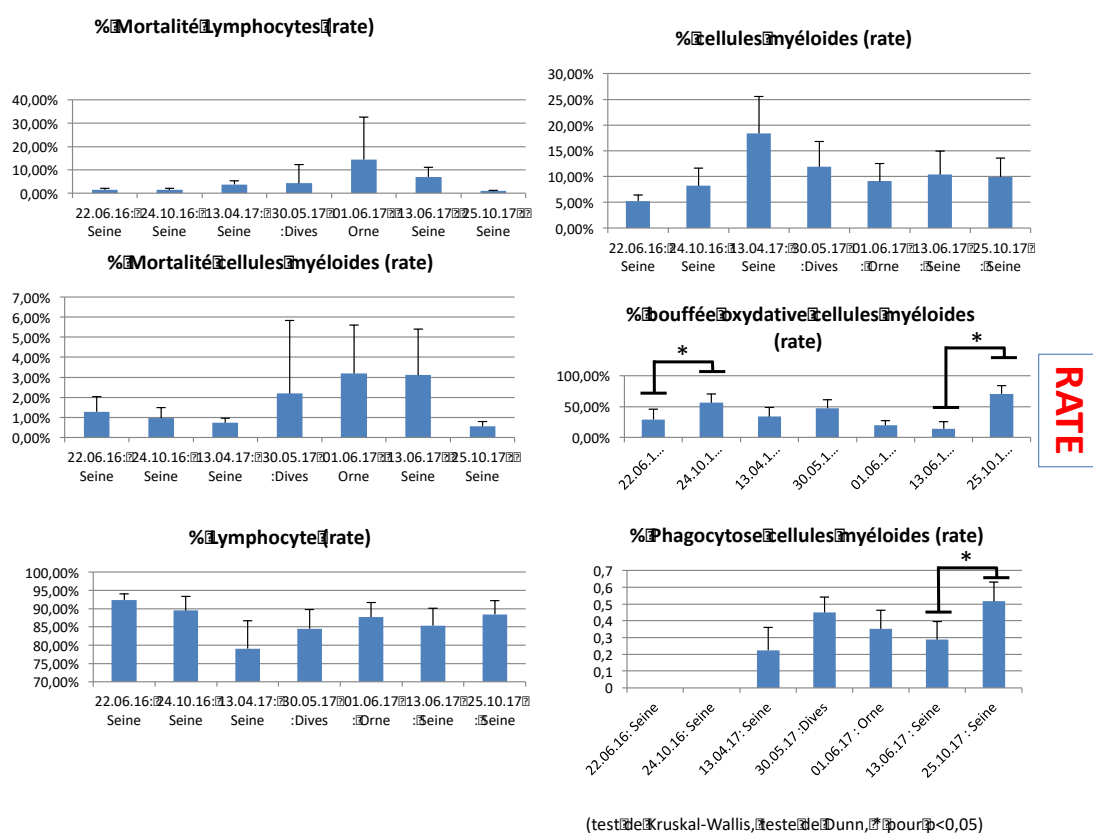
5 Résultats & discussion

5.1 Le bar *Dicentrarchus labrax*

Afin de contrebalancer l'absence de zone de référence non incluse initialement dans la projet Ecotones, des poissons de la Dives et de l'Orne ont été inclus dans l'analyse des mesures réalisées sur les poissons de l'estuaire de Seine.

5.1.1 Rate et rein antérieur

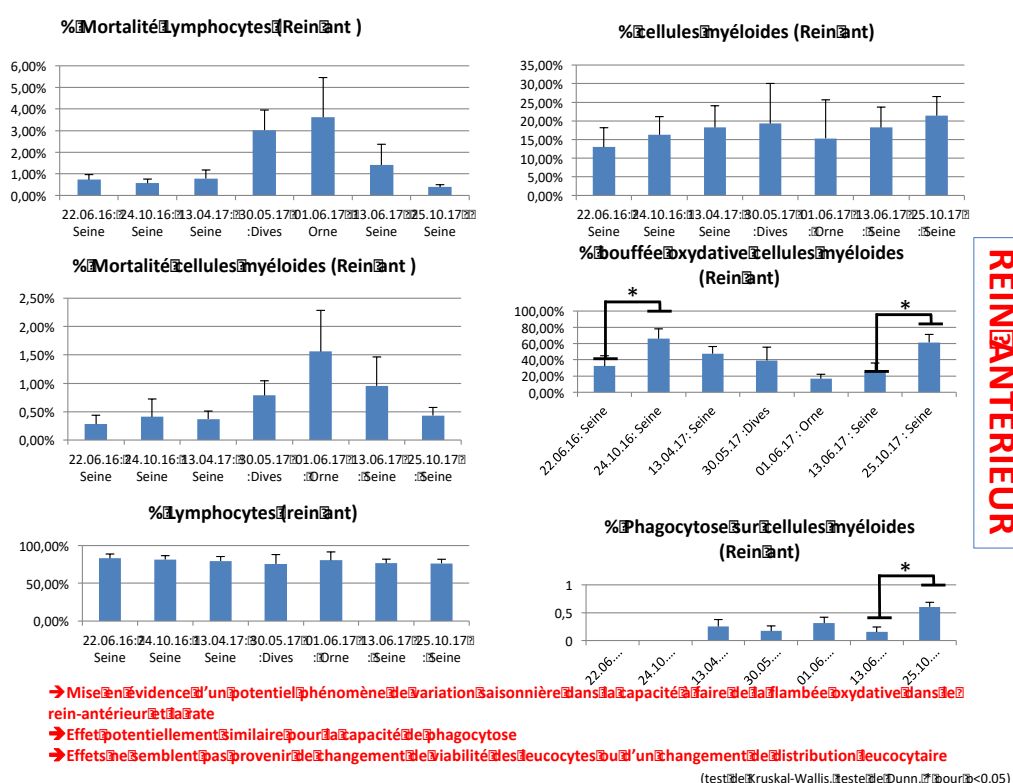
A travers les résultats obtenus pour les mesures de la rate et du rein antérieur, nous avons mis en évidence un phénomène de variation saisonnière dans la capacité à faire de la bouffée oxydative. La bouffée oxydative est plus marquée au mois d'octobre qu'au mois de juin, que ce soit en 2016 ou 2017.



Par ailleurs, en fait notable, il est à remarquer que les poissons issus de la Dives et de l'Orne présente une mortalité plus importante des cellules myéloïdes et lymphoïdes que ce soit au niveau de la rate ou du rein antérieur. Deux possibilités d'interprétation s'ouvrent à nous. Ces deux sites sont soit plus impactés en termes de contamination (microbiologique ou chimique) que nous ne l'avons entrevu, soit les poissons sont issus de sites plus éloignés et n'ayant pas été disséqués in situ, le transport qui s'est portant effectué sous bullage dans les meilleures conditions possibles, a affecté les animaux.

Ils semblent que les résultats obtenus sur la bouffée oxydative soient similaires à ceux de phagocytose, les deux mécanismes pouvant être intimement liés. Nous ne disposons malheureusement pas pour 2016 de données de phagocytose ni pour la rate ni le rein antérieur en raison de problème technique avec le cytomètre.

Ces résultats pour la rate et le rein antérieur et ceci uniquement pour la Seine, sont confortés par les résultats de viabilité cellulaire qui est importante et constante à travers tous les prélèvements et ne semble pas être attribuable à un changement de la distribution leucocytaire.

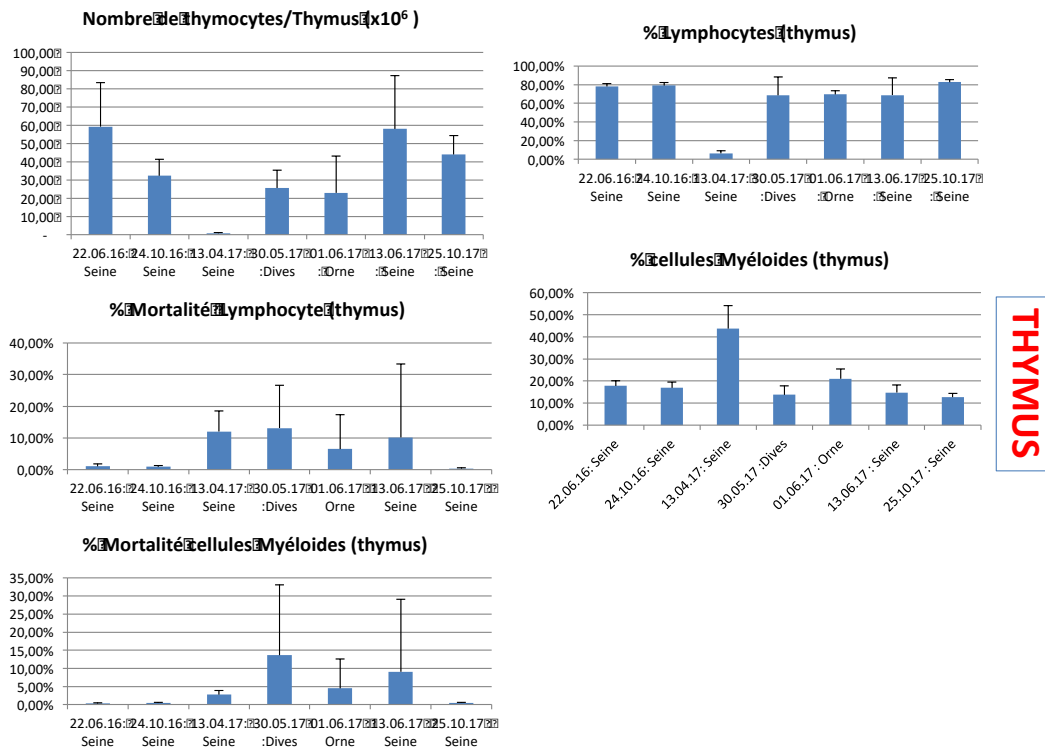


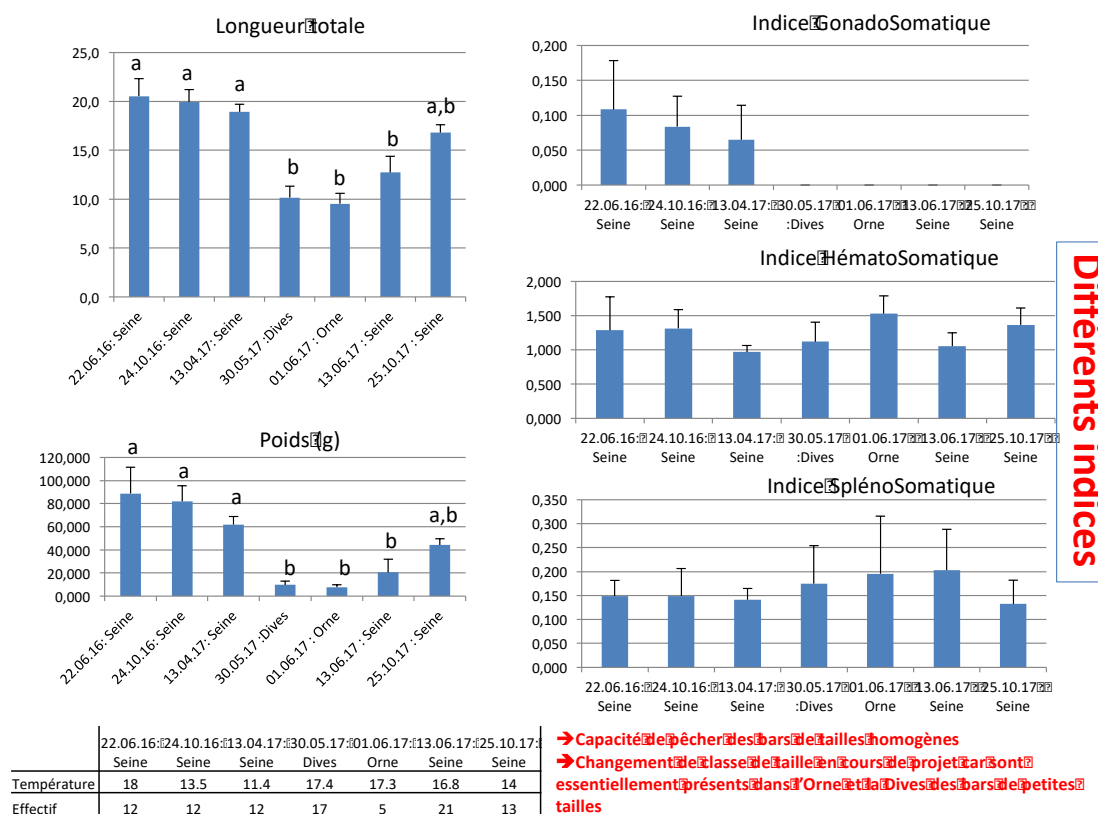
5.1.2 Le thymus

La mesure de la taille et de la cellularité de cet organe sont particulièrement intéressantes car cet organe constitue le pilier de l'orchestration de la réponse immune adaptative. En suivant la plasticité thymique, marquée par des phases d'involution et de recroissance nous établissons les capacités potentielles du bar à pouvoir développer une immunocompétence active. Ce besoin étant moins marqué en hiver face à une pression microbienne moins importante, une partie de l'immunité adaptative devient superflue et donc l'organisme

réduit ses productions de cellules immunes et donc met en veille une partie de son immunité adaptative. Il nous semble intéressant de suivre in situ, sur le terrain les variations de ces capacités d'immunocompétence, variation que nous étudions par ailleurs en laboratoire grâce à un autre support financier.

Nos résultats sont cohérents avec nos résultats de laboratoire en condition contrôlée indiquant une plasticité thymique fortement influencé par les saisons.





Ces indices sont indicateurs en premier lieu d'une capacité de pêche de bar de tailles homogènes. Nous avons cependant dû faire un changement de taille en cours de projet afin de pouvoir établir une comparaison avec les poissons qui ont été pêchés dans les deux autres estuaires, l'Orne et la Dives.

Nous avons pu mettre en évidence un phénomène de variations saisonnières dans la capacité à faire de la flambée oxydative dans le rein antérieur et la rate. Il semble que la phagocytose soit elle aussi assujettie à ce phénomène de variations saisonnières. Nous avons pu mettre en évidence que ces observations ne provenaient pas d'un changement de viabilité des leucocytes ou d'un changement de distribution des leucocytes.

5.2 *Mytilus sp.*

Chez les bivalves, les hémocytes sont les principaux effecteurs de la réponse immunitaire, exclusivement innée. Ces cellules secrètent divers peptides antimicrobiens et exercent la fonction phagocytaire (Riout et al., 2013a). Les hémocytes sont en suspension dans l'hémolymph en circulation dans le système cardiovasculaire. En cas d'infection, les hémocytes infiltrer les tissus et exercent une lutte antimicrobienne.

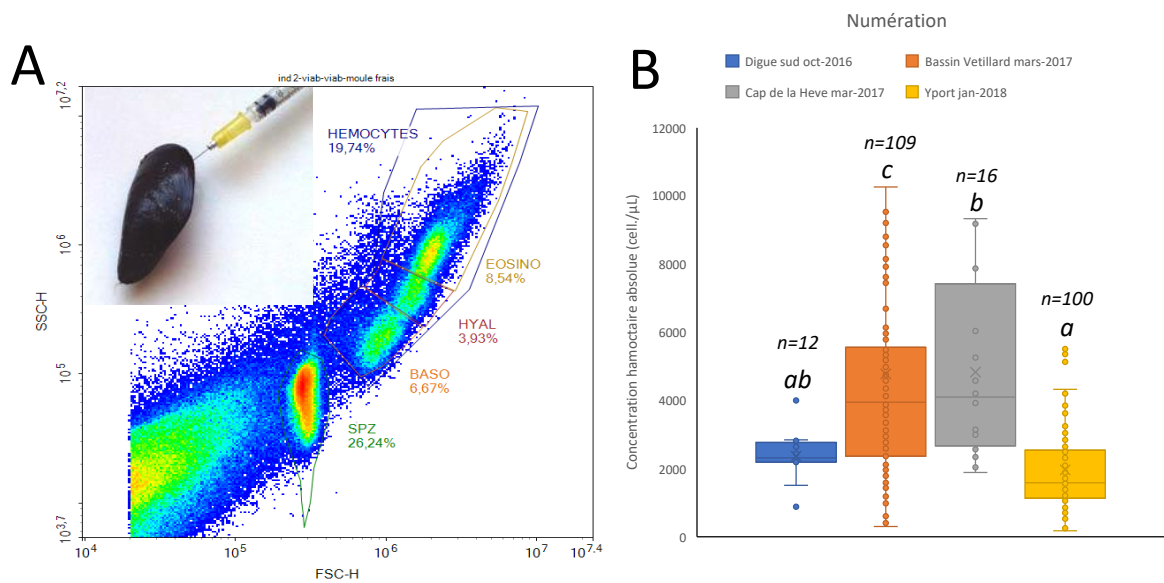


Figure 1 Numération cellulaire dans l'hémolymphe de *Mytilus sp.* A, l'hémolymphe est prélevée à l'aide d'une seringue dans le muscle adducteur postérieur de l'animal (insert) et immédiatement analysée par cytométrie en flux. Le graphe de structure des populations cellulaire exprime la taille des cellules (FSC-H) en fonction de leur complexité (SSC-H) en unités arbitraires de fluorescence. Cette représentation permet de distinguer les hémocytes, des débris et des spermatozoïdes, présents dans certains échantillons en période de reproduction. B, le nombre d'hémocyte dans 1 microlitre d'hémolymphe est donné. Les lettres indiquent les échantillons non significativement différents ($p < 0.05$).

Toutes les analyses sont effectuées en cytométrie en flux. La taille de l'échantillon est importante, fixée à 50 000 cellules par individu ; les échantillons de moins de 24 000 cellules sont éliminés. Les concentrations hémocytaires dans l'hémolymphe sont connues pour être variables (Riout et al., 2013b). Dans les échantillons analysés dans le cadre du programme Ecotones (Figure 1), les concentrations hémocytaires absolues varient de 400 et 16000 hémocytes / μL .

Sur les quatre sites étudiés, au niveau de la digue sud délimitant le chenal de navigation de l'estuaire de Seine en octobre 2016 ($n=12$), le bassin Vetillard du port du Havre en mars 2017 ($n=109$), la moulière du Cap de la Hève en mars 2017 ($n=16$) et la moulière dite des Trois Sources à Yport en janvier 2018 ($n=100$), des différences significatives sont observées, les deux dernières stations étant statistiquement non séparables.

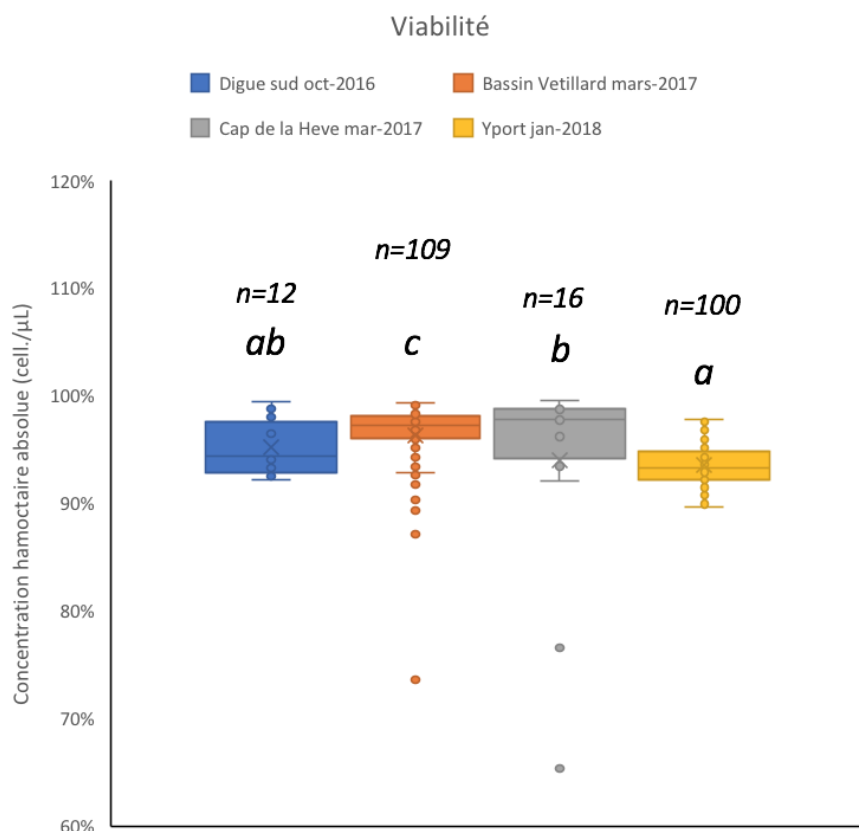


Figure 2 La viabilité cellulaire est déterminée par marquage des cellules mortes à l'iodure de propidium. La viabilité est généralement excellente et en moyenne, toujours supérieure à 90%, indiquant la bonne qualité des prélèvements d'hémolymphe. Les lettres indiquent les échantillons non significativement différents ($p < 0.05$).

La viabilité cellulaire (Figure 2) est excellente, généralement supérieure à 95 %, exceptionnellement inférieure à 90 %. Il convient néanmoins de remarquer plusieurs éléments :

- Les données en viabilité suivent les données en numération en termes de valeurs relatives et de différences statistiques entre les groupes,
- Les sites présentant la viabilité hémocyttaire moyenne la plus faible (moyenne \pm SEM) $93,55 \pm 0,19$ % ($n=100$) est le site d'Yport,
- Les sites du bassin Vétillard et du Cap de Hève sont les stations avec les chutes de viabilité les plus notables (un échantillon à 73 % et un autre à 63 %).

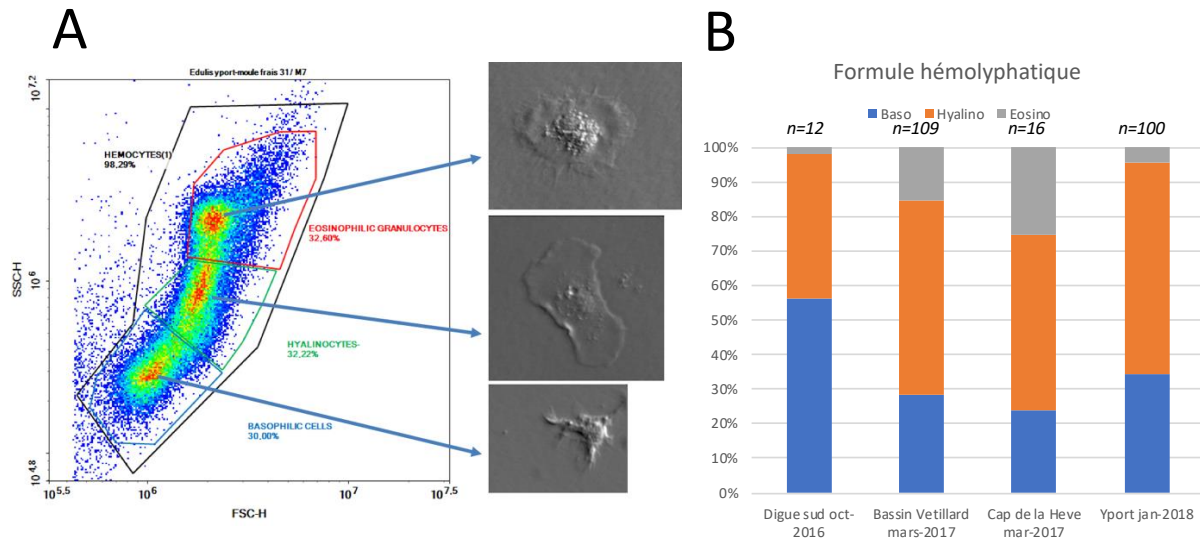


Figure 3 A, la formule hémocytaire est déterminée en comptant la proportion de cellule dans chacune des régions correspondant respectivement aux hémocytes basophiles, aux hyalinocytes et aux granulocytes éosinophiles (selon Le Foll et al., 2010). B, le pourcentage de chacune des sous-populations cellulaires est déterminé.

Chez *Mytilus sp.*, les hémocytes forment une population cellulaire hétérogène à l'immunophénotypage impossible du fait du manque d'anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre d'éventuels marqueurs de différenciation cellulaire. Néanmoins des travaux antérieurs nous ont permis de proposer une classification de ces cellules sur la base de leur coloration Hemacolor © et de leur activité motile (Le Foll et al., 2010). Trois types cellulaires peuvent alors être distingués : de petites cellules non phagocytaires, les basophiles, de grandes cellules peu granuleuses, les hyalinocytes, et de grandes cellules très granulaires à forte activité phagocytaire, les granulocytes éosiniphiles. Ces trois types cellulaires peuvent être distingués sur des bases morphologiques taille/complexité (Figure 3A).

La Figure 3B présente les proportions relatives de chacun de ces types cellulaires dans les prélèvements. Il est à noter que les hémocytes les plus nombreux sont les basophiles au niveau de Digue Sud en octobre 2016, tandis que dans les autres échantillons, les hyalinocytes sont toujours prépondérants. Les granulocytes éosinophiles restent les hémocytes les moins nombreux. L'apparition de granulocytes éosinophiles sur les stations du Bassin Vetillard et du Cap de la Hève en mars 2017 peut traduire une activité de lutte antibactérienne plus importante avec plus de granules et de phagolysosomes chez ces phagocytes professionnels.

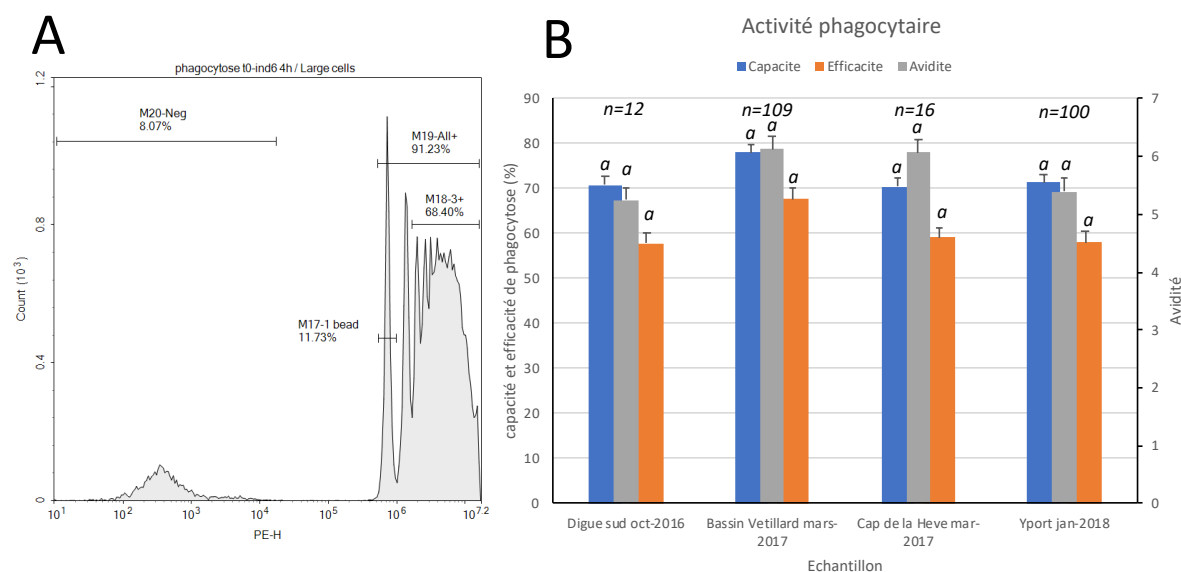


Figure 4 L'immunocompétence des organismes est déterminée par la capacité des hémocytes à phagocyter des microbilles fluorescences. A, niveau de fluorescence des cellules après 4h d'incubation à 15°C avec une proportion de 10 billes/cellule. Dans cet exemple, 8, 07 % des hémocytes n'ont phagocyté aucune bille (M20-Neg), 91,23 % des hémocytes ont incorporés au moins une bille (M10-All+) et 68,40 % des cellules contiennent 3 billes ou plus (M18-3+). B, la fonction phagocytaire est explorée en quantifiant la capacité phagocytaire, l'efficacité de phagocytose et l'avidité (cf matériel et méthodes). Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les échantillons ($p < 0.05$).

L'activité phagocytaire est évaluée par la capacité des cellules à ingérer les billes fluorescentes (Figure 4). Plus de 70 % des hémocytes sont actifs, c'est à dire qu'ils sont capables de fixer au moins une bille. Le critère d'efficacité en phagocytose est déterminé par le nombre de cellules capable d'internaliser au moins 3 billes (Fournier et al., 2000). Enfin, la performance phagocytaire est indiquée par l'avidité des cellules vis-à-vis des cibles, c'est à dire le nombre moyen de billes trouvées dans les cellules efficaces. Pour l'ensemble de ces trois critères, aucun des échantillons analysés de c'est trouvé statistiquement différent des autres.

6 Conclusion

6.1 Atteintes immunitaires chez le bar *Dicentrarchus labrax*

A l'aune des résultats obtenus, nous pouvons mettre en évidence des variations des paramètres mesurés en lien avec les saisons et non en fonction d'une pollution particulière.

Ceci pourrait être assimilé à des « valeurs de référence » en fonction des saisons et élimine ainsi toutes mauvaises interprétations de ces résultats en fonction d'une perturbation à des polluants. Afin de pouvoir établir des valeurs de référence pour les paramètres mesurés, il faudrait pouvoir inclure un voire deux sites moins impactés par les polluants (tel que cela a pu être amorcé avec la Dives et l'Orne) et pouvoir augmenter le nombre de poissons pêchés.

*6.2 Atteintes immunitaires chez *Mytilus* sp.*

Le programme Ecotones a permis d'établir la faisabilité du suivi de paramètres immunitaires chez *Mytilus* sp. en précisant le dimensionnement des réplicats nécessaires et le nombre des événements à considérer en cytométrie en flux. Les analyses sont possibles au laboratoire au retour du terrain sur la base d'une vingtaine d'individus par campagne pour les 3 groupes de paramètres proposés : numération-Formule sanguine, viabilité hématocytaire, fonction phagocytaire. Des difficultés d'organisation et de disponibilité des équipements d'analyse sur cette période ne nous pas permis de respecter le planning d'échantillonnage et d'analyse prévu par le programme. L'opérationnalité immédiate de l'approche reste donc difficile à évaluer. Il apparaît néanmoins que les paramètres hématiques (Numération et formule sanguine) sont plus variables d'un échantillon à l'autre que les paramètres fonctionnels (viabilité, phagocytose).

6.3 Conclusion commune aux deux espèces

Un effort doit maintenant être opéré afin de proposer, pour l'ensemble des immunomarqueurs de l'étude, des niveaux de bases et des seuils de réponse. Ces éléments pourront être obtenus à la fois par un suivi terrain saisonnier de populations de références et par une approche stabulation en conditions contrôlée.

7 Communication scientifique

Les résultats de cette recherche ont été présentés dans les différentes réunions organisées par le GIP Seine Aval.

Articles de rang A

Ben Cheikh Y., Travers M-A., Morga B., Godfrin Y., Rioult D., Le Foll F. (2016). First evidence for a *Vibrio* strain pathogenic to *Mytilus edulis* altering hemocyte immune capacities. Developmental and comparative Immunology 57, 107-109.

Ben Cheikh Y., Travers M-A., Le Foll F. (2017). Infection dynamics of a *V. splendidus* strain pathogenic to *Mytilus edulis*: In vivo and in vitro interactions with hemocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 70, 515-523.

Ben Cheikh Y., Xuereb B., Boulangé-Lecomte C., Le Foll F. (2018). Multixenobiotic resistance in *Mytilus edulis*: Molecular and functional characterization of an ABCG2- type transporter in hemocytes and gills. *Aquatic Toxicology* 195, 88-96.

Communications orales

Ben Cheikh Y., Travers M-A., Morga B., Godfrin Y., Rioult D., Le Foll F. First evidence for a *Vibrio* strain pathogenic to *Mytilus edulis* altering hemocyte immune capacities. 2nd International Conference of Fish & Shellfish Immunology, June 26th – 30th 2016, Portland, Maine.

Ben Cheikh Y., Xuereb B., Boulangé-Lecomte C., Restoux G., Duflot A., Le Foll F. Le système MXR chez *Mytilus edulis* : du laboratoire au terrain. XIIème colloque ECOBIM, 30 mai-1er juin 2016, Le Havre.

Chalghmi et al., Détection des anomalies du cycle cellulaire et diagnostic multiparamétrique de la Néoplasie Transmissible des Bivalves par cytométrie en flux chez la moule *Mytilus* sp. XIVème colloque ECOBIM, 22-26 mai 2018, Bordeaux.

Bibliographie

Bado-Nilles, A., Techer, R., Porcher, J.M., Geffard, A., Gagnaire, B., Betoulle, S., Sanchez, W. (2014). Detection of immunotoxic effects of estrogenic and androgenic endocrine disrupting compounds using splenic immune cells of the female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 38, 672–683.

Baumard P., Budzinski H., Garrigues P., Narbonne J. F., Burgeot T., Michel X. & Bellocq J. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Marine Environmental Research* 47, 415-439.

Bols N. C., Brubacher J.L., Ganassin R.C., Lee L.E.J. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25:853-873.

Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G. & Gallo, G. (2012). Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research* 76, 16-21.

Fournier M., Cyr D., Blakley B., Boermans H., Brousseau P. (2000). Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *American Zoologist* 40: 412-420.

Francois C., Joly J.-P., Garcia C., Lupo C., Travers M.-A., Pepin J.-F., Hatt P.-J., Arzu, I., Omnes E., Tourbiez D., Faury N., Haffner P., Huchet E., Dubreuil C., Chollet B., Renault T., Cordier R., Hebert P., Le Gagneur E., Parrad S., Gerla D., Annezo J.-P., Terre-Terrillon A., Le Gal D., Langlade A., Bedier E., Hittier B., Grizon J., Chabirand J.-M., Robert S., Seugne J.-L., Rumebe M., Le Gall P., Bouchoucha M., Baldi Y. & Masson J.-C. (2013). IFREMER.

Galloway T.S., Depledge M.H. 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10:5-23.

IFREMER (2014). Données Quadrige - Programme ROCCH organismes marins.

Janer G., Lavado R., Thibaut R. & Porte C. (2005). Janer G., Lavado R., Thibaut R. & Porte C. (2005). *Aquatic Toxicology* 75, 32-42. *Aquatic Toxicology* 75, 32-42.

Kimbrough K.L. Center for Coastal, M. & Assessment (2008). An assessment of two decades of contaminant monitoring in the nation's coastal zone [electronic resource] Silver Spring, Md. :: National Oceanic and Atmospheric Administration, National Ocean Service, National Centers for Coastal Ocean Science, Center for Coastal Monitoring and Assessment.

- Krzystyniak K., Tryphonas H., Fournier M. 1995. Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity. *Environmental Health Perspectives* 103(9): 17-22.
- Lacoste A., Jalabert F., Malham S., Cueff A., Gelebart F., Cordevant C., Lange M. & Poulet S. A. (2001). A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases in Aquatic Organisms* 46, 139-145.
- Le Bris, H. & Pouliquen, H. (2004). Experimental study on the bioaccumulation of oxytetracycline and oxolinic acid by the blue mussel (*Mytilus edulis*). An evaluation of its ability to bio-monitor antibiotics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 48, 434-440.
- Le Foll F., Rioult D., Boussa S., Pasquier J., Dagher Z. & Leboulenger F. (2010). Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish Shellfish Immunol* 28, 372-386.
- Rioult D. (2013a). Motilité cellulaire et immunocompétence des hémocytes de *mytilus edulis* -applications aux diagnostics environnementaux. Thèse soutenue le 7 novembre 2013 à l'Université Le Havre Normandie.
- Rioult D., Lebel J. M. & Le Foll F. (2013b). Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes in vitro. *Cytotechnology* 65, 749-758.
- Rioult D., Pasquier J., Boulange-Lecomte C., Poret A., Abbas I., Marin M., Minier, C. & Le Foll F. (2014). The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. *Aquatic Toxicology* 153, 98-109.
- Robert S., Soletchnik P., Le Moine O. & Zanker S. (2007). MYTILOBS1 Campagne 2015-2016 : Réseau d'observation des moules d'élevage sur la côte atlantique et dans la Manche. IFREMER.
- Robert S. & Bedier E. (2013). Rapport d'activités 2013 Laboratoire Environnement Ressources Morbihan – Pays de Loire. IFREMER.
- Javier Sánchez Vázquez, José A. Muñoz-Cueto, *Biology of european sea bass*, 1st edition, Boca Raton, CRC Press, 436 pages, 2014
- Seemann, F., Knigge, T., Duflot, A., Marie, S., Olivier, S., Minier, C., Monsinjon, T., 2016. Sensitive periods for 17 β -estradiol exposure during immune system development in sea bass head kidney: Sensitivity of seabass head kidney development to E2. *J. Appl. Toxicol.*
- Van der Oost R. Beyer J., Vermeulen N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(2): 57-149.
- Wong S., Fournier M., Coderre D., Banska W., Krzystyniak K. 1992. Environmental immunotoxicology in Animal biomarkers as pollution indicators: pp167-189.
- Zelikoff J. T., Carlson E., Li Y., Raymond A., Duffy J., Beaman J. R., Anderson M. 2002. Immunotoxicity Biomarkers in Fish: Development, Validation and Application for Field Studies and Risk Assessment. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8(2): 253-263.



Annexes 7

Rapport Seine-Aval 5

Acronyme du projet : ECOTONES

Coordinateur : Benoit Xuereb

Tache 2. Evaluation des effets de la contamination sur l'avifaune (responsable Paco Bustamante)

Contamination chimique par les éléments traces chez l'avifaune

Paco Bustamante, Maud Brault-Favrou, Carine Churlaud, Jérôme Fort,

Gaël Guillou – UMR 7266 LIENSs / ULR

Olivier Chastel, Charline Parentau, Cécile Ribout – UMR 7283 CEBC / ULR

Fabrice Gallien - Groupe Ornithologique Normand

Gilles Le Guillou - Maison de l'estuaire

1 Contexte

L'étude des éléments traces, des isotopes stables et des hormones de stress, ainsi que le sexage moléculaire des oiseaux a été réalisée dans le cadre du suivi des effets de la contamination chimique sur la santé des organismes de l'estuaire.

2 Echantillons analysés et protocoles

Les éléments traces (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, V et Zn) et les rapports isotopiques de l'azote, du carbone et du soufre ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{34}\text{S}$) ont été analysés dans les cellules sanguines et les plumes des poussins de 4 espèces d'oiseaux marins : goéland marin, goéland argenté, goéland brun et cormoran huppé (Tableau 1). Le sexage moléculaire a été réalisé sur l'ensemble des individus. Enfin, l'analyse d'une hormone de stress, la corticostérone, a été réalisée sur le plasma dans la mesure où le prélèvement a pu être effectué en moins de 3 minutes.

Tableau 1 Nombre d'échantillons dosés pour chaque paramètre (ET : éléments métalliques ; IS : isotopes stables ; CORT : corticostérone) pour chaque espèce d'oiseau et par site.

Oiseaux	Site	2015				2016				2017			
		ET	IS	Sexe	CORT	ET	IS	Sexe	CORT	ET	IS	Sexe	CORT
Goéland marin	Le Havre	13	13	13	13	13	13	13		11	11	11	
	Ilôt du Ratier	13	13	13	12	13	13	13					
	Antifer									3	3	3	
	Chausey									15	15	15	
Goéland brun	Le Havre	12	12	12	12	10	10	10		3	3	3	
Goéland argenté	Le Havre	12	12	12	12	15	15	15		12	12	12	
	Ilôt du Ratier	6	6	6	6	11	11	11					
	Chausey									16	16	16	
Cormoran huppé	Antifer									2	2		
	Chausey									10	10		
Total		56	56	56	56	77	77	77	77	72	72	72	

3 Matériel et méthodes

3.1 Dosage du mercure

Le dosage du mercure (Hg total) a été réalisé sur les échantillons de cellules sanguines lyophilisées et de plumes au laboratoire LIENSs par spectrophotométrie d'absorption atomique avec un Advanced Mercury Analyser (AMA 254) de marque ALTEC. Cet appareil permet l'analyse d'échantillons bruts qui sont brûlés sous atmosphère d'oxygène à une température de 800°C et dont le Hg libéré lors de la combustion est amalgamé sur un collecteur en or. Par chauffage de cet amalgameur, le Hg est libéré et l'analyse est réalisée par absorption atomique. Le contrôle qualité des analyses a été réalisé par la mesure de blancs au début de chaque session d'analyse et, tous les 10 échantillons, par l'analyse de matrices certifiées pour leur concentration en Hg, ici de l'hépatopancréas de homard (TORT-2, National Research Council Canada(NRCC)). Chaque prélèvement a fait l'objet d'au moins deux mesures de sorte que le pourcentage de variation entre les mesures soit inférieur à 10%. Les résultats des analyses du TORT-2 donnent un pourcentage de récupération de la concentration certifiée en Hg variant de 94 à 102% suivant la session d'analyse. La limite de quantification de l'appareil était de 0,01 ng de Hg. Les concentrations de Hg sont exprimés en $\mu\text{g g}^{-1}$ de poids sec.

3.2 Dosage des éléments métalliques

La mesure des concentrations de 13 éléments (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Mn, Pb, Se, V et Zn) a été réalisée sur les échantillons de cellules sanguines et de plumes lyophilisées par ICP-AES et ICP-MS au laboratoire LIENSs avec un appareil Varian Vista-Pro ICP-AES et un ICP-MS Thermo Fisher Scientific X Series II. Les échantillons (50–300 mg) ont été digérés avec un mélange de 6 ml d'acide nitrique HNO₃ 67–70% et 2 ml d'acide chlorhydrique 34–37% (Fisher Scientific, qualité ultrapure). La digestion acide des échantillons a été amorcée à température ambiante durant 12h et terminée au four microondes par 30 minutes de montée à 120°C suivis de 15 minutes à 120°C. Chaque échantillon a ensuite été dilué avec de l'eau Mili-Q pour atteindre un volume de 50 ml. Des blancs et des matrices de concentrations certifiées ont été préparés et analysés avec chaque lot d'échantillon. Les certifiés étaient le TORT-2 (NRCC) et du foie de requin DOLT-4 (NRCC). Les limites de quantification et les pourcentages de récupération étaient respectivement de 0,1 µg L⁻¹ et 82% pour l'Ag, 1 µg L⁻¹ et 98% pour l'As, 0,1 µg L⁻¹ et 94% pour le Cd, 0,1 µg L⁻¹ et 99% pour le Co, 0,1 µg L⁻¹ et 102% pour le Cr, 0,5 µg L⁻¹ et 93% pour le Cu, 20 µg L⁻¹ et 86% pour le Fe, 0,5 µg L⁻¹ et 90% pour le Mn, 0,2 µg L⁻¹ et 101% pour le Ni, 0,1 µg L⁻¹ et 86% pour le Pb, 0,5 µg L⁻¹ et 109% pour le Se, et 20 µg L⁻¹ et 98% pour le Zn. Les concentrations des éléments métalliques sont exprimées en µg g⁻¹ de poids sec.

3.3 Analyse des isotopes stables

Les isotopes stables ont été déterminés sur les cellules sanguines lyophilisées puis réduites en poudre au laboratoire LIENSs. Des quantités variant entre 0,2 et 0,5 mg pour l'azote et pour le carbone et entre 0,4 et 0,8 pour le soufre ont été pesés avec précision ($\pm 0,001$ mg) et placées ont été placés dans des capsules d'étain pour l'analyse des isotopes stables. Cet analyse a été réalisée avec un analyseur élémentaire Flash EA 1112 Thermo Scientific couplé à un spectromètre de masse Delta V Advantage ThermoScientific, Brême, Allemagne). Les résultats sont rapportés en notation unitaire δ (exprimée en par mil par rapport aux références, le Vienna Pee Dee Belemnite pour le $\delta^{13}\text{C}$ et l'azote gazeux de l'air pour le $\delta^{15}\text{N}$). La précision analytique des mesures était de <0.10 ‰ et de <0.06 ‰ pour l'azote et le carbone, respectivement.

3.4 Mesure de la corticostérone

Les concentrations plasmatiques de corticostérone ont été déterminées au laboratoire CEBC à partir du plasma des oiseaux dont la prise de sang a été réalisée en moins de 3 minutes après la capture. La corticostérone plasmatique a été mesurée dans des échantillons (30 µL) après extraction à l'éther éthylique par radioimmunoessais tel que décrit dans Lormée et al. (2003) à l'aide d'un sérum commercial de lapin contre le conjugué corticostérone-3-(O-carboxy-méthyl) oxime dans du sérum de bœuf (Biogenesis, UK). La réaction croisée était inférieure à 10% avec la 1-désoxycorticostérone. Des aliquotes en double (100 µL) des extraits ont été incubées pendant une nuit à 4 ° C avec 8000 cpm de ³H-corticostérone (Amersham Pharmacia Biotech-France) et l'antisérum. La corticostérone liée et libre a été séparée en ajoutant du charbon de bois revêtu de dextrane. Après centrifugation, la fraction liée a été comptée dans un compteur à scintillation liquide. Les niveaux de corticostérone détectables minimaux étaient de 0,4 ng mL⁻¹. Tous les échantillons ont été analysés trois fois pour obtenir un niveau de variabilité inférieur à 10%. Les concentrations de corticostérone plasmatique sont données en ng/ml.

3.5 Sexage moléculaire

Le sexe a été déterminé par l'amplification par réaction en chaîne de la polymérase d'une partie de deux gènes hautement conservés (CHD) présents sur les chromosomes sexuels. Les analyses ont été effectuées au laboratoire CEBC (Centre d'Etudes Biologiques de Chizé) tel que détaillé dans Weimerskirch et al. (2005). L'ADN a été extrait à partir des échantillons de cellules sanguines en utilisant la digestion à la protéinase K suivie d'une extraction au phénol (Fridolfsson et Ellegren 1999). Après centrifugation, le culot a été lavé dans 1 ml de PLB. Après élimination du surnageant, le culot a été incubé pendant 1 heure à 58 °C. Les réactions de PCR ont été effectuées dans des volumes de 20 µL sur un thermocycleur Perkin Elmer 9600 en utilisant une polymérase AmpliTaq 0,05 U, un désoxyribonucléoside triphosphate 200 µM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM et 2 pmol. des amorces 2550F (5'-GTTACTGATTCGTC TACGAGA-3 ') et 2718R (5'-ATTGAAATGATC CAGTGCTTG-3'). Le profil thermique comprend une étape initiale de dénaturation de 94°C pendant 4 minutes. Une série de 25 à 35 cycles supplémentaires a été effectuée, consistant en une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 s, une étape de recuit à 50°C pendant 30s et une étape d'extension à 72°C pendant 40 s. Il y a eu une dernière étape d'extension de 5 min après le dernier cycle. Les

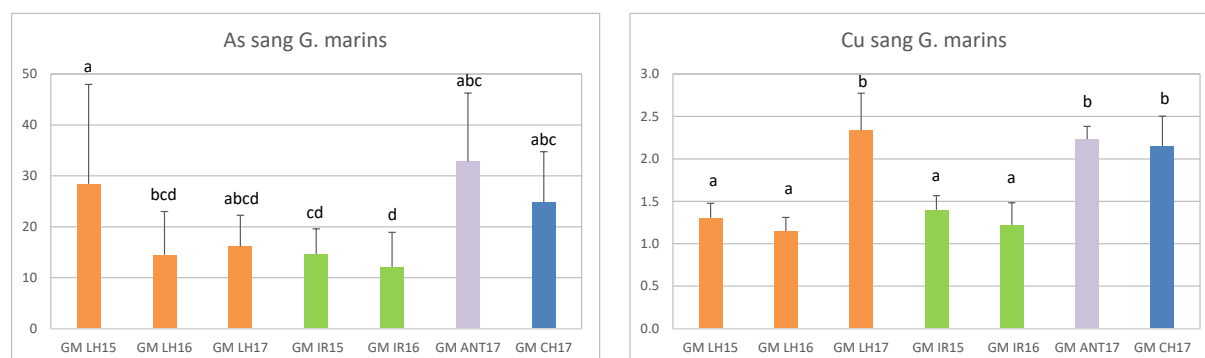
produits de réaction en chaîne de la polymérase ont été séparés dans des gels d'agarose à 1%, passés dans un tampon TBE standard pendant 1 heure et visualisés par coloration au bromure d'éthidium.

4 Résultats et analyses

Les résultats des analyses des concentrations métalliques sont présentés par espèce. Les graphiques par élément métallique sont présentés en annexes. Les résultats des corrélations entre tissus sont présentés par année. L'influence des isotopes stables est présenté par année.

4.1 Goéland marin

Pour les goélands marins, les concentrations de l'Ag, du Cd, du Co, du Cr, du Ni, et du V dans le sang sont généralement inférieures à la limite de détection quel que soit le site et quelle que soit l'année. Pour les éléments essentiels, on retiendra une faible variation des concentrations de Fe, de Se et de Zn sans patterns clairs, une concentration de Cu et de Mn plus élevée pour les individus échantillonnés en 2017 quel que soit le site (Figure 1). Les concentrations de Pb les plus élevées sont rencontrées chez les goélands du Havre quelle que soit l'année. Enfin, les concentrations de Hg sont les plus élevées chez les goélands des îles Chausey (Figure 1).



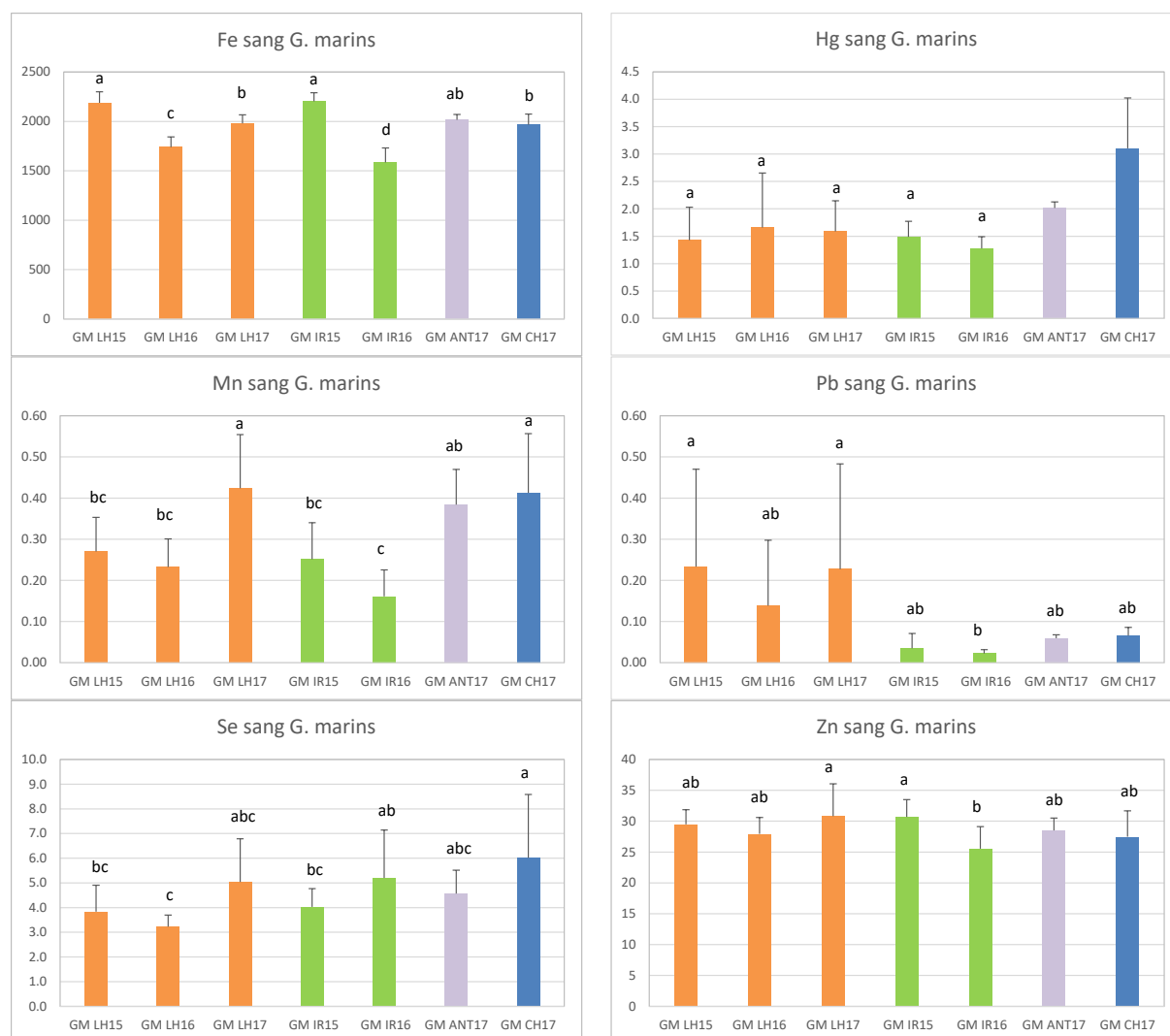


Figure 1 Concentrations des éléments métalliques ($\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) chez le goéland marin (GM) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (IR), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (26), 2016 (26) et 2017 (29).

4.2 Goéland Argenté

Pour les goélands argentés, les concentrations de l'Ag, du Cd, du Co, du Cr, du Ni, et du V dans le sang sont également généralement inférieures à la limite de détection quel que soit le site et quelle que soit l'année. Pour les éléments essentiels, il n'y a aucune différence significative entre les sites et les années pour le Mn et le Zn (Figure 2). Comme pour les goélands marins, l'année 2017 se distingue avec des concentrations plus élevées en Cu et moins élevées en Fe pour les oiseaux du Havre et de Chausey. Les plus faibles concentrations de Pb sont observées pour les oiseaux de Chausey sans différence marquée entre les sites du Havre et celui du Ratier. En revanche, les goélands argentés de Chausey présentent les plus fortes concentrations de Se et ceux de la ville du Havre es plus faible, ce qui semble indiquer

une influence de l'alimentation marine sur les niveaux de Se. Cette influence marine n'est cependant pas retrouvée pour l'As et le Hg (Figure 2) même si elle est bien marquée par des valeurs significativement différentes pour les rapports isotopiques du carbone et du soufre.

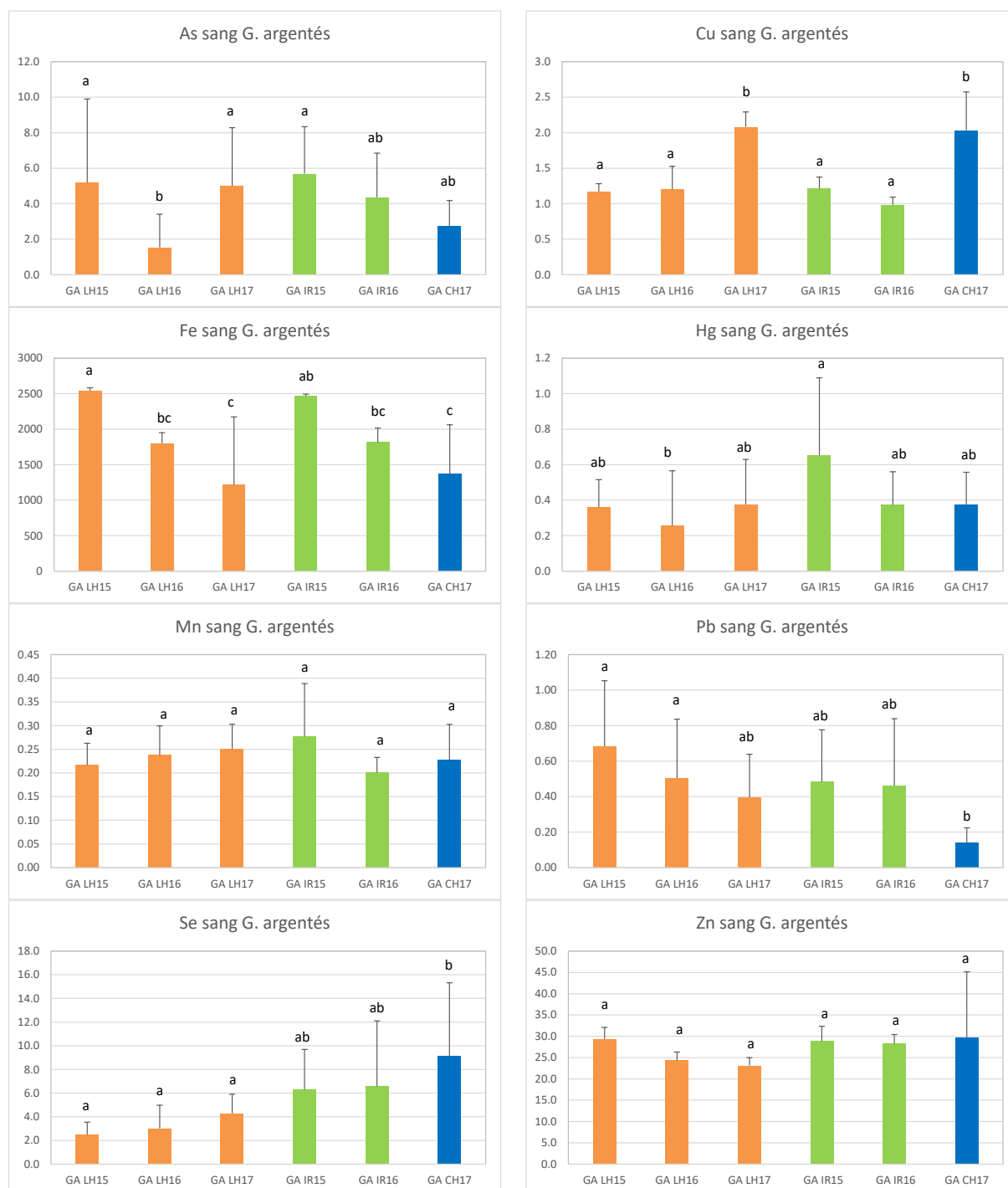


Figure 2 Concentrations des éléments métalliques ($\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) chez le goéland argenté (GA) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (IR) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (18), 2016 (26) et 2017 (28).

4.3 Goéland brun

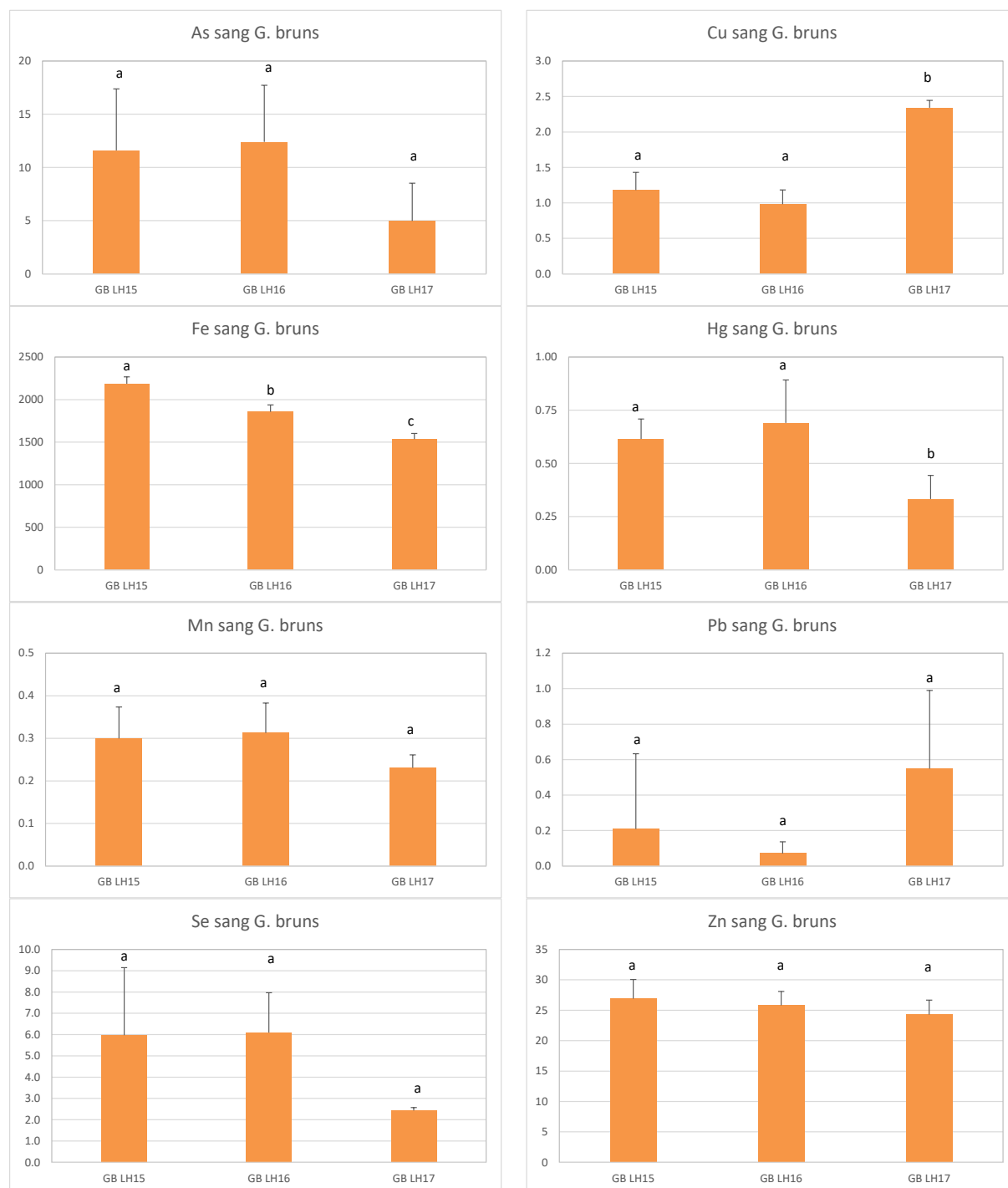


Figure 3 Concentrations des éléments métalliques ($\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) chez le goéland brun (GB) du site de Le Havre (LH), échantillonnés en 2015 (12), 2016 (10) et 2017 (3).

Les goélands bruns ont été échantillonnés uniquement sur le site du Havre, les concentrations de Cu sont significativement plus élevées en 2017 que les autres années en cohérence avec ce qui a été observé pour les deux autres espèces de goélands. Comme pour le goéland argenté, les concentrations de Fe sont en revanche inférieures en 2017, ce qui est

le cas également des concentrations de Hg. Aucune différence significative des concentrations en As, Mn, Se et Zn n'est observée pour cette espèce.

4.4 Cormorans huppés



Figure 4 Concentrations des éléments métalliques ($\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) chez le cormoran huppé (COR) du site d'Antifer (ANT) et de Chausey (CH) échantillonnés en 2017 (12).

Dans le cas des cormorans huppés (Figure 4), les mesures ont toutes été réalisées en 2017. A l'exception du Fe et du Mn pour lesquels il n'y a pas de différence significative entre les sites, toutes les concentrations sont inférieures chez les oiseaux de Chausey comparés à ceux d'Antifer.

4.5 Corrélations entre tissus

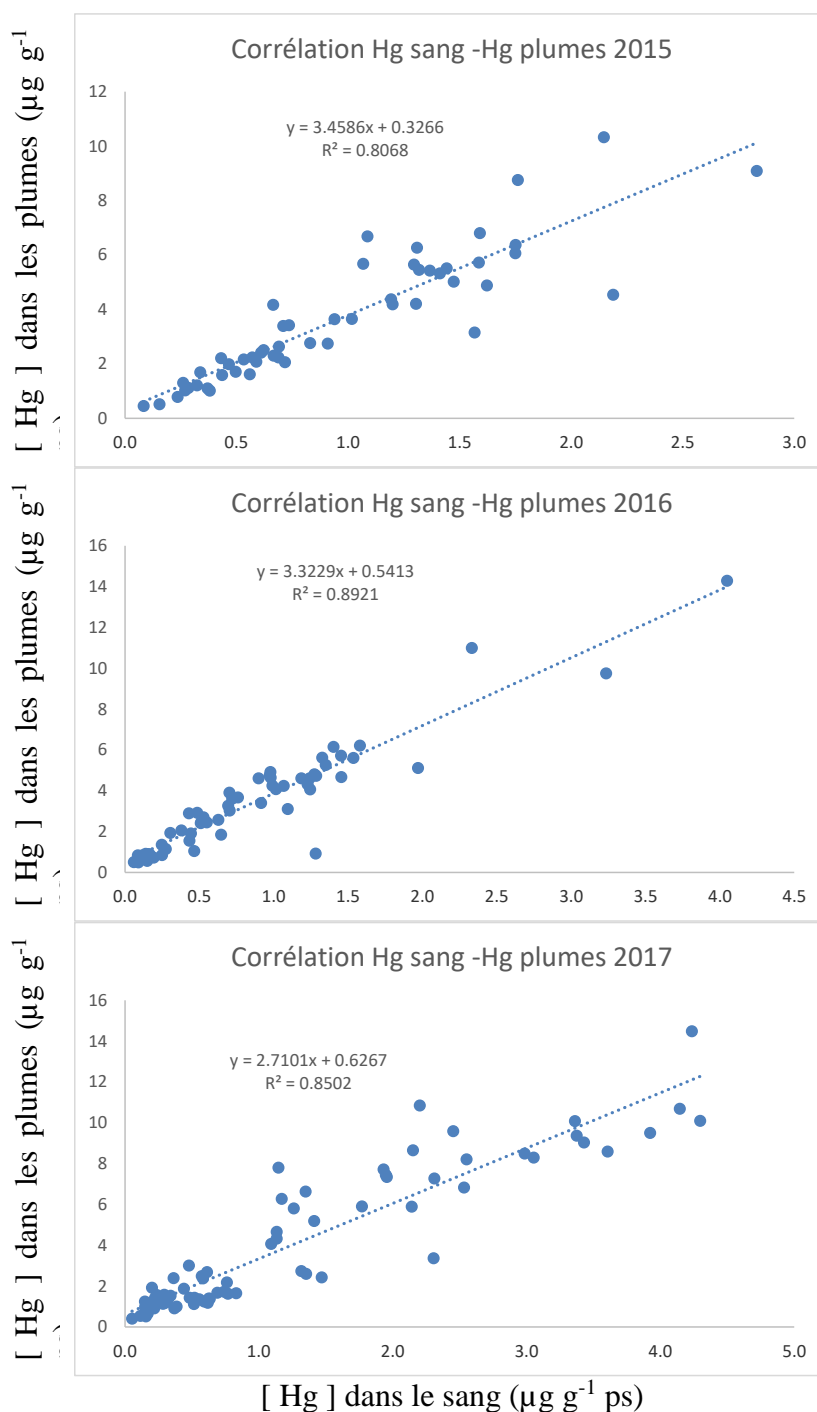


Figure 5 Corrélations entre les concentrations de mercure dans les plumes et dans le sang ($\mu g\ g^{-1}$ poids sec) pour les années 2015 (56), 2016 (77) et 2017 (72) indépendamment de l'espèce et du site d'échantillonnage.

Parmi les 14 éléments métalliques dosés, seul le Hg montre une corrélation significative entre les concentrations mesurées dans le sang et les concentrations mesurées dans les plumes indépendamment de l'espèce (Figure 5). L'un ou l'autre tissu sont donc représentatif de l'exposition au Hg au cours de la croissance des poussins.

En ce qui concerne les isotopes stables, ils montrent tous une forte corrélation entre le sang et les plumes (Figures 6, 7 et 8) quelle que soit l'année considérée.

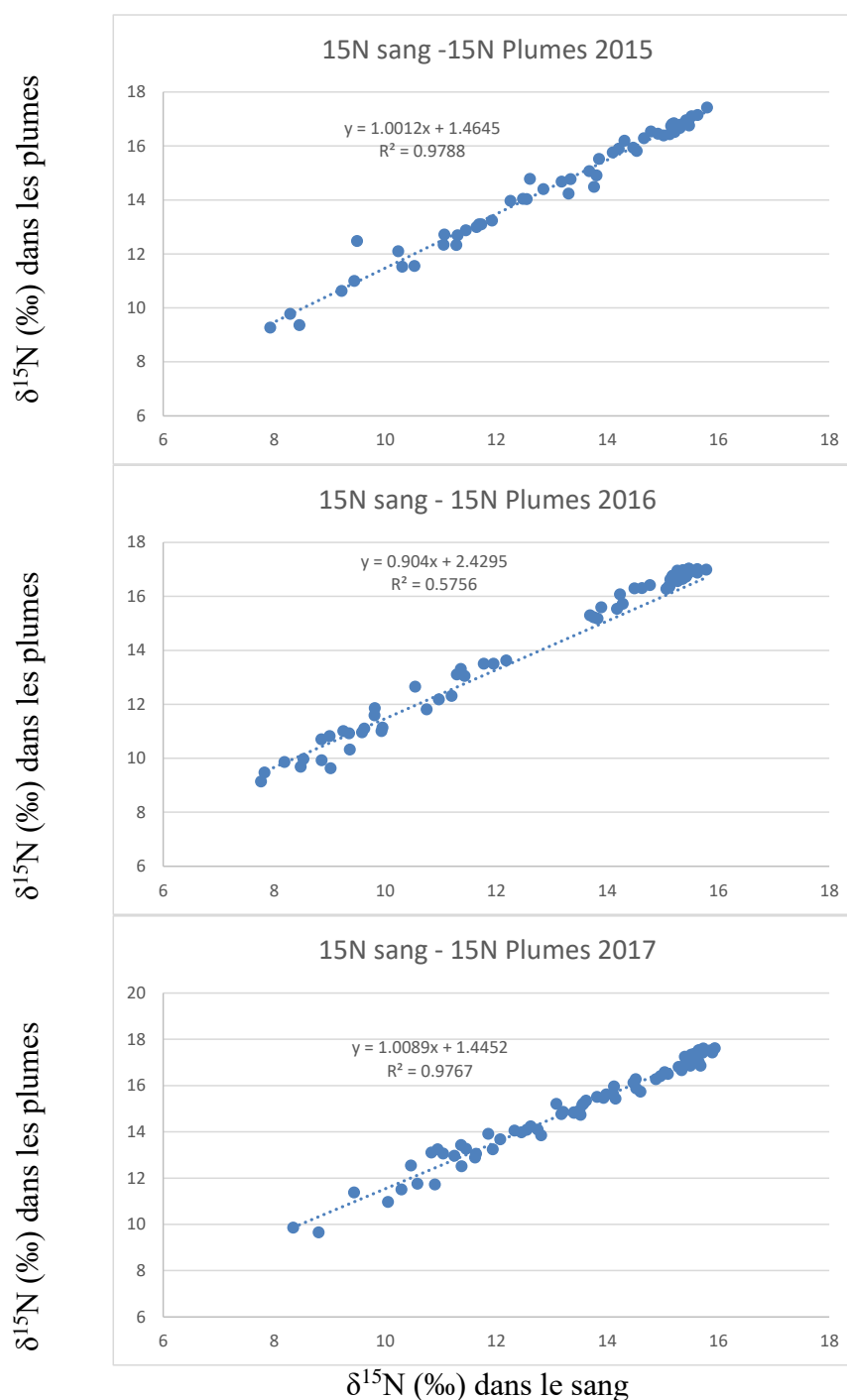


Figure 6 Corrélations entre rapports isotopiques de l'azote dans les plumes et dans le sang (‰) pour les années 2015 (54), 2016 (77) et 2017 (72) indépendamment de l'espèce et du site d'échantillonnage.

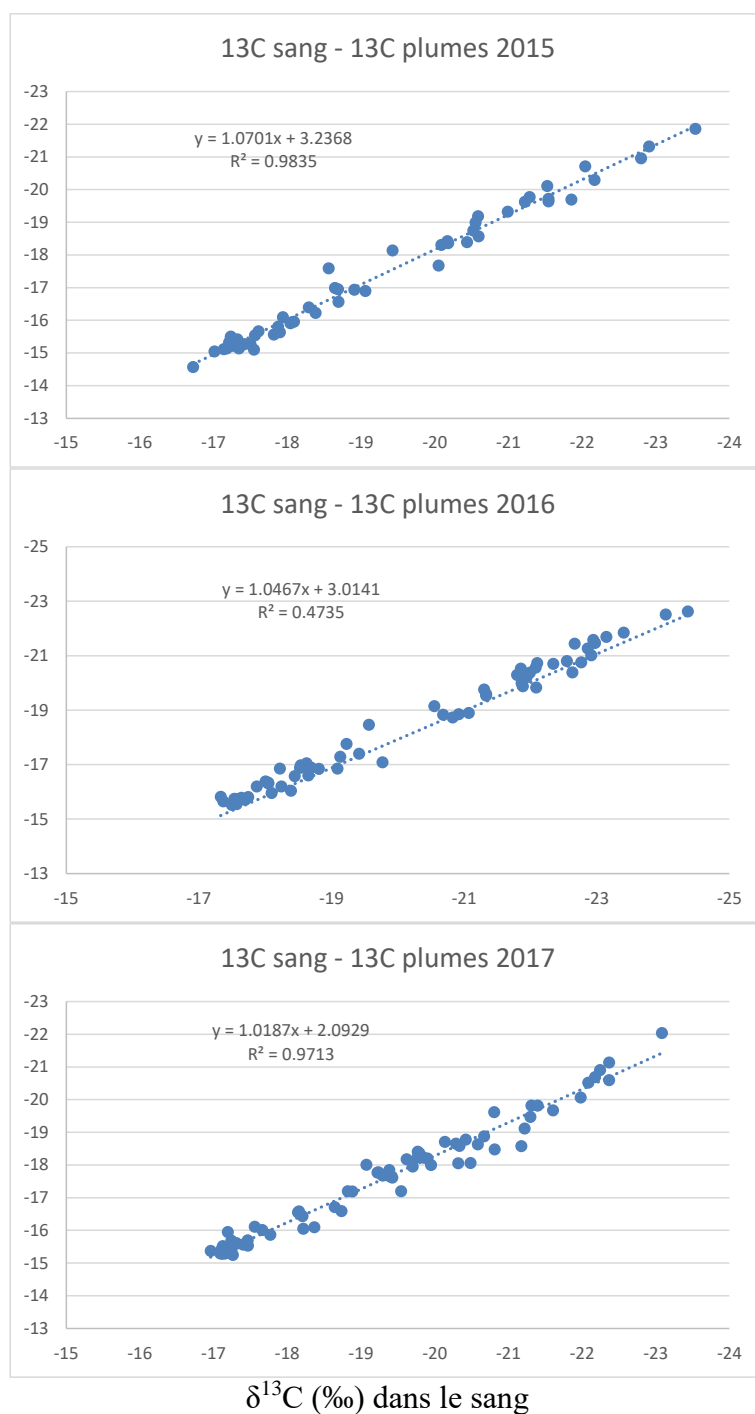
$\delta^{13}\text{C}$ (‰) dans les plumes $\delta^{13}\text{C}$ (‰) dans les plumes $\delta^{13}\text{C}$ (‰) dans les plumes

Figure 7 Corrélations entre rapports isotopiques du carbone dans les plumes et dans le sang (‰) pour les années 2015 (54), 2016 (77) et 2017 (72) indépendamment de l'espèce et du site d'échantillonnage.

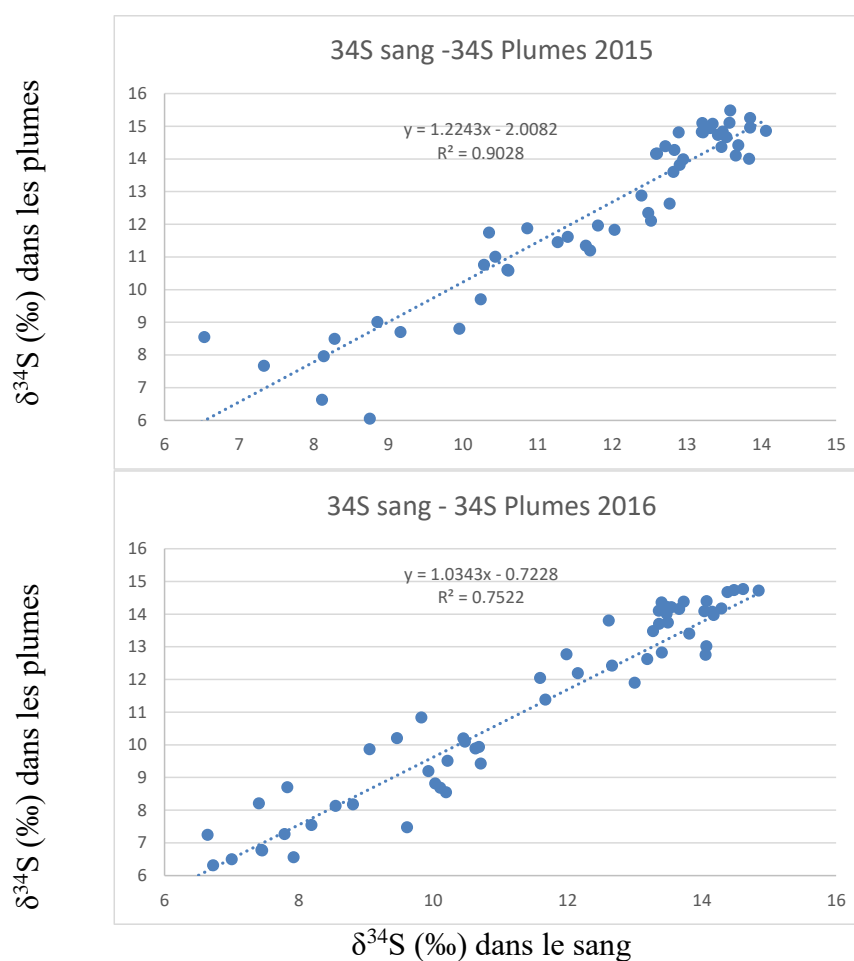


Figure 8 Corrélations entre rapports isotopiques du soufre dans les plumes et dans le sang (‰) pour les années 2015 (54) et 2016 (77) indépendamment de l'espèce et du site d'échantillonnage.

4.6 Influence du niveau trophique et de l'habitat d'alimentation

Le niveau trophique influence les contaminants bioamplifiables tels le Hg (Figure 9). Ainsi la position trophique inférieure des goélands argentés par rapport à celle des goélands bruns et marins explique qu'ils ont des concentrations de Hg plus faibles quel que soit le tissu considéré. L'habitat d'alimentation plus côtier des goélands argentés par rapport aux goélands bruns et marins est aussi un facteur qui explique la moindre exposition des poussins au mercure (Figures 10 et 11).

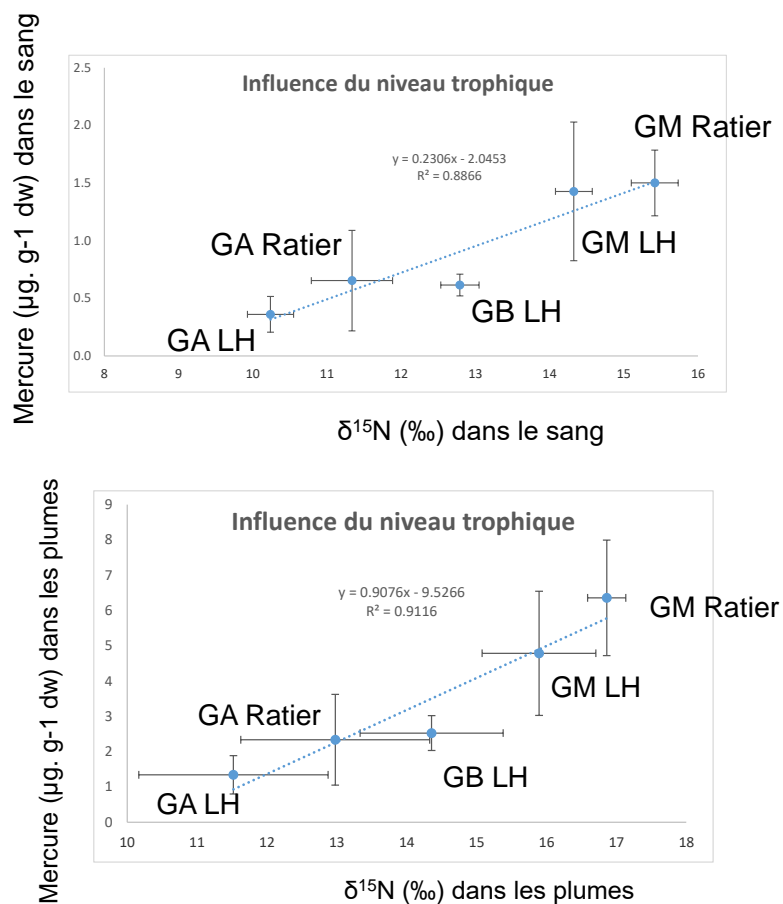
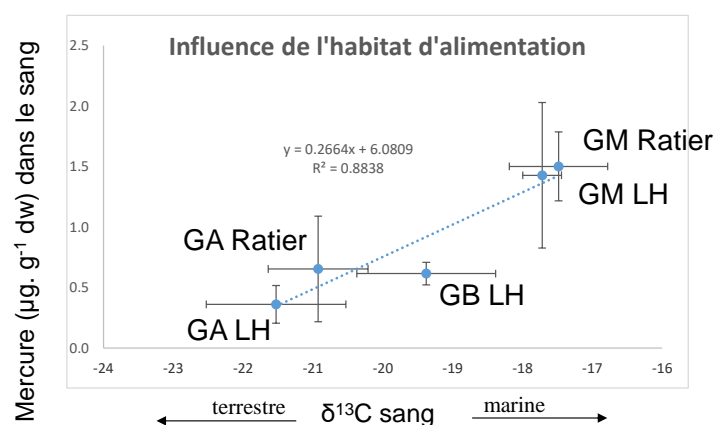


Figure 9 Concentrations de mercure ($\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) en fonction du rapport isotopique de l'azote (‰) pour les 3 espèces de goélands échantillonnés au Havre (LH) et à l'îlot du Ratier (IR) en 2015. GM : goéland marin ; GA : goéland argenté ; GB : goéland brun.



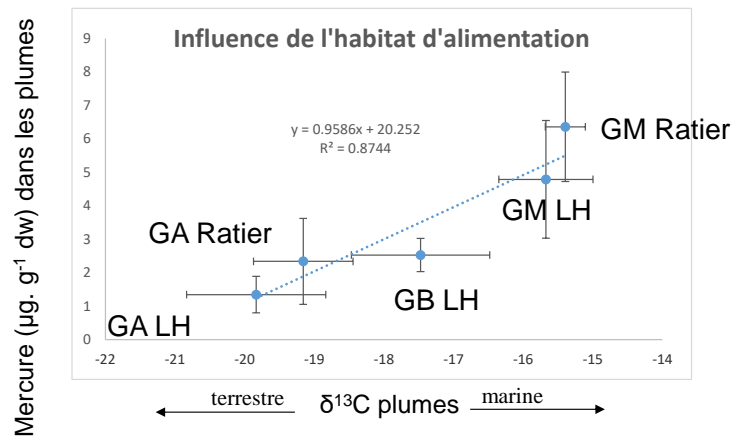


Figure 10 Concentrations de mercure ($\mu\text{g.g}^{-1}$ poids sec) en fonction du rapport isotopique du carbone (‰) pour les 3 espèces de goélands échantillonnés Havre (LH) et à l'îlot du Ratier (IR) en 2015. GM : goéland marin ; GA : goéland argenté ; GB : goéland brun.

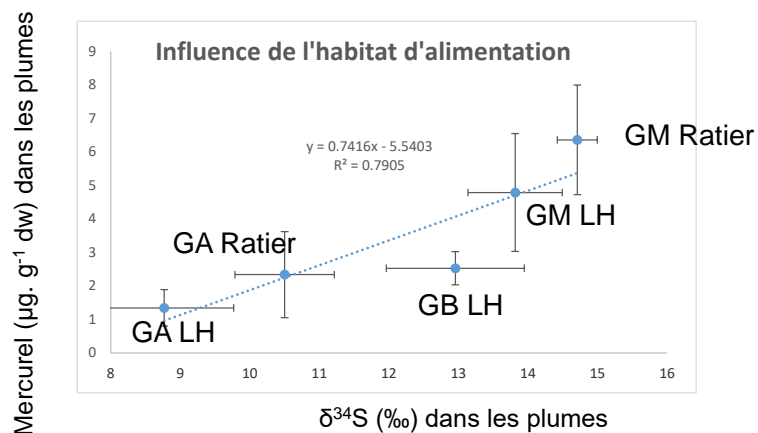
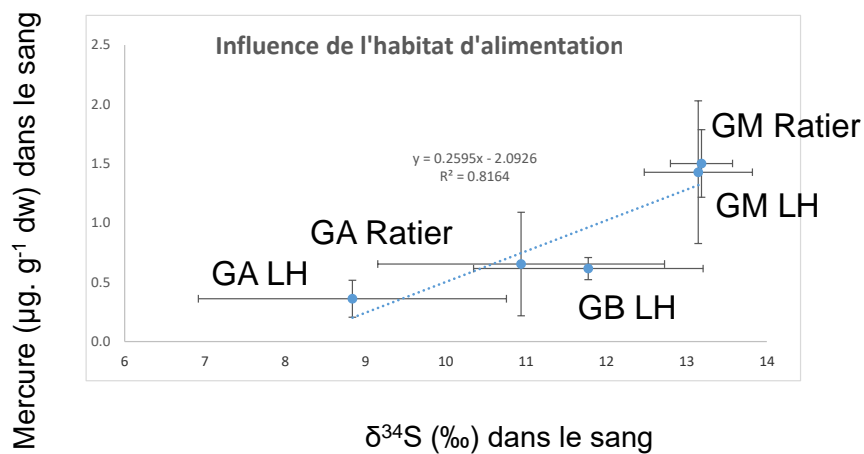


Figure 11 Concentrations de mercure ($\mu\text{g.g}^{-1}$ poids sec) en fonction du rapport isotopique du soufre (‰) pour les 3 espèces de goélands échantillonnés Havre (LH) et à l'îlot du Ratier (IR) en 2015. GM : goéland marin ; GA : goéland argenté ; GB : goéland brun.

5 Données supplémentaires - Présentation des résultats par élément métallique

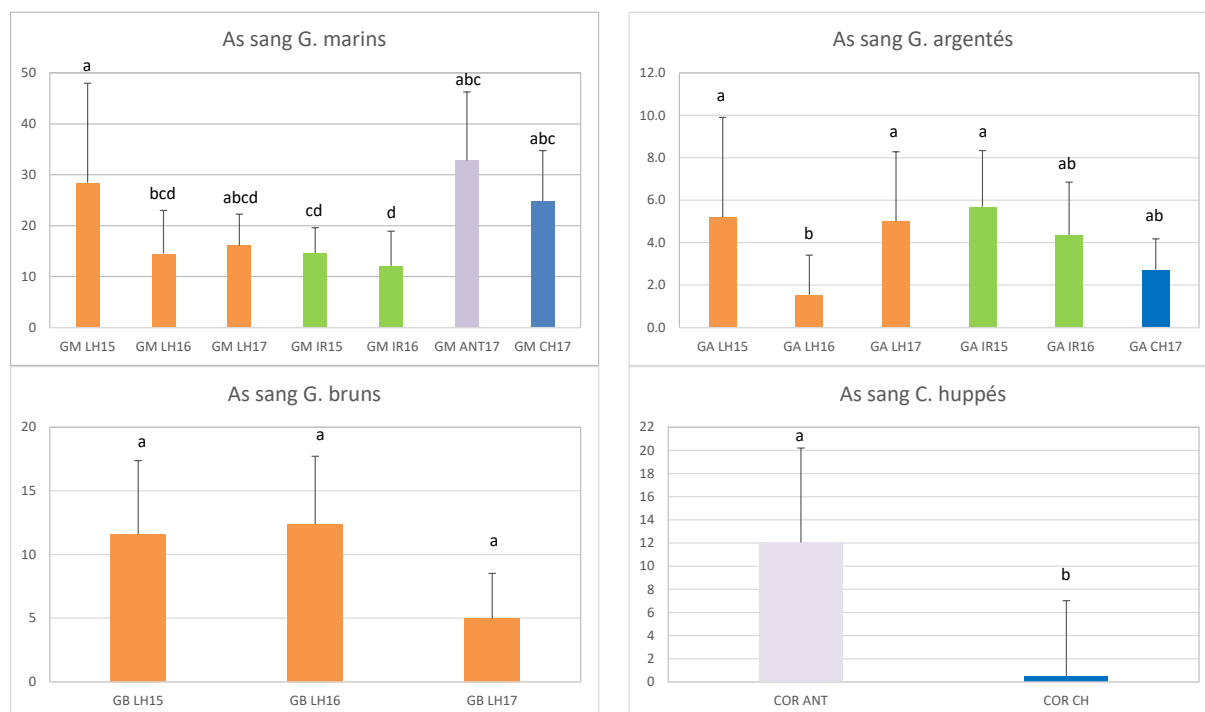


Figure 12 Concentrations d'arsenic ($\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) chez le goéland marin (GM), le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (56), 2016 (77) et 2017 (72).

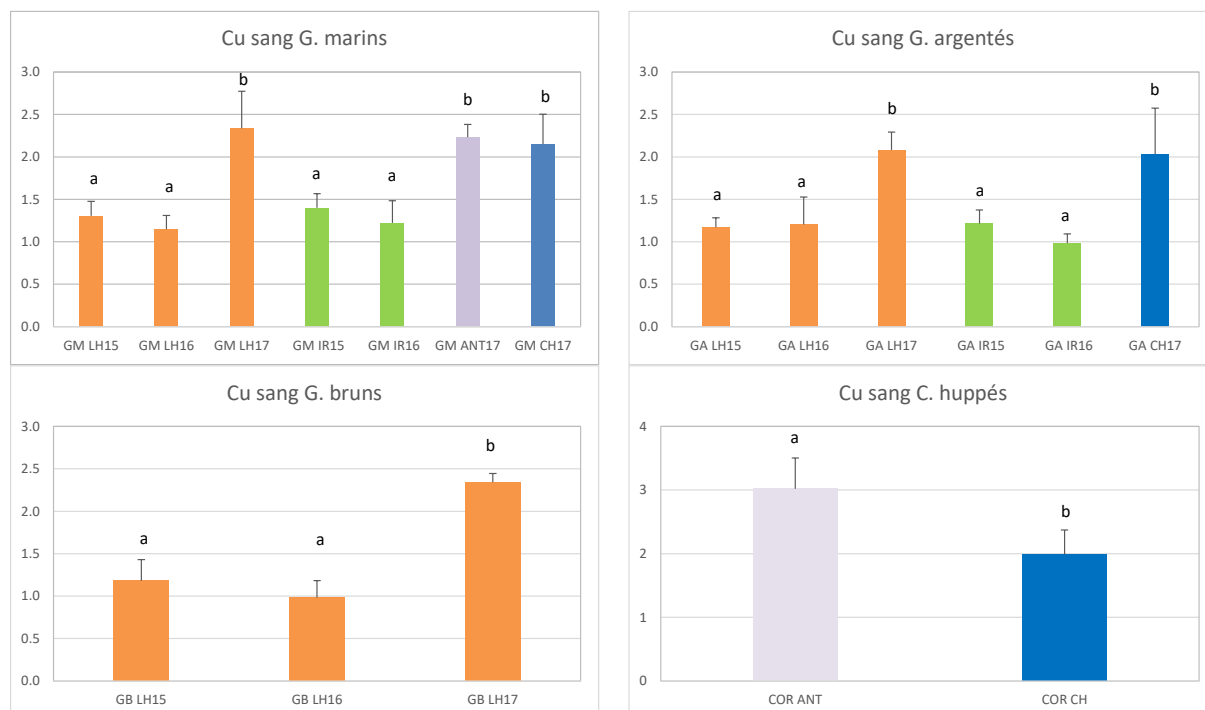


Figure 13 Concentrations de cuivre ($\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) chez le goéland marin (GM), le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (56), 2016 (77) et 2017 (72).

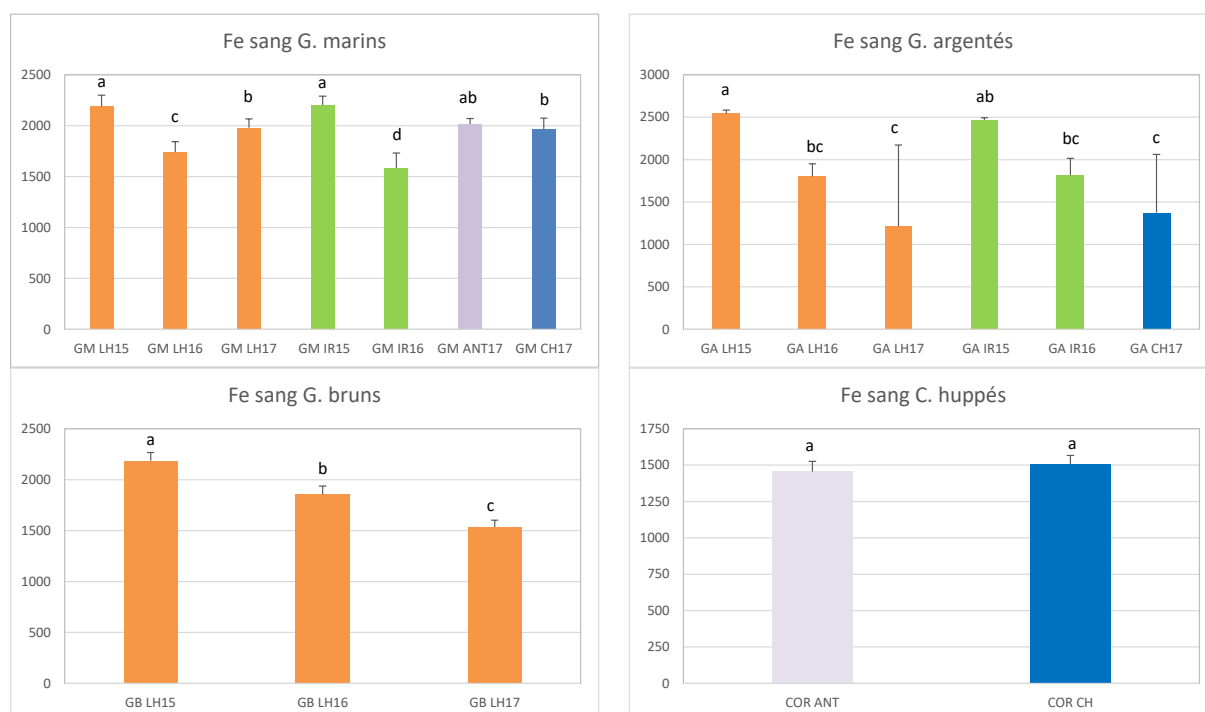


Figure 14 Concentrations de fer ($\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) chez le goéland marin (GM), le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (56), 2016 (77) et 2017 (72).

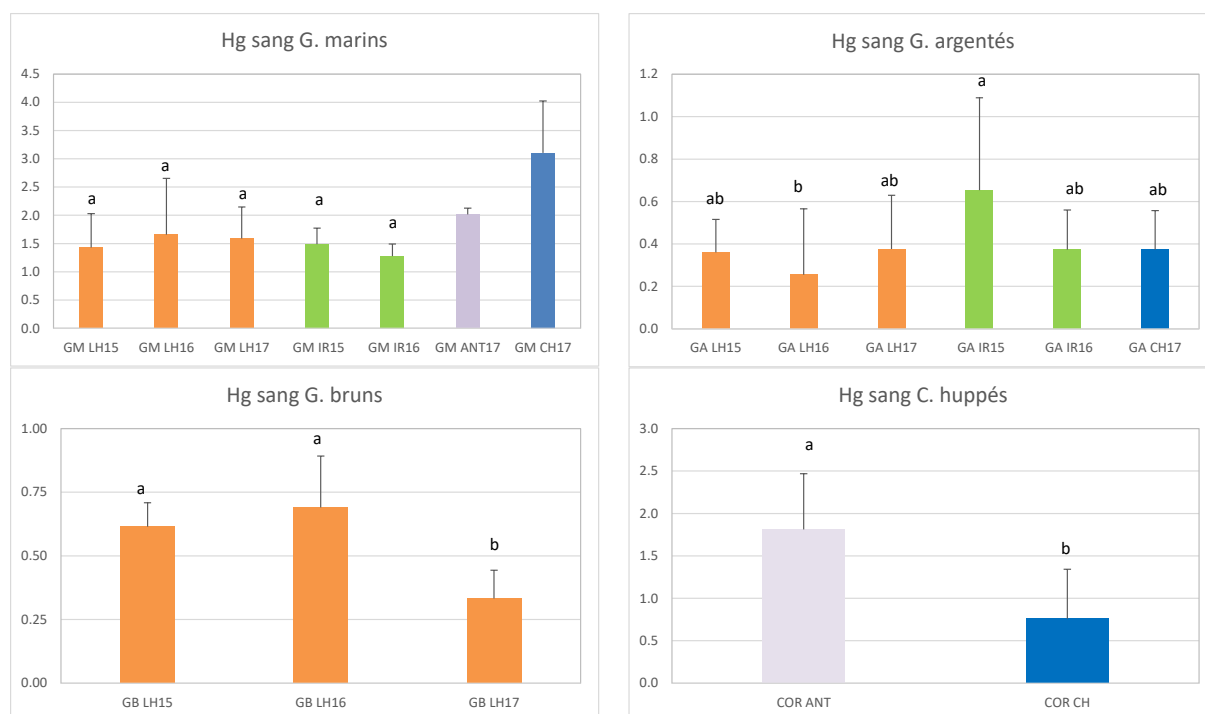


Figure 15 Concentrations de mercure (µg g⁻¹ poids sec) chez le goéland marin (GM), le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (56), 2016 (77) et 2017 (72).

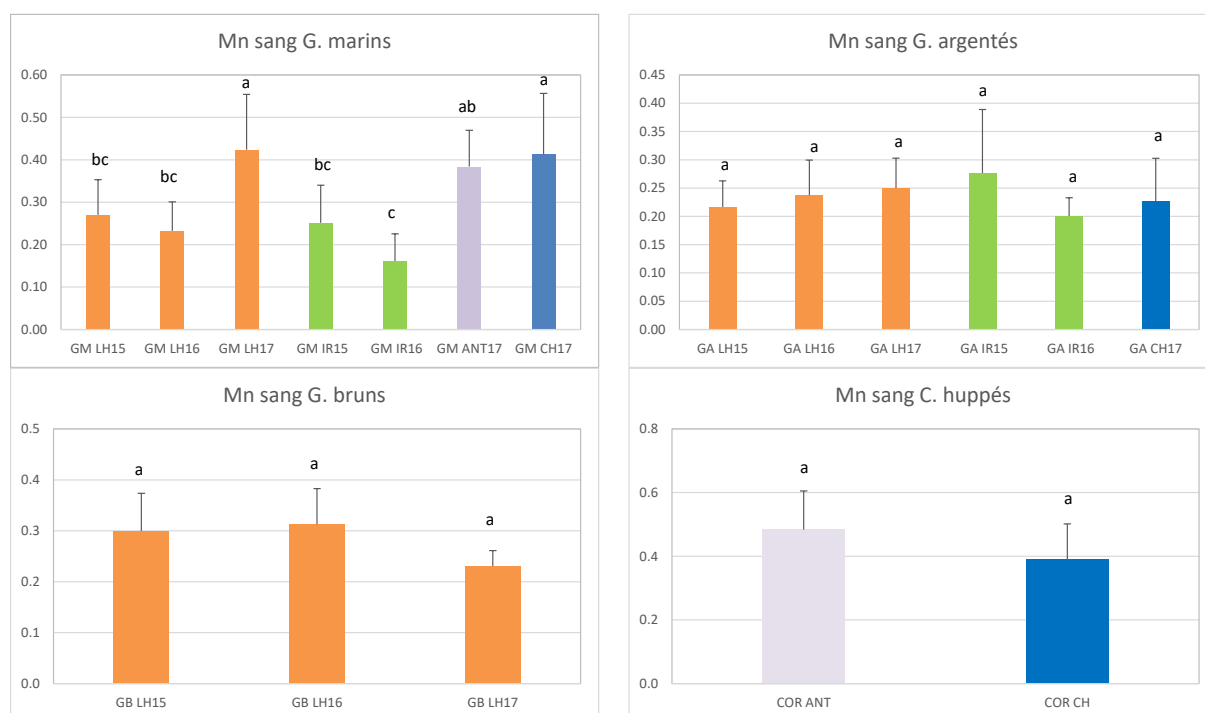


Figure 16 Concentrations de manganèse (µg g⁻¹ poids sec) chez le goéland marin (GM), le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (56), 2016 (77) et 2017 (72).

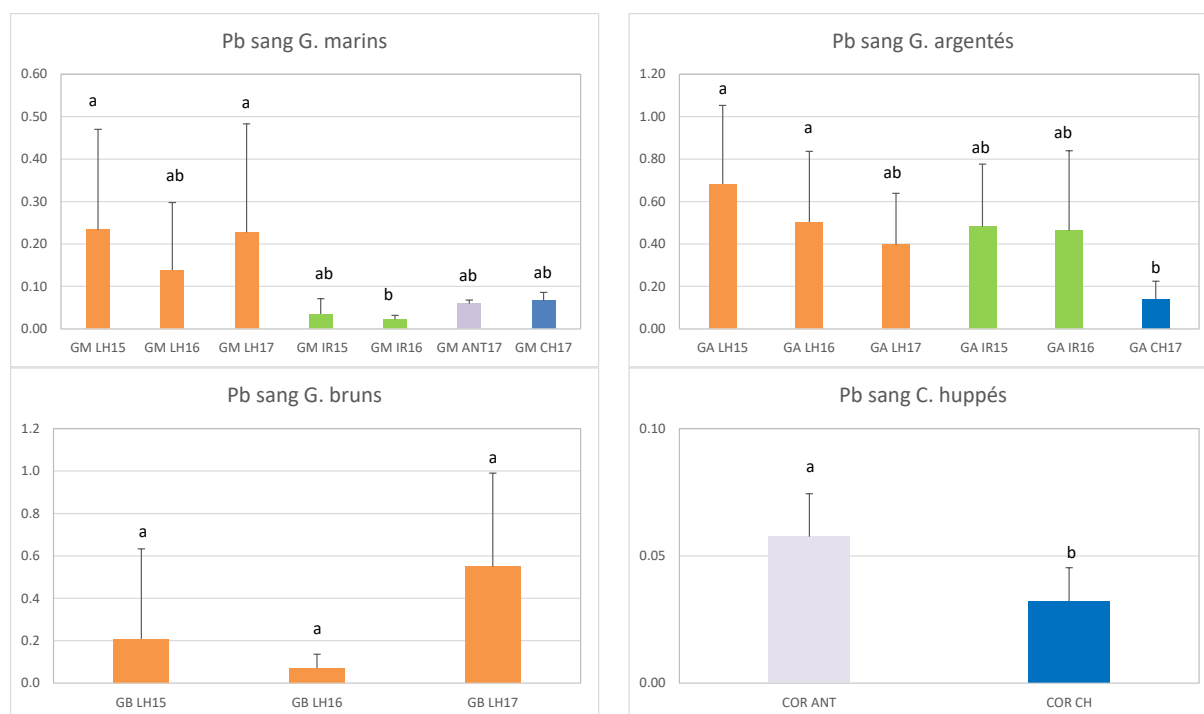


Figure 17 Concentrations de plomb ($\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) chez le goéland marin (GM), le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (56), 2016 (77) et 2017 (72).

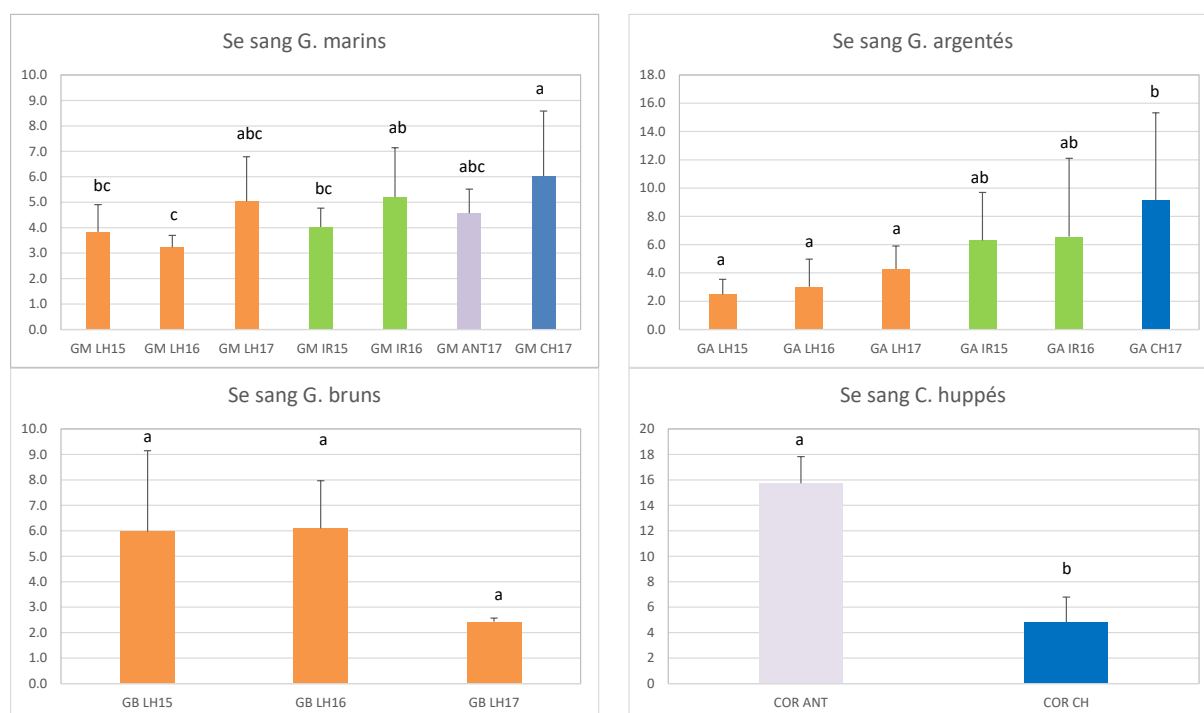


Figure 18 Concentrations de sélénium ($\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) chez le goéland marin (GM), le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (56), 2016 (77) et 2017 (72).

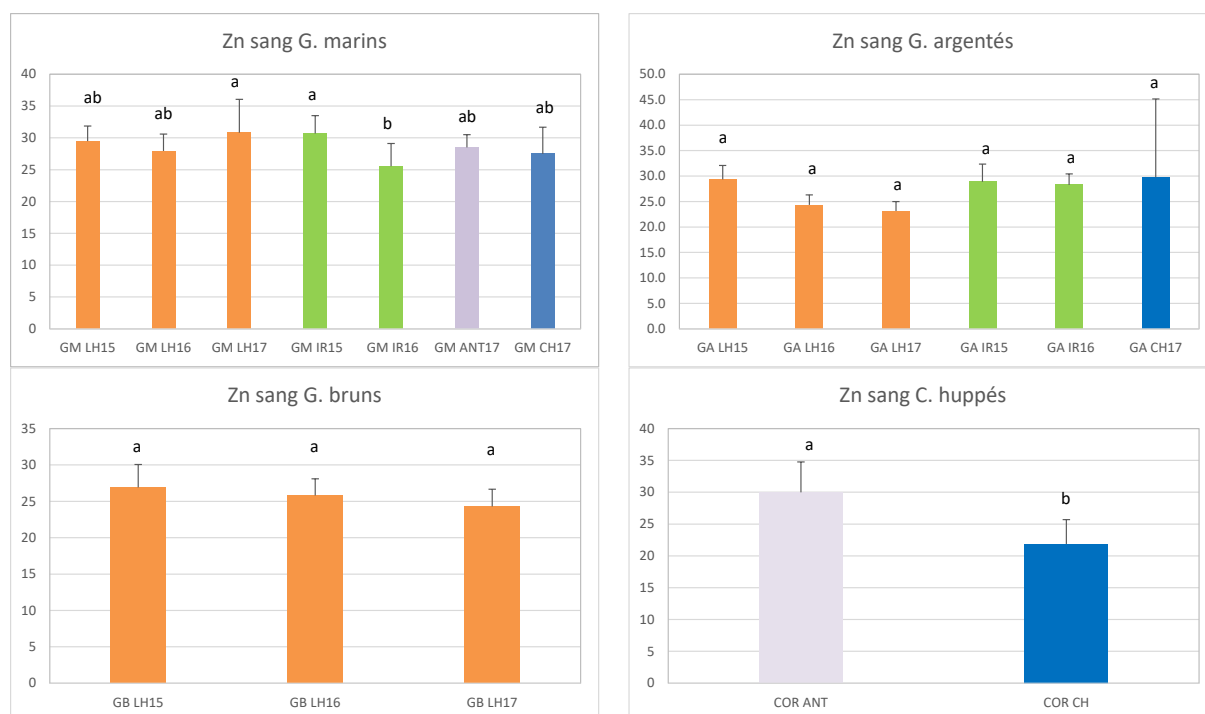


Figure 19 Concentrations de zinc ($\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) chez le goéland marin (GM), le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (56), 2016 (77) et 2017 (72).



Annexes 8

Rapport Seine-Aval 5

Acronyme du projet : ECOTONES

Coordinateur : Benoit Xuereb

Tache 2. Evaluation des effets de la contamination sur l'avifaune (responsable Paco Bustamante)

HAP et alkylphénols dans l'avifaune de l'estuaire de Seine

L. Poirier, A. Zalouk-Vergnoux, A. Kamari – EA 2160 MMS / UNantes

P. Bustamante - UMR 7266 LIENSs / ULR

1 Contexte

L'étude des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et de leurs métabolites (mHAP), ainsi que des alkylphénols (AP) a été réalisée dans le cadre du suivi des effets de la contamination chimique sur la santé des organismes de l'estuaire.

2 Echantillons analysés et protocoles

Seize HAP (naphtalène, Nap ; 1-méthylnaphtalène, 1-MeNap ; 2-méthylnaphtalène, 2-MeNap ; acénaphthène, Ace ; fluorène, Fluo ; phénanthrène, Phe ; anthracène, Ant ; fluoranthène, Fla ; pyrène, Pyr ; benzo(a)anthracène, B(a)ant ; chrysène, Chry ; benzo(b)fluoranthène, B(b)fla ; benzo(k)fluoranthène, B(k)fla ; benzo(a)pyrène, B(a)pyr ; benzo(ghi)pérylène, B(ghi)per ; dibenzo(ah)anthracène, D(ah)ant), 7 mHAP (1-naphtol, 1-OHNap ; 2-naphtol, 2-OHNap ; 2-hydroxyfluorène, 2-OHF ; 1 hydroxyphénanthrène, 1-OHPhe ; 9 hydroxyphénanthrène, 9-OHPhe ; 1 hydroxypyrène, 1-OHPyr ; 6-hydroxychrysène ; 6-OHChry) et 4 AP (4-tert-butylphénol ; 4-tBP, 4 tert-octylphénol, 4-tOP ; 4 n-octylphénol, 4-nOP, mélange de 4-nonylphénol ramifié, 4-pNP) ont été analysés dans le plasma des poussins de 4 espèces d'oiseaux marins : goéland marin, goéland argenté, goéland brun et cormoran huppé prélevés dans différents sites de l'estuaire de Seine de 2015 à 2017, et sur le site des Iles Chausey en 2017 (Tableau 1).

Tableau 1 Nombre d'échantillons dosés pour chaque paramètre (HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques ; mHAP : métabolites de HAP ; AP : alkylphénols) pour chaque espèce d'oiseau et par site.

Oiseaux	Site	2015			2016			2017		
		HAP	mHAP	AP	HAP	mHAP	AP	HAP	mHAP	AP
Goéland marin	Le Havre	13	13	13	13	13	13	11	11	11
	Illet du Ratier	13	13	13	13	13	13			
	Antifer							3	3	3
	Chausey							15	15	15
Goéland brun	Le Havre	12	12	12	10	10	10	3	3	3
Goéland argenté	Le Havre	12	12	12	15	15	15	12	12	12
	Illet du Ratier	6	6	6	11	11	11			
	Chausey							16	16	16
Cormoran huppé	Antifer							2	2	2
	Chausey							10	10	10
Total		56	56	56	77	77	77	77	72	72

3 Matériel et méthodes

Les HAP, mHAP et AP ont été analysés dans le plasma des individus prélevés après une étape de purification de l'échantillon sur des cartouches SPE (Solid phase extraction) de type Bondelut (C18, 100mg, 1mL). La cartouche est préalablement conditionnée avec 3 x 1mL de méthanol (MeOH, VWR Chemicals) puis 3 x 1mL d'eau MilliQ. L'échantillon de plasma (250 µL) est ensuite déposé en haut de colonne. Une première étape de lavage impliquant l'élution de 3 x 1 mL d'un mélange Eau MilliQ : MeOH (95 :5, v/v) est réalisée avant un séchage de la cartouche sous vide pendant 10 min. Les analytes sont élués à l'aide de 6 x 1 mL d'acétonitrile (ACN, Scharlau LC-MS) suivis de 6 x 1 mL de dichlorométhane (DCM, Hypersolv Chromanorm, VWR Chemicals). Les fractions organiques ainsi récupérées sont évaporées sous flux d'azote jusqu'à atteindre un volume d'environ 150 µL. Un volume de 150 µL de diméthylformamide (DMF, Scharlau) est alors ajouté à l'extrait. L'évaporation est poursuivie jusqu'à 150 µL. L'extrait est alors ajusté à un volume de 250 µL avec de l'ACN dans une seringue graduée puis placé dans un vial ambré à -20 °C jusqu'à l'analyse.

L'analyse des extraits est réalisée par chromatographie liquide haute performance couplée à un fluorimètre (CLHP-Fluo, HPLC DIONEX ULTIMATE 3000, détecteur de fluorescence DIONEX 3000RS) équipée d'une colonne KINETEX C18 (2.6 µm, 15 cm x 2.1 mm). L'analyse est effectuée à l'aide d'un gradient d'élution pendant 20,8 min impliquant un mélange ACN /

Eau MilliQ (tableau 2). La température de la colonne est maintenue à 40°C et celle des échantillons à 4°C.

Tableau 2 Conditions d'élution utilisées pour l'analyse des échantillons par CLHP-Fluo.

Temps (min)	Débit (mL/min)	%Eau MilliQ	% Acétonitrile
0	0,48	63	37
4,2	0,48	63	37
13,8	0,48	20	80
14,9	0,48	0	100
17,6	0,48	0	100
18,1	0,48	63	37
20,8	0,48	63	37

Les temps de rétention ainsi que les couples de longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour chaque analyte sont présentés dans le tableau 3. En l'absence de matériaux certifiés, l'ensemble de la procédure analytique a été validée à l'aide d'échantillons de plasma dopés, avec des quantités d'analyte variant de 10 à 250 ng. Un taux de recouvrement satisfaisant et répétable (> 60%) a été obtenu pour la grande majorité des analytes (tableau 3). Cinq blancs ont été effectués tous les 30 échantillons afin d'évaluer les contaminations croisées. La concentration des blancs a été soustraite à la concentration calculée dans l'échantillon. Ces dernières sont exprimées en ng/mL de plasma. Les limites de détection et de quantification de la méthode (de l'ordre du pg/mL au ng/mL) ont été calculées à l'aide de la méthode de Vial et Jardy (1999)² et sont présentées dans le tableau 3. Lorsque la concentration d'un congénère est comprise entre la LOQ et la LOD, la valeur de la LOD est utilisée. Afin d'analyser les différences entre les sites, les années et les espèces, un test de Kruskal-Wallis a été effectué à l'aide du logiciel STATISTICA, suivi d'un test post-hoc de comparaison multiple.

² J. Vial and A. Jardy, Experimental Comparison of the Different Approaches To estimate LOD and LOQ of an HPLC Method, Analytical Chemistry. 1999, 71, 2672- 2677.

Tableau 3 Paramètres chromatographiques et de détection des différents analytes.

	Abbréviation composé	Temps de rétention (min)	Longueurs d'onde excitation (nm)	Longueurs d'onde émission (nm)	Limite de quantification (ng/mL de plasma)	Limite de détection (ng/ml de plasma)	Rendement moyen (%)
4-tert-butylphénol	4-tBP	5,12	225	313	3,94	1,18	84
4 tert-octylphénol	4-tOP	12,49	225	313	1,28	0,38	68
Nonylphénol ramifié	4-pNP	13,93	225	313	18,03	5,41	51
4 n-octylphénol	4-nOP	14,15	225	313	3,85	1,16	59
2-naphtol	2-OHNap	2,48	245	380	3,11	0,93	72
1-naphtol	1-OHNap	2,94	290	430	6,54	1,96	70
2 - hydroxyfluorène	2-OHF	4,82	245	380	0,81	0,24	82
1 et 9 - hydroxyphénanthrène	OHPhé	7,57	245	380	1,34	0,40	49
1 - hydroxypyrene	1-OHPyr	9,58	245	380	6,71	2,01	83
6-hydroxychrysène	6-OHChry	11,23	245	380	0,79	0,24	50
Naphtalène	Nap	8,59	271	334	1,31	0,39	43
1-Methylnaphtalène	1-MeNap	10,63	270	324	1,45	0,44	49
2-Methylnaphtalène	2-MeNap	10,87	270	324	0,71	0,21	64
Acenaphtène	Ace	11,24	225	313	0,79	0,24	61
Fluorène	Fluo	11,46	270	324	0,08	0,02	71
Phenanthrène	Phé	12,01	245	380	0,40	0,12	81
Anthracène	Ant	12,27	245	380	0,64	0,19	65
Fluoranthène	Fla	13,17	280	455	0,60	0,18	60
Pyrene	Pyr	13,38	270	385	0,12	0,04	69
Benzo(a)anthracène	B(a)ant	14,40	270	385	0,19	0,06	66
Chrysène	Chry	14,51	270	385	0,41	0,12	70
Benzo(b)fluoranthène	B(b)fla	15,43	290	430	1,01	0,30	67
Benzo(k)fluoranthène	B(k)fla	15,52	290	430	0,18	0,05	69
Benzo(a)pyrène	B(a)pyr	15,64	290	430	0,35	0,11	64
Dibenzo(ah)anthracène	D(ah)ant	16,32	290	430	1,00	0,30	63
Benzo(ghi)perylene	B(ghi)per	16,54	290	430	1,15	0,35	67

4 Résultats et analyses

Les résultats des analyses des contaminants organiques sont présentés par espèce. Les graphiques présentant les proportions de chaque congénère dans chaque famille chimique sont présentés en annexes.

4.1 Goéland marin

Les concentrations en HAP, mHAP et AP totaux dans le plasma des goélands marins sont présentées dans la figure 1 (colonne de gauche). Le pourcentage global d'individus dont les concentrations sont supérieures aux limites de détection est de 88% pour la somme des HAP, 57% pour celles des mHAP et 75% pour les AP. Une forte variabilité individuelle et inter-annuelle peut être observée au sein de chaque cohorte d'échantillons. Concernant les HAP totaux, les concentrations s'échelonnent de 15 ng/mL à 81 ng/mL. Les individus prélevés en 2016 sur l'îlot du Ratier et sur Le Havre présentent des concentrations significativement supérieures aux poussins des mêmes sites prélevés en 2015. Les individus du site de Chausey présentent une concentration significativement supérieure à celle des goélands argentés et des cormorans prélevés sur le même site, la même année. Concernant les mHAP totaux, la concentration calculée chez les poussins échantillonnés sur le site d'Antifer en 2017 (270 ± 59 ng/mL) est significativement plus élevée que celle calculée pour les poussins prélevés sur l'îlot du Ratier en 2015 (7 ± 9 ng/mL). Aucune autre différence significative entre les sites et les saisons n'est observée. Concernant les AP totaux, les concentrations s'échelonnent de 7 ng/mL à 204 ng/mL. Les individus prélevés en 2017 sur les sites d'Antifer et de Chausey présentent des concentrations significativement inférieures aux individus prélevés sur l'îlot du Ratier en 2016, et aux individus prélevés sur le site du Havre en 2016 et 2017.

Les proportions relatives de chaque congénère sont présentées dans la colonne droite de la figure 1. Concernant les HAP, les résultats montrent une prédominance des congénères les plus légers à 2 cycles aromatiques (Nap, 1 MeNap et 2 MeNap) dont la somme varie de 59 à 99 % en fonction du site ou de la saison. Puis suivent les congénères à 3 cycles (Ace, Fluo, Phe), représentant de 2 à 26 % des HAP totaux. Parmi les HAP lourds (4 cycles et +), seul le pyrène est quantifié dans la presque totalité des individus ; le B(a)ant et le Chry sont quantifiés ponctuellement, tandis que le B(b)fla, le B(k)fla, le B(a)pyr, le D(ah)ant et le

B(g,h,i)per ne sont pas détectés. La forte proportion d'HAP de faible poids moléculaire dans le plasma des poussins pourrait traduire une contamination majoritaire des individus par la voie atmosphérique (Motelay-Massei et al., 2006).

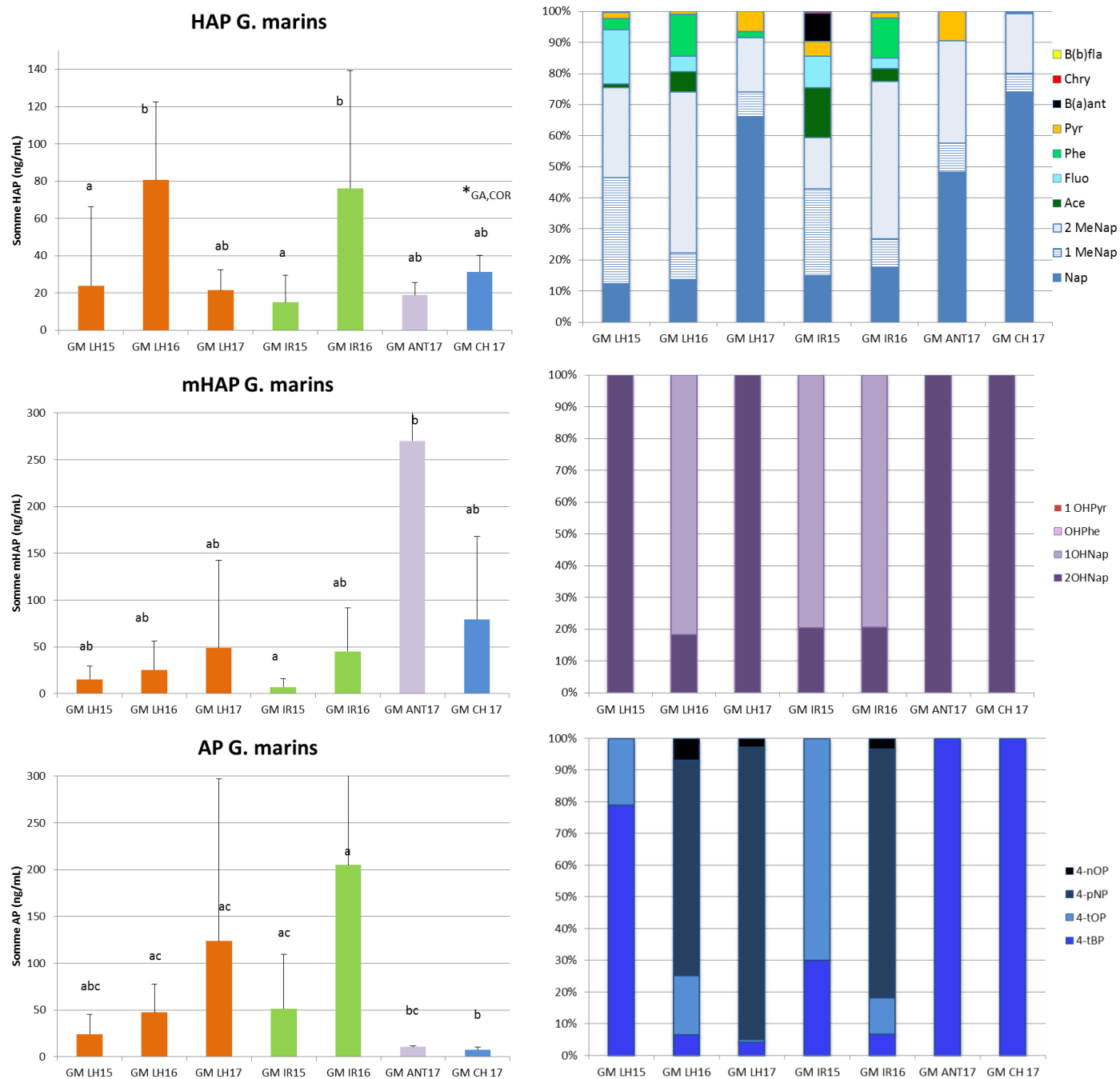


Figure 1 Concentrations (moyenne \pm écart-type) des HAP, mHAP et AP totaux (à gauche ; ng/mL) et proportions relatives des différents congénères (à droite ; %) dans le plasma des goélands marins (GM) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (IR), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (26), 2016 (26) et 2017 (29). Les différences inter-site et inter-saison (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) sont indiquées à l'aide de lettres minuscules. Au sein de chaque famille de composés, les différences inter-espèces au sein d'un même site et d'une même saison sont indiquées par des astérisques suivies de l'espèce présentant une différence significative (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

Concernant les mHAP, les métabolites hydroxylés du Nap (1 et 2-OHNap) représentent les seuls métabolites détectés chez les goélands marins. Ce résultat est cohérent avec la proportion majoritaire d'HAP légers dans le plasma des individus. Le 2-OHNap est plus fréquemment quantifié et domine les profils chimiques obtenus pour les individus du Havre (2015 et 2017), d'Antifer et de Chausey (2017). L'inverse est observé pour les individus du Havre en 2016, et sur l'Ilot du Ratier en 2015 et 2016, pour lesquels le 1-OHNap est le plus abondant. Concernant les AP, le 4-tBP et le 4-pNP représentent les deux composés les plus fréquemment quantifiés dans les individus, suivis du 4-tOP. Les profils d'abondance relative de ces congénères varient en fonction de l'année et du site ; des similitudes peuvent être notées en 2016 entre les individus prélevés au Havre et sur l'Ilot du Ratier. Sur Antifer et Chausey en 2017, seul le 4-tBP est détecté dans le plasma des individus. Ces résultats sont en cohérence avec les études précédentes sur les alkylphénols en milieux côtiers et estuariens, qui montrent une prédominance du 4-pNP en lien direct avec sa production et son usage plus élevés (David et al., 2009 ; Lui et al., 2011). Les effluents de station d'épuration constituent une des sources majeures du nonylphénol dans les eaux estuariennes.

4.2 Goéland argenté

Les concentrations en HAP, mHAP et AP totaux dans le plasma des goélands argentés sont présentées dans la figure 2 (colonne de gauche). Comme observé pour le goéland marin, le pourcentage d'individus dont les concentrations sont supérieures aux limites de détection est de 84% pour la somme des HAP, 38% pour celles des mHAP et 63% pour les AP. Concernant les HAP totaux, les concentrations s'échelonnent de 6 ng/mL à 29,8 ng/mL sans différence significative entre les sites et les années. Une différence inter-espèce peut être soulignée au niveau du site du Havre en 2017 : la concentration en HAP totaux des goélands argentés est significativement supérieure à celle des goélands bruns. Concernant les mHAP totaux, la concentration calculée chez les poussins échantillonnés sur le site de l'Ilot du Ratier en 2016 (115 ± 105 ng/mL) est significativement plus élevée que celle calculée pour les poussins prélevés au Havre en 2015 ($9,2 \pm 10,3$ ng/mL). Le faible pourcentage d'individus supérieur à la LOD ne permet pas de mettre en évidence d'autre différence significative entre les sites. Concernant les AP totaux, les concentrations s'échelonnent de 14,5 ng/mL à 146 ng/mL. Les individus prélevés en 2017 sur le site de Chausey présentent des

concentrations inférieures aux autres sites. Cependant, la différence n'est significative qu'avec les individus du Havre de 2015 en raison des fortes variations individuelles. Aucun AP n'a été détecté dans les individus prélevés en 2016 au Havre. Une différence inter-espèce peut être notée en 2015 au Havre : la concentration en AP totaux des goélands argentés est significativement supérieure à celles des goélands bruns.

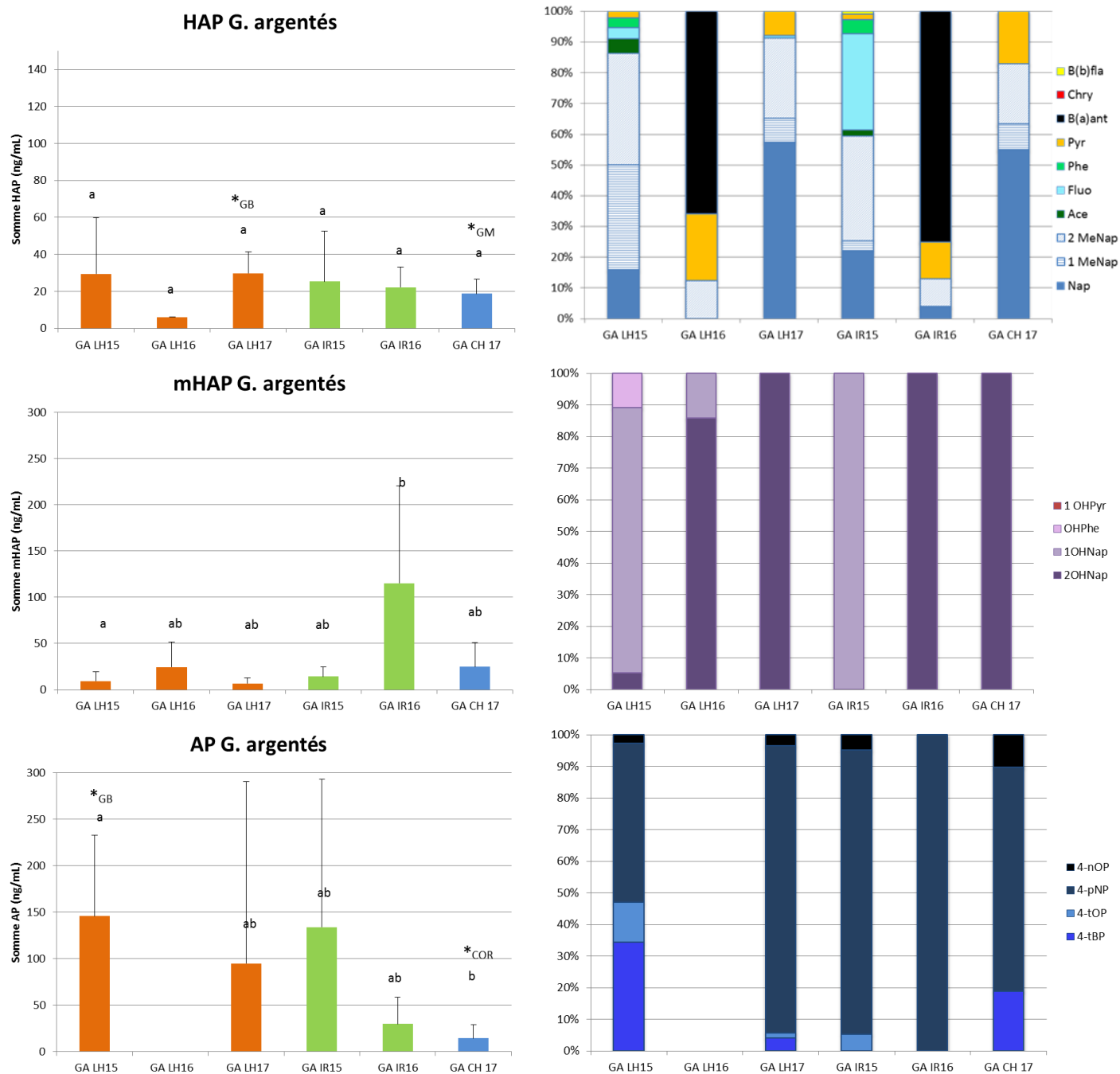


Figure 2 Concentrations (moyenne \pm écart-type) des HAP, mHAP et AP totaux (à gauche ; ng/mL) et proportions relatives des différents congénères (à droite ; %) dans le plasma des goélands argentés (GA) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (IR) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (18), 2016 (26) et 2017 (28).

Les différences inter-site et inter-saison (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) sont indiquées à l'aide de lettres minuscules. Au sein de chaque famille de composés, les différences inter-espèces au sein d'un même site et d'une même saison sont indiquées par des astérisques suivies de l'espèce présentant une différence significative (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

Les proportions relatives de chaque congénère sont présentées dans la colonne de droite de la figure 2. Concernant les HAP, une prédominance des congénères légers (Nap, 1 MeNap et 2 MeNap) est observée dans la plupart des cas : de 59 à 91 % en fonction du site et de la saison. Les individus de 2016 prélevés au Havre et sur l'Îlot du Ratier présentent cependant un profil dominé par des HAP plus lourds (B(a)ant et Pyr) pouvant indiquer une exposition ponctuelle à des émissions plus concentrées en ces composés (combustion incomplète de produits pétroliers (huile, essence, fioul, goudron)).

Concernant les mHAP, les métabolites hydroxylés du Nap (1 et 2-OHNap) sont, comme précédemment observé chez les goélands marins, les plus représentés. Le 2-OHNap est plus fréquemment quantifié et domine les profils chimiques obtenus pour les individus du Havre (2016 et 2017), d'Antifer et de Chausey (2017). L'inverse est observé pour les individus du Havre et de l'Îlot du Ratier en 2015, pour lesquels le 1-OHNap est le plus abondant.

Concernant les AP, le 4-pNP domine le profil chimique quel que soit le site et l'année.

4.3 Goéland brun

Les goélands bruns ont été échantillonnés uniquement sur le site du Havre.

Les concentrations en HAP, mHAP et AP totaux sont présentées dans la figure 3 (colonne de gauche). Le pourcentage d'individus dont les concentrations sont supérieures aux limites de détection est de 100% pour les HAP, 48% pour les mHAP et 55 pour les AP. Concernant les HAP totaux, les concentrations s'échelonnent de 6,9 ng/mL à 37 ng/mL avec une concentration significativement supérieure chez les individus prélevés en 2016, comparativement aux autres années. Une tendance similaire a été observée chez les goélands marins du Havre en 2016.

Concernant les mHAP totaux, les teneurs évoluent entre 6,7 et 19,7 ng/mL sans différence significative entre les années d'échantillonnage. Un résultat similaire est observé pour les AP totaux, avec des teneurs faibles s'échelonnant de 6,7 à 12,4 ng/mL. L'absence de quantification des AP dans les 10 goélands bruns sur le site du Havre en 2016 peut être soulignée.

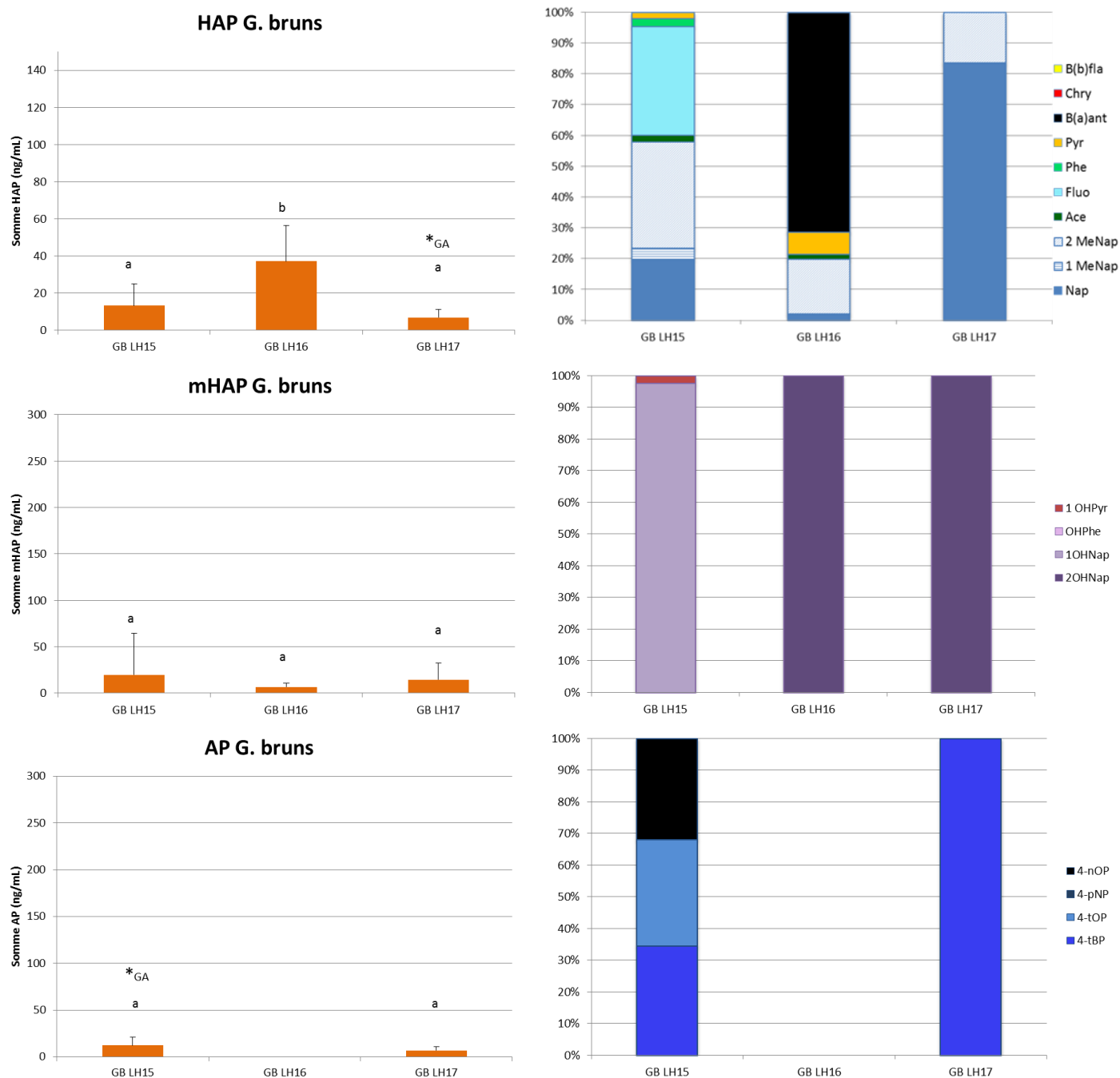


Figure 3 Concentrations (moyenne \pm écart-type) des HAP, mHAP et AP totaux (à gauche ; ng/mL) et proportions relatives des différents congénères (à droite ; %) dans le plasma des goélands bruns (GB) du site Le Havre (LH) échantillonnés en 2015 (12), 2016 (10) et 2017 (3).

Les différences inter-saison (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) sont indiquées à l'aide de lettres minuscules. Au sein de chaque famille de composés, les différences inter-espèces au sein d'un même site et d'une même saison sont indiquées par des astérisques suivies de l'espèce présentant une différence significative (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

Les proportions relatives de chaque congénère sont présentées en figure 3 (colonne de droite). Concernant les HAP, une prédominance des congénères légers (Nap, 1 MeNap et 2 MeNap) est observée en 2015 et 2017 : 58 et 100 % respectivement. Les individus prélevés

en 2016 présentent quant à eux un profil dominé par les HAP à 4 cycles et particulièrement le B(a)ant, comme précédemment observé pour les poussins de goéland argenté du Havre et de l'Îlot du Ratier cette même année.

Concernant les mHAP, les métabolites hydroxylés du Nap (1 et 2-OHNap) sont de nouveau les plus représentés. Concernant les AP, les profils sont variables : le 4-tBP est le seul analyte quantifié dans les individus de 2017 ; alors qu'en 2015, il est associé aux deux octylphénols (4-tOP, 4-nOP).

4.4 Cormoran huppé

Dans le cas des cormorans huppés (Figure 4), les mesures ont toutes été réalisées en 2017. Le pourcentage d'individus dont les concentrations sont supérieures aux limites de détection est de 100% pour les HAP, 90% pour les mHAP et 100% pour les AP. Aucune différence significative entre les deux sites échantillonnés n'est observée, quel que soit la famille d'analyte. Sur le site de Chausey, des différences inter-espèces peuvent être notées : les cormorans présentent des concentrations en HAP et AP totaux significativement inférieures à celles calculées pour les goélands marins et les goélands argentés prélevés sur ce site la même année, respectivement.

Concernant les profils chimiques (Figure 4, colonne de droite), la dominance des HAP à 2 cycles est observée pour les cormorans des deux sites (100 et 87 %, Antifer et Chausey, respectivement). Le 2-OHNap (pour les mHAP) et le 4 t-BP (pour les AP) représentent les seuls congénères détectés dans les oiseaux des deux sites.

5 Analyse globale des données de contamination

L'interprétation des données obtenues par site et espèce en intégrant l'ensemble des années de prélèvements sont résumées dans cette section.

Concernant les HAP, aucune différence inter-site n'est observée entre les sites d'Antifer, du Havre et de l'Îlot du Ratier. Sur le site de Chausey, des concentrations significativement supérieures ont été déterminées dans les goélands marins comparativement aux goélands argentés et aux cormorans.

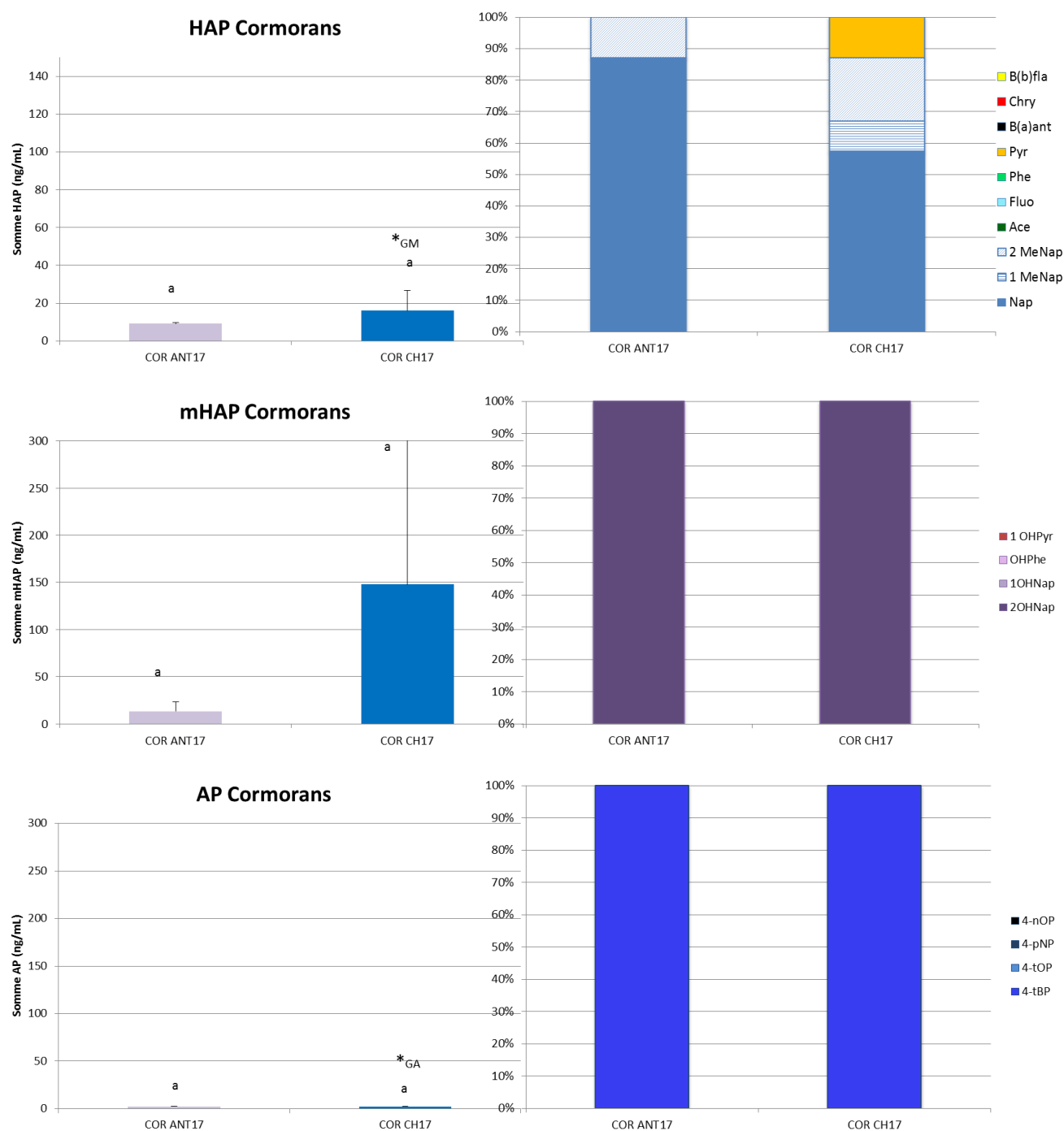


Figure 4 Concentrations (moyenne \pm écart-type) des HAP, mHAP et AP totaux (à gauche ; ng/mL) et proportions relatives des différents congénères (à droite ; %) dans le plasma des cormorans huppés (COR) du site d'Antifer (ANT) et de Chausey (CH) échantillonnés en 2017 (12).

Les différences inter-saison (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) sont indiquées à l'aide de lettres minuscules. Au sein de chaque famille de composés, les différences inter-espèces au sein d'un même site et d'une même saison sont indiquées par des astérisques suivies de l'espèce présentant une différence significative (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

Concernant les mHAP, les goélands marins du site d'Antifer présentent des concentrations supérieures aux individus du Havre et de l'Îlot du Ratier. Une supériorité est également observée chez le goéland argenté avec des concentrations supérieures au niveau de l'Îlot du Ratier par rapport au Havre.

Concernant les AP, les goélands marins du site du Havre et de l'Îlot du Ratier présentent des concentrations supérieures aux individus d'Antifer. Des différences inter-espèces peuvent être observées au niveau du Havre : les goélands argentés et marins présentent des concentrations supérieures aux goélands bruns. Une tendance similaire est observée sur Chausey entre le goéland argenté et le cormoran.

Une analyse de corrélation avec les différentes variables biologiques mesurées (masse, isotopes stables du ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S) a permis de mettre en évidence une corrélation inverse faible mais significative entre la concentration en AP totaux et le rapport isotopique du ^{34}S dans le plasma des goélands marins ($n=58$; $r=-0,30$; $p\text{-value}=0,023$) et argentés ($n=44$; $r=-0,37$; $p\text{-value}=0,011$) (Figure 5). Chez les goélands marins, cette relation inverse est également observée avec le rapport isotopique du ^{13}C ($n=58$; $r=-0,54$; $p\text{-value}<0,0001$) (Figure 6). Ces résultats suggèrent une contamination aux AP plus importante chez les individus se nourrissant préférentiellement sur le continent. Cette tendance n'est pas observée chez les goélands bruns et les cormorans pour lesquels les concentrations en AP totaux sont généralement proches des limites de détection.

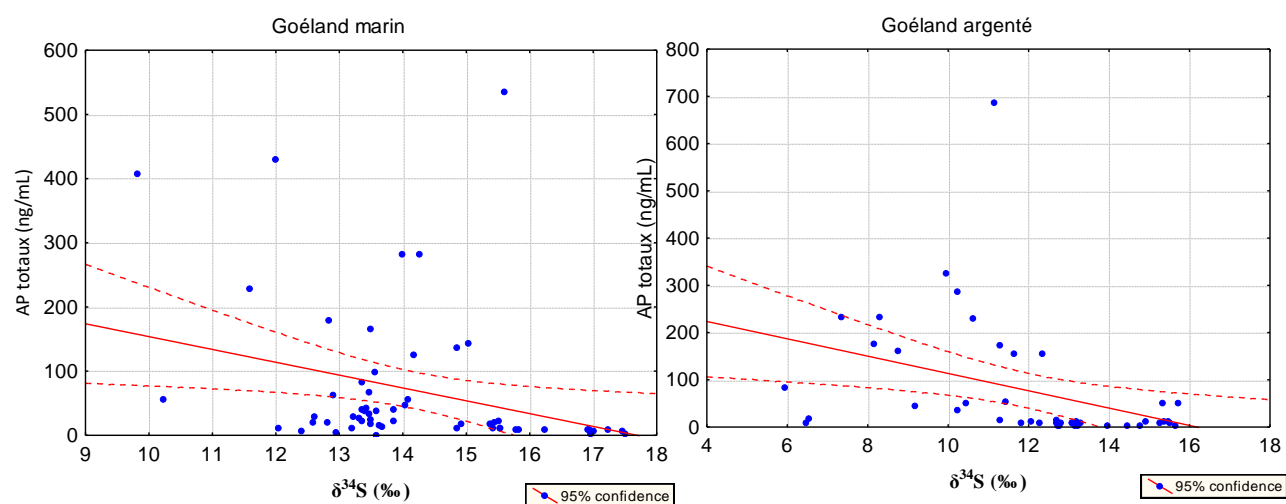


Figure 5 Concentrations des AP totaux (ng/mL) en fonction du rapport isotopique du soufre (‰) dans le sang des goélands marins (à gauche) et argentés (à droite), tous sites et années confondus.

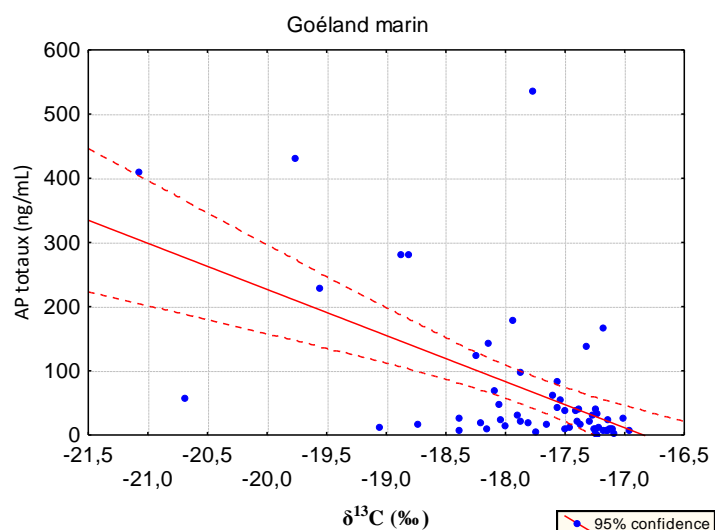


Figure 6 Concentrations des AP totaux (ng/mL) en fonction du rapport isotopique du carbone (‰) dans le sang des goélands marins, tous sites et années confondus.

Concernant les mHAP, une relation positive faible avec le rapport isotopique de l'azote peut être observée ($n=42$; $r=0,33$; $p\text{-value}=0,035$), pouvant indiquer une potentielle influence du niveau trophique sur les teneurs en mHAP (Figure 7). Aucune corrélation n'est cependant observée avec les molécules parentes, les HAP. D'autre part, une corrélation significative entre les mHAP et le rapport isotopique du soufre est notée chez cette même espèce ($n=42$; $r=0,35$; $p\text{-value}=0,025$), pouvant traduire une influence de l'habitat d'alimentation sur les teneurs en mHAP. Une nouvelle fois, aucune corrélation n'est cependant observée avec les molécules parentes.

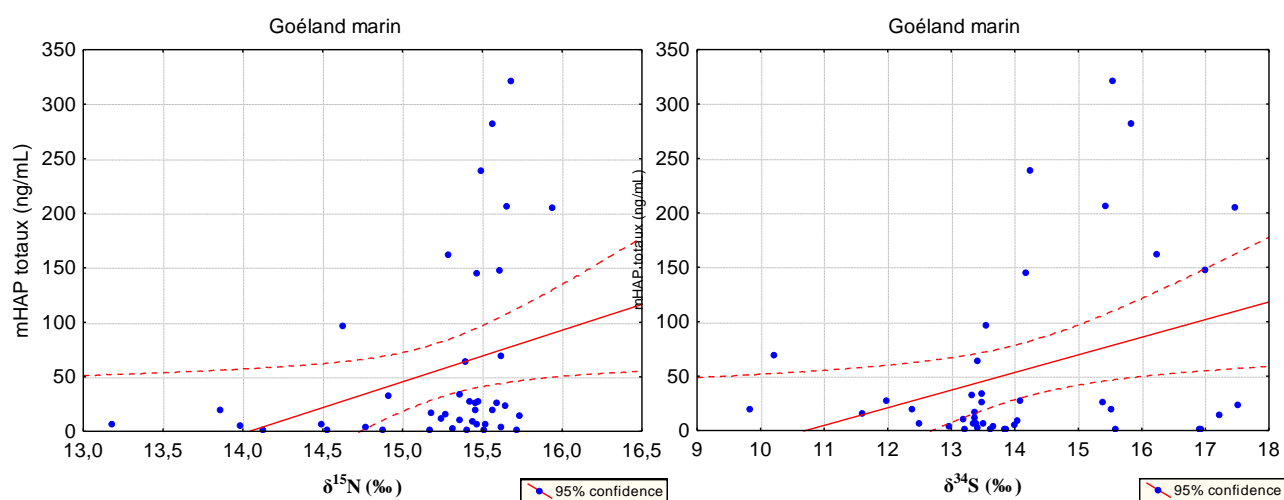


Figure 7 Concentrations des mHAP totaux (ng/mL) en fonction du rapport isotopique (‰) de l'azote (à gauche) et du carbone (à droite) dans le sang des goélands marins, tous sites et années confondus.

Chez le goéland argenté, une influence potentielle de l'habitat d'alimentation peut également être notée via une corrélation significative inverse entre les mHAP et le rapport isotopique du carbone ($n=26$; $r=-0,43$; $p\text{-value}=0,028$) (Figure 8). Cette relation n'est cependant pas observée avec les molécules parentes.

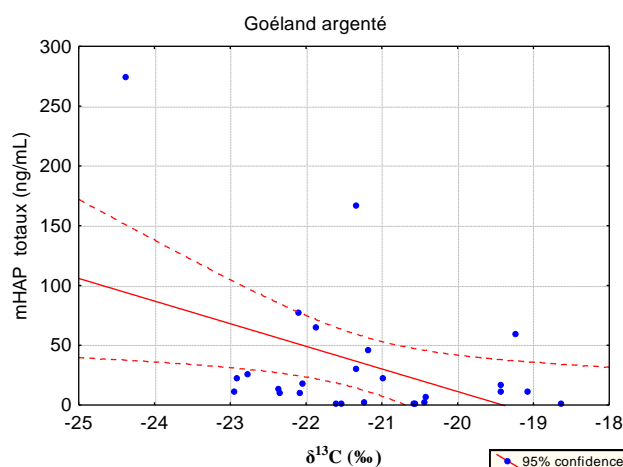


Figure 8 Concentrations des mHAP totaux (ng/mL) en fonction du rapport isotopique (‰) du carbone dans le sang des goélands argentés, tous sites et années confondus.

Concernant les HAP, une relation positive significative avec le rapport isotopique de l'azote peut être observée ($n=24$; $r=0,42$; $p\text{-value}=0,044$), pouvant indiquer une influence potentielle du niveau trophique sur les teneurs en HAP chez le goéland brun (Figure 9).

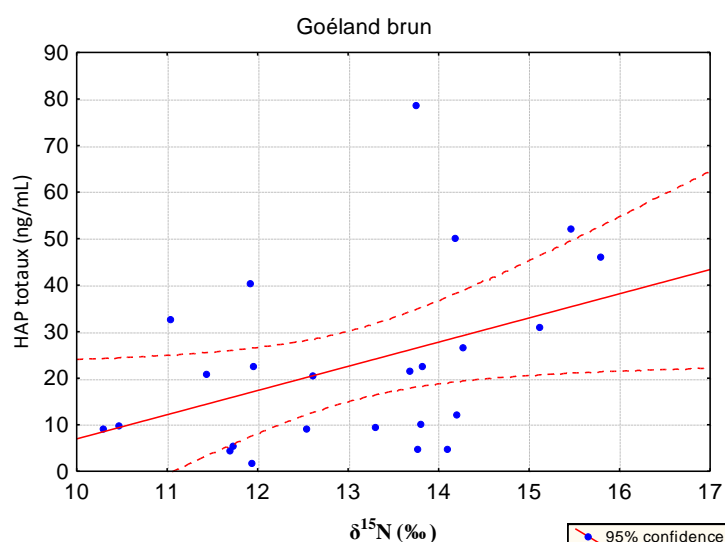


Figure 9 : Concentrations des HAP totaux (ng/mL) en fonction du rapport isotopique (‰) de l'azote dans le sang des goélands bruns prélevés sur le site du Havre de 2015 à 2017.

Bibliographie

- A. Motelay-Massei, B. Garban, K. Tiphagne-Larche, M. Chevreuil, D. Ollivon, Mass balance for polycyclic aromatic hydrocarbons in the watershed of Le Havre (France) : transport and fate of PAHs from the atmosphere to the outlet, *Water research*. 2006, 40, 1995-2006.
- Liu, J.L., Wang, R.M., Huang, B., Lin, C., Wang, Y., Pan, X.J., Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China, *Environ. Pollut.* 2011, 159, 2815–2822.
- David, A., Fenet, H., Gomez, E., Alkylphenols in marine environments: distribution monitoring strategies and detection considerations, *Mar. Pollut. Bull.* 2009, 58, 953–960.



Annexes 9

Rapport Seine-Aval 5

Acronyme du projet : ECOTONES

Coordinateur : Benoit Xuereb

Tache 2. Evaluation des effets de la contamination
sur l'avifaune (responsable Paco Bustamante)

Impregation de l'avifaune par les polluants organiques persistants en estuaire de Seine

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

1 Contexte

L'estuaire de Seine constitue le réceptacle d'un bassin versant soumis à une forte pression industrielle et agricole. Cette anthropisation est à l'origine d'une contamination chimique par divers micropolluants, comme les polluants organiques persistants (POP) et d'autres d'intérêts plus émergents. Les POP sont à la fois ubiquistes, toxiques et bioaccumulables.

Dans le cadre du suivi des effets de la contamination chimique sur la santé des prédateurs aviaires, quatre espèces sentinelles et bioindicatrices d'oiseaux marins, représentatifs d'un niveau trophique élevé et caractéristiques de l'estuaire de Seine, ont été choisies afin de déterminer l'imprégnation de cet écosystème par différentes classes de contaminants historiques et d'intérêt plus émergent. En effet, aucune donnée n'est encore disponible, dans la littérature, sur l'imprégnation chimique de l'avifaune de l'estuaire de Seine par les POP. Afin de pallier ce manque, les niveaux de trois classes de POP historiques, à savoir les polychlorobiphényles (PCB), les pesticides organochlorés (OCP) et les éthers de biphényles polybromés (PBDE) ont été mesurés dans le plasma de 178 poussins. Les niveaux d'une classe de polluants organohalogénés d'intérêt émergent, les composés per- et poly-fluoroalkylés (PFAS) ont été dosés dans le plasma de 97 poussins sélectionnés parmi les 178 échantillonnés.

2 Echantillons analysés et protocoles

Sept congénères de PCB (CB 28 ; CB 52 ; CB 101 ; CB 118 ; CB 153 ; CB 138 ; CB 180), douze OCP (HCB ; γ HCH ; Heptachlore ; Heptachlore époxyde ; 2,4' DDE ; cis chlordane ; trans nonachlor ; 4,4' DDE ; 2,4' DDD (+ CB154) ; 4,4' DDD ; 2,4' DDT ; 4,4' DDT ; Mirex), huit PBDE (BDE 28 ; BDE 47 ; BDE 100 ; BDE 99 ; BDE 154 ; BDE 153 ; BDE 183 ; BDE 209) et seize PFAS (6:2 FTSA ; 8:2 FTSA ; 10:2 FTSA ; PFOA ; PFNA ; PFDA ; PFUnA ; PFTTrDA ; PFTTeDA ; PFDoA ; PFHxS ; PFHpS ; L-PFOS ; Br-PFOS ; PFDS ; FOSA) ont été analysés dans le plasma de poussins de 4 espèces d'oiseaux marins (goéland argenté : *Larus argentatus* ; goéland brun : *Larus fuscus* ; goéland marin : *Larus marinus* ; cormoran huppé : *Phalacrocorax aristotelis*) (Tableau 1).

Les échantillons de plasmas sont stockés à l'obscurité et à -20°C dans des tubes Eppendorf® en polypropylène.

2.1 Dosage des PCB, OCP et PBDE

Le protocole est détaillé dans Carravieri et al., 2014. Une prise d'essai de 300 μ L de plasma est placée dans un tube à centrifuger par contrôle gravimétrique. Des étalons internes (0,5 ng de chaque étalon de PCB : CB 30 ; CB 103 ; CB 155 ; PCB 198 ; 0,5 ng de 4,4' DDT-d8 de Dr Ehrenstorfer GmbH ; 0,10 ng de F-BDE-47 de Chiron As ; 0,20 ng de BDE 181 et 1,4 ng de BB209 de Wellington laboratories) sont ajoutés par contrôle gravimétrique. Un échantillon de contrôle, composé de plasma de poulet (P3266 ; Sigma-Aldrich) fortifié avec chaque solution de composés natifs (SRM 2262 et SRM 2261 de Nist ; MXE BDE de Wellington), et un blanc composé d'étalons internes suivent le reste du protocole.

L'extraction liquide-liquide est réalisée par l'ajout de 150 μ L d'acide sulfurique (95 - 98% qualité extrapure ; Scharlau), et de 3mL d'un mélange de pentane (« ultra resi-analyzed » ; J.T. Baker) et de dichlorométhane (« for residue and pesticides analysis » ; Acros Organics) (90:10 ; v/v). Afin d'augmenter la surface d'échange entre les deux phases, les échantillons sont agités sur vortex pendant une minute. Ensuite, les phases sont séparées par centrifugation (2 minutes à 3900 x g). Le surnageant est transféré dans un tube pour une future concentration. L'extraction est répétée deux fois de plus.

Oiseaux	Site	2015				2016				2017			
		PCB	OCP	PBDE	PFAS	PCB	OCP	PBDE	PFAS	PCB	OCP	PBDE	PFAS
Goéland marin	Le Havre	8	8	8	5	13	13	13	5	11	11	11	5
	Ilot du Ratier	10	10	10	9	12	12	12	5				
	Antifer									3	3	3	3
	Chausey									15	15	15	5
Goéland brun	Le Havre	10	10	10	10	10	10	10	5	3	3	3	3
Goéland argenté	Le Havre	10	10	10	9	15	15	15	5	12	12	12	5
	Ilot du Ratier	6	6	6	6	10	10	10	6				
	Chausey									16	16	16	5
Cormoran huppé	Antifer									2	2	2	2
	Chausey									10	10	10	5
Total		44	44	44	39	60	60	60	25	74	74	74	23

Tableau 1 Nombre d'échantillons dosés pour chaque classe de contaminants organiques (PCB : polychlorobiphényles ; OCP : pesticides organochlorés ; PBDE : éthers de biphényles polybromés ; PFAS : composés per- et poly-fluoroalkylés) pour chaque espèce d'oiseau, site et année.

Les extraits sont concentrés sous flux d'azote (pureté 5.0) jusqu'à 500µL et repris dans de l'isooctane (grade HPLC ; Scharlau) avant une purification sur colonne de cuivre activé et de silice acidifiée à 40%. Les extraits sont élués à l'aide de trois fois 5mL d'un mélange de pentane et de dichlorométhane (90 : 10, v : v).

Les extraits purifiés sont reconcentrés à 100µL et un étalon d'injection (0,25 ng d'octachloronaphtalène ; Dr Ehrentorfer GmbH) est ajouté dans chaque échantillon. Les extraits sont conservés à -20°C avant l'analyse.

Les analyses quantitatives des PCB et des OCP de ces extraits, après décongélation, ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse (sur un Agilent 6890) couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD), avec une colonne HP 5MS Agilent Technologies (60 m ; 0,25 mm ; 0,10 µm). Une rampe de température de 80°C à 300°C est appliquée pour chaque échantillon à une vitesse de 2°C par minute. La source d'ionisation est le ⁶³Ni.

Les analyses quantitatives des PBDE ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS, Quattro micro GC Waters Micromass), avec une colonne HP 5MS Agilent Technologies (15 m ; 0,25 mm ; 0,10 µm). Une rampe de température de 90°C à 315°C est appliquée pour chaque échantillon avec un gradient de 14°C par minute. L'ionisation chimique se fait en mode négatif, à 40eV et le gaz réactant est le méthane.

Pour ces trois classes de composés, la quantification s'effectue par étalonnage interne.

Au total, 18 blancs de protocole ont été réalisés afin de connaître la contamination apportée à l'échantillon par l'environnement analytique. De plus, 11 échantillons de contrôle (échantillons de plasma de poulet fortifiés) ont été analysés pour déterminer notamment la répétabilité du protocole et le calcul des limites de détection. La fidélité de ces échantillons de contrôle est en moyenne de 92 % [70 – 127] pour les PCB, de 78 % [35 – 115] pour les OCP et de 109 % [52 – 174] pour les PBDE.

De plus, les taux de récupération étaient en moyenne de 73 % [41 – 81 PCB 30 ; 53 – 94 PCB 103 ; 54 – 122 PCB 155 ; 58 – 95 PCB 198] pour les PCB, de 81 % [40 – 117 4,4' DDT d8] pour les OCP et de 78 % [26 – 274 F-BDE 47 ; 21 – 137 BDE 181 ; 13 – 140 BB 209] pour les PBDE.

2.2 Dosage des PFAS

Munoz et al., 2017 : une prise d'essai de 25 µL de plasma est placée dans un tube Eppendorf® de 2 mL par contrôle gravimétrique. Une solution d'étalons internes (24 pg de

chaque composé : $^{13}\text{C}_4$ -PFBA, $^{13}\text{C}_3$ -PFPeA, $^{13}\text{C}_4$ -PFHpA, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA, $^{13}\text{C}_5$ -PFNA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDA, $^{13}\text{C}_2$ -PFUnDA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDODA, $^{13}\text{C}_2$ -PFTeDA, $^{18}\text{O}_2$ -PFHxS, $^{13}\text{C}_4$ -PFOS, $^{13}\text{C}_2$ -6:2FTS, $^{13}\text{C}_2$ -8:2-FTS, $^{13}\text{C}_8$ -FOSA, d_3 -MeFOSA, d_3 -MeFOSAA, $^{13}\text{C}_4$ -6:2diPAP, $^{13}\text{C}_2$ -8:2diPAP de Wellington Laboratories) est ajoutée également par contrôle gravimétrique. Au moins deux échantillons de contrôle, un composé de plasma de poulet (P3266 ; Sigma-Aldrich) fortifié avec une solution de natifs (0,1 ng de chaque composé : PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFDA, PFUDA, PFDODA, PFTrDA, PFTeDA, PFBS, PFHxS, PFHpS, PFOS, PFDS ; FOSA, MeFOSA, EtFOSA, FOSAA, MeFOSAA, EtFOSAA, 6:2diPAP, 8:2diPAP, 4:2FTS, 6:2FTS, 8:2FTS, 10:2FTS, H-FPO-DA, NaDONA, PFECHS de Wellington Laboratories) et un autre composé d'eau LC-MS fortifiée, un échantillon de référence de plasma humain SRM 1957 (NIST) et au moins trois blancs, composés d'étalons internes, suivent la totalité du protocole.

Afin de dénaturer les protéines, 100µL d'acétonitrile (« Ultra gradient HPLC » ; J.T. Baker) sont ajoutés à l'échantillon, qui est ensuite agité au vortex et centrifugé pendant 10 minutes à 24000 x g. Le surnageant est transféré dans un tube à filtre (0,20 µm) puis centrifugé une seconde fois 3 minutes.

L'extrait est transféré dans des flacons d'injection de 2 mL et ils sont conservés à -20°C.

Avant leur injection, 675µL d'eau LCMS (« analyzed LC-MS Reagent » ; J.T.Baker) sont ajoutés aux échantillons sont à nouveau agités au vortex.

Les analyses quantitatives des PFAS sur ces échantillons ont été réalisées par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS, Agilent Technologies 6490 MS). De plus, un module d'extraction sur phase solide (SPE) en ligne est monté avant la colonne chromatographique ; une cartouche OASIS HLB préparée au laboratoire est utilisé pour l'étape d'extraction des analytes. La colonne chromatographique est une colonne Zorbax Eclipse plus C18 rapid resolution HD 2,1 x 100mm 1,8µm de Agilent. Deux colonnes de gardes UHPLC Guard 3PK poroshell 120SB-C18 2,1 x 5mm 2,7µm de Agilent sont ajoutés à la sortie de la chambre de mélange des solvants constitutifs de la phase mobile de la colonne chromatographique et à la sortie de la pompe de la phase mobile du système SPE. La phase mobile est constituée d'eau milli-Q tamponnée avec 2 mM d'acétate d'ammonium et d'un mélange binaire acétonitrile/eau milli-Q tamponnée avec 2 mM d'acétate d'ammonium. La phase mobile du système SPE est constituée d'eau LCMS et d'acétonitrile.

Au total, 18 blancs protocoles ont été réalisés afin de connaître la contamination apportée à l'échantillon. Plusieurs échantillons de contrôles (6 échantillons de plasma de poulet fortifiés et 4 échantillons d'eau LC-MS fortifiés) ont été analysés pour estimer la répétabilité du protocole et le calcul des limites de détection et quantification. La fidélité de ces échantillons de contrôles est en moyenne de 103 % [72 – 136]. De plus, une matrice certifiée de plasma humain, SRM 1957, a été analysée 10 fois pour vérifier la justesse de la quantification. Les rendements de quantification pour cette matrice sont en moyenne de 77 % [49 – 111].

2.3 Calcul des limites de quantification et de détection

Les limites de quantification pour toutes les classes de composés étudiés ici sont définies comme la valeur la plus haute entre :

$$LQ_{\text{blanc}} = \frac{3 * \text{quantité dans le blanc le plus fort}}{\text{masse de la prise d'essai moyenne}}$$

ou

$$LQ_{\text{ech. contrôle}} = \frac{9 * \text{concentration de l'échantillon fortifié}}{\text{rapport signal sur bruit}} \text{ (valeur médiane)}$$

Si la LQ venant de l'échantillon de contrôle est la valeur la plus haute, alors, une limite de détection peut être calculée comme suit :

$$LD_{\text{ech. contrôle}} = \frac{3 * \text{concentration de l'échantillon fortifié}}{\text{rapport signal sur bruit}} \text{ (valeur médiane)}$$

Finalement, les résultats des analyses sont corrigés par rapport à la quantité dans le blanc série d'analyses par série d'analyses et normalisés à la prise d'essai. Pour l'analyse des niveaux de contamination, deux cas sont alors possibles :

- Les résultats sont supérieurs à la valeur de la LD ou la LQ_{blanc} , alors ils sont utilisés tels quels.
- Les résultats sont inférieurs à la LQ_{blanc} ou inférieurs à la $LD_{\text{ech. contrôle}}$, alors ils sont remplacés par la valeur de la LQ_{blanc} ou de la $LD_{\text{ech. contrôle}}$ divisée par 2.

Pour la représentation des profils de contamination, seules les valeurs supérieures à la LQ_{blanc} ou la $LD_{\text{ech. contrôle}}$ sont utilisées.

,

2.4 Traitement des résultats

Pour déterminer les éventuelles différences entre les espèces, les sites et les années, un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de comparaison multiple (seuil de significativité fixé à 0,05), a été réalisé grâce au logiciel R (3.4.3) d'après Siegel et Castellan (1988)..

3 Résultats et analyses

Les résultats des analyses des concentrations en polluants organiques sont présentés ci-après par espèce. Les graphiques par classe de composés pour les différents sites et espèces sont présentés en annexe. Pour toutes les classes de composés, les concentrations sont données en ng.g^{-1} de plasma poids frais (pf).

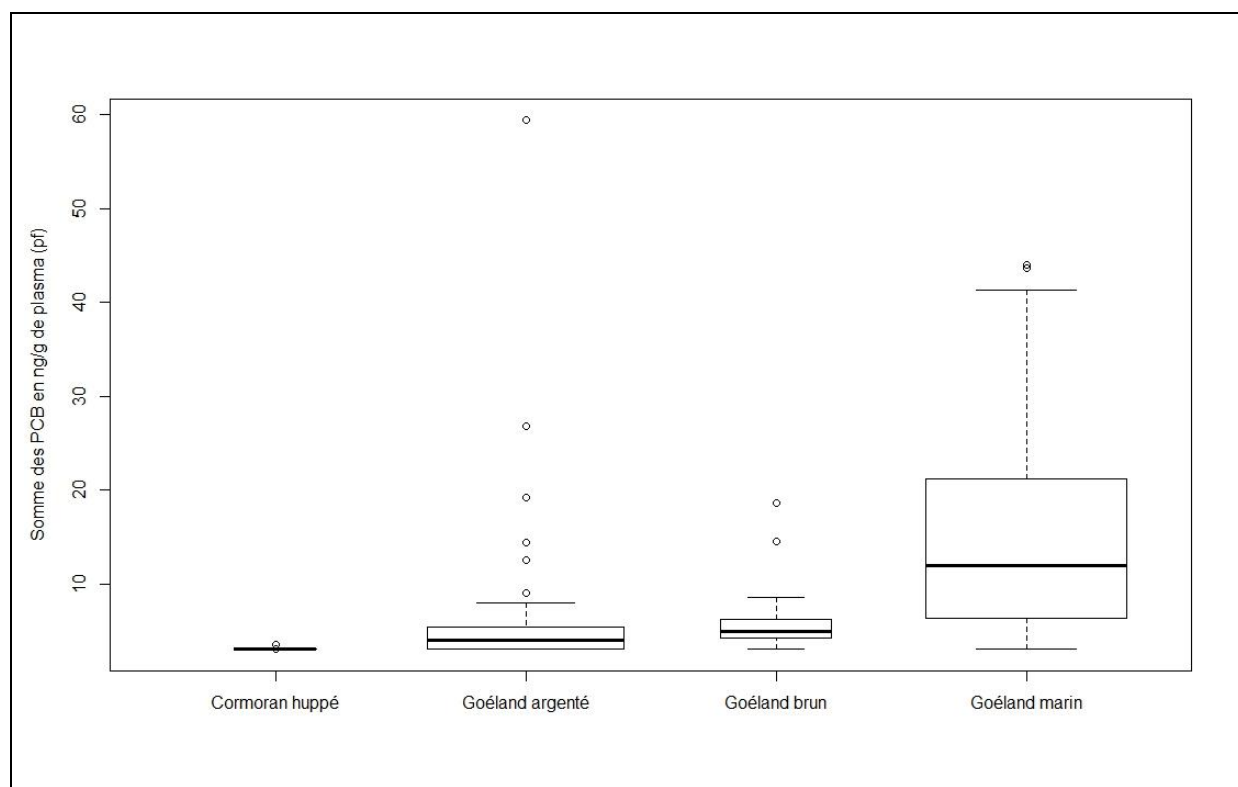


Figure 1 Concentration totales de PCB, OCP, PBDE et PFAS en ng g^{-1} de plasma poids frais, chez les espèces cormoran huppé (n=12), goéland argenté (n=69), goéland brun (n=23) et goéland marin (n=74) tous sites et années de prélèvement confondus.

La ligne en gras représente la valeur médiane, les lignes supérieures et inférieures représentent les premiers et troisièmes quartiles et les extrémités des moustaches correspondent aux valeurs minimales et maximales du jeu de données, en excluant les valeurs aberrantes, représentées par des cercles.

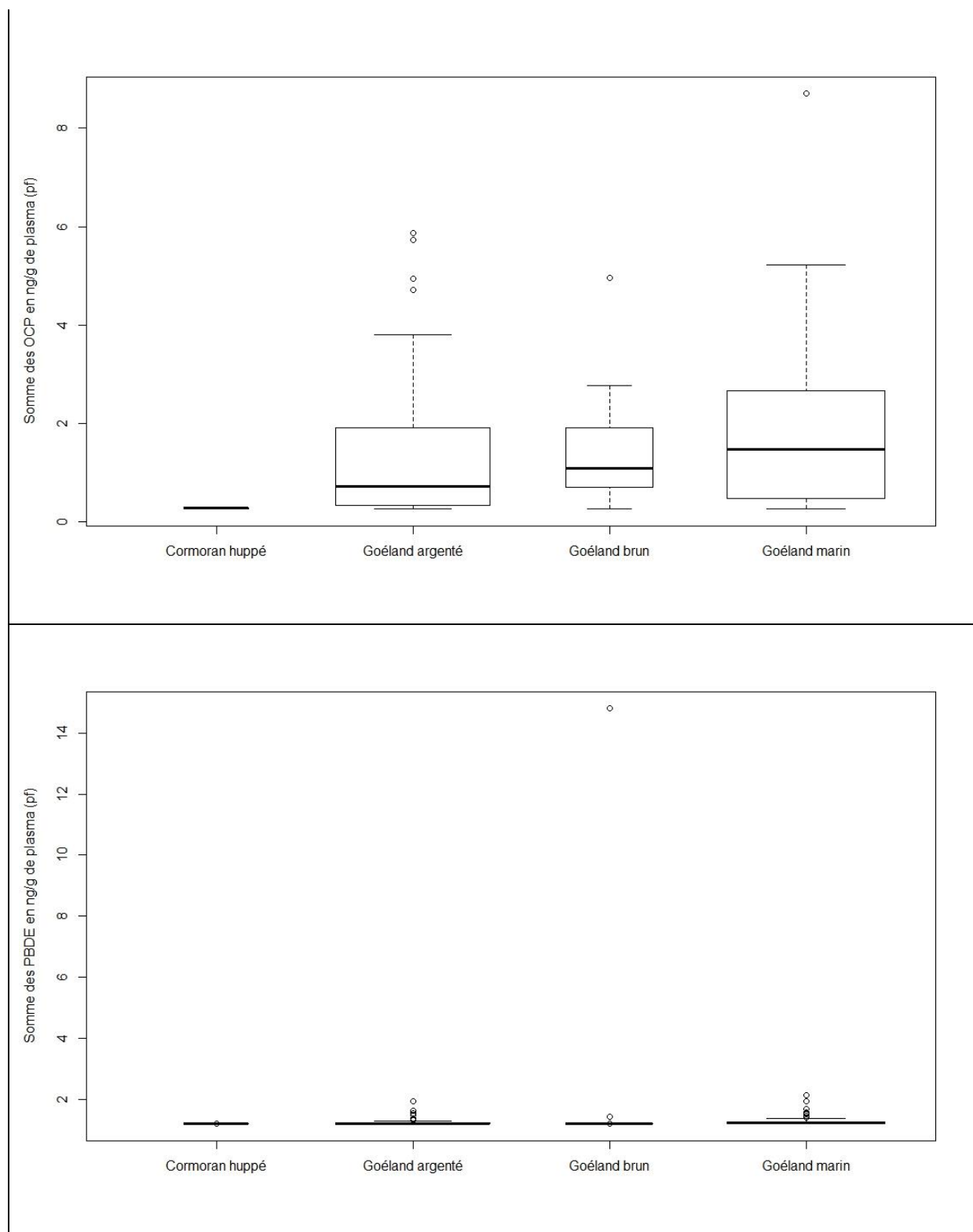


Figure 1 (suite)

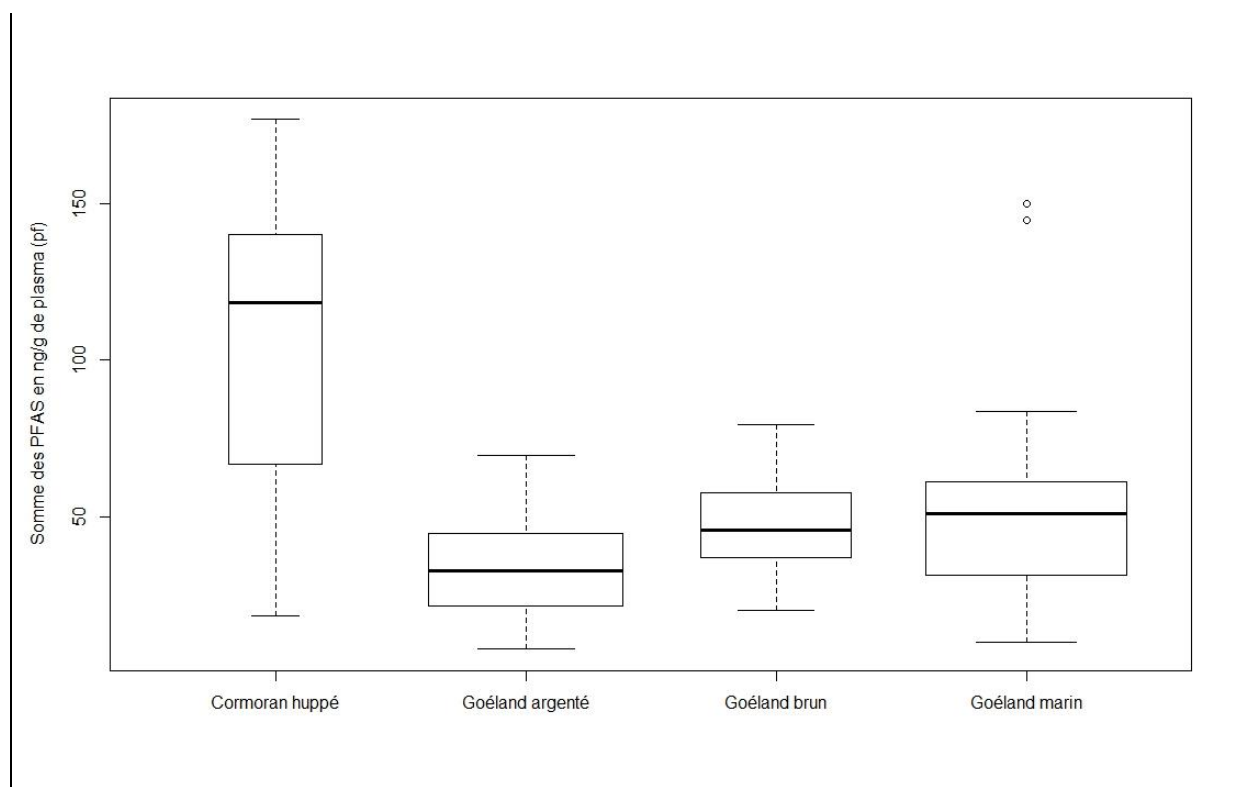


Figure 1 (suite)

Outre la grande variabilité interindividuelle des niveaux d'imprégnation au sein de chaque espèce, la figure 1 montre aussi que les cormorans huppés semblent moins contaminés en PCB et OCP (teneurs proches des limites de détection) que les trois espèces de goélands (teneurs quantifiables pour la majorité des individus). La tendance inverse est observée pour les PFAS, pour lesquels les cormorans huppés (104,0 [18,2 – 176,9] ng.g⁻¹ pf) paraissent plus contaminés que les goélands argentés, bruns et marins (respectivement 32,7 [7,8 – 69,6] ng.g⁻¹ pf, 45,7 [20,3 – 79,6] ng.g⁻¹ pf et 51,2 [9,2 – 150,0] ng.g⁻¹). Ces tendances pourraient être expliquées par la différence de régime alimentaire entre le cormorans huppé, piscivore, et les goélands, qui sont eux, des prédateurs plus opportunistes.

De plus, les goélands marins semblent aussi être l'espèce la plus imprégnée par les PCB (12,0 [3,1 – 44,0] ng.g⁻¹ pf contre 3,5 [3,5 – 3,6] ng.g⁻¹ pf pour les cormorans huppés, 5,0 [3,1 – 18,6] ng.g⁻¹ pf pour les goélands bruns et 4,1 [3,1 – 59,4] ng.g⁻¹ pf pour les goélands argentés). Cela pourrait être expliqué par leur position trophique par rapport aux autres espèces, puisque leurs rapports isotopiques de l'azote sont de 15,23 ‰ [12,85 – 15,94] contre 9,87 ‰ [7,76 – 13,82] pour les goélands argentés, 13,76 ‰ [10,29 – 15,79] pour les goélands bruns et 13,56 ‰ [13,40 – 14,60] pour les cormorans huppés. En effet, de par ses

rapports isotopiques de l'azote plus élevés, les goélands marins semblent avoir une position trophique plus haute que celles des trois autres espèces. Cette position trophique supérieure entraînera donc une bioamplification des PCB plus importante pour cette espèce comparée aux autres.

3.1 Goéland marin

3.1.1 PCB

Chez les goélands marins ($n=73$), le CB 28 n'a jamais été détecté. La fréquence de quantification des autres congénères est de 3 % pour le CB 52, 6 % pour le CB 101, 28 % pour le CB 118, de 34 % pour les CB 153 et CB 180, et de 35 % pour le CB 138.

Les niveaux de PCB varient entre des valeurs inférieures à la limite de détection à $44,0 \text{ ng.g}^{-1}$ de plasma pf. Une différence significative est observée entre les faibles concentrations relevées chez les 15 individus des Îles de Chausey ($4,1 \pm 2,2 \text{ ng.g}^{-1}$ pf) comparées aux fortes teneurs de l'Îlot du Ratier (2015, $n=13$, et 2016, $n=13$) et du Havre en 2016 ($n=13$), respectivement $18,4 \pm 5,8 \text{ ng.g}^{-1}$ pf, $25,6 \pm 11,1 \text{ ng.g}^{-1}$ pf et $14,5 \pm 5,8 \text{ ng.g}^{-1}$ pf (Figure 2, colonne de droite). Les niveaux au Havre en 2015 ($n=8$) et 2017 ($n=11$) sont de respectivement $12,5 \pm 5,7 \text{ ng.g}^{-1}$ pf et $15,8 \pm 14,8 \text{ ng.g}^{-1}$ pf alors que ceux d'Antifer ($n=3$) sont de $27,9 \pm 5,8 \text{ ng.g}^{-1}$ pf. De plus, les goélands marins prélevés sur l'Îlot du Ratier en 2016 ont un niveau en PCB significativement plus fort que celui des goélands argentés ($n=15$; $4,3 \pm 1,0 \text{ ng.g}^{-1}$ pf) échantillonnés sur le même site durant la même période, suggérant une différence de comportement alimentaire des parents. Cette hypothèse est appuyée par la différence des rapports isotopiques du carbone (entre $-17,33$ et $-21,07$ ‰ pour les goélands marins contre $-21,30$ et $-24,37$ ‰ pour les goélands argentés) et de l'azote (entre $15,06$ et $15,62$ ‰ pour les goélands marins contre $7,82$ et $11,78$ ‰ pour les goélands argentés).

Hormis pour les individus échantillonnés sur l'Îlot du Ratier en 2016, les profils de PCB sont similaires (Figure 2, colonne de droite) avec le CB 153 majoritaire (39 ± 3 %), puis le 138 (31 ± 2 %), le CB 118 (16 ± 1 %), le CB 180 (10 ± 3 %) et enfin le CB 52 (2 ± 3 %). La plus grande influence du CB 180 (32%) sur l'Îlot du Ratier en 2016 pourrait s'expliquer par une différence de comportement alimentaire de ces individus ou à une source de nourriture différemment contaminée. Le rapport isotopique du carbone (entre $-17,33$ et $-21,07$ ‰ sur l'Îlot du Ratier en 2016 contre entre $-16,72$ et $-19,01$ ‰ sur les autres sites) appuie cette hypothèse.

3.1.2 OCP

Parmi les pesticides organochlorés, l'heptachlore, le cis-chlordane, le 4,4'-DDT et le Mirex n'ont jamais été détectés. Seul le γ -HCH est quantifiable à 56 % alors que les autres congénères d'OCP sont détectés sur 4 % des individus pour le 2,4'-DDE, 38 % pour le trans-nonachlor, 41 % pour le 4,4'-DDD, 56 % pour le 2,4'-DDT, 68 % pour le 2,4'-DDD (co-élué avec le CB 154), 71 % pour l'heptachlore époxyde, de 88 % pour l'HCB, et enfin 90 % pour le 4,4'-DDE.

Les niveaux d'OCP sont compris entre $0,3 \pm 0,1 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$ pour les individus de l'archipel de Chausey en 2017 (n=15) et $3,4 \pm 1,3 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$ pour ceux de l'Îlot du Ratier en 2015 (n=16). Au Havre, les niveaux sont de $2,5 \pm 1,3 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$ en 2015 (n=8), de $2,9 \pm 1,9 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$ en 2016 (n=13) et de $0,7 \pm 0,5 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$ (n=11) en 2017. Sur l'Îlot du Ratier en 2015 (n=13), le niveau d'OCP sont de $1,6 \pm 1,0 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$. Enfin, à Antifer en 2017 (n=3), le niveau d'OCP est de $1,5 \pm 0,4 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$. Ils ne présentent pas de différence significative entre les lieux et années de prélèvement pour cette espèce (Figure 2, colonne de droite).

Le composé majoritaire est le γ -HCH avec $42 \pm 22 \%$ puis le 4,4'-DDE ($28 \pm 16 \%$) pour tous les sites de prélèvements hors Antifer (n=3) et l'archipel de Chausey en 2017 (n=15) pour lesquels le 4,4'-DDE ($55 \pm 8 \%$) est le composé majoritaire.

3.1.3 PBDE

Sur les 8 congénères de PBDE recherchés, seuls les BDE 28, BDE 47, BDE 100 et BDE 99 sont détectés à une fréquence de 12 %, 60 %, 4 % et 12 % respectivement.

Comme pour les PCB, les niveaux de PBDE (Figure 2, colonne de gauche) des goélands marins prélevés sur l'Îlot du Ratier en 2016 (n=13, $0,3 \pm 0,3 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$) sont plus importants que ceux des individus prélevés sur l'archipel de Chausey (n=15, < LD à $0,03 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$). Cette différence pourrait s'expliquer par une variation de comportement alimentaire entre les individus de l'archipel de Chausey et ceux de l'Îlot du Ratier. Le rapport isotopique du carbone (entre -17,33 et -21,07 ‰ sur l'Îlot du Ratier en 2016 contre entre -16,72 et -19,0 ‰ sur les autres sites) vient appuyer cette hypothèse. Au Havre les niveaux sont de $1,2 \pm 0,04 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$ en 2015 (n=8), de $1,3 \pm 0,1 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$ en 2016 (n=13) et de $1,2 \pm 0,1 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$ en 2015 (n=11). Sur l'Îlot du Ratier en 2015 (n=13), le niveau de PBDE est de $1,2 \pm 0,02 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$ et à Antifer (n=3), de $1,3 \pm 0,03 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$.

Le profil moléculaire est dominé par le BDE 47 (70 ± 33 %). De plus, le BDE 100 est uniquement détecté dans les individus prélevés au Havre (entre 4 et 13 % du profil moléculaire).

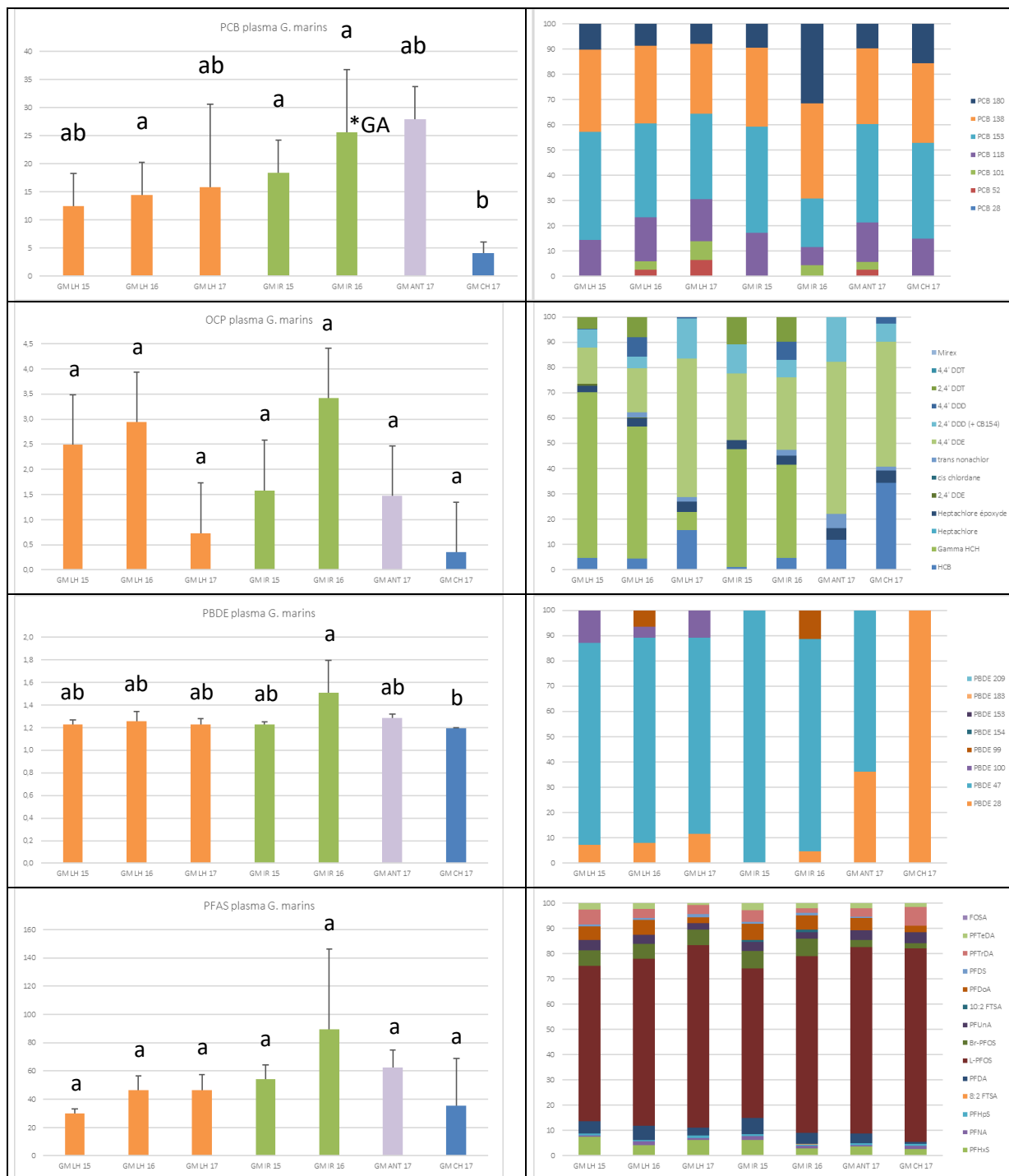


Figure 2 Concentration totales des PCB, OCP, PBDE et PFAS (ng g⁻¹ de plasma, poids frais, colonne de gauche) et profil en % de la somme des congénères > LQ_{blanc} ou LD_{éch. controle} (colonne de droite) chez les goélands marins (GM) des sites suivants : Le Havre (LH), Ilot du ratier (IR), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (26), 2016 (26) et 2017 (29).

Les différences inter-site et inter-saison (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) sont indiquées à l'aide de lettres minuscules. Au sein de chaque famille de composés, les différences inter-espèces au sein d'un même site et d'une même année sont indiquées par des astérisques suivies de l'espèce présentant une différence significative (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

3.1.4 PFAS

Le 6:2 FSTA, le PFHxS, l'isomère linéaire et les isomères ramifiés du PFOS, le PFUnDA, le PFDoDA, le PFTTrDA sont quantifiés dans tous les échantillons analysés. Le PFTeDA est quantifié dans 97 % des individus, les PFHpS et PFDA le sont à 91%, le PFDS à 78%, le PFNA à 59%, le 10 :2 FTSA à 31%. Le 8 :2 FTSA a été quantifié dans seulement un échantillon de goéland marin.

Les niveaux de PFAS sont compris entre 9,2 et 150,0 ng.g⁻¹ pf pour l'espèce des goélands marins (n=37). Les profils moléculaires sont très majoritairement dominés par l'isomère linéaire du PFOS (69 ± 7%). Il n'y a pas de différence significative de niveau et de profils de PFAS entre les lieux et années de prélèvement pour cette espèce (Figure 2). Cependant, les individus prélevés sur le site de l'Îlot du Ratier en 2016 (n=5) (89,4 ± 56,7 ng.g⁻¹ pf) semblent plus contaminés que les autres (Le Havre 2015 : n=5, 29,8 ± 3,5 ng.g⁻¹ pf ; Le Havre 2016 : n=5 ; 46,5 ± 9,9 ng.g⁻¹ pf ; Le Havre 2017 : n=5, 46,6 ± 10,8 ng.g⁻¹ pf ; Îlot du Ratier 2015 : n=9, 54,4 ± 10,0 ng.g⁻¹ pf ; Antifer 2017 : n=3, 62,4 ± 12,5 ng.g⁻¹ pf ; Chausey 2017 : n=5, 35,6 ± 33,4 ng.g⁻¹ pf)

3.2 Goéland Argenté

3.2.1 PCB

Chez les goélands argentés (n=69), le CB 52 n'est jamais détecté. Les CB 28 et CB 101 ne sont détectés qu'une fois sur le jeu de données. Les CB 118, CB 153, CB 138 et CB 180 sont quantifiés sur, respectivement, 16 %, 58 %, 55 %, 70 % des plasmas de goélands argentés prélevés.

Concernant les niveaux de PCB pour cette espèce, la seule différence significative est entre le site de l'Îlot du Ratier en 2015 (n=6 ; 19,5 ± 17,0 ng.g⁻¹ pf) et l'archipel de Chausey en 2017 (n=16 ; 3,1 ± 0,1 ng.g⁻¹ pf) (Figure 3, colonne de gauche). En effet, sur l'archipel de Chausey, les niveaux de PCB sont très souvent inférieurs à la limite de quantification (13/16 individus dont le niveau de PCB est inférieur à la LQ) alors que les niveaux relevés sur l'Îlot du Ratier en 2015 sont assez fort (entre 7,9 et 59,3 ng.g⁻¹ de plasma frais). Sur les autres sites et années de prélèvement, les niveaux sont de 4,3 ± 1,0 ng.g⁻¹ pf pour Îlot du Ratier en 2016 (n=10), 5,7 ± 1,8 ng.g⁻¹ pf pour le Havre en 2015 (n=10), 4,6 ± 3,4 ng.g⁻¹ pf pour 2016 (=15) et 4,2 ± 0,9 ng.g⁻¹ pf pour le Havre en 2017.

Le profil moléculaire des PCB pour ces échantillons est dominé par le CB 153, représentant 48 ± 3 % de la somme des sept congénères recherchés, puis on trouve le CB 138 (35 ± 3 %), et les CB 180 et CB 118 (respectivement, 10 ± 1 % et 6 ± 4 %).

3.2.2 OCP

Pour les pesticides organochlorés, l'heptachlore, le cis-chlordane, le 4,4'-DDT et le mirex ne sont jamais détectés. Le 2,4'-DDE est quantifié dans 3 % des plasmas analysés, le 4,4'-DDD dans 6 %, le trans-nonachlore dans 20 %, le 2,4'-DDT dans 39 %, le γ -HCH dans 45 %, l'heptachlore époxyde dans 49 %, le 2,4'-DDD (co-élué avec le CB 154) dans 58 %, le 4,4'-DDE dans 65 % et le HCB dans 71 % des échantillons analysés.

Pour les niveaux d'OCP (Figure 3, colonne de gauche), les goélands argentés du Havre en 2015 et 2016 ($n=10$; $2,7 \pm 1,9$ et $n=15$; $1,7 \pm 1,0$ ng.g⁻¹ pf respectivement) sont significativement plus imprégnés de ceux du Havre et de l'archipel de Chausey en 2017 ($n=12$; $0,3 \pm 0,1$ et $n=16$; $0,5 \pm 0,5$ ng.g⁻¹ pf respectivement). De plus, les plasmas des individus de l'archipel de Chausey sont aussi significativement moins concentrés en OCP que ceux de l'Îlot du Ratier en 2015 ($n=6$; $3,4 \pm 1,8$ ng.g⁻¹ pf). Enfin, le niveau d'OCP sur l'Îlot du Ratier en 2016 ($n=10$) est de $0,7 \pm 0,5$ ng.g⁻¹ pf.

Les profils moléculaires (Figure 3, colonne de droite), sont aussi différents pour les deux sites ayant les plus faibles niveaux (Le Havre, $n=12$, et l'archipel de Chausey, $n=16$, en 2017) où le 2,4'-DDD (et le CB 154, qui est co-élué) est le composé majoritaire à 62 ± 21 % alors que sur les autres sites, le γ -HCH domine largement le profil (77 ± 8 %).

3.2.3 PBDE

Pour les PBDE, les congénères BDE 153, BDE 154, BDE 183 et BDE 189 ne sont détectés dans aucun des échantillons de plasma de goélands argentés. Les BDE 28, BDE 47, BDE 100 et BDE 99 sont détectés respectivement dans 3 %, 43 %, 23 % et 13 % des plasmas.

Les niveaux de PBDE dans les échantillons de plasma de goélands argentés s'échelonnent de 1,2 à $1,4 \pm 0,3$ ng.g⁻¹ pf. Il n'y a pas de différence significative suivant les lieux et les années entre ces niveaux (Figure 3, colonne de gauche) même si les individus prélevés sur le site de l'Îlot du Ratier en 2015 semble légèrement plus imprégnés en PBDE que les autres.

Le profil des PBDE est dominé par le BDE 47 (53 ± 16 %), suivi du BDE 100 (19 ± 18 %) et du BDE 99 (13 ± 22 %). De plus, pour les individus du site de Chausey ($n=16$), le BDE 28 représente 70 % du alors que le BDE 47 ne représente plus que 30 % du profil moléculaire.

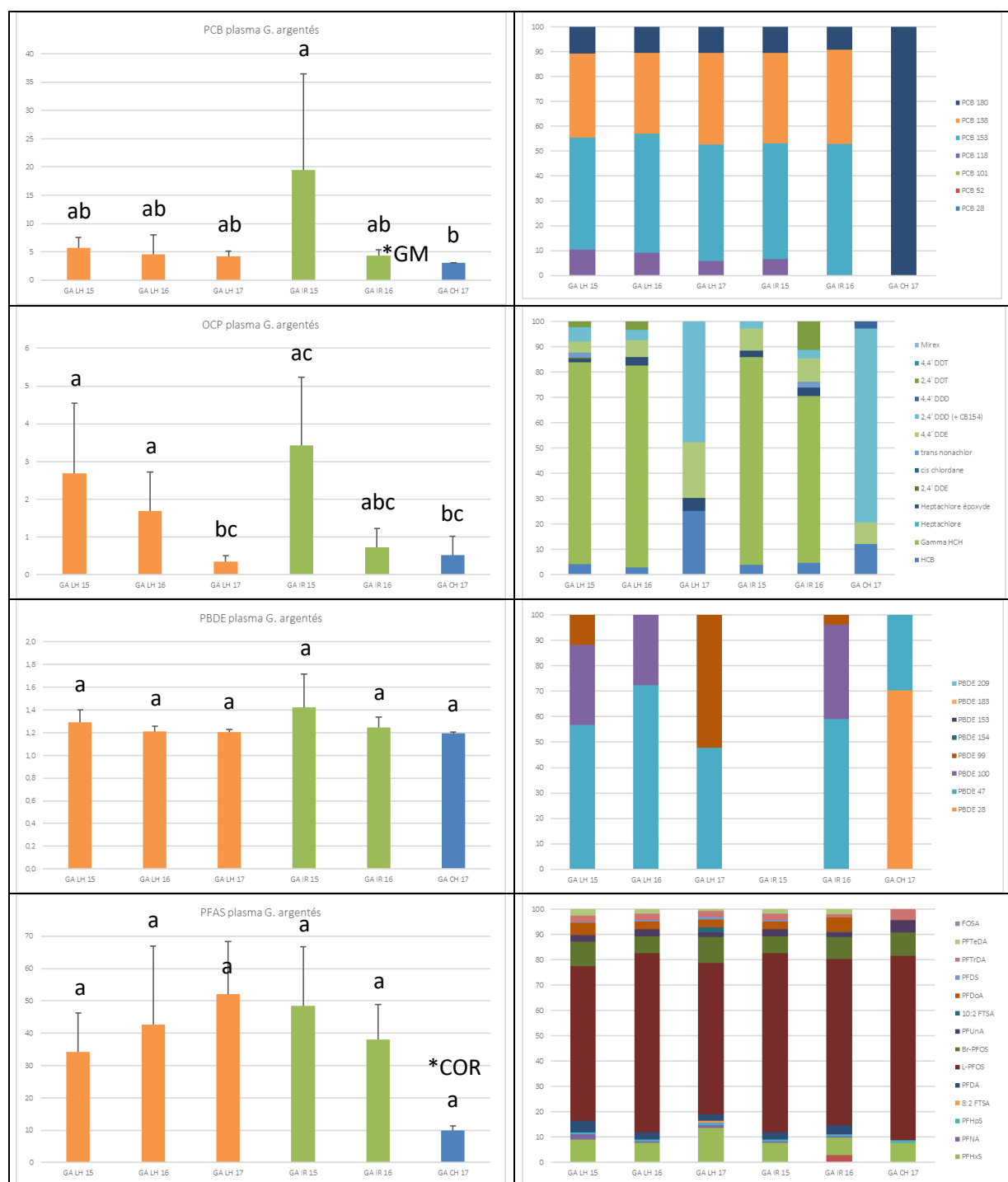


Figure 3 Concentration totales des PCB, OCP, PBDE et PFAS (ng g⁻¹ de plasma, poids frais, colonne de gauche) et profil en % de la somme des congénères > LQ_{blanc} ou LD_{ech. controle} (colonne de droite) chez les goélands argentés (GA) des sites suivants : Le Havre (LH), Ilot du ratier (IR) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (18), 2016 (26) et 2017 (28).

Les différences inter-site et inter-saison (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) sont indiquées à l'aide de lettres minuscules. Au sein de chaque famille de composés, les différences inter-espèces au sein d'un même site et d'une même année sont indiquées par des astérisques suivies de l'espèce présentant une différence significative (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

3.2.4 PFAS

Les PFAS 8 :2 FTSA et FOSA ne sont pas détectés sur ce jeu d'échantillons. Le PFOA et le 10:2 FTSA sont détectés dans 10% des individus. Le PFDS est détecté dans 27% des plasmas analysés, suivi du PFNA (43 %), puis du PFTeDA (67 %), du PFTrDA (73 %), du PFDA, du PFUnDA et PFDoDA (80 %) et du PFHpS (93 %). Enfin, le 6:2 FTSA, le PFHpS, l'isomère linéaire et les isomères ramifiés du PFOS sont détectés dans tous les échantillons.

Les niveaux de PFAS dosés dans les plasmas de goélands argentés (n=36) vont de 7,8 à 73,6 ng.g⁻¹ pf. Comme pour les PBDE, il n'y a pas de différence significative suivant les lieux et les années entre ces niveaux (Figure 3, colonne de gauche), en raison de la forte variabilité interindividuelle. Cependant, les niveaux retrouvés dans les individus de l'archipel de Chausey (n=16, 9,8 ± 1,5 ng.g⁻¹ pf) (Figure 2, colonne de gauche), sont significativement inférieurs à ceux mesurés sur le même site la même année dans des plasmas de cormorans huppés (n=5, 111,2 ± 46,5 ng.g⁻¹ pf) (Figure 5, colonne de gauche). Cela pourrait s'expliquer par une différence de comportement alimentaire de ces deux espèces : en effet, comme le montrent les rapports isotopiques du carbone et de l'azote, les goélands argentés à Chausey sont des prédateurs opportunistes (rapport du carbone entre -19,24 et -21,22 ‰ ; rapport de l'azote entre 10,83 et 13,52 ‰) alors que les cormorans huppés du même site semblent avoir une alimentation beaucoup moins variée (rapport du carbone entre -19,22 et -19,90 ‰ ; rapport de l'azote entre 13,40 et 14,15 ‰).

Les profils de PFAS pour cette espèce sont dominés par l'isomère linéaire du PFOS, représentant 67 ± 5 % de la somme des congénères. Il n'y a pas de différence de profils de contamination (Figure 3, colonne de droite) pour les goélands argentés suivant les sites et les années.

3.3 Goéland brun

L'échantillonnage des plasmas de goélands bruns (n=23) a été réalisé uniquement sur le site Le Havre.

3.3.1 PCB

Pour cette espèce, les CB 28, CB 52 et CB 101 ne sont jamais détectés. Le CB 118 est quantifiés dans 23% des échantillons, les CB 153 et CB 138 sont quantifiés dans 86% des plasma et le CB 180, dans 95% des cas.

Les niveaux de PCB pour les goélands bruns s'échelonnent de $5,5 \pm 3,3$ à $13,0 \pm 5,0$ ng.g⁻¹ pf. Les profils se présentent sous l'ordre suivant : CB 153 (44 ± 2 %), CB 138 (32 ± 4 %), CB 118 (13 ± 4 %) et CB 180 (11 ± 3 %).

Il n'y a pas de différence significative de niveau et de profils de PCB entre les années de prélèvement pour cette espèce (Figure 4).

3.3.2 OCP

Pour les pesticides organochlorés, l'heptachlore, le cis-chlordane, le trans-nonachlor, le mirex, le 2,4'-DDE, le 4,4'-DDD et le 4,4'-DDT ne sont jamais détectés. L'HCB est détecté dans tous les échantillons analysés. Le 4,4'-DDE est quantifié dans 86 % des cas, suivi par l'heptachlore époxyde à 82 %, puis le 2,4'-DDD (co-élué avec le CB 154) à 73 %, le γ -HCH à 68 % puis le 2,4'-DDT dans la moitié des échantillons de plasma de goélands argentés.

Les niveaux d'OCP varient entre $0,2 \pm 0,2$ et $2,0 \pm 1,3$ ng.g⁻¹ pf. Aucune différence significative entre ces niveaux suivant l'année de prélèvement n'est notée. Cependant, durant l'année 2017, les individus paraissent moins imprégnés en OCP que ceux des deux années précédentes (Figure 4, colonne de gauche).

Le γ -HCH représente 64 ± 6 %, le 4,4'-DDE 12 ± 2 % et l'HCB 9 ± 5 %. En 2017, n=3, le 4,4'-DDE est le composé majoritaire (85 %) et l'HCB représente 15 % du profil moléculaire.

3.3.3 PBDE

Les BDE 28, BDE 153, BDE 154 et BDE 183 ne sont jamais détectés dans les plasmas de goélands argentés. Un individu présente un fort niveau en BDE 209 ($14,7$ ng.g⁻¹). Le BDE 47 est détecté dans 2 individus et les BDE 99 et BDE 100 dans un seul individu.

Les niveaux de PBDE vont de $0,9$ à $1,5 \pm 3,7$ ng.g⁻¹ pf dans les plasmas de goélands bruns. Ils ne sont pas significativement différents, même si l'individu présentant la forte teneur en BDE 209 tire le niveau retrouvé en 2016 (n=10) vers le haut (Figure 4, colonne de gauche).

Les profils sont eux aussi impactés par cet individu (Figure 4, colonne de droite). En effet, en 2016, le profil de contamination en PBDE des plasmas échantillonnés est composé uniquement de BDE 209 alors qu'en 2015 (n=11) et 2017 (n=3), le profil est composé de BDE 47 (56 ± 4 %), de BDE 100 (24 ± 15 %) et de BDE 99 (21 ± 20 %). Cet individu ne présente, hormis ce fort niveau en BDE 209, aucun signe distinctif (masse, taille et rapports isotopiques dans la moyenne).

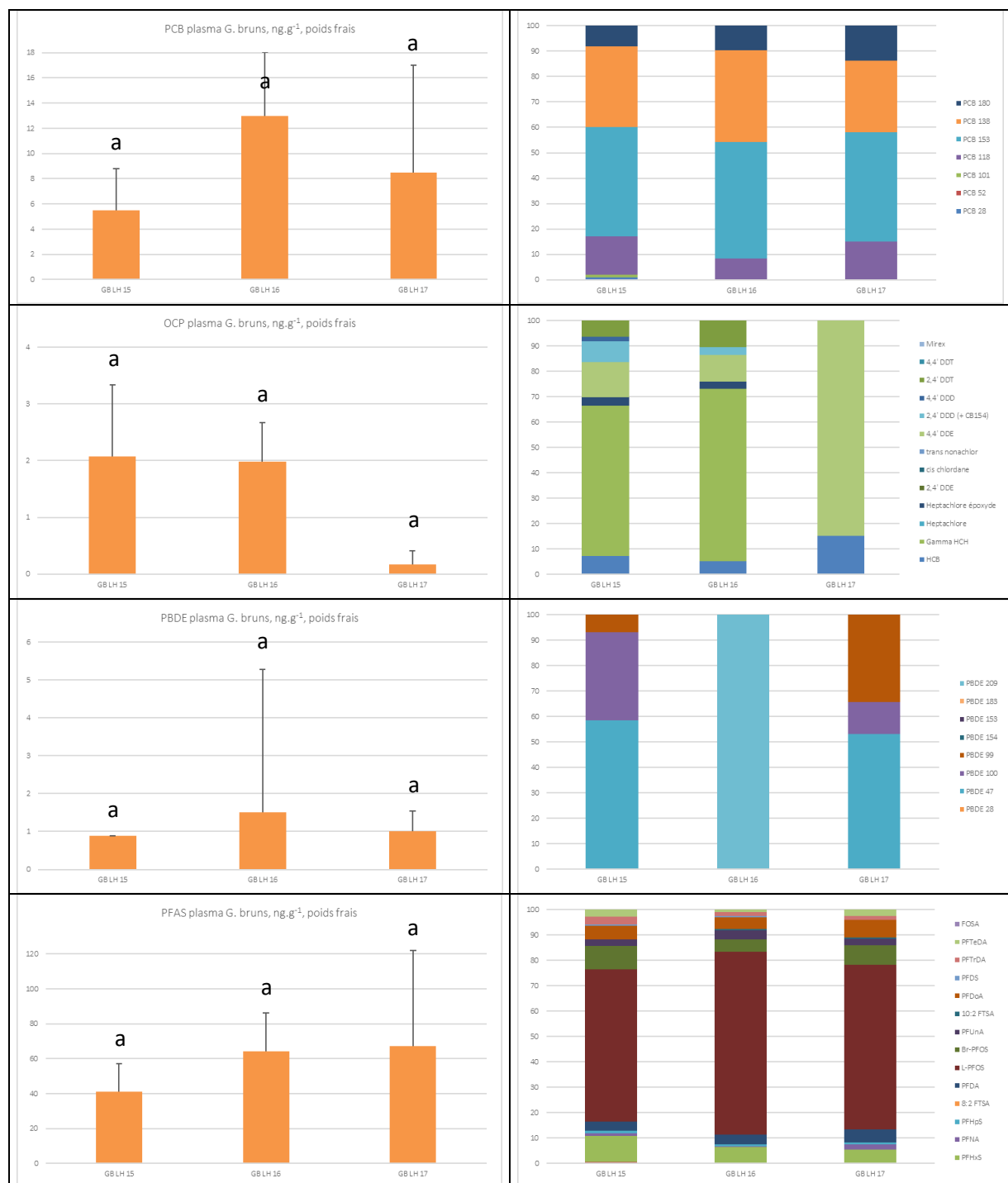


Figure 4 Concentration totales des PCB, OCP, PBDE et PFAS (ng g⁻¹ de plasma, poids frais, colonne de gauche) et profil en % de la somme des congénères > LQ_{blanc} ou LD_{ech. controle} (colonne de droite) chez les goélands bruns (GB) du site de Le Havre (LH), échantillonnés en 2015 (11), 2016 (10) et 2017 (3).

Les différences inter-site et inter-saison (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) sont indiquées à l'aide de lettres minuscules. Au sein de chaque famille de composés, les différences inter-espèces au sein d'un même site et d'une même année sont indiquées par des astérisques suivies de l'espèce présentant une différence significative (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

3.3.4 PFAS

Enfin, pour la classe des PFAS, le 6:2 FTSA, le PFHxS, le PFHpS, le PFDA, l'isomère linéaire et les isomères ramifiés du PFOS, le PFUnDA et le PFDODA ont été quantifiés dans tous les échantillons analysés. Le PFTrDA est quantifié dans 94% des échantillons, le PFTeDA à 89% et le PFNA et PFDS dans la moitié des échantillons. Les 8:2 FTSA et 10:2 FTSA sont quantifiés respectivement dans seulement 6 et 11 % des échantillons analysés, tandis que le PFOA et le FOSA ne sont jamais détectés.

Les niveaux s'échelonnent entre $41,3 \pm 16,0$ et $67,3 \pm 54,7$ ng.g⁻¹ pf (n=18). Aucune différence significative n'est observée pour les niveaux de contamination (Figure 4, colonne de gauche).

Les profils sont dominés par l'isomère linéaire du PFOS (66 ± 6 %), puis par les isomères ramifiés du PFOS et le PFHxS (7 ± 2 % et 7 ± 3 % respectivement). Les profils ne présentent pas non plus de différences interannuelle (Figure 4, colonne de droite).

3.4 Cormorans huppés

Tous les prélèvements de plasmas de cormorans huppés (n=12) ont été réalisés en 2017.

3.4.1 PCB

Pour cette espèce, seuls les congénères CB 153 et CB 180 de PCB sont quantifiés dans respectivement, 8 % et 17 % des individus.

Les niveaux de PCB pour les cormorans huppés sont de 3,05 ng.g⁻¹ pf à Chausey (n=10) et de $3,3 \pm 0,3$ ng.g⁻¹ pf à Antifer (n=2) (Figure 5, colonne de gauche).

Le profil de PCB des cormorans à Antifer (n=2) est composé de 77 % de CB 153 et de 23 % de CB 180 alors que celui des individus de l'archipel de Chausey est composé à 100% de CB 180 (figure 5, colonne de droite). Cette différence peut s'expliquer par le faible niveau de PCB retrouvé dans les échantillons de l'archipel de Chausey et peut être en lien avec une empreinte chimique différente des proies.

3.4.2 OCP

Pour les pesticides organochlorés, l'HCB a été détecté dans tous les individus, le 4,4'-DDE dans 3 individus, l'heptachlore époxyde dans un individu. Les autres composés n'ont pas été détectés, y compris le γ -HCH.

Les niveaux d'OCP sont de $0,3 \pm 0,01 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$ pour les individus de l'archipel de Chausey ($n=10$) et de $0,2 \pm 0,2 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$ pour ceux d'Antifer ($n=2$). Il n'y a pas non plus de différence de niveaux d'OCP pour les cormorans huppés (Figure 5, colonne de gauche).

Sur l'archipel de Chausey ($n=10$), l'HCB représente 87 % de la somme des OCP et le 4,4'-DDE 13%, contrairement au site d'Antifer ($n=2$), où les cormorans échantillonnés ont, en plus de l'HCB (51 %) et du 4,4'-DDE (36 %), de l'heptachlore époxyde (13 %) (Figure 5, colonne de droite). Ces différences de profil moléculaire sont probablement liées à la différence de sources de contamination.

3.4.3 PBDE

Le BDE 28 est détecté uniquement dans un individu prélevé sur l'archipel de Chausey ($0,02 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$). Aucun autre PBDE n'est détecté (Figure 5).

3.4.4 PFAS

Le 6:2 FTSA, le PFHxS, le PFHpS, le PFDA, l'isomère linéaire et les isomères ramifiés du PFOS, le PFUnDA, le PFDODA, et le FOSA sont détectés dans tous les échantillons. Le PFOA, le PFNA, le PFTTrDA sont détectés dans 86% des individus. Le PFDS est détectés dans 57% des cas, puis le PFTeDA (43%), et enfin les 8:2 et 10:2 FTSA dans 14% des individus.

Les cormorans huppés échantillonnés sur l'archipel de Chausey ($n=10$) présentent des niveaux de PFAS de $111,3 \pm 46,5 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$ et ceux d'Antifer de $56,2 \pm 57,5 \text{ ng.g}^{-1} \text{ pf}$ (Figure 5, colonne de gauche). Ces niveaux ne présentent pas de différence significative même si une tendance entre les sites pourrait être potentiellement être mise en évidence avec des effectifs plus importants. De plus, comme discuté précédemment, les niveaux retrouvés dans les cormorans huppés, piscivores, de l'archipel de Chausey sont significativement supérieurs à ceux mesurés sur le même site la même année dans des plasmas de goélands argentés, dont le régime alimentaire est plus opportuniste.

Le profil moléculaire des PFAS est similaire sur les deux sites de prélèvement (Figure 5, colonne de droite), avec une forte prédominance de l'isomère linéaire du PFOS ($78 \pm 4 \%$). Le FOSA est lui aussi présent ($2 \pm 2 \%$) quel que soit le site de prélèvement, contrairement aux autres espèces.

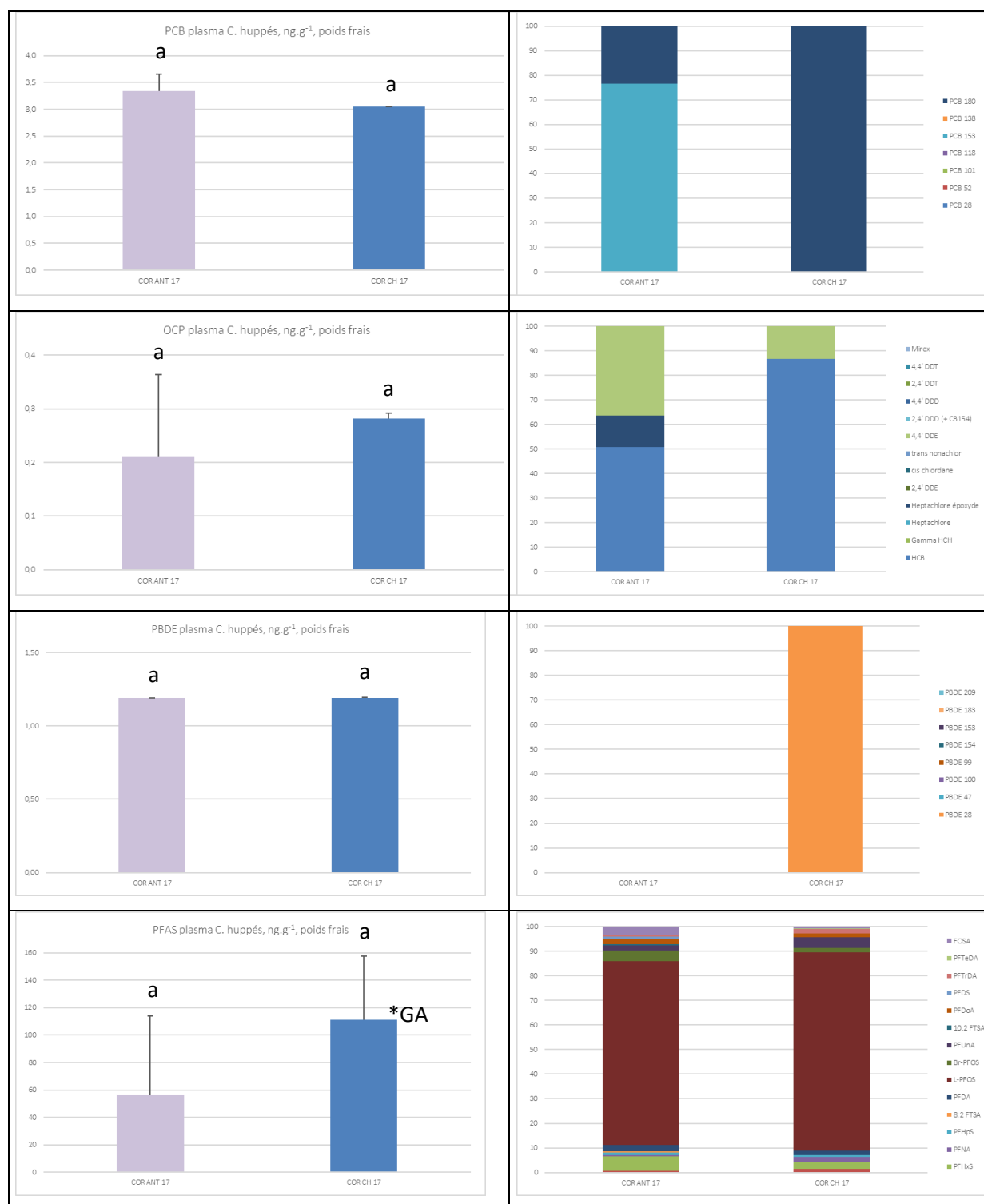


Figure 5 Concentration totales des PCB, OCP, PBDE et PFAS (ng g⁻¹ de plasma, poids frais, colonne de gauche) et profil en % de la somme des congénères > LQ_{blanc} ou LD_{ech. controle} (colonne de droite) chez les cormorans huppés (COR) du site d'Antifer (ANT) et de Chausey (CH) échantillonnés en 2017 (12).

Les différences inter-site et inter-saison (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) sont indiquées à l'aide de lettres minuscules. Au sein de chaque famille de composés, les différences inter-espèces au sein d'un même site et d'une même année sont indiquées par des astérisques suivies de l'espèce présentant une différence significative (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

En conclusion, une grande variabilité des niveaux de contamination au sein de chaque espèce est à remarquer. Les goélands marins semblent être les plus contaminés en PCB et OCP, alors que les cormorans huppés sont les plus imprégnés en PFAS. Pour les contaminants historiques, les sites de prélèvements pourraient être classés par niveau de contamination avec l'archipel de Chausey comme le site le moins imprégné, puis les sites du Havre et d'Antifer à des niveaux plus forts, et l'îlot du Ratier comme le site le plus contaminé.

4 Influence de la masse totale et de l'écologie trophique des individus sur les niveaux de polluants

Les traits d'histoires de vie et l'écologie trophique des organismes étudiés sont susceptibles d'influencer leurs niveaux de contamination. Ainsi, l'existence de corrélations entre les niveaux des différentes classes de contaminants, les rapports des $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$ et la masse des individus regroupés par espèce a été recherchée. En effet, le $\delta^{13}\text{C}$ permet de comparer la distance à la côte des proies, puisque les proies d'origine pélagique (influence plus marine) ont un rapport isotopique du carbone moins négatif montrant un enrichissement en C13 par rapport à celles provenant des zones côtières. Le $\delta^{15}\text{N}$ augmente d'environ 3 ‰ à chaque niveau trophique. Enfin, le $\delta^{34}\text{S}$ augmente avec la teneur en protéine de l'alimentation de l'organisme étudié.

Aucune corrélation n'a été observée entre les niveaux des contaminants et la masse des individus sauf pour les goélands argentés, où une relation négative est observée pour les PBDE ($r = -0,30$, $p\text{-value} = 0,0117$).

Les représentations graphiques des corrélations entre l'imprégnation chimique des individus et les différents rapports isotopiques sont présentés dans les figures ci-dessous. L'année 2015 a été utilisée à titre d'exemple et les graphiques obtenus pour les autres années sont donnés en Annexe.

La figure 6 montre que les goélands marins ont une position trophique plus élevée que les goélands bruns et argentés. De plus, ce niveau trophique joue sur les niveaux de contaminants bioamplifiables comme les PCB. Cela explique pourquoi les goélands marins sont globalement les plus imprégnés en PCB. Les trois goélands argentés aux niveaux aberrant de PCB suivent aussi cette tendance.

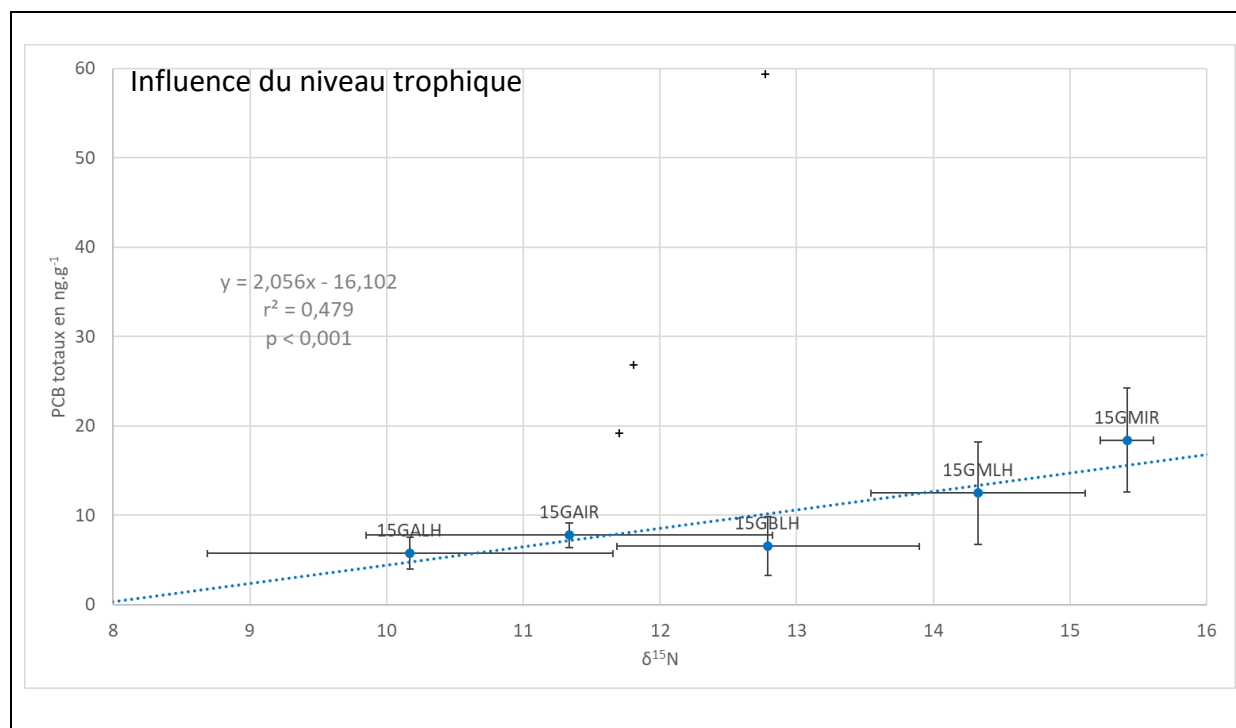


Figure 6 Corrélations entre les concentrations totales des PCB (ng g⁻¹ de plasma, poids frais) et le δ¹⁵N en ‰ pour les goélands marins (GM), les goélands argentés (GA) et les goélands bruns (GB) en 2015 (n=43). Les croix noires représentent trois goélands argentés de l'îlot du Ratier ayant des teneurs en PCB aberrantes. Ces individus n'ont pas été pris en compte dans les représentations graphiques de cette figure.

La figure 7 montre, dans un premier temps, les préférences des zones de nourrissage de chaque espèce. En effet, les goélands argentés se nourrissent principalement sur les zones côtières alors que les goélands marins se nourrissent dans des zones plus marines. Les goélands bruns, se nourrissent sur des zones entre celles des goélands argentés et des goélands marins. Un gradient terrestre – marin est donc visible grâce au δ¹³C. De plus, les niveaux de PCB et de PFAS sont corrélés au δ¹³C (respectivement $r^2 = 0,404$, p-value < 0,001 ; $r^2 = 0,1336$, p-value = 0,0022). Les concentrations de ces deux classes de contaminants semblent diminuer avec la proximité des zones de chasse des parents à la côte.

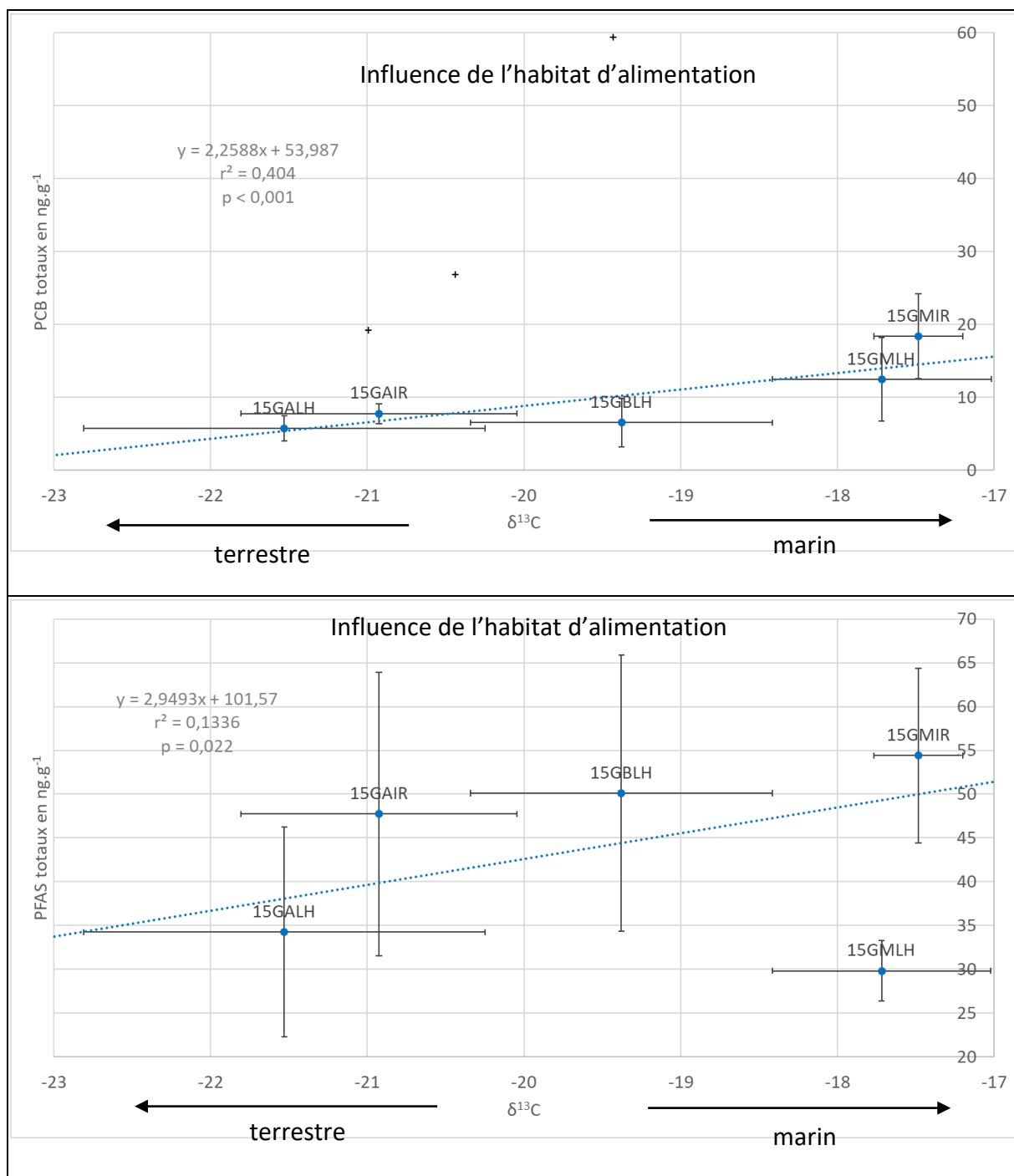


Figure 7 Corrélations entre les concentrations totales des PCB et PFAS (ng g⁻¹ de plasma, poids frais) et le $\delta^{13}C$ en ‰ pour les goélands marins (GM), les goélands argentés (GA) et les goélands bruns (GB) en 2015 (n=43). Les croix noires représentent trois goélands argentés de l'Îlot du Ratier ayant des teneurs en PCB aberrantes. Ces individus n'ont pas été pris en compte dans les représentations graphiques de cette figure.

Les corrélations entre le $\delta^{34}S$ et les niveaux de PCB et de PFAS sont positives et significatives. La corrélation du $\delta^{34}S$ avec les concentrations totales de PCB est de $r^2 = 0,305$, p-value < 0,001 et avec les PFAS de $r^2 = 0,192$, p-value = 0,005. Les forts niveaux des PCB et des PFAS, associés aux $\delta^{34}S$ les plus forts, seraient donc reliés à une alimentation plus riche en protéines comparée à celle des individus ayant les niveaux en contaminants les plus faibles.

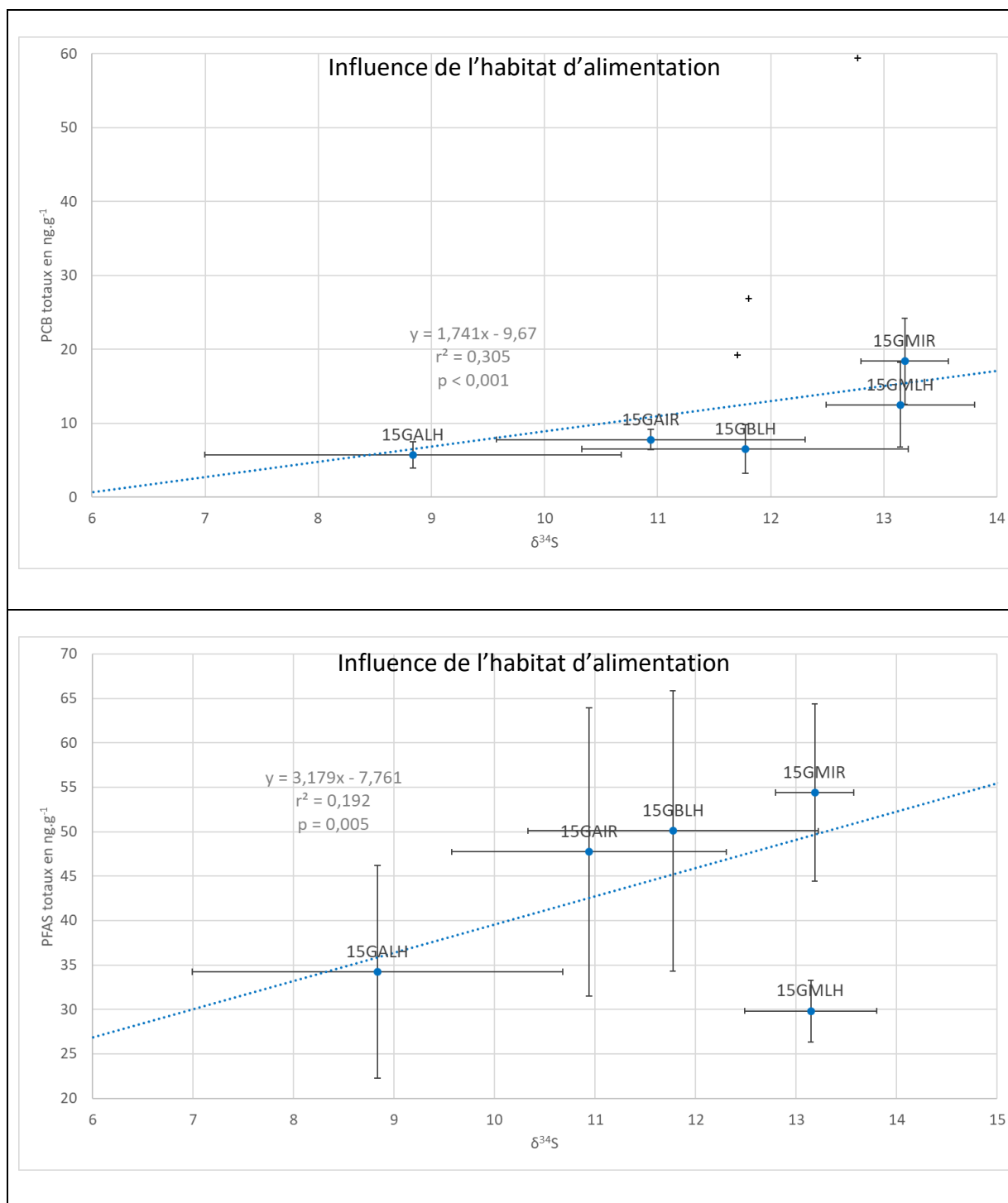


Figure 8 Corrélations entre les concentrations totales des PCB et PFAS (ng.g^{-1} de plasma, poids frais) et le $\delta^{34}\text{S}$ en ‰ pour les goélands marins (GM), les goélands argentés (GA) et les goélands bruns (GB) en 2015 ($n=43$). Les croix noires représentent trois goélands argentés de l'Îlot du Ratier ayant des teneurs en PCB aberrantes. Ces individus n'ont pas été pris en compte dans les représentations graphiques de cette figure.

Aucune autre corrélation entre les niveaux de contaminants et les rapports isotopiques n'est observée pour les individus de 2015.

En résumé, une influence de la position trophique sur l'imprégnation chimique en PCB, OCP, PBDE et PFAS des individus peut être montrée, notamment pour les PCB et PFAS, et les $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{34}\text{S}$ montrent, respectivement, que le lieu de prédation et le type de régime alimentaire sont les paramètres ayant le plus d'influence sur les niveaux de PCB et de PFAS.

5 Données supplémentaires - Présentation des résultats par classe de composés

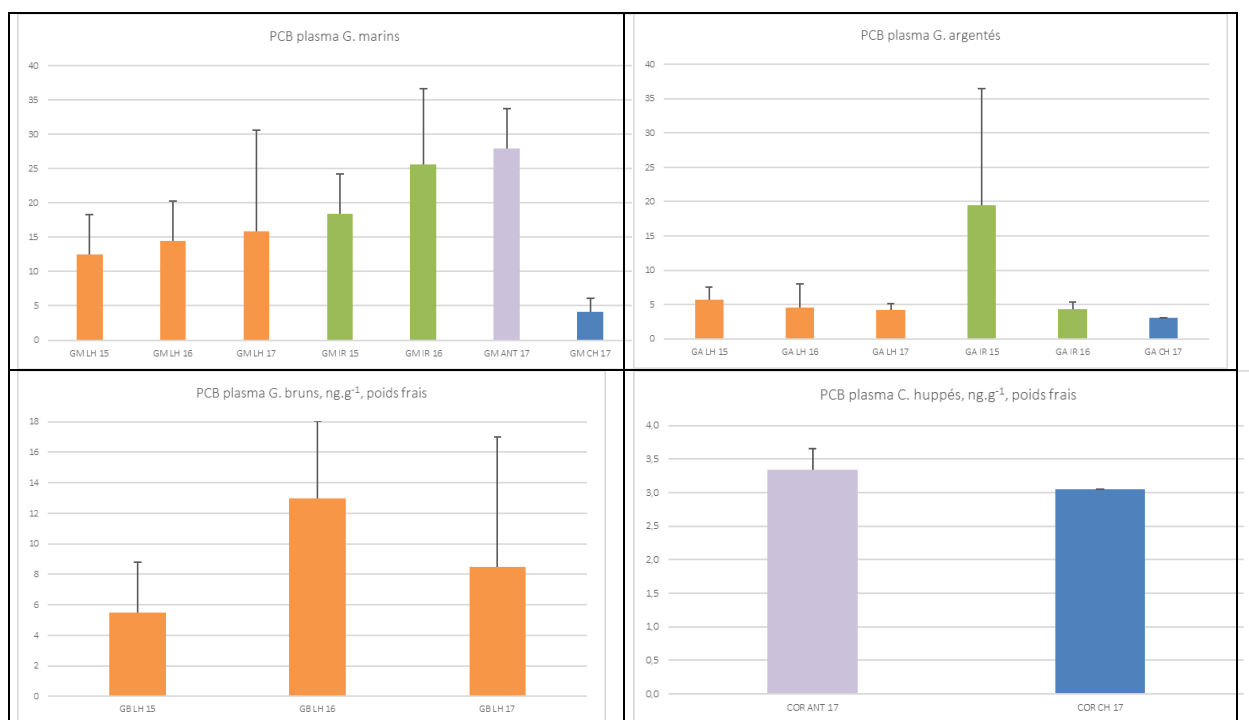


Figure 8 Concentration totales des PCB (ng.g⁻¹ de plasma, poids frais, colonne de gauche) chez le goéland marin (GM), le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015, 2016 et 2017.

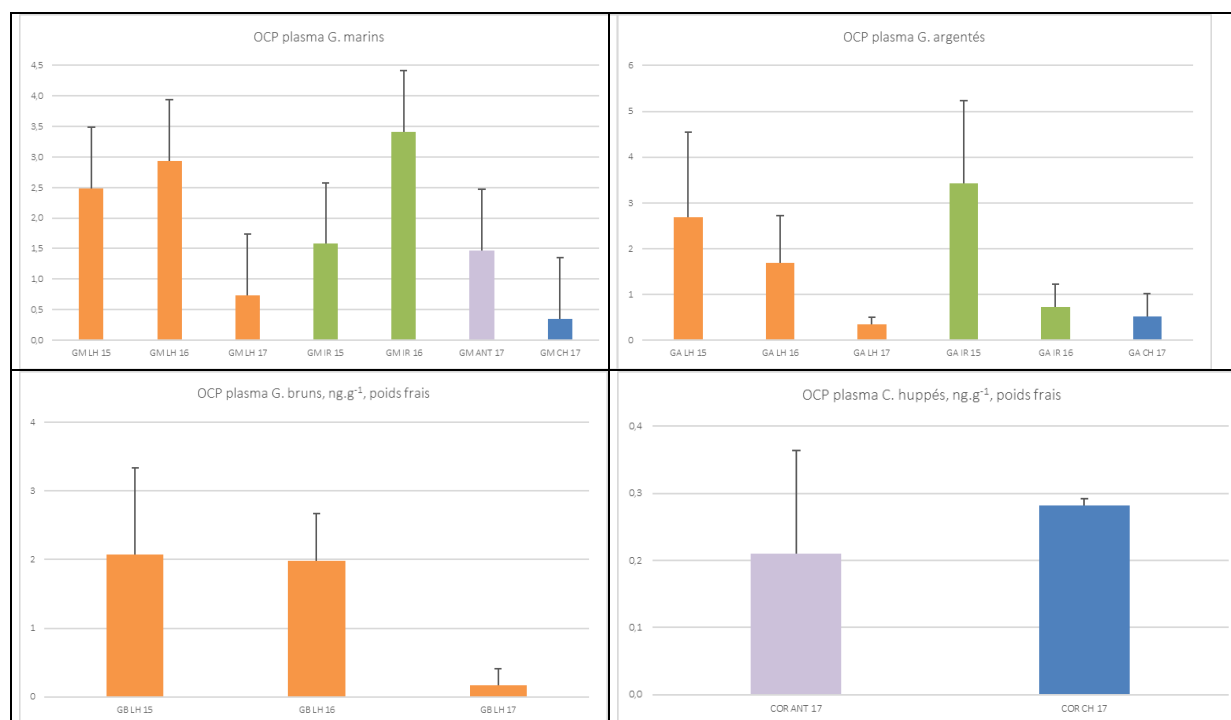


Figure 9 Concentration totales des PCB (ng.g^{-1} de plasma, poids frais, colonne de gauche) chez le goéland marin (GM), le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015, 2016 et 2017.

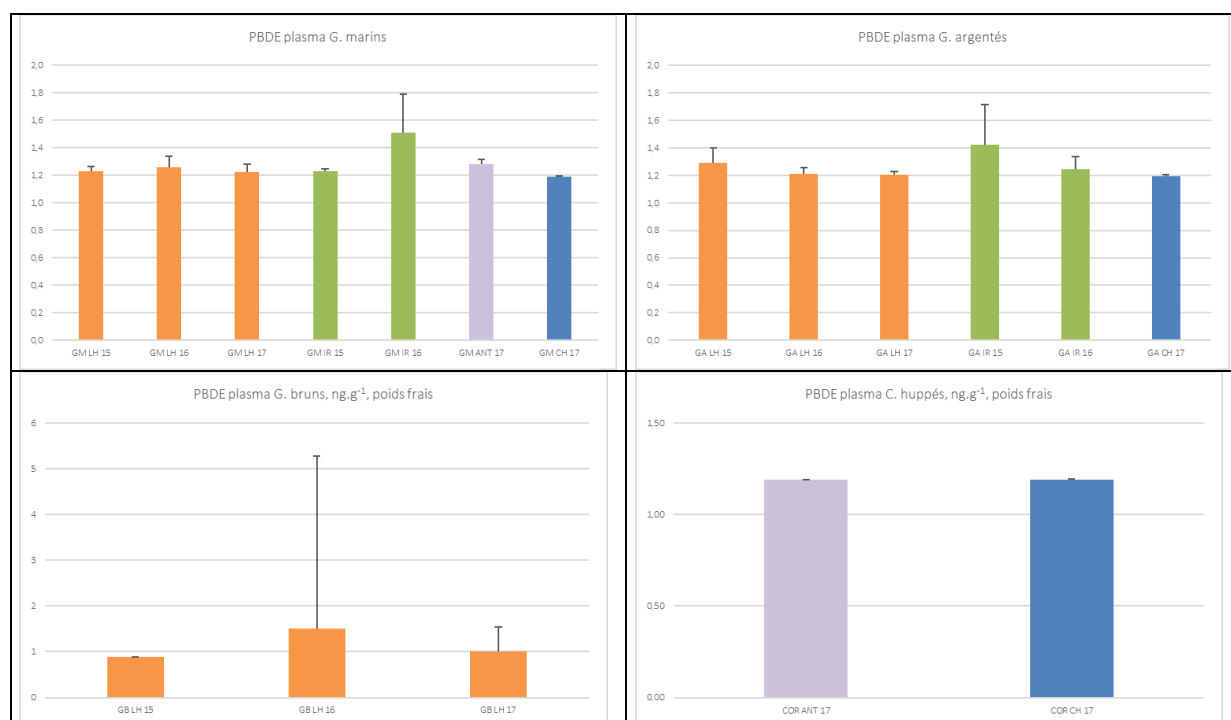


Figure 10 Concentration totales des PBDE (ng.g^{-1} de plasma, poids frais, colonne de gauche) chez le goéland marin (GM), le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015, 2016 et 2017.

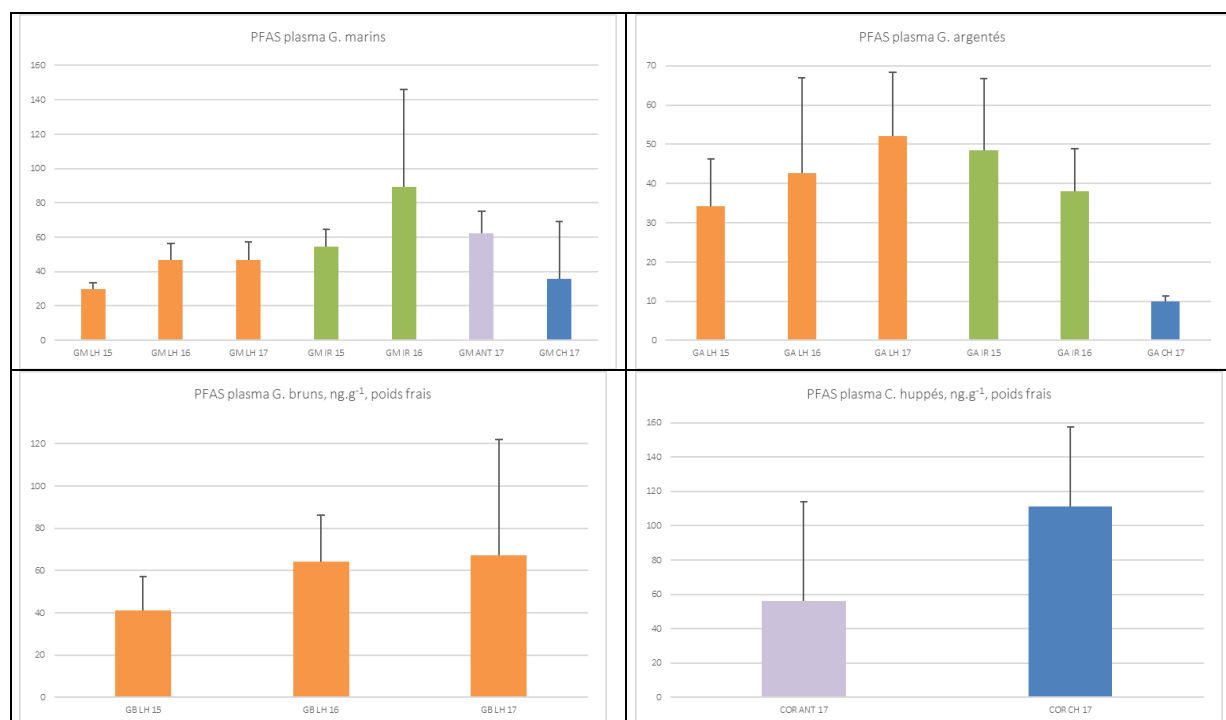


Figure 11 Concentration totales des PFAS (ng.g^{-1} de plasma, poids frais, colonne de gauche) chez le goéland marin (GM), le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2015, 2016 et 2017.

Bibliographie

- Carravieri, A., Bustamante, P., Tartu, S., Meillère, A., Labadie, P., Budzinski, H., ... & Cherel, Y. 2014. Wandering albatrosses document latitudinal variations in the transfer of persistent organic pollutants and mercury to Southern Ocean predators. *Environmental science & technology*, 48(24), 14746-14755.
- Munoz, G., Labadie, P., Geneste, E., Pardon, P., Tartu, S., Chastel, O., Budzinski, H., 2017. Biomonitoring of fluoroalkylated substances in Antarctica seabird plasma: Development and validation of a fast and rugged method using on-line concentration liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1, 107-117.
- Siegel & Castellan, 1988. Non-parametric statistics for the behavioural sciences. MacGraw Hill Int., New York. pp 213-214



Annexes 10

Rapport Seine-Aval 5

Acronyme du projet : ECOTONES

Coordinateur : Benoit Xuereb

Tache 2. Evaluation des effets de la contamination sur l'avifaune (responsable Paco Bustamante)

Suivi de biomarqueurs du stress oxydant chez l'avifane

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

1 Contexte

L'étude des biomarqueurs a été réalisée dans le cadre du suivi des effets de la contamination chimique sur la santé des organismes de l'estuaire.

2 Echantillons analysés et protocoles

Les biomarqueurs du stress oxydant : activités spécifiques de la Catalase (CAT), de la Superoxyde dismutase (SOD), des Glutathione-S-transférases (GST) et la concentration en Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARs), ont été dosés dans le plasma de 4 espèces : Goéland marin, Goéland argenté, Goéland brun et Cormoran (Tableau 1).

Tableau 1 Nombre d'échantillons dosés pour chaque biomarqueur (Catalase CAT ; SOD Superoxyde dismutase ; GST Glutathione S Transférases, TBARs Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique) pour chaque espèce d'oiseaux et par site.

Oiseaux	Site	2015				2016				2017			
		CAT	SOD	GST	TBARs	CAT	SOD	GST	TBARs	CAT	SOD	GST	TBARs
Goéland marin	Le Havre	12	13	13	13	10	12	13	12	5	11	11	10
	Illet du Ratier	12	13	13	13	10	12	11	11				
	Antifer									1	3	2	2
	Chausey									12	15	15	17
Goéland brun	Le Havre	10	11	11	11	9	10	10	10	2	3	3	2
Goéland argenté	Le Havre	12	12	12	12	14	14	13	14	11	12	11	11
	Illet du Ratier	6	6	6	6	10	11	10	9				

	Chausey									12	15	14	12
Cormoran	Antifer									2	2	1	2
	Chausey									8	10	9	9

3 Matériel et méthodes

Dosage des protéines (méthode de Bradford) : Le dosage des protéines est issu du protocole modifié décrit à l'origine par Bocquené & Galgani (1998). Une gamme étalon (Y-globuline, 1,34 mg.mL⁻¹) est préparée à des concentrations comprises entre 0 et 1 mg.mL⁻¹. En microplaque, 10µL de chaque standard ou d'échantillons de plasma dilués au 1000^{ème} sont mélangés (triplicats) avec 200µL de réactif de Bradford dilué au 5^{ème}. Après 15min d'agitation, la densité optique (DO) est mesurée à 595nm. Le dosage des protéines permet d'exprimer l'activité spécifique des enzymes étudiées par gramme de protéines.

Activité de la Catalase (CAT) : L'activité de la catalase est mesurée selon la méthode de Roméo *et al.* (2000). La solution réactionnelle est composée de H₂O₂ (9,78 M) et de tampon phosphate 100 mM, pH 7,4 (0,520 < DO_{240nm} < 0,550). Entre 5µL et 20µL d'échantillon non dilué sont placés dans une cuve en quartz dans un volume total d'1mL de solution réactionnelle (triplicat). L'activité spécifique de la CAT, exprimée en µmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines, se détermine en suivant la cinétique de disparition de H₂O₂ pendant 1 min à 240 nm.

Activité de la Superoxyde Dismutase (SOD) : Le protocole décrit par Chatelain *et al.* (2008) est appliqué pour quantifier l'activité SOD ajusté à l'étude du plasma d'oiseaux. Une gamme étalon de SOD (30 unités.mL⁻¹) est préparée, de 0 à 20 U.mL⁻¹. La solution réactionnelle est composée de 1 volume de Xanthine 0,7 mM pour 10 volumes de Cytochrome³⁺ C 0,03 M, dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7,8) et de l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA 1mM). En microplaque, 50 µL d'échantillon à 10 mg/mL ou de solution de gamme étalon sont ajoutés à 200 µL de solution réactionnelle et à 50 µL de Xanthine oxydase 0,03 unité.mL⁻¹. L'activité spécifique de la SOD, exprimée en U.mg⁻¹ de protéines, est mesurée à travers la cinétique d'apparition du Cytochrome²⁺ C.

Activité des Glutathion-S-Transférases (GST) : Le dosage de l'activité GST est réalisé en suivant le protocole décrit par Geracitano *et al.* (2002). La solution réactionnelle photosensible est composée de 1 chloro-2-4-dinitrobenzène – CDNB (60 mM), de tampon phosphate (100 mM, pH 6,5) et de GSH (10 mM). Dans chaque puits, 100 μL d'échantillon à la concentration de 10 mg.mL^{-1} de protéines sont déposés et la réaction est déclenchée en ajoutant 200 μL de solution réactionnelle. En parallèle, 300 μL de solution réactionnelle sont déposés en triplicat. La cinétique d'apparition du GS-CDNB est suivie à 340 nm pendant 2 min à 25°C. L'activité spécifique de la GST, exprimée en $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines, est déterminée en dosant la quantité de CDNB s'étant lié au GSH (GS-CDNB).

Concentration en Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARS) :

La concentration en TBARS est déterminée en suivant le protocole de Knight *et al.* (1988). Cette mesure repose sur la propriété du MDA (malondialdéhyde) à produire une coloration rose lue à 532 nm (Sunderman, 1985). Le MDA est issu de la réaction du TBA (acide thiobarbiturique) avec les lipides peroxydés. Une gamme étalon de TMP (tétraméthoxypropane, $11,82.10^{-2}$ mM diluée dans l'éthanol 40%) est préparée à des concentrations de 0 à 0,029 mM. 50 μL d'échantillon sont mélangés à 0,6 mL d'acide phosphorique (1,2%), 150 μL de KCl (154 mM) et 250 μL de TBA (30 mM). Les tubes sont agités et incubés 45 min à 90°C. Après 5 min de refroidissement à température ambiante, 300 μL de solution sont placés en triplicats sur microplaque. La concentration en lipides peroxydés est exprimée en nmol MDA. mg^{-1} de protéines.

4 Résultats et analyses

Les résultats sont présentés par espèce. Les graphes par biomarqueurs sont présentés en annexes.

4.1 Goéland marin

Concernant les goélands marins (Figure 1), les activités spécifiques (AS) CAT et SOD sont significativement plus élevées en 2015 qu'en 2016 et en 2017 quel que soit le site d'où proviennent les oiseaux (Le Havre et îlot du Ratier). La quantité de TBARS est également plus élevée en 2015 qu'en 2016 et 2017 chez les oiseaux des deux sites (Le Havre ou îlot du

Ratier). L'AS GST ne montre pas de différence significative quels que soient l'année ou le site. Les enzymes CAT et SOD sont des enzymes de phase I intervenant les premières dans la lutte métabolique contre le stress oxydant et dont les activités ont pour rôle de limiter la peroxydation lipidique (quantifiée par les TBARs). Leur activité diminue parallèlement à la concentration en TBARs en 2016 et 2017 chez les oiseaux des deux sites. La GST est une enzyme de phase II, qui agit sur la détoxification de molécules endogènes et exogènes telles que des pesticides organochlorés ou des PCB (Roméo et al. 2003).

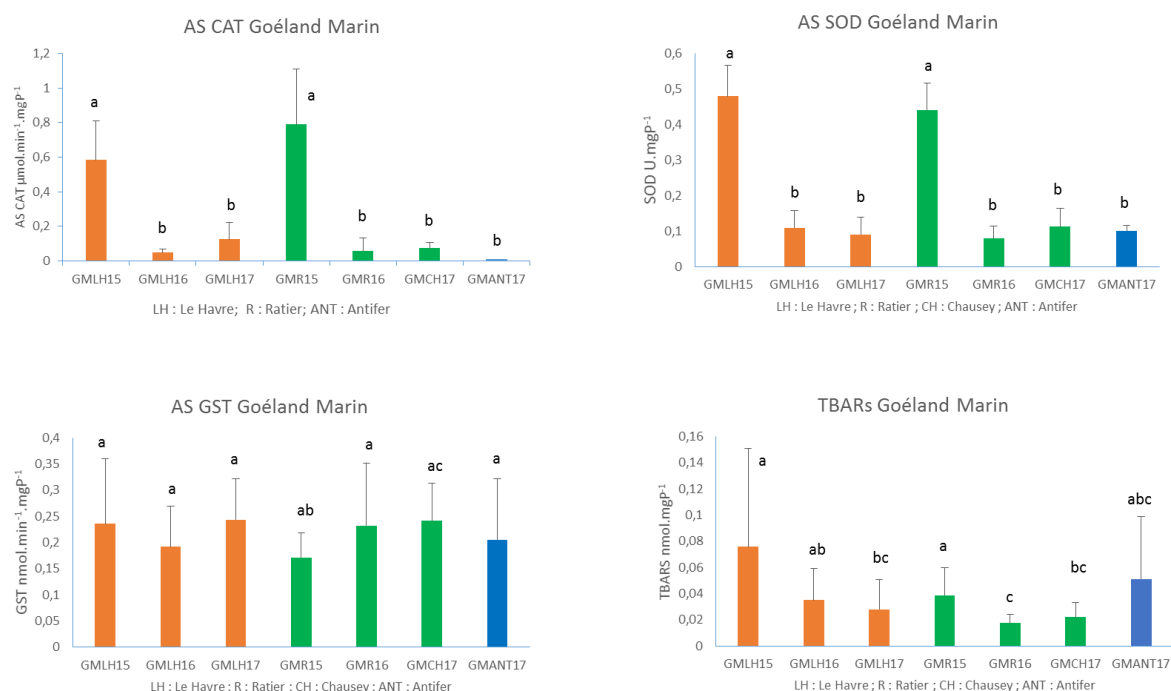


Figure 1 Activités spécifiques de la Catalase (AS CAT), de la Superoxyde dismutase (AS SOD), des Glutathione-S-Transférases (AS GST), et concentrations en Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARs) chez le goéland marin (GM) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Chausey (CH), Antifer (ANT) échantillonnés en 2015 (15), 2016 (16) et 2017 (17).

4.2 Goéland Argenté

Concernant les goélands argentés (Figure 2), les AS CAT et SOD sont également significativement plus élevées en 2015 qu'en 2016 et en 2017 pour les oiseaux des deux sites (Le Havre et îlot du Ratier). Concernant la GST, une augmentation significative de son activité est observée en 2017 chez les oiseaux des deux sites. La quantité de TBARs n'est pas significativement différente d'une année à l'autre chez les oiseaux de chaque site ; elle est néanmoins plus faible chez les oiseaux de l'îlot du Ratier montrant une peroxydation lipidique moindre. On retrouve donc des résultats similaires à ceux observés pour les goélands marins concernant les AS CAT, SOD et concentration en TBARs. Un stress oxydatif

semble avoir provoqué une augmentation de l'activité GST chez les oiseaux des sites Le Havre et Chausey en 2017 sans provoquer d'augmentation des activités enzymatiques de phase I (CAT et SOD).



Figure 2 Activités spécifiques de la Catalase (AS CAT), de la Superoxyde dismutase (AS SOD), des Glutathione-S-Transférases (AS GST), et concentrations en Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARs) chez le goéland argenté (GM) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Chausey (CH), échantillonnés en 2015 (15), 2016 (16) et 2017 (17).

4.3 Goéland brun

Concernant les goélands bruns échantillonnés uniquement sur le site Le Havre (Figure 3), les AS CAT et SOD sont significativement plus élevées en 2015 par rapport à 2016 et 2017 comme pour les deux autres espèces de goélands. Aucune différence significative d'AS GST ou de concentration en TBARs n'est observée pour cette espèce.

4.4 Cormorans

Concernant les cormorans (Figure 4) pour lesquels les biomarqueurs n'ont été dosés qu'en 2017, seule l'AS CAT présente une différence significative entre les deux sites (activité supérieure chez les oiseaux du site d'Antifer par rapport à ceux de Chausey). Les AS SOD et GST de même que la quantité de TBARs sont supérieures chez les oiseaux du site d'Antifer par rapport au site de Chausey. Ces résultats montrent un stress oxydant plus important avec une induction des enzymes chez les oiseaux du site d'Antifer. La quantité de TBARs

montre également une peroxydation lipidique plus importante chez les oiseaux du site d'Antifer (par rapport aux oiseaux du site de Chausey) qui n'est pas compensée par l'activation des enzymes luttant contre le stress oxydant. Il sera intéressant de corrélérer les concentrations des contaminants mesurés dans le plasma des mêmes individus avec les activités des biomarqueurs de stress oxydant, les AS des enzymes CAT et SOD ainsi que la concentration en TBARs semblant ici les plus informatives.

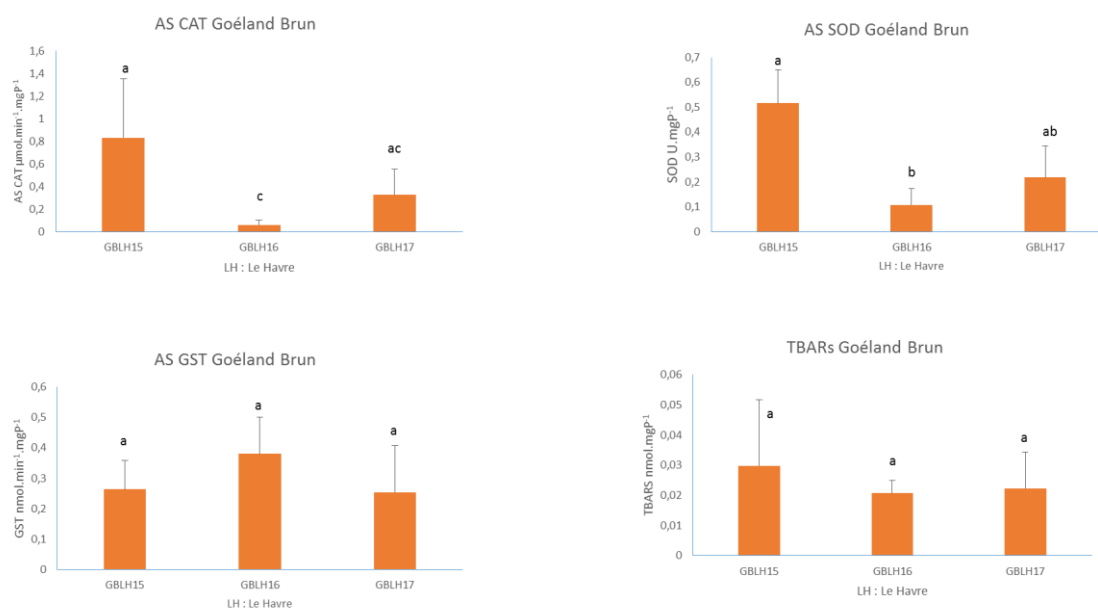


Figure 3 Activités spécifiques de la Catalase (AS CAT), de la Superoxyde dismutase (AS SOD), des Glutathione-S-Transférases (AS GST), et concentrations en Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARs) chez le goéland brun (GB) du site Le Havre (LH) échantillonnés en 2015 (15), 2016 (16) et 2017 (17).

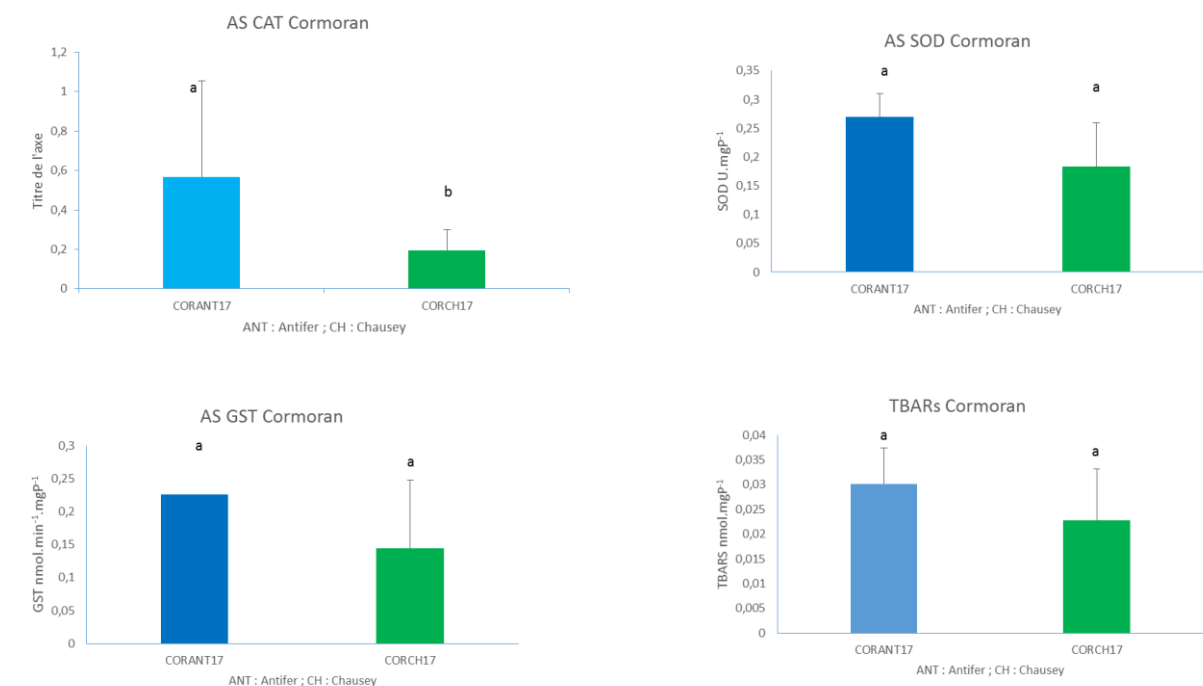


Figure 4 Activités spécifiques de la Catalase (AS CAT), de la Superoxyde dismutase (AS SOD), des Glutathione-S-Transférases (AS GST), et concentrations en Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARs) chez les cormorans (COR) des sites Antifer (ANT) et Chausey (CH), échantillonnés en 2017 (17).

5 Données supplémentaires - Présentation des résultats par biomarqueur

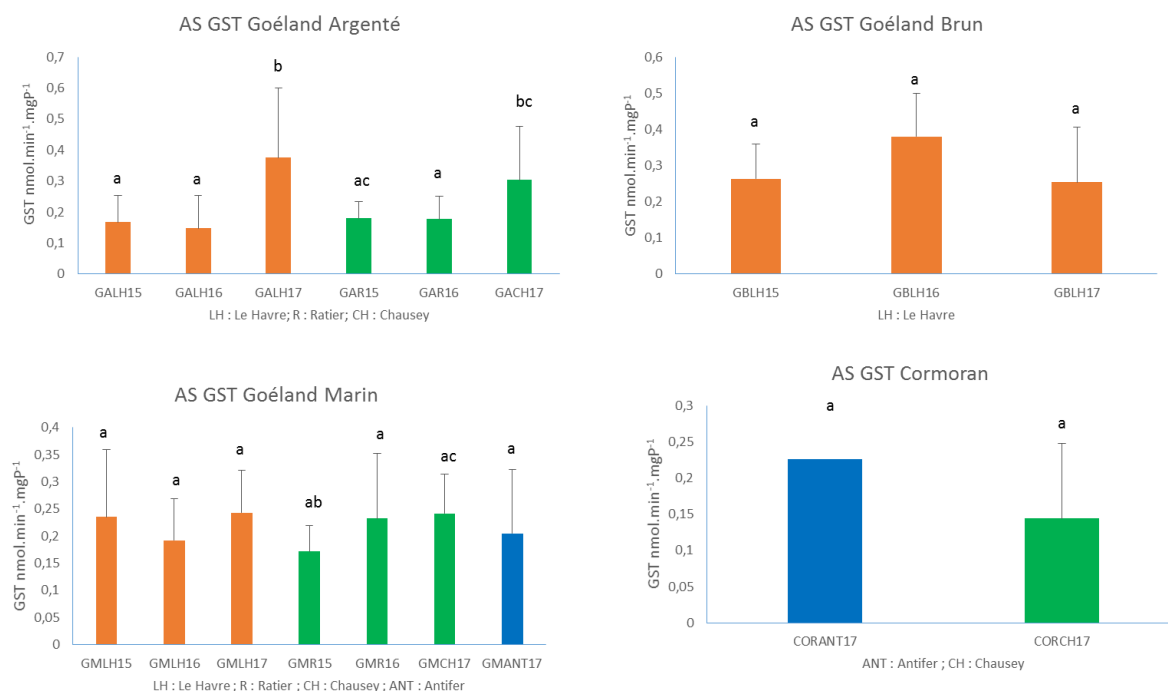


Figure 5 Activités spécifiques des Glutathione-S-Transférases (AS GST) chez le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), le goéland marin (GM) et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Chausey (CH), Antifer (ANT) échantillonnés en 2015 (15), 2016 (16) et 2017 (17).



Figure 6 Activités spécifiques de la catalase (CAT) chez le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), le goéland marin (GM) et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Chausey (CH), Antifer (ANT) échantillonnés en 2015 (15), 2016 (16) et 2017 (17).



Figure 7 Activités spécifiques de la Superoxyde dismutase (AS SOD) chez le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), le goéland marin (GM) et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Chausey (CH), Antifer (ANT) échantillonnés en 2015 (15), 2016 (16) et 2017 (17).

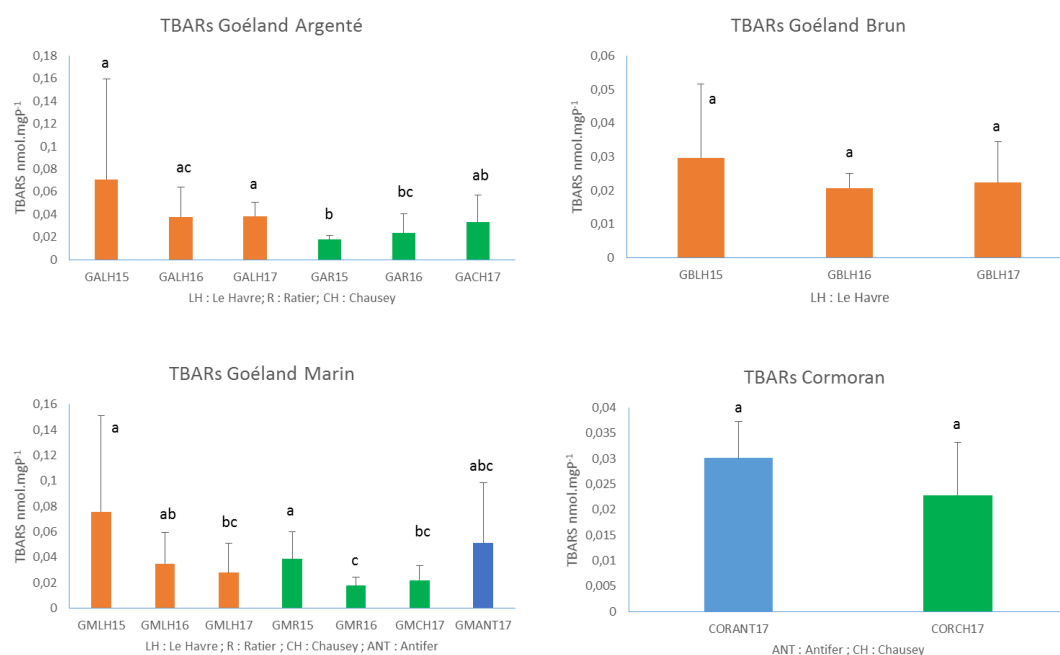


Figure 8 Concentrations en Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARS) chez le goéland argenté (GA), le goéland brun (GB), le goéland marin (GM) et le cormoran (COR) des sites Le Havre (LH), Ilot du ratier (R), Chausey (CH), Antifer (ANT) échantillonnés en 2015 (15), 2016 (16) et 2017 (17).



Annexes 11

Rapport Seine-Aval 5

Acronyme du projet : ECOTONES

Coordinateur : Benoit Xuereb

Tache 3. Bancarisation et intégration des données
(responsable Benoit Xuereb)

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

Iris Barjhoux - UMR-I02 / SEBIO-URCA

1 LOE Biomarqueurs

1.1 Définition des valeurs de référence, des seuils Th , seuils d'effet et poids des biomarqueurs

Les paragraphes suivants décrivent les valeurs de référence, les seuils $Th(i)$, les seuils d'effet (pour la fonction $Z(i)$) et les poids *Weight* appliqués lors de l'intégration des données dans la LOE Biomarqueurs. Ces informations sont synthétisées dans le *Tableau S1*.

1.1.1 La crevette *Palemonetes longirostris*

Chez la crevette *P. longirostris*, la valeur de référence et le seuil Th associés au taux d'endommagement basal de l'ADN des spermatozoïdes ont été déterminés d'après les résultats du suivi d'une population de référence (espèce littorale *P. serratus* à la station d'Yport) sur deux campagnes de 7 mois chacune, entre 2015 et 2016. La valeur de référence est le taux moyen de dommages ADN des spermatozoïdes observé sur l'ensemble des campagnes et le seuil Th a été calculé d'après la borne supérieure de l'intervalle de confiance unilatéral à 95%. Le seuil d'effet permettant de définir ensuite la fonction de correction $Z(i)$ a été établie d'après la valeur d'effet sur la descendance (20 % Tail DNA, extrapolée de la littérature ; c.f. Annexe 5). Cette valeur a été traduite en unité arbitraire (100 AU) en l'assignant à une classe de dommage et en calculant l'indice de dommage ADN correspondant à 100% des cellules dans cette classe de dommage. Les études préalables

ayant démontré l'absence de variation saisonnière pour ce biomarqueur, les mêmes valeurs seuil ont été appliquées sur toutes les campagnes du projet ECOTONES.

Enfin, un poids de 1,7 a été proposé pour les dommages ADN analysés par le test comète sur les spermatozoïdes de crevette. Cette valeur a été choisie de façon à se situer entre la valeur de 1,5 proposée par Piva et al. (2011) pour les biomarqueurs susceptibles de refléter des effets à des niveaux d'organisation biologique plus élevés (comme l'AChE, les CYP P450 et la perte d'intégrité de l'ADN) et la valeur de 1,9 assignées aux dysfonctions reproductives et/ou hormonales.

Lors de l'intégration, une « moyenne Estuaire » a été calculée en moyennant les valeurs d'effets E(i) calculées pour chaque site de prélèvement lors d'une même campagne, à l'exception du site de la rivière Risle.

1.1.2 Le polychète *Hediste diversicolor*

La définition des valeurs de référence, seuils Th et seuils d'effet chez cette espèce ont été effectués en s'appuyant sur les travaux précédents du laboratoire portant sur les activités AChE, GST, CAT et TBARS (Barrick et al., 2018). Ainsi, les valeurs BAC (*Baseline assessment criteria*) ont été utilisées comme valeur de référence, et le seuil Th a été dérivé de la valeur limite inférieure (ou supérieure) associées à la valeur BAC. La valeur EAC (*Environmental assessment criteria*) létal a été utilisée pour établir le seuil d'effet. La même démarche a été appliquée pour déterminer des valeurs BAC et EAC afin de dériver les paramètres du modèle LOE Biomarqueurs pour les réponses supplémentaires (lipides, glycogène et densité). Les variations saisonnières de ces réponses ont été prises en compte lors de la définition des valeurs BAC et EAC. Ainsi, pour les campagnes ECOTONES de mars, les valeurs BAC et EAC moyennées entre février et mai ont été utilisées. Pour les campagnes de juin et juillet, les valeurs BAC et EAC moyennées entre mai et août ont été appliquées (*Tableau S1*).

L'attribution des poids des réponses AChE, CAT, GST et TBARS a suivi les recommandations de Piva et al. (2011) pour cette espèce avec des valeurs respectives de 0,75, 0,5, 0,5 et 0,75. Le poids associé aux mesures de glycogène et de lipides a été défini par analogie à la valeur de 1,2 établie par de Piva et al. (2011) pour les lipides neutres, toujours chez *Hediste diversicolor*. Enfin, un poids de 2,8 a été attribué à la mesure de densité afin de se situer entre le poids associé à la mortalité (3) et celui associé aux histopathologies et échecs de reproduction/infertilité (2.4).

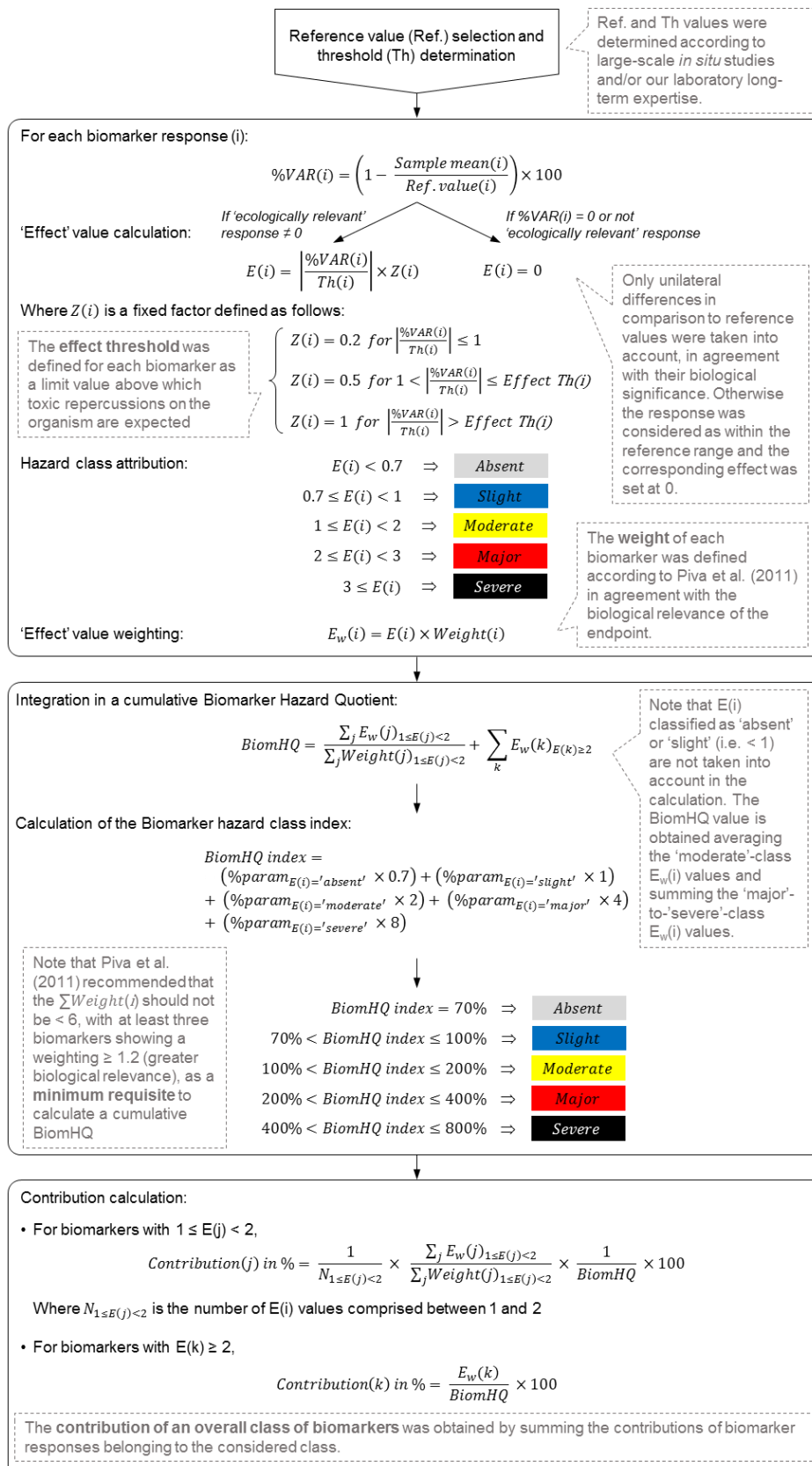


Figure S1 Principe calculatoire de la LOE Biomarqueurs d'après Barjoux et al. (2018).

Tableau S1 Récapitulatif des valeurs de référence, seuils Th, seuils d'effet et facteurs de pondération (*Weight*) appliqués aux différentes réponses intégrées dans la LOE Biomarqueurs.

Catégorie	Espèce	Biomarqueur	Abrév.	Valeur Réf.	Unité	Sens réponse	Seuil Th(i)	Seuil d'effet	Weight
Reproduction	<i>P. longirostris</i>	Dommages ADN (Test comète) sur spermatozoïdes	CSptz	52.6	Unité arbitraire (AU)	Induction	17.3%	90.1%	1.70
Stress oxydant	<i>H. diversicolor</i>	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique	TBARS	0.68 (mars) 0.62 (juin/juil.)	nmol MDA /mg prot.	Induction	20.0% (mars) 22.0%(juin/juil.)	43.1% (mars) 47.3% (juin/juil.)	0.75
Stress oxydant	<i>H. diversicolor</i>	Activité catalase	CAT	36.4 (mars) 41.4 (juin/juil.)	nmol/min /mg prot.	Induction	45.0% (mars) 39.7% (juin/juil.)	76.3% (mars) 67.2% (juin/juil.)	0.50
Stress oxydant	<i>H. diversicolor</i>	Activité Glutathion-S-transférase	GST	76.1 (mars) 82.3 (juin/juil.)	nmol/min /mg prot.	Induction	27.2% (mars) 25.1% (juin/juil.)	55.6% (mars) 51.5% (juin/juil.)	0.50
Neurotoxicité	<i>H. diversicolor</i>	Activité Acétylcholinestérase	AChE	36.9 (mars) 23.6 (juin/juil.)	nmol/min /mg prot.	Inhibition	-28.6% (mars) -44.7% (juin/juil.)	-51.4% (mars) -80.3% (juin/juil.)	0.75
Métabolisme énergétique	<i>H. diversicolor</i>	Réserves lipides	Lip.	7.61 (mars) 8.48 (juin/juil.)	mg/g pf	Inhibition	-34.9% (mars) -31.3% (juin/juil.)	-66.7% (mars) -59.9% (juin/juil.)	1.20
Métabolisme énergétique	<i>H. diversicolor</i>	Réserves glycogènes	Gly.	12.5 (mars) 18.9 (juin/juil.)	mg/g pf	Inhibition	-46.8% (mars) -30.9% (juin/juil.)	-69.6% (mars) -45.9% (juin/juil.)	1.20
Effets populationnels	<i>H. diversicolor</i>	Densité	Dens.	2190 (mars) 3183 (juin/juil.)	Nb. indiv./m ²	Inhibition	-46.8% (mars) -32.2% (juin/juil.)	-88.5% (mars) -60.9% (juin/juil.)	2.8
Neurotoxicité	<i>E. affinis</i>	Activité Acétylcholinestérase	AChE	398.5	nmol ACTC /min/mg prot.	Inhibition	-6.45%	-30.0%	0.75
Métabolisme énergétique	<i>E. affinis</i>	Rapport ARN/ADN	ARN/ADN	5.10	Sans unité (SU)	Inhibition	-62.0%	-92.9%	1.20

1.1.3 Le copépode *Eurytemora affinis*

Les valeurs de référence et le seuil Th pour le rapport ARN/ADN et l'activité AChE analysés chez *E. affinis* ont été déterminés d'après les moyennes de récupération en laboratoire et la borne inférieure de l'intervalle de confiance unilatéral à 95% (R. Coulaud, *communication personnelle*) (Tableau S1). Pour le seuil d'effet servant à la détermination du facteur de correction Z(i), le seuil de 30% d'inhibition de l'AChE par rapport à la valeur de référence a été retenu d'après la littérature (Bocquené and Galgani, 1998; Burgeot et al., 2011). Concernant le rapport ARN/ADN, un seuil arbitraire correspondant à 1,5*seuil Th a été retenu comme proposé par Barjhoux et al. (2018) pour l'intégration des biomarqueurs chez le gammare dans le cadre du programme Piren-Seine.

Comme précédemment pour *H. diversicolor*, un poids de 0,75 a été attribué à l'activité AChE et un poids de 1,2 pour le rapport ARN/ADN, similairement aux autres marqueurs du métabolisme énergétique (Piva et al., 2011).

1.2 Détail de l'intégration des données de chaque biomarqueur

A noter que les valeurs de biomarqueurs injectées dans le modèle correspondent aux moyennes des répliques (si pertinent) par campagne de prélèvement pour chaque site. Par ailleurs, lors du calcul d'un indice moyen, ce n'est pas la moyenne des mesures de biomarqueurs qui est utilisée mais directement la moyenne des effets E(i) qui est calculée. Ceci permet d'intégrer d'éventuelles variations de valeurs de référence et/ou de seuil %Th, ainsi que la correction Z(i).

1.2.1 Dommages à l'ADN chez la crevette *P. longirostris*

Les résultats en termes d'effets E(i) et de classes de risque associées concernant l'endommagement de l'ADN des spermatozoïdes de crevette *P. longirostris* sont présentés dans la Figure S2.

Globalement, le risque associé aux dommages ADN chez est très élevé (« sévère ») au sein de l'estuaire. Une tendance saisonnière est difficilement identifiable mais il ressort que les campagnes du printemps 2015 et de l'automne 2017 sont les moins impactées. Il est également difficile d'identifier un gradient d'effets clair le long des sites étudiés bien que les effets semblent décroître légèrement de l'amont vers l'aval, avec parfois une remontée des

valeurs au niveau du pont de Normandie, comme cela peut être le cas pour les campagnes printanières.

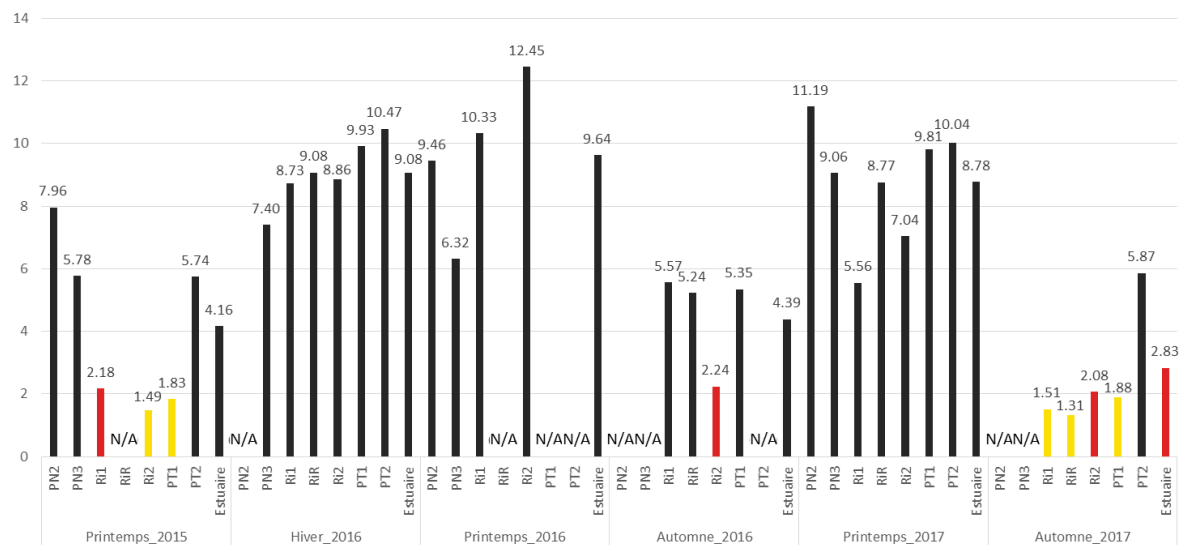


Figure S2 Valeurs d'effet E(i) et classes de risque évaluées pour les dommages à l'ADN chez les spermatozoïdes de crevettes pour les sites de Pont de Normandie (PN), la Risle (RI et RI2) et le pont de Tancarville (PT). La valeur « Estuaire » représente la moyenne des valeurs observées pour tous les points à l'exception de la rivière Risle (RI2).

1.2.2 Biomarqueurs d'effet et d'exposition chez le polychète *H. diversicolor*

Les valeurs d'effets E(i) et les classes de risque associées ainsi que les effets pondérés Ew(i) calculés pour les biomarqueurs d'effet et d'exposition chez le polychète *H. diversicolor* sont détaillés dans le *Tableau S2*.

Les TBARS sont associés au risque maximal pour l'ensemble des temps de prélèvement, à l'exception de l'année 2017. En revanche, les activités enzymatiques CAT, GST et AChE ne sont pas notablement modulées et le risque associé à ces biomarqueurs est évalué à « absent » ou « léger ». Il en est de même pour le dosage des lipides, à l'exception d'un risque « majeur » pour la campagne de mars 2017. Les réserves en glycogène voient le risque qui leur est associé croître entre mars 2015 et juillet 2016 pour atteindre la classe de risque maximal à cette date-là. En 2017, le risque est établi à « majeur » pour ce marqueur mais il est à noter que la valeur d'effet pour le point de juin 2017 est très proche de la classe de risque « sévère ».

Enfin, les valeurs d'effet associées à la densité en polychète sont globalement plus élevées lors des campagnes estivales (juin, juillet), avec des risques « majeur » ou « sévère ». Les effets sont généralement plus faibles pour les campagnes du mois de mars, avec des risques

« léger » ou « modéré », bien qu'en mars 2016, la valeur d'effet de 2,01 fasse passer à la classe de risque « majeur », de peu (limite inférieure à 2,00).

Le nombre et la nature des biomarqueurs analysés chez *H. diversicolor* remplissant les critères d'application de l'intégration de la LOE Biomarqueurs (total des poids *Weight* des biomarqueurs égaux à 7,7 et trois biomarqueurs d'un poids supérieur ou égal à 1,2, voir *Figure S1* pour le minimum requis), une première intégration a pu être proposée, reposant uniquement sur les réponses de ce modèle biologique. Les quotients de risque $\text{BiomHQ}_{\text{Hediste}}$ et les indices de classe de risque associés sont présentés dans la *Figure S3*. Les valeurs de quotient de risque sont globalement similaires pour les deux premières années de prélèvement avec néanmoins des valeurs maximales observées pour la campagne de juillet 2016 (*Figure S3A*). Les classes de risque associées sont « majeures » pour l'ensemble de ces points.

En revanche, l'année 2017 se démarque par des quotients de risque moins élevés, associés à des classes de risque « modéré ».

Ces observations se répercutent sur les quotients annuels moyens, avec des années 2015 et 2016 associée à un risque « majeur » bien que l'année 2015 présente des valeurs plus basses que 2016 (*Figure S3B*). Les plus faibles valeurs sont obtenues pour l'année 2017 avec un risque « modéré ». Le risque global sur les 3 années de suivi est évalué à « majeur » et aucune tendance saisonnière nette n'est visible, selon les moyennes saisonnières calculées (risque « majeur » pour les deux périodes d'échantillonnage), bien que les valeurs pour les mois de mars soient sensiblement plus basses (*Figure S3B*).

Tableau S2 Valeurs d'effets E(i) (A), classes de risque associées (B) et effets pondérés Ew(i) (C) calculés pour les biomarqueurs d'effet et d'exposition chez le polychète *H. diversicolor*. En gras, les moyennes d'effets calculées pour les années 2015, 2016 et 2017, les « saisons » mars et juin/juillet, et la moyenne générale sur l'ensemble des temps de prélèvement, nommée « Global ».

(A)	Effets E(i)											
	MAR_15	JUN_15	MAR_16	JUIL_16	MAR_17	JUN_17	2015	2016	2017	MARS	JUN-JUIL	GLOBAL
TBARS	23.93	5.57	9.52	28.96	0.71	0.79	14.75	19.24	0.75	11.39	11.77	11.58
AChE	0.56	0.00	0.05	0.58	0.09	0.54	0.28	0.32	0.32	0.23	0.38	0.30
GST	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CAT	0.82	0.56	0.01	0.00	0.01	0.00	0.69	0.01	0.01	0.28	0.19	0.23
Lip.	0.15	0.05	0.56	0.16	2.04	0.06	0.10	0.36	1.05	0.92	0.09	0.50
Gly.	1.53	1.83	1.65	3.04	2.07	2.97	1.68	2.34	2.52	1.75	2.61	2.18
Dens.	0.85	3.01	2.01	2.95	1.94	2.79	1.93	2.48	2.37	1.60	2.92	2.26

(B)	Classes de risque associées aux valeurs d'effet E(i)											
	MAR_15	JUN_15	MAR_16	JUIL_16	MAR_17	JUN_17	2015	2016	2017	MARS	JUN-JUIL	GLOBAL
TBARS	Sévère	Sévère	Sévère	Sévère	Léger	Léger	Sévère	Sévère	Léger	Sévère	Sévère	Sévère
AChE	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
GST	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
CAT	Léger	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Lip.	Absent	Absent	Absent	Absent	Majeur	Absent	Absent	Absent	Modéré	Léger	Absent	Absent
Gly.	Modéré	Modéré	Modéré	Sévère	Majeur	Majeur	Modéré	Majeur	Majeur	Modéré	Majeur	Majeur
Dens.	Léger	Sévère	Majeur	Majeur	Modéré	Majeur	Modéré	Majeur	Majeur	Modéré	Majeur	Majeur

(C)	Effets pondérés Ew(i)											
	MAR_15	JUN_15	MAR_16	JUIL_16	MAR_17	JUN_17	2015	2016	2017	MARS	JUN-JUIL	GLOBAL
TBARS	17.95	4.18	7.14	21.72	0.53	0.59	11.06	14.43	0.56	8.54	8.83	8.68
AChE	0.42	0.00	0.04	0.44	0.07	0.41	0.21	0.24	0.24	0.18	0.28	0.23
GST	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CAT	0.41	0.28	0.01	0.00	0.01	0.00	0.35	0.00	0.00	0.14	0.09	0.12
Lip.	0.19	0.06	0.67	0.19	2.44	0.07	0.13	0.43	1.26	1.10	0.11	0.60
Gly.	1.84	2.20	1.98	3.64	2.49	3.57	2.02	2.81	3.03	2.10	3.14	2.62
Dens.	2.37	8.42	5.64	8.26	5.44	7.80	5.40	6.95	6.62	4.48	8.16	6.32

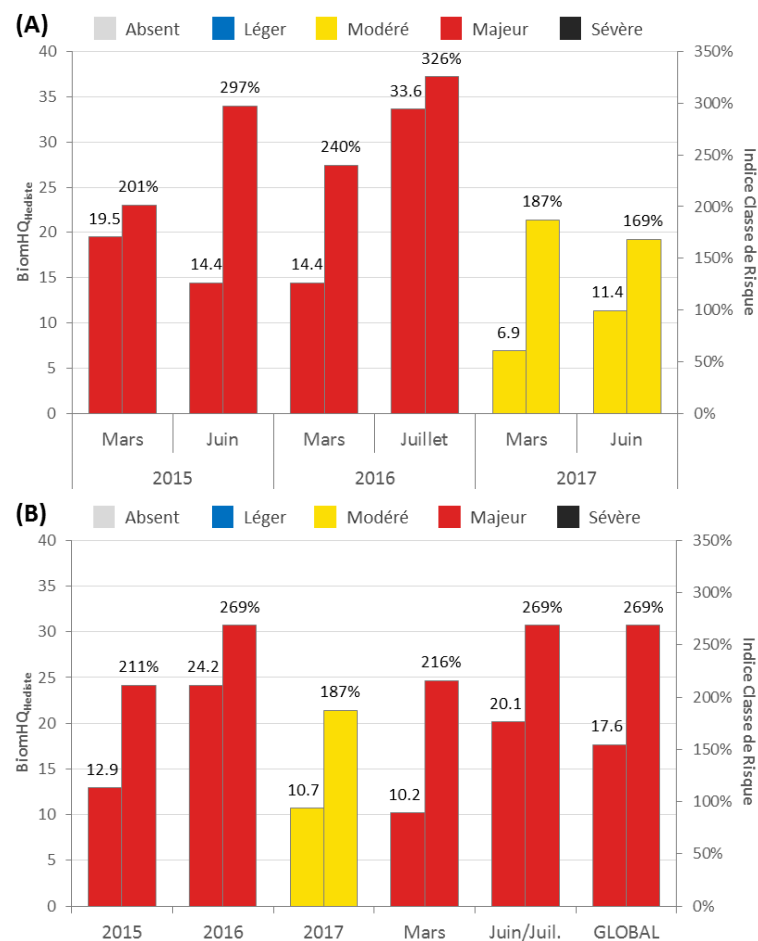


Figure S3 Quotient de risque (BiomHQ_{Hediste}) et indice de classe de risque calculés pour les biomarqueurs chez le polychète *H. diversicolor*, pour chaque campagne de prélèvements (A) ainsi que pour les moyennes annuelles, saisonnières et globale (B).

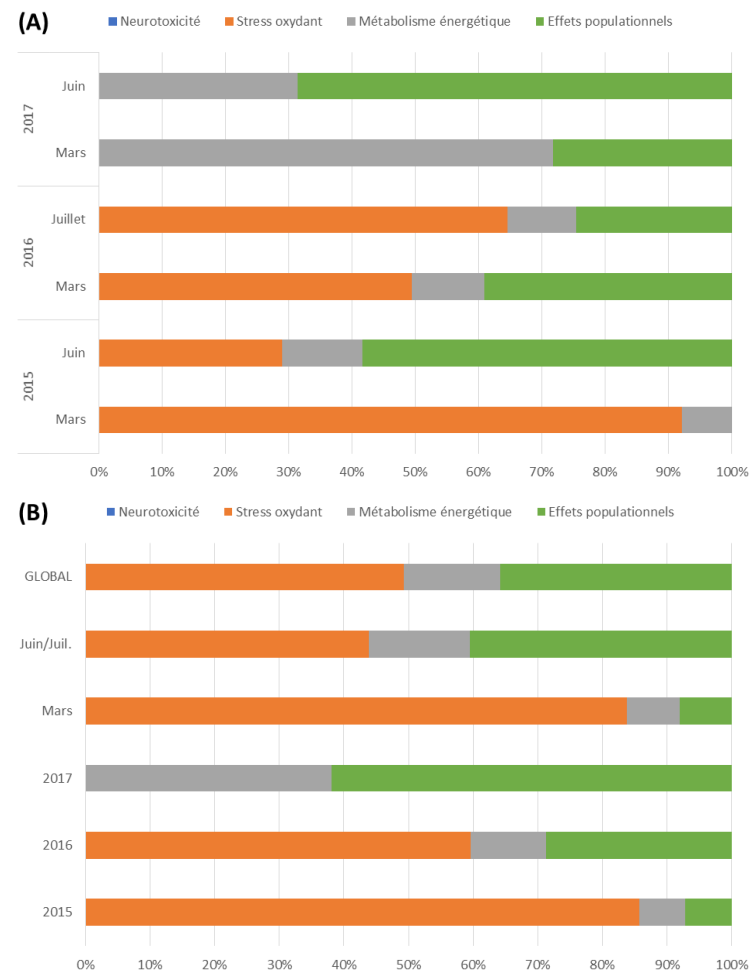


Figure S4 Contributions des biomarqueurs aux BiomHQ_{Hediste} calculés pour chaque campagne de prélèvements (A) ainsi que pour les moyennes annuelles, saisonnières et globale (B). Les contributions sont présentées par catégorie de biomarqueurs. Voir le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** pour le détail des contributions par réponse.

L'examen des contributions par catégorie de biomarqueurs permet d'identifier les marqueurs du stress oxydant comme principaux contributeurs aux valeurs de BiomHQ_{Hediste} pour la campagne de mars 2015 (>90%) et celles de l'année 2016 (50-65%) (*Figure S4A*). Une contribution proche de 30% est également observée pour juin 2015. En revanche, aucune contribution de cette catégorie de biomarqueur n'est notée pour les campagnes de 2017. L'analyse des contributions individuelles de chaque biomarqueurs permet d'identifier les TBARS comme unique marqueur du stress oxydant affichant des modulations responsables de ces contributions élevées (*Erreur ! Source du renvoi introuvable.*). Les contributions des marqueurs du métabolisme énergétique sont très similaires sur les 4 premières campagnes (2015-2016), avec des contributions variant de 8% à 13%, uniquement imputable aux mesures de glycogène (*Figure S4A et Erreur ! Source du renvoi introuvable.*). L'année 2017 se démarque une nouvelle fois avec une augmentation des contributions des marqueurs du métabolisme énergétique, supérieure à 70% pour le mois de mars (avec des contributions équivalentes des réserves en glycogène et lipides ; *Erreur ! Source du renvoi introuvable.*) (*Figure S4A*). Les effets populationnels, retracés par la mesure de densité, contribuent non négligemment au risque associé aux campagnes de l'année 2016 et de mars 2017 (valeurs comprises entre 24% et 39%) et représentent les contributeurs majoritaires pour les campagnes de juin 2015 et 2017 (*Figure S4A et Erreur ! Source du renvoi introuvable.*).

Tableau S3 Contributions des différents biomarqueurs aux BiomHQ_{Hediste}. En gras, les contributions pour les quotients moyens calculés pour les années 2015, 2016 et 2017, les « saisons » mars et juin/juillet, et la moyenne générale sur l'ensemble des temps de prélèvement, nommée « Global ».

	Contributions											
	MAR_15	JUN_15	MAR_16	JUIL_16	MAR_17	JUN_17	2015	2016	2017	MARS	JUN-JUIL	GLOBAL
TBARS	92.1%	28.9%	49.5%	64.6%	0.0%	0.0%	85.6%	59.6%	0.0%	83.8%	43.9%	49.3%
AChE	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
GST	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
CAT	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Lip.	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	35.5%	0.0%	0.0%	0.0%	9.8%	0.0%	0.0%	0.0%
Gly.	7.9%	12.7%	11.4%	10.8%	36.2%	31.4%	7.2%	11.6%	28.3%	8.1%	15.6%	14.9%
Dens.	0.0%	58.4%	39.1%	24.6%	28.3%	68.6%	7.2%	28.7%	61.9%	8.1%	40.6%	35.9%

Les profils de contributions qui résultent de ces observations sont donc similaires pour les moyennes annuelles de 2015 et 2016 ainsi que pour la moyenne saisonnière du mois de mars, avec une contribution majoritaire associée aux marqueurs du stress oxydant (TBARS) et des contributions bien moindres (7% à 12%) pour les marqueurs populationnels et du métabolisme énergétique (*Figure S4B*). Les moyennes pour la période estivale et l'ensemble

des campagnes (« global ») sont associées à des contributions quasi-équivalentes (36% à 49%) des marqueurs du stress oxydant et des effets populationnels, et limitées (~15%) pour le métabolisme énergétique. De manière attendue, la moyenne annuelle de 2017 est marquée par des contributions répartis entre seulement deux catégories de biomarqueurs : le métabolisme énergétique (38%) et les effets populationnels (62%) (*Figure S4B*). Il semble donc que les effets relatifs au stress oxydant se réduisent considérablement pour cette dernière année de suivi, laissant place à une atteinte de plus en plus marquée des marqueurs du métabolisme énergétique et de la densité de population.

1.2.3 Marqueurs de neurotoxicité et du métabolisme énergétique chez le copépode *E. affinis*

Les résultats en termes d'effets E(i) et de classes de risque associées concernant les biomarqueurs analysés chez le copépode *E. affinis* sont présentés dans la *Figure S5*.

Chez cette espèce, aucun effet sur le marqueur du métabolisme énergétique (rapport ARN/ADN) n'est mis en évidence, quel que soit le temps de prélèvement considéré. Le risque est donc évalué à « absent » pour ce paramètre. En revanche, de fortes valeurs d'effets associées à un risque « sévère » sont observées pour l'activité AChE pour l'ensemble des périodes échantillonnées, à l'exception des mois de mai et juillet 2015, présentant des valeurs plus faibles et un risque « léger » et « modéré », respectivement. En dépit de ces plus faibles valeurs et risques associés, les valeurs d'effets calculées pour toutes les années de suivi restent fortes avec un risque maximal (« sévère »). On remarque cependant une augmentation des valeurs d'effet au cours des ans, de 3,8 en 2015 jusqu'à 10,4 en 2017, suggérant une augmentation de la neurotoxicité chez le copépode exposé aux eaux de l'estuaire.

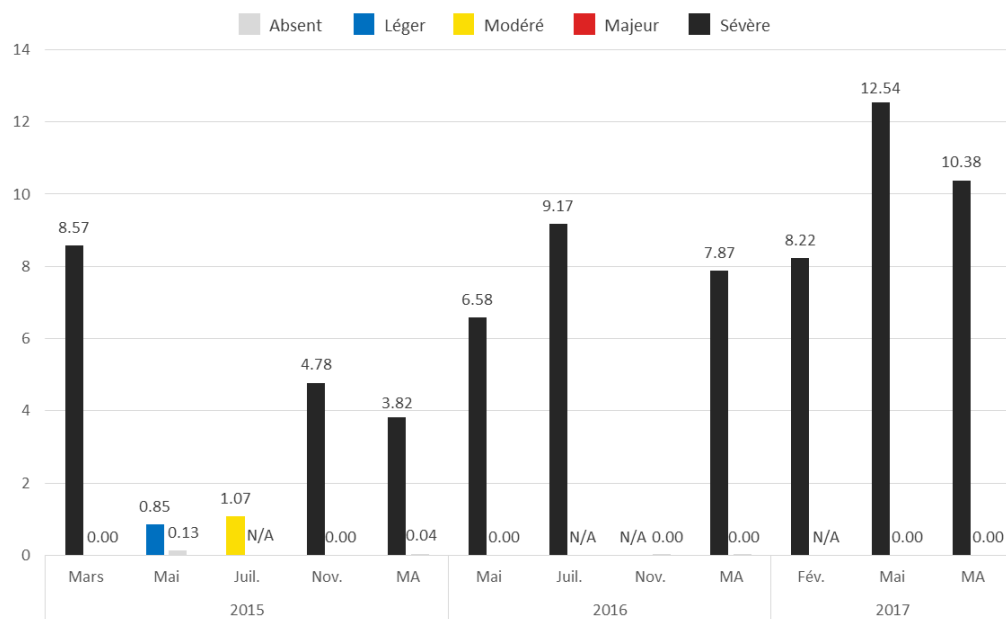


Figure S5 Valeurs d'effet E(i) et classes de risque évaluées pour l'activité AChE (barres de gauche) et le rapport ARN/ADN (barres de droite) chez le copépode, pour les différentes campagnes de prélèvement ainsi que les moyennes annuelles (MA).

2 LOE Bioaccumulation

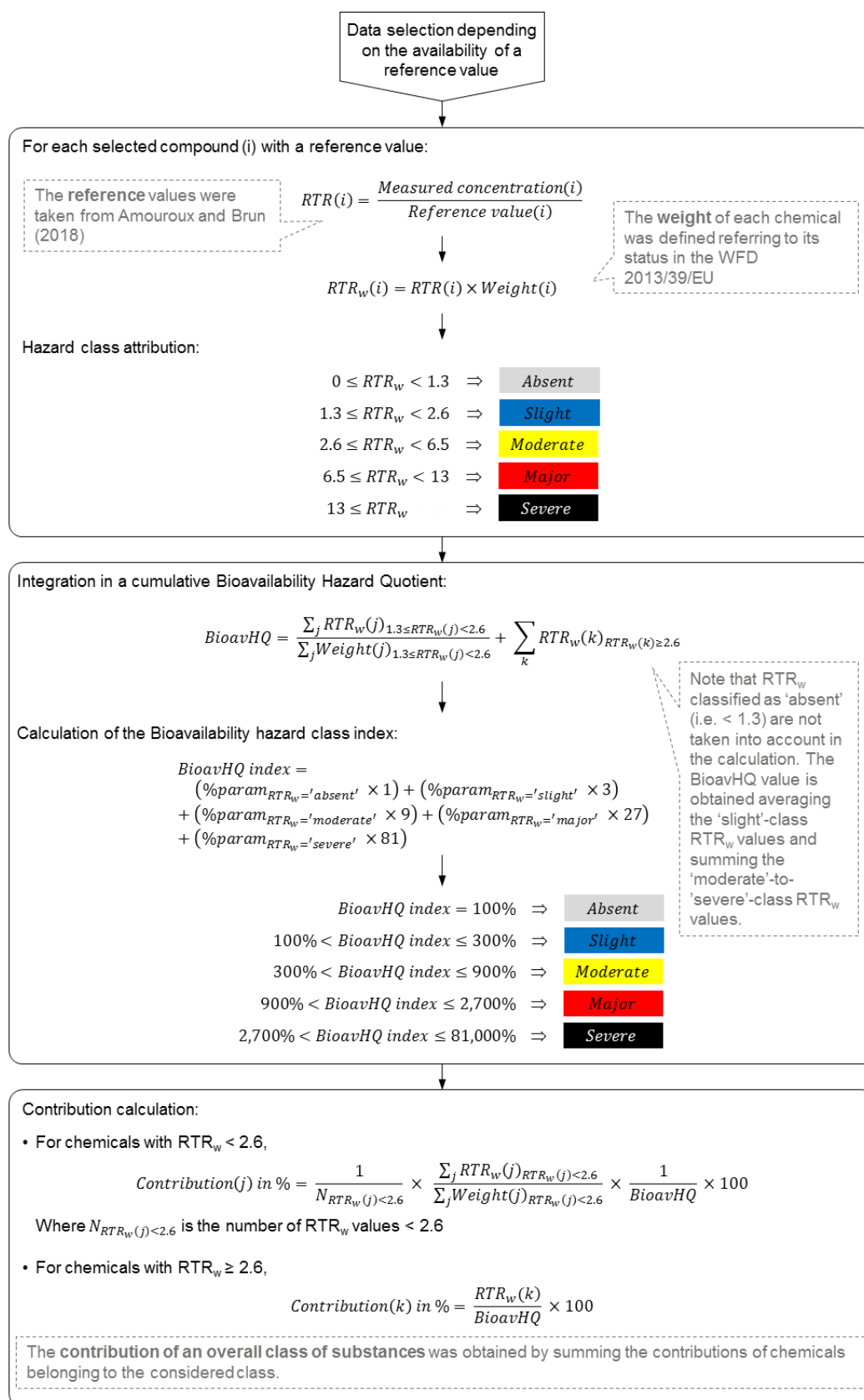


Figure S6 Principe calculatoire de la LOE Bioaccumulation d'après Barjhoux et al. (2018).

Contrairement au modèle proposé par Piva et al. (2011) et modifié par Barjhoux et al. (2018), nous avons choisi de ne pas corriger les valeurs RTR à l'aide d'une fonction $Z(i)$. En effet, dans ces travaux, la valeur de référence utilisée représente le niveau d'imprégnation basale de la population étudiée. La fonction $Z(i)$ est alors insérée dans le but d'augmenter le poids de valeurs s'éloignant notablement de la gamme de référence et donc susceptible de dépasser un seuil d'effet ou de répercussion potentielle. Or, dans la présente étude, nous avons pu utiliser des valeurs de référence de type VGE ou seuil OSPAR qui représentent déjà un seuil de protection des prédateurs supérieurs et/ou sanitaire, au-delà duquel un risque potentiel est à craindre. Nous avons donc choisi de ne pas intégrer de fonction $Z(i)$ en considérant que le seul dépassement de la valeur de référence représentait ici un risque en soi. Le principe calculatoire de la LOE Bioaccumulation est ainsi très similaire et cohérent à ce qui est appliqué dans la LOE Chimie, qui utilise des valeurs de référence de même nature.

2.1 Liste des composés intégrés, concentrations, valeurs de référence et poids correspondants

Les données d'imprégnation chez la moule bleue *Mytilus edulis* ont été extraites de la base de données Quadrigé² du réseau de surveillance ROCCH pour les sites Cap de la Hève et Villerville pour les années 2015 à 2017 (deux campagnes par année, sauf pour 2017 où une seule campagne était disponible ; *Tableau S4*). Une « moyenne Estuaire » a ainsi été calculée en combinant les données issues pour les deux sites cités ci-dessus. Les valeurs de référence ont été tirées des travaux d'Amouroux et Brun (2018) et les composés dont la limite de quantification (LQ) ou de détection (LD) présentait une valeur supérieure à la valeur de référence ont été exclus de l'analyse. Les mesures inférieures à la LQ ont été remplacées par 0. En raison des données disponibles et des valeurs de référence établies, une vingtaine de substances réparties dans 5 grandes familles de composés ont pu être intégrées. Chaque composé s'est vu attribué un poids *Weight* en fonction de son statut dans la Directive Cadre Eau (2013/39/EU) : une substance listée prioritaire et dangereuse (PHS) a un poids égale à 1,3, une substance listée prioritaire a un poids de 1,1 et les autres substances ou composés non-listés, un poids de 1. Le *Tableau S5* rassemble les données et les paramètres du modèle pour la LOE Bioaccumulation.

2.2 Détail de l'intégration des données de bioaccumulation

Les rapports pondérés RTR_w et les classes de risque associées sont présentées dans le *Tableau S6*. Les classes de risques établies pour chaque substance intégrée dans la démarche mettent en évidence un risque « absent » à « léger » pour la plupart des composés à l'exception des PCBs et du fluoranthène. Pour ce dernier, un risque « modéré » est observé uniquement pour la campagne de novembre 2015. En revanche, un risque « modéré » est attribué au PCB 52 pour toutes les campagnes de prélèvement. Le risque associé au PCB 153 est faible (« absent » à « léger ») pour l'ensemble des campagnes, avec néanmoins un risque « modéré » pour la première campagne de 2016. Chez cette famille de composés, ce sont les congénères 138, 101 et 118 qui s'avèrent les plus problématiques avec des risques allant respectivement de « modéré » à « majeur », de « majeur » à « sévère », et « sévère » (*Tableau S6*).

Il résulte de ces observations des quotients de risque BioavHQ relativement similaires pour l'ensemble des campagnes ainsi que pour les moyennes annuelles calculées, variant de 66,1 pour la campagne de décembre 2016 à 78,4 pour la campagne de novembre 2015 (*Figure S7*). Le risque associé à ces valeurs est établi à « majeur », à l'exception de la seconde campagne de 2016 et de la moyenne de cette année, en raison d'un pourcentage de composés associés aux plus fortes classes de risque inférieur en comparaison des autres années. On peut néanmoins noter que la valeur du quotient de risque et la classe de risque augmentent dès la campagne de février 2017 par rapport à ce qui est observé quelques mois avant, en décembre 2016 (*Figure S7*). Cette observation est à relier à l'augmentation de l'accumulation en PCB 101 pour ce dernier point de suivi.

En toute logique, considérant les observations précédentes, les PCBs sont les contributeurs uniques (ou très largement majoritaires) aux valeurs BioavHQ calculées, avec des contributions comprises entre 94% et 100% (*Figure S8*). Conformément aux informations délivrées par l'analyse des classes de risque, c'est le PCB 118 qui présente les plus fortes contributions (57% à 66%), suivi du PCB 101 (16% à 20%), du congénère 138 (8% à 16%), du PCB 52 (4% à 8%) et enfin du PCB 153 (< 5%) (*Tableau S7*).

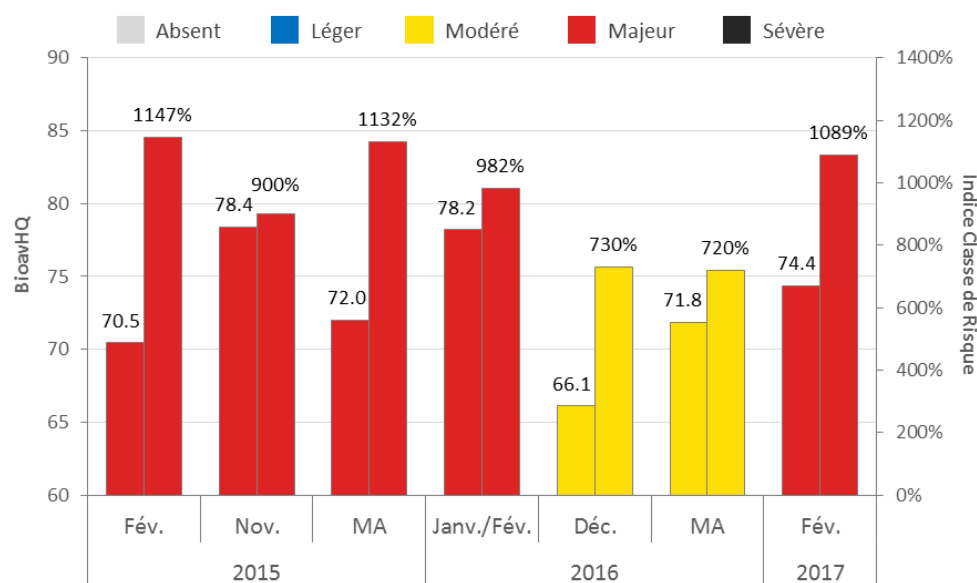


Figure S7 Quotient de risque (BioavHQ) et indice de classe de risque déterminés pour la bioaccumulation chez la moule bleue *Mytilus edulis*, pour chaque campagne de prélèvements ainsi que pour les moyennes annuelles (MA).

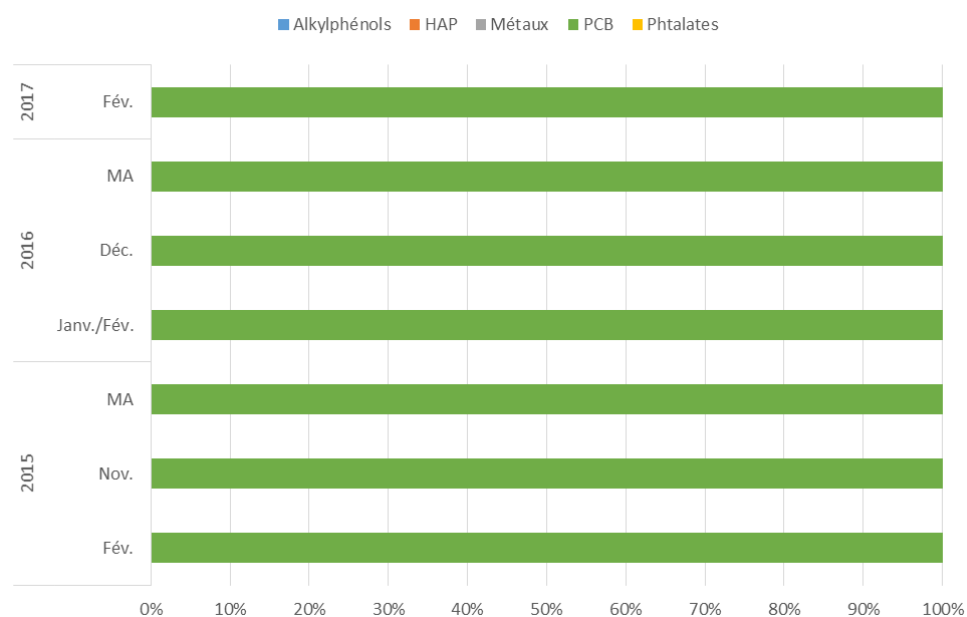


Figure S8 Contributions des composés accumulés aux BioavHQ calculés pour chaque campagne de prélèvements ainsi que pour les moyennes annuelles (MA). Les contributions sont présentées par famille de composés. Voir le *Tableau S7* pour le détail des contributions par substance.

Tableau S5 Liste des substances, valeurs de référence, *Weight* et concentrations « moyenne Estuaire » intégrées dans la LOE Bioaccumulation.

Code Sandre	Famille de composés	Substance	Statut DCE (2013/39/EU)	Unité	Valeur Réf.	Nature Val. Réf.	Weight	fév.-15	nov.-15	Moy 2015	janv./ fév.-16	déc.-16	Moy 2016	fév.-17
5474	Alkylphénols	4-n-Nonylphénol	PHS	µg/kg PF	344.4	VGE	1.3	No Data	60.90	60.90	No Data	0.00	0.00	No Data
1458	HAP	Anthracène	PHS	µg/kg PF	173.8	VGE	1.3	0.32	4.65	1.76	0.99	1.74	1.36	0.48
1191	HAP	Fluoranthène	PS	µg/kg PF	20.9	NQE	1.1	5.27	59.85	23.46	13.29	25.19	19.24	7.55
1517	HAP	Naphtalène	PS	µg/kg PF	214	VGE	1.1	No Data	6.19	6.19	No Data	0.60	0.60	No Data
1115	HAP	Benzo(a)pyrène	PHS	µg/kg PF	5	NQE	1.3	2.19	5.34	3.24	5.14	2.34	3.74	1.53
1082	HAP	Benzo(a)anthracène		µg/kg PS	80	OSPAR	1	17.45	23.60	19.50	31.49	14.00	22.75	9.58
1118	HAP	Benzo(g,h,i)pérylène	PHS	µg/kg PS	110	OSPAR	1.3	23.30	10.70	19.10	30.55	32.65	31.60	8.92
1524	HAP	Phénanthrène		µg/kg PS	1700	OSPAR	1	7.95	507.00	174.30	27.14	110.95	69.05	17.35
1537	HAP	Pyrène		µg/kg PS	100	OSPAR	1	50.70	182.00	94.47	52.59	97.07	74.83	25.80
1388	Métaux	Cadmium	PHS	mg/kg PF	0.5722	VGE	1.3	0.24	0.21	0.23	0.38	0.17	0.28	0.20
1382	Métaux	Plomb	PS	mg/kg PF	1.5	OSPAR	1.1	0.46	0.42	0.44	0.90	0.35	0.63	0.43
1387	Métaux	Mercuré	PHS	mg/kg PF	0.5	OSPAR	1.3	0.03	0.03	0.03	0.04	0.02	0.03	0.03
1239	PCB	PCB 28		µg/kg PS	3.2	OSPAR	1	1.78	2.12	1.89	2.35	3.71	3.03	3.25
1241	PCB	PCB 52		µg/kg PS	5.4	OSPAR	1	17.76	19.50	18.34	17.30	28.07	22.68	28.34
1242	PCB	PCB 101		µg/kg PS	6	OSPAR	1	78.64	77.90	78.39	76.63	72.99	74.81	88.50
1243	PCB	PCB 118		µg/kg PS	1.2	OSPAR	1	55.92	53.23	55.02	61.80	50.36	56.08	55.66
1244	PCB	PCB 138		µg/kg PS	15.8	OSPAR	1	88.22	204.00	126.81	110.73	82.00	96.36	93.60
1245	PCB	PCB 153		µg/kg PS	80	OSPAR	1	149.58	100.00	133.05	215.01	160.22	187.62	166.07
1246	PCB	PCB 180		µg/kg PS	24	OSPAR	1	16.81	10.50	14.70	14.43	11.76	13.09	12.15
6616	Phtalates	Di(2-ethylhexyl)phtalate	PHS	µg/kg PF	2920	QS _{hhfood}	1.3	No Data	No Data	No Data	No Data	31.95	31.95	7.78

Tableau S6 Valeurs des rapports pondérés RTR_w (A) et classes de risque associées (B) pour les niveaux d'imprégnation chez la moule bleue *M. edulis*. En gras, les moyennes calculées pour les années 2015, 2016 et 2017.

(A)		Rapports pondérés RTR _w (i)						
Famille de composés	Substance	fév.-15	nov.-15	Moy 2015	janv./ fév.-16	déc.-16	Moy 2016	fév.-17
Alkylphénols	4-n-Nonylphénol	No Data	0.23	0.23	.	0.00	0.00	No Data
HAP	Anthracène	0.00	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
HAP	Fluoranthène	0.28	3.15	1.23	0.70	1.33	1.01	0.40
HAP	Naphtalène	No Data	0.03	0.03	No Data	0.00	0.00	No Data
HAP	Benzo(a)pyrène	0.57	1.39	0.84	1.34	0.61	0.97	0.40
HAP	Benzo(a)anthracène	0.22	0.30	0.24	0.39	0.18	0.28	0.12
HAP	Benzo(g,h,i)pérylène	0.28	0.13	0.23	0.36	0.39	0.37	0.11
HAP	Phénanthrène	0.00	0.30	0.10	0.02	0.07	0.04	0.01
HAP	Pyrène	0.51	1.82	0.94	0.53	0.97	0.75	0.26
Métaux	Cadmium	0.55	0.48	0.51	0.85	0.40	0.63	0.46
Métaux	Plomb	0.34	0.31	0.32	0.66	0.26	0.46	0.32
Métaux	Mercuré	0.07	0.07	0.07	0.11	0.06	0.09	0.07
PCB	PCB 28	0.56	0.66	0.59	0.73	1.16	0.95	1.02
PCB	PCB 52	3.29	3.61	3.40	3.20	5.20	4.20	5.25
PCB	PCB 101	13.11	12.98	13.07	12.77	12.17	12.47	14.75
PCB	PCB 118	46.60	44.36	45.85	51.50	41.96	46.73	46.38
PCB	PCB 138	5.58	12.91	8.03	7.01	5.19	6.10	5.92
PCB	PCB 153	1.87	1.25	1.66	2.69	2.00	2.35	2.08
PCB	PCB 180	0.70	0.44	0.61	0.60	0.49	0.55	0.51
Phtalates	Di(2-ethylhexyl)phtalate	No Data	No Data	No Data	No Data	0.01	0.01	0.00

(B)		Classes de risque associées aux valeurs RTR _w (i)						
Famille de composés	Substance	fév.-15	nov.-15	Moy 2015	janv./ fév.-16	déc.-16	Moy 2016	fév.-17
Alkylphénols	4-n-Nonylphénol	N/A	Absent	Absent	N/A	Absent	Absent	N/A
HAP	Anthracène	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
HAP	Fluoranthène	Absent	Modéré	Absent	Absent	Léger	Absent	Absent
HAP	Naphtalène	N/A	Absent	Absent	N/A	Absent	Absent	N/A
HAP	Benzo(a)pyrène	Absent	Léger	Absent	Léger	Absent	Absent	Absent
HAP	Benzo(a)anthracène	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
HAP	Benzo(g,h,i)pérylène	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
HAP	Phénanthrène	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
HAP	Pyrène	Absent	Léger	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Métaux	Cadmium	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Métaux	Plomb	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Métaux	Mercuré	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
PCB	PCB 28	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
PCB	PCB 52	Modéré	Modéré	Modéré	Modéré	Modéré	Modéré	Modéré
PCB	PCB 101	Sévère	Majeur	Sévère	Majeur	Majeur	Majeur	Sévère
PCB	PCB 118	Sévère	Sévère	Sévère	Sévère	Sévère	Sévère	Sévère
PCB	PCB 138	Modéré	Majeur	Majeur	Majeur	Modéré	Modéré	Modéré
PCB	PCB 153	Léger	Absent	Léger	Modéré	Léger	Léger	Léger
PCB	PCB 180	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Phtalates	Di(2-ethylhexyl)phtalate	N/A	N/A	N/A	N/A	Absent	Absent	Absent

Tableau S7 Contributions des différentes substances accumulées aux BioavHQ. En gras, les contributions pour les quotients moyens calculés pour les années 2015, 2016 et 2017

Famille de composés	Substance	Contributions						
		fév.-15	nov.-15	Moy 2015	janv./ fév.-16	déc.-16	Moy 2016	fév.-17
Alkylphénols	4-n-Nonylphénol	N/A	0.0%	0.0%	N/A	0.0%	0.0%	N/A
HAP	Anthracène	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
HAP	Fluoranthène	0.0%	4.0%	0.0%	0.0%	1.2%	0.0%	0.0%
HAP	Naphtalène	N/A	0.0%	0.0%	N/A	0.0%	0.0%	N/A
HAP	Benzo(a)pyrène	0.0%	0.9%	0.0%	1.3%	0.0%	0.0%	0.0%
HAP	Benzo(a)anthracène	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
HAP	Benzo(g,h,i)pérylène	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
HAP	Phénanthrène	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
HAP	Pyrène	0.0%	0.9%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Métaux	Cadmium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Métaux	Plomb	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Métaux	Mercuré	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
PCB	PCB 28	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
PCB	PCB 52	4.7%	4.6%	4.7%	4.1%	7.9%	5.8%	7.1%
PCB	PCB 101	18.6%	16.6%	18.1%	16.3%	18.4%	17.4%	19.8%
PCB	PCB 118	66.1%	56.6%	63.7%	65.9%	63.5%	65.0%	62.4%
PCB	PCB 138	7.9%	16.5%	11.1%	9.0%	7.9%	8.5%	8.0%
PCB	PCB 153	2.7%	0.0%	2.3%	3.4%	1.2%	3.3%	2.8%
PCB	PCB 180	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Phtalates	Di(2-ethylhexyl)phtalate	N/A	N/A	N/A	N/A	0.0%	0.0%	0.0%

3 LOE Chimie

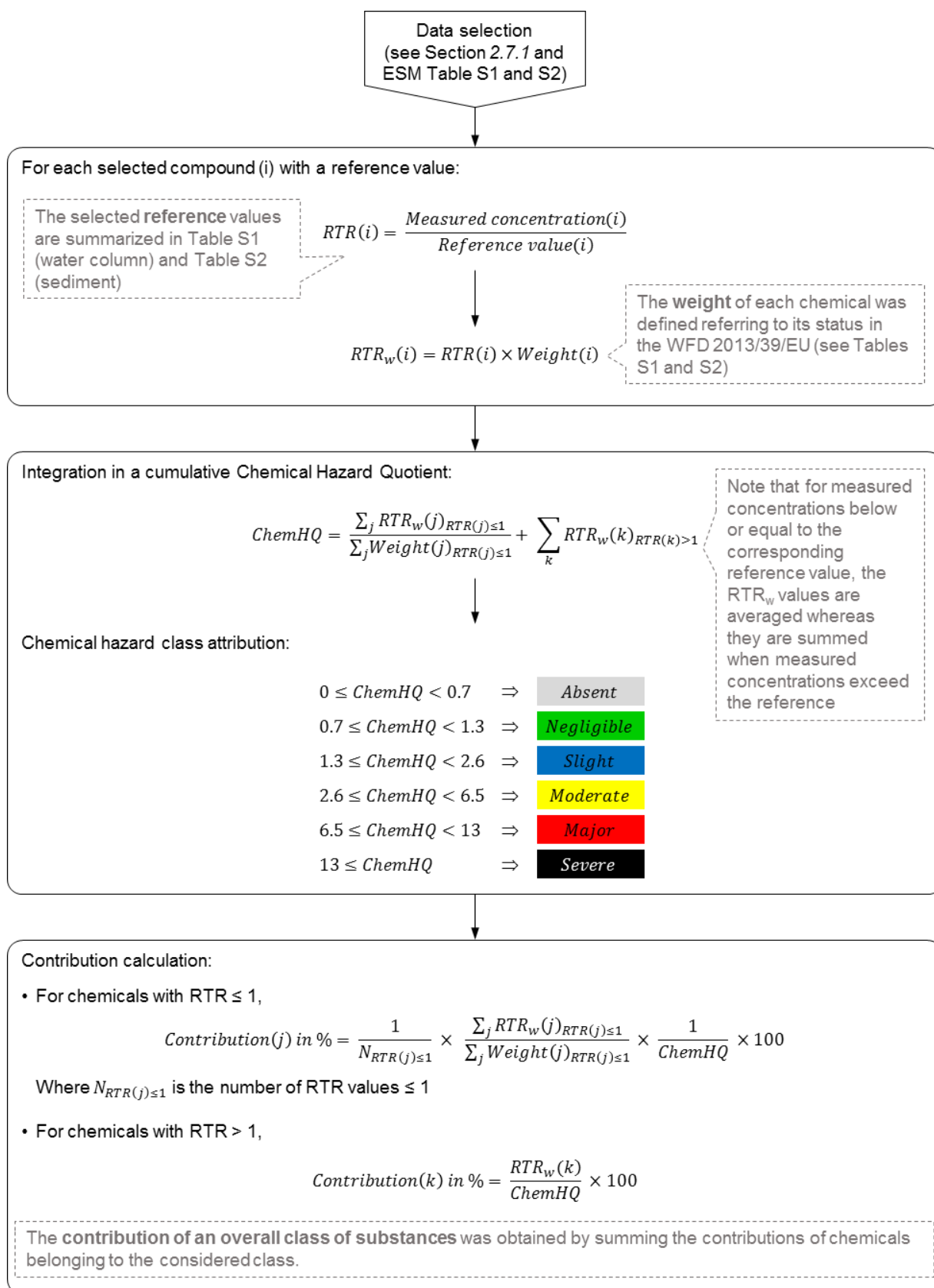


Figure S9 Principe calculatoire de la LOE Chimie d'après Barjhoux et al. (2018).

3.1 Liste des composés intégrés, concentrations, valeurs de référence et poids correspondants

Les données de contamination de la colonne d'eau (fraction dissoute) et des sédiments ont été extraites de la banque de données Naiades de l'AESN pour les années 2015, 2016 et 2017 pour le site de Honfleur. Pour les sédiments, une campagne par année était disponible et est considérée comme représentative de l'année entière, à l'exception de 2017 pour laquelle aucune donnée n'est disponible. Concernant la colonne d'eau, des campagnes mensuelles étaient disponibles et les moyennes annuelles ont été calculées à partir des données de celles-ci (à noter que, pour l'année 2017, seules 4 à 8 campagnes étaient disponibles selon les composés). Les NQE-MA de l'arrêté du 27/07/2015 (MEDAD, 2015) ont été utilisées comme valeurs de référence. Concernant les sédiments, les PNEC proposées par Barjhoux et al. (2018) ont été utilisées. A noter que les valeurs de fond géochimique pour les éléments traces métalliques utilisées dans ces mêmes travaux ont également été appliquées pour corriger les valeurs PNEC, comme recommandé par la réglementation. La sélection des substances pouvant être intégrées au modèle a été conditionnée par la disponibilité des données dans la banque Naiades et d'une valeur de référence. Par ailleurs et comme pour la LOE Bioaccumulation, les composés dont la LQ ou LD présentait une valeur supérieure à la valeur de référence ont été exclus de l'analyse et les mesures inférieures à la LQ ont été remplacées par 0. Enfin, un poids *Weight* a été assigné à chaque substance intégrée dans la LOE en fonction de son statut dans le cadre de la DCE, comme au sein de la LOE Bioaccumulation (voir *partie 2.1*).

Le *Tableau S8* (eau) et le *Tableau S9* (sédiments) synthétisent l'ensemble de ces informations et la liste détaillée des composés intégrés à la LOE.

3.2 Détail de l'intégration des données de contamination du milieu

Les principaux résultats de l'intégration des données de la LOE Chimie sont présentés dans le corps du rapport. Le détail des contributions par composé aux valeurs d'indice ChemHQ calculées est présenté dans le *Tableau S10* (eau), le *Tableau S11* (sédiments) et la *Figure S10*. Pour la colonne d'eau, seul le benzo(b)fluoranthène présente des concentrations légèrement supérieures à la valeur de référence pour les campagnes de 2015 et 2017 (*Tableau S8*). Ainsi, c'est le benzo(b)fluoranthène qui contribue très majoritairement (> 95%) aux valeurs de ChemHQ_{eau} calculées pour ces années-ci (*Tableau S10*). On remarque également que le

benzo(a)pyrène atteint des concentrations représentant 70% à 87% de la NQE-MA. Tous les autres composés sont présents à des niveaux bien inférieurs à la NQE correspondante et ne représente donc pas de risque notable (*Tableau S8*).

Concernant les sédiments, seules les années 2015 et 2016 ont pu être étudiées. Parmi les composés intégrés dans l'approche, seul le pyrène présente des concentrations supérieures à la valeur de référence ($\times 2,4$ et $\times 1,85$ pour 2015 et 2016, respectivement ; *Tableau S9*). On notera également un très léger dépassement pour le benzo(g,h,i)pérylène et le phénanthrène pour les années respectives 2016 et 2015. Enfin, le manganèse est retrouvé à une concentration égale à la valeur de référence (corrigé par le fond géochimique) en 2016. Les autres composés sont mesurés à des concentrations bien inférieures à la valeur PNEC retenue et ne semblent donc pas présenter de risque majeur (*Tableau S9*). Ainsi, les principaux contributeurs à la valeur ChemHQ_{sed} pour l'année 2015 sont le phénanthrène (33%) et le pyrène (61%). Pour l'année 2016, il s'agit du pyrène (42,5%), du benzo(g,h,i)pérylène (30%) et du manganèse (23%) (*Tableau S11*).

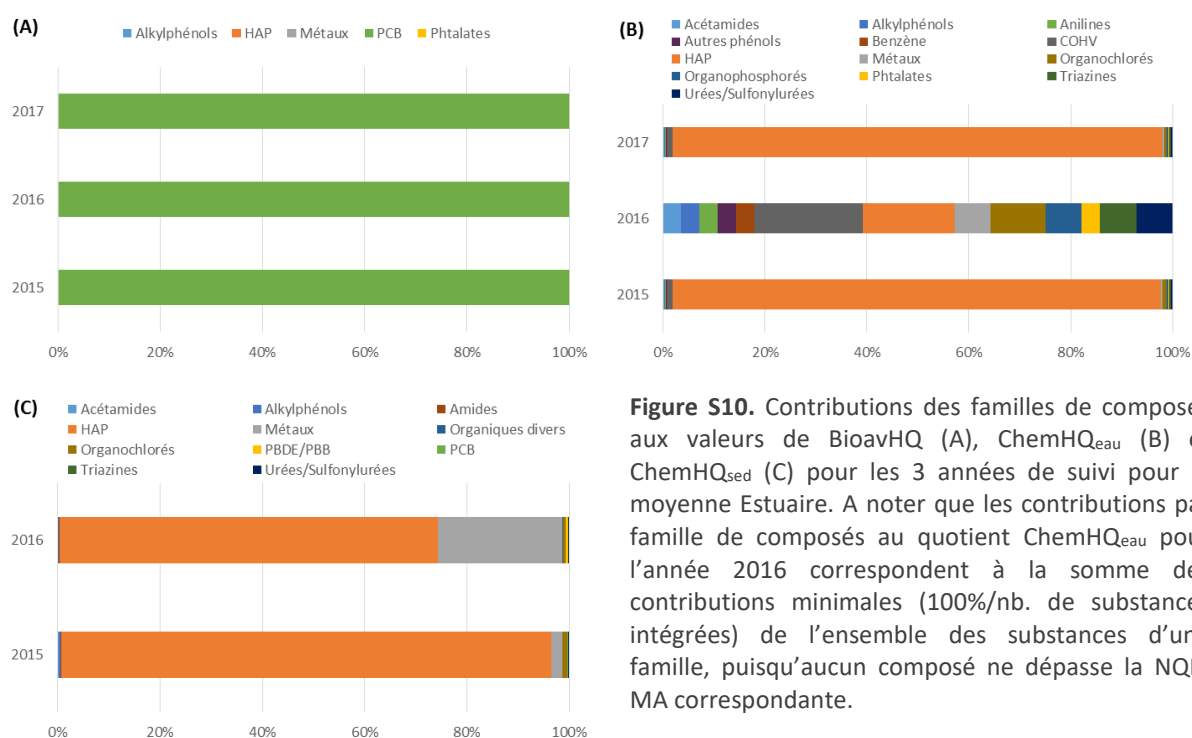


Figure S10. Contributions des familles de composés aux valeurs de BioavHQ (A), ChemHQ_{eau} (B) et ChemHQ_{sed} (C) pour les 3 années de suivi pour la moyenne Estuaire. A noter que les contributions par famille de composés au quotient ChemHQ_{eau} pour l'année 2016 correspondent à la somme des contributions minimales (100%/nb. de substances intégrées) de l'ensemble des substances d'une famille, puisqu'aucun composé ne dépasse la NQE-MA correspondante.

Tableau S8 Données de contamination de la colonne d'eau, liste des substances, poids *weight* et valeurs de références intégrés dans la LOE Chimie.

Code Sandre	Famille de composés	Substance	Statut DCE (2013/39/EU)	Unité	Valeur Réf.	Weight	Moy_2015	Moy_2016	Moy_2017
1101	Acétamides	Alachlore	PS	µg/L	0.3	1.1	0.00	0.00	0.00
5474	Alkylphénols	4-n-Nonylphénol	PHS	µg/L	0.3	1.3	0.00	0.00	0.00
1289	Anilines	Trifluraline	PHS	µg/L	0.03	1.3	0.00	0.00	0.00
1235	Autres phénols	Pentachlorophénol	PS	µg/L	0.4	1.1	0.00	0.00	0.00
1114	Benzène	Benzène	PS	µg/L	8	1.1	0.00	0.00	0.00
1276	COHV	Tétrachlorure de carbone		µg/L	12	1	0.00	0.00	0.00
1161	COHV	Dichloroéthane 1,2	PS	µg/L	10	1.1	0.00	0.00	0.00
1168	COHV	Dichlorométhane	PS	µg/L	20	1.1	6.19	0.00	0.94
1272	COHV	Tétrachloroéthylène		µg/L	10	1	0.00	0.00	0.00
1286	COHV	Trichloréthylène		µg/L	10	1	0.00	0.00	0.00
1135	COHV	Chloroforme	PS	µg/L	2.5	1.1	0.00	0.00	0.00
1458	HAP	Anthracène	PHS	µg/L	0.1	1.3	0.01	0.01	0.01
1191	HAP	Fluoranthène	PS	µg/L	0.1	1.1	0.05	0.04	0.05
1517	HAP	Naphtalène	PS	µg/L	1.2	1.1	0.00	0.02	0.00
1115	HAP	Benzo(a)pyrène	PHS	µg/L	0.05	1.3	0.04	0.03	0.04
1116	HAP	Benzo(b)fluoranthène	PHS	µg/L	0.03	1.3	0.04	0.03	0.03
1382	Métaux	Plomb	PS	µg(Pb)/L	7.2	1.1	0.00	0.00	0.00
1386	Métaux	Nickel	PS	µg(Ni)/L	20	1.1	2.71	0.73	0.18
1148+1147+1146+1144	Organochlorés	DDT total		µg/L	0.025	1	0.00	0.00	0.00
1148	Organochlorés	DDT 44'		µg/L	0.01	1	0.00	0.00	0.00
1199	Organochlorés	HCB	PHS	µg/L	0.01	1.3	0.00	0.00	0.00
1652	Organochlorés	Hexachlorobutadiène	PHS	µg/L	0.1	1.3	0.00	No Data	No Data
1464	Organophosphorés	Chlorfenvinphos	PS	µg/L	0.1	1.1	0.00	0.00	0.00
1083	Organophosphorés	Chlorpyrifos-éthyl	PS	µg/L	0.03	1.1	0.00	0.00	0.00
6616/1461	Phtalates	Di(2-ethylhexyl)phtalate	PHS	µg/L	1.3	1.3	0.22	0.15	0.14
1107	Triazines	Atrazine	PS	µg/L	0.6	1.1	0.00	0.01	0.00
1263	Triazines	Simazine	PS	µg/L	1	1.1	0.00	0.00	0.00
1177	Urées/Sulfonylurées	Diuron	PS	µg/L	0.2	1.1	0.00	0.00	0.00
1208	Urées/Sulfonylurées	Isoproturon	PS	µg/L	0.3	1.1	0.01	0.01	0.01

Tableau S9 Données de contamination des sédiments, liste des substances, poids *weight* et valeurs de références intégrés dans la LOE Chimie.

Code Sandre	Famille de composés	Substance	Statut DCE (2013/39/EU)	Unité	Valeur Réf. (GM-PNEC)	Weight	Fond géochimique	2015	2016
1101	Acétamides	Alachlore	PS	µg/kg	34.00	1.1		0.00	0.00
5474	Alkylphénols	4-n-Nonylphénol	PHS	µg/kg	35.00	1.3		0.00	0.00
1959	Alkylphénols	4-tert-Octylphénol	PS	µg/kg	20.14	1.1		0.00	0.00
1814	Amides	Diflufenicanil		µg/kg	20.00	1.0		0.00	0.00
1453	HAP	Acénaphène		µg/kg	179.50	1.0		2.77	18.7
1458	HAP	Anthracène	PHS	µg/kg	55.57	1.3		40	35.9
1082	HAP	Benzo(a)anthracène		µg/kg	151.43	1.0		126	99.5
1115	HAP	Benzo(a)pyrène	PHS	µg/kg	1115.02	1.3		130	126
1118	HAP	Benzo(g,h,i)pérylène	PHS	µg/kg	140.00	1.3		110	142
1116	HAP	Benzo(b,k)fluoranthène	PHS	µg/kg	878.34	1.3		166.2	149.7
1117									
1476	HAP	Chrysène		µg/kg	256.62	1.0		119	87.5
1621	HAP	Dibenzo(a,h)anthracène		µg/kg	87.31	1.0		28.3	25.9
1191	HAP	Fluoranthène	PS	µg/kg	480.49	1.1		176	131
1623	HAP	Fluorène		µg/kg	98.36	1.0		11.7	10.3
1204	HAP	Indéno(1,2,3-cd) pyrène	PHS	µg/kg	560.00	1.3		103	93.2
1517	HAP	Naphtalène	PS	µg/kg	196.35	1.1		14.9	8.69
1524	HAP	Phénanthrène		µg/kg	61.85	1.0		82.5	56.1
1537	HAP	Pyrène		µg/kg	82.27	1.0		201	152
1376	Métaux	Antimoine		µg(Sb)/kg	11200	1.0	510	500	500
1368	Métaux	Argent		µg(Ag)/kg	438130	1.0		530	0.00
1369	Métaux	Arsenic		µg(As)/kg	17138	1.0	6500	8000	8000
1388	Métaux	Cadmium	PHS	µg(Cd)/kg	1833	1.3	180	300	500
1389	Métaux	Chrome		µg(Cr)/kg	110223	1.0	37600	60000	51000
1379	Métaux	Cobalt		µg(Co)/kg	9500	1.0	6100	5900	5000
1392	Métaux	Cuivre		µg(Cu)/kg	21656	1.0	14900	16000	16000
1394	Métaux	Manganèse		µg(Mn)/kg	3300	1.0	368000	No Data	373000
1395	Métaux	Molybdène		µg(Mo)/kg	22600000	1.0		0.00	0.00
1386	Métaux	Nickel	PS	µg(Ni)/kg	16558	1.1	16500	14000	13000
1382	Métaux	Plomb	PS	µg(Pb)/kg	46870	1.1	26100	28000	27000
1373	Métaux	Titane		µg(Ti)/kg	600000	1.0	2250000	2180000	1940000

Tableau S9 Suite

Code Sandre	Famille de composés	Substance	Statut DCE (2013/39/EU)	Unité	Valeur Réf. (GM-PNEC)	Weight	Fond géochimique	2015	2016
1384	Métaux	Vanadium		µg(V)/kg	75260	1.0	40000	45000	43000
1383	Métaux	Zinc		µg(Zn)/kg	93333.9	1.0	52000	100000	93000
1951	Organiques divers	Azoxystrobine		µg/kg	16.00	1.0		No Data	0.00
1113	Organiques divers	Bentazone	SC	µg/kg	39.71	1.0		No Data	0.00
1143	Organochlorés	Somme des DDDs (DDD 24'+44')		µg/kg	4.88	1.0		0.00	0.00
1144									
1145	Organochlorés	Somme des DDEs (DDE 24'+44')		µg/kg	3.16	1.0		0.25	No Data
1146									
3268	Organochlorés	Somme des DDTs (DDT 24'+44')		µg/kg	4.16	1.0		1.1	0.00
1199	Organochlorés	HCB	PHS	µg/kg	17.45	1.3		0.00	0.00
1203	Organochlorés	HCH gamma	PHS	µg/kg	1.35	1.3		0.00	0.00
1198	Organochlorés	Heptachlore époxydes (cis/trans)	PHS	µg/kg	2.47	1.3		0.00	0.00
2915	PBDE/PBB	BDE 100	PHS	µg/kg	310.00	1.3		No Data	0.00
2912	PBDE/PBB	BDE 153	PHS	µg/kg	5.66	1.3		No Data	0.00
2911	PBDE/PBB	BDE 154	PHS	µg/kg	6.57	1.3		No Data	0.00
1815	PBDE/PBB	BDE 209	PS	µg/kg	100578	1.1		No Data	37.2
2919	PBDE/PBB	BDE 47	PHS	µg/kg	13.26	1.3		No Data	0.00
2916	PBDE/PBB	BDE 99	PHS	µg/kg	71.02	1.3		No Data	0.00
N/A	PCB	Somme 7 PCB réglementaires (PCB #28, #52, #101, #118, #138, #153 et #180)		µg/kg	201.65	1.0		20.96	No Data
1194	Triazines	Flusilazole		µg/kg	25.42	1.0		No Data	0.00
1209	Urées/Sulfonilurées	Linuron		µg/kg	27.93	1.0		0.00	0.00

Tableau S10 Contributions des différentes substances aux ChemHQ_{eau}.

Famille de composés	Substance	Moy_2015	Moy_2016	Moy_2017
Acétamides	Alachlore	0.18%	3.57%	0.17%
Alkylphénols	4-n-Nonylphénol	0.18%	3.57%	0.17%
Anilines	Trifluraline	0.18%	3.57%	0.17%
Autres phénols	Pentachlorophénol	0.18%	3.57%	0.17%
Benzène	Benzène	0.18%	3.57%	0.17%
COHV	Tétrachlorure de carbone	0.18%	3.57%	0.17%
COHV	Dichloroéthane 1,2	0.18%	3.57%	0.17%
COHV	Dichlorométhane	0.18%	3.57%	0.17%
COHV	Tétrachloroéthylène	0.18%	3.57%	0.17%
COHV	Trichloréthylène	0.18%	3.57%	0.17%
COHV	Chloroforme	0.18%	3.57%	0.17%
HAP	Anthracène	0.18%	3.57%	0.17%
HAP	Fluoranthène	0.18%	3.57%	0.17%
HAP	Naphtalène	0.18%	3.57%	0.17%
HAP	Benzo(a)pyrène	0.18%	3.57%	0.17%
HAP	Benzo(b)fluoranthène	95.05%	3.57%	95.40%
Métaux	Plomb	0.18%	3.57%	0.17%
Métaux	Nickel	0.18%	3.57%	0.17%
Organochlorés	DDT total	0.18%	3.57%	0.17%
Organochlorés	DDT 44'	0.18%	3.57%	0.17%
Organochlorés	HCB	0.18%	3.57%	0.17%
Organochlorés	Hexachlorobutadiène	0.18%	N/A	N/A
Organophosphorés	Chlorfenvinphos	0.18%	3.57%	0.17%
Organophosphorés	Chlorpyriphos-éthyl	0.18%	3.57%	0.17%
Phtalates	Di(2-ethylhexyl)phtalate	0.18%	3.57%	0.17%
Triazines	Atrazine	0.18%	3.57%	0.17%
Triazines	Simazine	0.18%	3.57%	0.17%
Urées/Sulfonylurées	Diuron	0.18%	3.57%	0.17%
Urées/Sulfonylurées	Isoproturon	0.18%	3.57%	0.17%

Tableau S11 Contributions des différentes substances aux ChemHQ_{sed}.

Famille de composés	Substance	2015	2016
Acétamides	Alachlore	0.16%	0.09%
Alkylphénols	4-n-Nonylphénol	0.16%	0.09%
Alkylphénols	4-tert-Octylphénol	0.16%	0.09%
Amides	Diflufenicanil	0.16%	0.09%
HAP	Acénaphène	0.16%	0.09%
HAP	Anthracène	0.16%	0.09%
HAP	Benzo(a)anthracène	0.16%	0.09%
HAP	Benzo(a)pyrène	0.16%	0.09%
HAP	Benzo(g,h,i)pérylène	0.16%	30.35%
HAP	Benzo(b,k)fluoranthène	0.16%	0.09%
HAP	Chrysène	0.16%	0.09%
HAP	Dibenzo(a,h)anthracène	0.16%	0.09%
HAP	Fluoranthène	0.16%	0.09%
HAP	Fluorène	0.16%	0.09%
HAP	Indéno(1,2,3-cd) pyrène	0.16%	0.09%

Tableau S11 Suite

Famille de composés	Substance	2015	2016
HAP	Naphtalène	0.16%	0.09%
HAP	Phénanthrène	33.19%	0.09%
HAP	Pyrène	60.80%	42.52%
Métaux	Antimoine	0.16%	0.09%
Métaux	Argent	0.16%	0.09%
Métaux	Arsenic	0.16%	0.09%
Métaux	Cadmium	0.16%	0.09%
Métaux	Chrome	0.16%	0.09%
Métaux	Cobalt	0.16%	0.09%
Métaux	Cuivre	0.16%	0.09%
Métaux	Manganèse	N/A	23.12%
Métaux	Molybdène	0.16%	0.09%
Métaux	Nickel	0.16%	0.09%
Métaux	Plomb	0.16%	0.09%
Métaux	Titane	0.16%	0.09%
Métaux	Vanadium	0.16%	0.09%
Métaux	Zinc	0.16%	0.09%
Organiques divers	Azoxystrobine	N/A	0.09%
Organiques divers	Bentazone	N/A	0.09%
Organochlorés	Somme des DDDs (DDD 24'+44')	0.16%	0.09%
Organochlorés	Somme des DDEs (DDE 24'+44')	0.16%	N/A
Organochlorés	Somme des DDTs (DDT 24'+44')	0.16%	0.09%
Organochlorés	HCB	0.16%	0.09%
Organochlorés	HCH gamma	0.16%	0.09%
Organochlorés	Heptachlore époxydes (cis/trans)	0.16%	0.09%
PBDE/PBB	BDE 100	N/A	0.09%
PBDE/PBB	BDE 153	N/A	0.09%
PBDE/PBB	BDE 154	N/A	0.09%
PBDE/PBB	BDE 209	N/A	0.09%
PBDE/PBB	BDE 47	N/A	0.09%
PBDE/PBB	BDE 99	N/A	0.09%
PCB	Somme 7 PCB réglementaires (PCB #28, #52, #101, #118, #138, #153 et #180)	0.16%	N/A
Triazines	Flusilazole	N/A	0.09%
Urées/Sulfonylurées	Linuron	0.16%	0.09%

4 Intégration globale

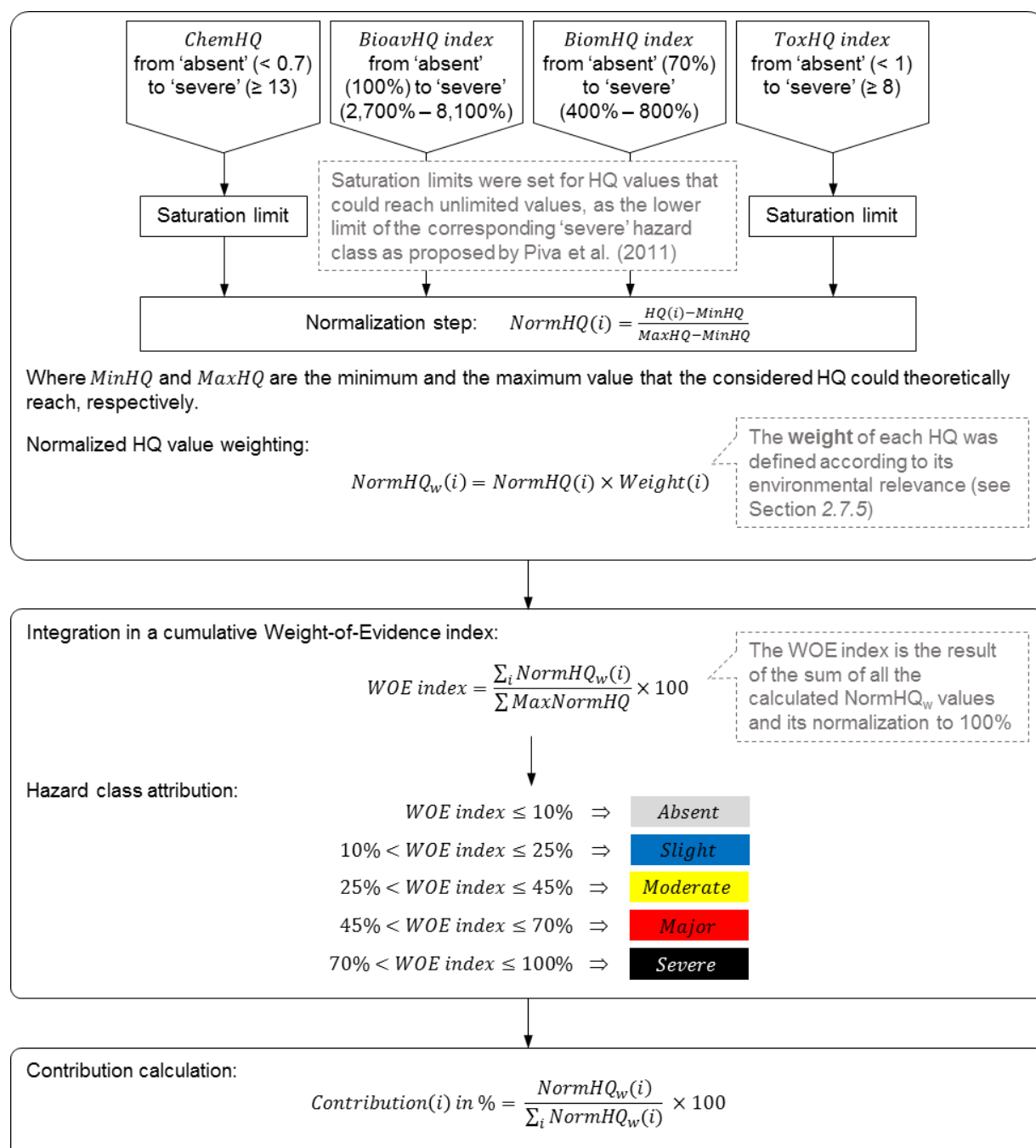


Figure S11 Principe calculatoire de l'intégration WOE d'après Barjhoux et al. (2018).

4.1 Paramètres de l'intégration WOE

L'intégration WOE finale a été effectuée en utilisant les résultats de chaque LOE pour les années 2015, 2016 et 2017, selon la méthodologie décrite dans la *Figure S10*. En effet, l'échelle annuelle est la seule échelle commune à l'ensemble des paramètres intégrés dans l'approche, le calendrier de prélèvement étant propre à chaque type d'analyse. Ainsi, les résultantes des 3 LOE présentées dans les parties précédentes ont été utilisées lors de l'intégration finale :

- ✓ Les valeurs ChemHQ_{sed} observées pour les années 2015 et 2016 (données de l'année 2017 non disponibles)
- ✓ Les valeurs ChemHQ_{eau} obtenues pour les moyennes des concentrations mesurées au cours des années 2015, 2016 et 2017
- ✓ Les valeurs BioavHQ index issues des moyennes annuelles 2015 et 2016, et pour le mois de février 2017 (seule campagne disponible pour cette année-là)
- ✓ Les valeurs BiomHQ index obtenues par l'intégration des moyennes annuelles calculées pour 2015, 2016 et 2017 de chaque biomarqueur. A noter que pour les dommages ADN chez la crevette, les valeurs d'effets « Estuaire » ont été utilisées et les résultats annuels ont été dérivés des moyennes des effets des campagnes du printemps pour l'année 2015, des hiver, printemps et automne pour 2016, et des printemps et automne pour 2017.

Les valeurs d'effets E(i) et les poids des biomarqueurs intégrés dans la LOE Biomarqueurs globales sont rappelées dans le *Tableau S12*.

Tableau S12 Liste des biomarqueurs, poids et valeurs d'effet utilisés lors de l'intégration globale pour la LOE Biomarqueurs.

Famille	Abbr.	Espèce	Sens de l'effet considéré	Weight	Effet E(i)		
					2015	2016	2017
Stress oxydant	TBARS	<i>H. diversicolor</i>	Induc.	0.75	14.75	19.24	0.75
Stress oxydant	GST	<i>H. diversicolor</i>	Induc.	0.50	0.00	0.00	0.00
Stress oxydant	CAT	<i>H. diversicolor</i>	Induc.	0.50	0.69	0.01	0.01
Neurotoxicité	ACHé	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	0.75	0.28	0.32	0.32
Métabolisme énergétique	Lip.	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	1.20	0.10	0.36	1.05
Métabolisme énergétique	Gly.	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	1.20	1.68	2.34	2.52
Effets populationnels	Dens.	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	2.80	1.93	2.48	2.37
Neurotoxicité	ACHé	<i>E. affinis</i>	Inhib.	0.75	3.82	7.87	10.38
Métabolisme énergétique	ARN/ADN	<i>E. affinis</i>	Inhib.	1.20	0.04	0.00	0.00
Reproduction	CSptz	<i>P. longirostris</i>	Induc.	1.70	4.16	7.70	5.81

4.2 Détails de l'intégration globale

4.2.1 LOE Biomarqueurs

A l'échelle annuelle, les activités CAT, GST et AChE mesurées chez le polychète *H. diversicolor* et le rapport ARN/ADN chez le copépode *E. affinis* ne présentent aucune modulation notable par rapport à leur valeur de référence respective. Ces biomarqueurs sont donc associés à un risque « absent » pour toutes les années de suivi (c.f. [Tableau de risques associés aux biomarqueurs présenté dans le rapport](#)). En revanche et de manière entièrement opposée, l'activité AChE mesurée chez le copépode présente une inhibition notable et se voit attribué un risque « sévère » pour les 3 années de prélèvement. Le même niveau de risque maximal est calculé pour les dommages ADN analysés chez les spermatozoïdes de crevette *P. longirostris*, ainsi que pour les TBARS lors des deux premières années. Pour ce dernier biomarqueur, le risque est rétrogradé à « léger » pour l'année 2017. Enfin, les mesures de réserves en glycogène et de densité analysées chez *H. diversicolor* suivent la même tendance avec un risque annuel « modéré » en 2015 qui croît à « majeur » pour les années 2016 et 2017. Les réserves lipidiques ne présentent un risque notable (« modéré ») que pour cette dernière année.

Le [Tableau S13](#) présente les contributions de chaque biomarqueur aux valeurs BiomHQ calculées.

Tableau S13 Contributions des biomarqueurs aux valeurs BiomHQ calculées pour les années 2015, 2016 et 2017.

Class	Espèce	Abbr.	2015	2016	2017
Stress oxydant	<i>H. diversicolor</i>	TBARS	48.4%	33.4%	0.0%
Stress oxydant	<i>H. diversicolor</i>	GST	0.0%	0.0%	0.0%
Stress oxydant	<i>H. diversicolor</i>	CAT	0.0%	0.0%	0.0%
Neurotoxicité	<i>H. diversicolor</i>	AChE	0.0%	0.0%	0.0%
Métabolisme énergétique	<i>H. diversicolor</i>	Lip.	0.0%	0.0%	3.7%
Métabolisme énergétique	<i>H. diversicolor</i>	Gly.	4.1%	6.5%	10.7%
Effets populationnels	<i>H. diversicolor</i>	Dens.	4.1%	16.1%	23.4%
Neurotoxicité	<i>E. affinis</i>	AChE	12.5%	13.7%	27.5%
Métab. Energ.	<i>E. affinis</i>	ARN/ADN	0.0%	0.0%	0.0%
Reproduction	<i>P. longirostris</i>	CSptz	31.0%	30.3%	34.8%

4.2.2 Intégration WOE globale

Le *Dans notre* cas, un poids de 1 a été attribué aux ChemHQ, alors que des poids de 1,2 et 1,5 ont respectivement été assignés aux BioavHQ et BiomHQ indexes. En effet, ces deux derniers quotients sont issus de paramètres acquis sur le compartiment biotique in situ, et sont donc plus représentatifs de l'état de santé des organismes de l'estuaire en comparaison de simples mesures de contamination du compartiment abiotique. Suivant la même philosophie, un poids supérieur a été attribué au quotient de la LOE retraçant les réponses biologiques des organismes (BiomHQ) en comparaison du quotient issu de mesures d'imprégnation (BioavHQ).

Tableau S14 récapitule les valeurs HQ des différentes LOE intégrées dans la phase finale d'intégration ainsi que les poids appliqués et les limites de saturation.

Dans notre cas, un poids de 1 a été attribué aux ChemHQ, alors que des poids de 1,2 et 1,5 ont respectivement été assignés aux BioavHQ et BiomHQ indexes. En effet, ces deux derniers quotients sont issus de paramètres acquis sur le compartiment biotique in situ, et sont donc plus représentatifs de l'état de santé des organismes de l'estuaire en comparaison de simples mesures de contamination du compartiment abiotique. Suivant la même philosophie, un poids supérieur a été attribué au quotient de la LOE retraçant les réponses biologiques des organismes (BiomHQ) en comparaison du quotient issu de mesures d'imprégnation (BioavHQ).

Tableau S14 Paramètres du modèle d'intégration finale WOE.

	2015	2016	2017	Limite de saturation	Valeur minimale	Weight
ChemHQwater	1.61	0.09	1.39	13	0	1
ChemHQsed	4.02	4.35	N/A	13	0	1
BioavHQ_Index	1132%	720%	1089%	8100%	100%	1.2
BiomHQ_Index	315%	355%	298%	800%	70%	1.5

Les indices globaux WOE calculés pour les trois années de suivi de l'estuaire présentent des valeurs très proches, comprises entre 24% et 27%. Ces valeurs sont très resserrées autour de la borne inférieure de la classe de risque « modéré » (*Figure S11*). Ainsi, les années 2015 et 2016 sont associées à une classe de risque « modéré » alors que l'année 2017 est rétrogradée à un risque « léger ». Malgré des contributions majoritaires de la LOE Biomarqueurs (de 46% à 65% ; *Figure S12*) établissant un niveau de risque « majeur » à l'ensemble des années étudiées, les classes de risque globales ne reflètent pas le même

niveau d'impact. Ceci est dû à aux valeurs ChemHQ très basses observées pour la colonne d'eau.

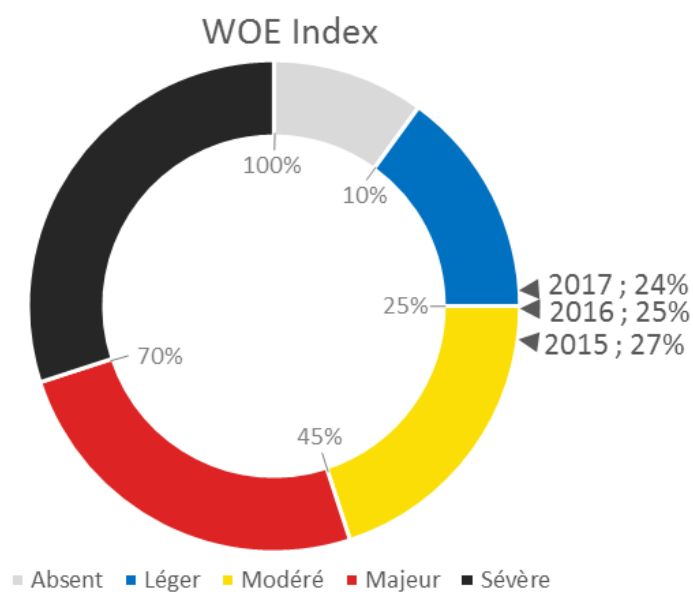


Figure S11 Indices globaux WOE et classes de risque associées pour les trois années de suivi de l'estuaire.

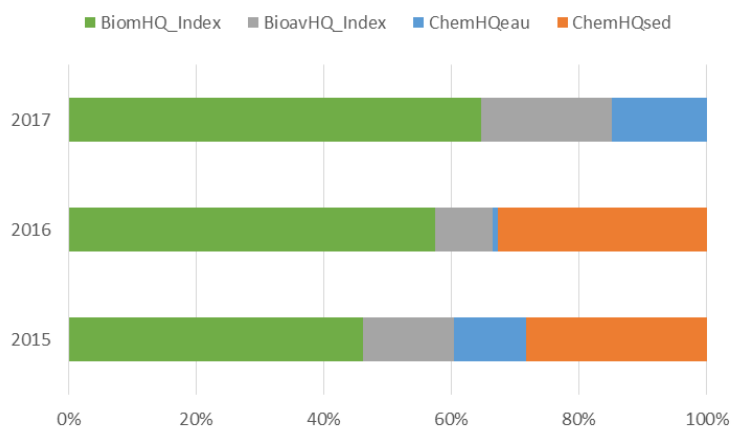


Figure S12 Contributions des différentes LOE aux valeurs d'indice global WOE calculées pour les 3 années de suivi de l'estuaire.

Bibliographie

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. doi:10.1007/s11356-016-6993-6
- 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. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.02.006
- 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. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.01.050
- Benedetti, M., Ciaprini, 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. doi:10.1016/j.envint.2011.08.003
- Bocquené, G., Galgani, F., 1998. Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Tech. Mar. Environ. Sci.* 22, 19.
- 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. doi:10.1016/j.envint.2006.09.001
- 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.
- 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. doi:10.1897/IEAM_2007-067.1
- 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.
- 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. doi:10.1039/ap9842100196
- 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 et.
- Piva, F., Ciaprini, 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. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.064

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), 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.

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 :

