



BIOMONITORING ACTIF
(ENGAGEMENT DE FLETS ET DE CREVETTES)
POUR LE SUIVI DE L'IMPACT DE L'INCENDIE
DU 26 SEPTEMBRE 2019 DES INSTALLATIONS
« LUBRIZOL / NL-LOGISTIQUE »

Octobre 2020

Coordination : Rachid AMARA

**Co-Auteurs : Jean LAROCHE; Jérôme COUTEAU; Benoit XUEREB;
Vianney PICHEREAU; Mamadou DIOP**

TABLE DES MATIERES

SCIENTIFIQUES AYANT PARTICIPE AU PROJET	3
INTRODUCTION	4
PARTIE I : ÉVALUATION DE L'IMPACT A COURT TERME DE L'INCENDIE DU 26 SEPTEMBRE 2019 SUR LE FLET	5
1 Encagement des juvéniles de flet (15 jours et 1 mois) à Petit-Couronne et en Canche en novembre 2019	5
2 Réponses des flets engagés en automne 2019 à leur environnement : comparaison entre les flets engagés à Petit-Couronne et dans la Canche	8
2.1 Taux de survie, croissance en poids et indices de fitness des flets	8
2.2 Biomarqueurs de dommages	9
2.3 Réponses du protéome hépatique des flets européens	11
3 Comparaison des réponses biologiques des flets engagés à Petit-Couronne en automne 2017, 2018 et en 2019	13
3.1 Taux de survie, croissance en poids et indices de condition des flets.	13
3.2 Biomarqueurs de dommages	15
3.3 Comparaisons des réponses protéomiques haut-débit « shotgun » entre l'automne 2017 et l'automne 2019	16
4 Conclusion	17
PARTIE II : ÉVALUATION DE L'IMPACT DE L'INCENDIE DU 26 SEPTEMBRE 2019 SUR DES CREVETTES	18
5 Matériels et méthodes	18
5.1 Matériel biologique	18
5.2 Calcul de l'indice de condition	19
5.3 Mesure de l'intégrité de l'ADN spermatique	19
5.4 Dosage des réserves énergétique	21
5.5 Mesure de l'activité phagocytaire	22
6 Résultats et discussion	23
6.1 Évaluation de l'évolution des dommages à l'ADN spermatique de crevettes autochtones au niveau du site de Tancarville	23
6.2 État de santé des crevettes engagées sur les stations de Tancarville et Petit Couronne.	24
6.3 Conclusion	28
CONCLUSION	29
LISTE DES ILLUSTRATIONS	30
BIBLIOGRAPHIE	32

SCIENTIFIQUES AYANT PARTICIPE AU PROJET

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

Coordination scientifique : Rachid AMARA

Equipe : Mamadou DIOP, Khalef RABHI, Eric TAVERNIER; Michel LAREAL, Jérémy. DENIS

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

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

- **Equipe 3** : SEBIO, Le Havre

Equipe : Benoît XUEREB, Aurélie DUFLOT, Gauthier TREMOLET, Frank LE FOLLI, Romain COULAUD

- **Equipe 4** : TOXEM, Montivilliers

Equipe : Géraldine MAILLET, Jérôme COUTEAU

INTRODUCTION

Contexte

Le 26 septembre 2019, un incendie a touché les installations d'enfûtage et d'entreposage de l'usine de produits chimiques de la société Lubrizol, ainsi qu'un entrepôt voisin de la société NL-Logistique. Cet événement a engendré le déversement d'une partie des eaux d'extinction et des polluants associés dans la Seine, au niveau du bassin aux bois à Rouen, via les exutoires des réseaux d'eau pluviale (volume estimé à 2000 m³). Une présence d'hydrocarbures lourds a été associée à ce rejet et une mortalité piscicole a été observée dans le bassin aux bois suite à l'incendie. Plus de 150 m³ de polluants purs, c'est-à-dire séparés de l'eau, ont été retirés, le pompage ayant duré jusqu'au 6 octobre 2019 (SDIS-76, 2019 ; Bouillon & Adam, 2020). Suite à cet accident, de nombreuses questions se posent concernant les conséquences que cela a pu engendrer à proximité du bassin aux bois et à l'échelle de l'estuaire de la Seine (qualité des eaux, impacts sur la faune aquatique et le fonctionnement de l'écosystème).

Les réponses biologiques, directement mesurées sur des organismes prélevés ou transplantés dans le milieu naturel, rendent compte des effets toxiques de la contamination, en intégrant les variations de biodisponibilité et les effets mélanges, dans un contexte on ne peut plus réaliste. Dans le cadre des projets Seine Aval 5 et 6, des méthodes d'encagement d'organismes aquatiques (poissons, crustacés) ont été développés afin de mettre en place un biomonitoring actif (Xuereb et Bustamante, 2019 ; Amara et Laroche, 2020). Cette approche présente un avantage certain en connaissant avec précision la localisation et la durée d'exposition des espèces tout en conservant les caractéristiques environnementales du site étudié (Oikari et al., 2006). Elle permet d'utiliser des organismes contrôlés et calibrés, provenant d'une même population, et ainsi limiter l'impact de nombreux facteurs biologiques, dits de confusion.

La présente étude vise à évaluer à partir d'une approche multi-biomarqueurs l'impact à moyen terme des polluants rejetés dans la Seine suite à l'incendie de Lubrizol/NL-Logistique sur une espèce de poisson, le flet (*Platichthys flesus*) et une espèce de crevette, la crevette blanche (*Palaemon longirostris*). L'encagement des organismes s'est déroulé le 13 novembre 2019, au niveau du trou du chapon à Petit-Couronne, site situé à une dizaine de kilomètres en aval du bassin aux bois. Les durées d'encagement étaient de 15 jours pour les crevettes et de 15 et 30 jours pour les flets. Un panel de biomarqueurs a été mesuré sur les organismes exposés. Ce panel de biomarqueurs intègre des mesures de fitness, de génotoxicité et de neurotoxicité. Pour les flets, des mesures de protéomique haut-débit de type « shot-gun » ont également été menées sur le foie des poissons. L'interprétation des résultats issus de ces campagnes de biomonitoring actif sur les juvéniles de flets bénéficie des résultats acquis lors de campagnes similaires menées à l'automne 2017 et 2018 dans le cadre du projet scientifique Seine-Aval 6 HQ-Fish. De plus, des comparaisons pourront être réalisées avec les résultats de l'encagement de flets réalisé au niveau d'un site peu anthropisé, l'estuaire de la Canche. Pour les crevettes, des mesures de l'ADN spermatique ont également été menées sur des organismes prélevés en Seine à Tancarville en septembre, octobre et novembre 2019. L'interprétation des résultats issus de ces campagnes de biomonitoring sur les crevettes bénéficie des résultats acquis lors des campagnes menées en estuaire de Seine et sur le littoral normand, notamment dans le cadre du projet scientifique Seine-Aval 5 ECOTONES.

PARTIE I : ÉVALUATION DE L'IMPACT A COURT TERME DE L'INCENDIE DU 26 SEPTEMBRE 2019 SUR LE FLET

1 Encagement des juvéniles de flet (15 jours et 1 mois) à Petit-Couronne et en Canche en novembre 2019

Le 9 novembre 2019, environ 300 flets (taille moyenne = $9,25 \pm 0,70$ cm; poids moyen = $8,04 \pm 1,89$ g) ont été capturés au petit chalut à perche dans l'estuaire de la Canche et maintenus vivants au Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences à Wimereux. Les flets ont été acclimatés pendant cinq jours dans un aquarium de 500 L et nourris avec des proies vivantes (Krylls). Durant l'acclimatation, la photopériode était réglée à 10h de lumière et de 14h d'obscurité. La température de la salle était maintenue à 11°C, l'oxygène dissous était de 95 mg/L et la salinité baissée graduellement jusqu'à 5 NTU à la veille de l'expérience. Les flets ont été encagés au niveau de deux sites (Figure 1): 1) dans la Seine au niveau du trou du chapon à Petit-Couronne, site situé à une dizaine de kilomètres en aval du bassin aux bois ; 2) dans la Canche, site considéré comme site témoin qui nous permettra de mieux interpréter et comparer les réponses des biomarqueurs mesurées sur les flets à Petit-Couronne.

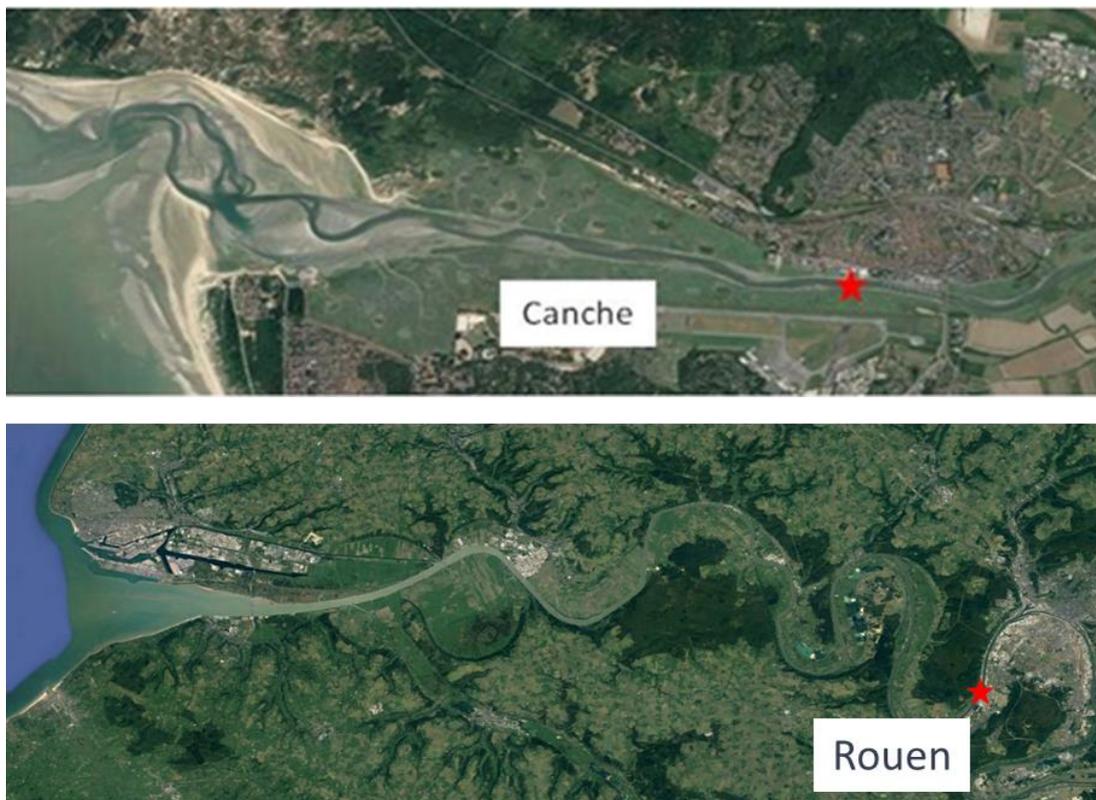


Figure 1 : Localisation des sites d'implantation des cages en Seine (à Petit-Couronne) et en Canche. Il faut noter que les flets transplantés dans les deux sites ont été pêchés dans la Canche puis acclimatés au laboratoire avant d'être encagés.

La mise en cage des flets s'est déroulée du 13 novembre 2019 à Petit-Couronne (soit 50 jours après l'incendie) et le 15 novembre 2019 dans l'estuaire de la Canche. Un total de 6 cages (dimension : L= 1m ; l = 0,6 m; H= 0,6 m; volume = 0,36 m³ ; maillage = 1cm) dont 4 cages à Rouen et 2 cages à la Canche ont été déployées. Des dispositifs d'enrichissement (zone-refuge, abris contre les courants, collecteur d'invertébrés,...) ont été développés pour améliorer le bien-être et réduire le stress du poisson lié à l'encagement (Figure 2). Afin de faciliter l'accès à la nourriture aux poissons, un récif constitué de coquilles d'huîtres a été fixé à l'intérieur de chaque cage.



Figure 2 :Cage développée dans le projet HQFISH et utilisée dans cette étude pour l'encagement des juvéniles de flets avec différentes améliorations et enrichissement pour favoriser le bien-être des poissons.

Dans chaque cage, 15 juvéniles de flet ont été placés. 24 h avant la mise en cage, les poissons ont été mesurés et pesés afin de suivre leurs croissances en poids et en taille. Après 15 jours d'encagement, 2 cages à Petit-Couronne et 1 cage en Canche ont été relevées respectivement le 28 et le 29 novembre 2019. Les autres cages ont été relevées un mois après, soit le 12 et le 13 décembre 2019 respectivement à Petit-Couronne et en Canche. Après le relèvement des cages, les poissons ont été maintenus vivants jusqu'au laboratoire où ils vont être pesés, mesurés puis disséqués. Rapidement après le sacrifice de l'animal, le cerveau, le foie et des échantillons de muscles et de sang ont été prélevés puis placés à -80°C jusqu'à analyse des biomarqueurs. Des échantillons de muscles, de branchies et de carcasses ont été aussi prélevés et conservés à -20°C pour de futurs dosages de contaminants chimiques.

Une approche multi-marqueurs a été développée pour évaluer la réponse individuelle des juvéniles de flets mis en cage à leur environnement. La réponse des flets a été évaluée à la fois avec des indices intégrateurs liés à la fitness (rapport ARN/ADN, indice de condition, état des réserves lipidiques et protéiques et croissance somatique), des biomarqueurs de dommages (test des comètes), aux métabolismes de détoxification et énergétique (EROD) et avec des réponses du système nerveux (AchE) (Tableau.1). Des mesures protéomiques haut-débit de type « shot-gun » ont également été menées sur le foie. Les résultats obtenus dans cette étude ont été comparés avec ceux acquis durant les campagnes de biomonitoring actif, dans le cadre du projet scientifique Seine-Aval 6 HQ-Fish, mené à l'automne 2017 et 2018 dans le même site de Petit-Couronne.

Le tableau I synthétise les différents paramètres étudiés sur les flets engagés à Petit-Couronne en 2017, 2018 et 2019 et en Canche en 2019.

Tableau I : Les biomarqueurs mesurés lors des campagnes d'encagement à Petit-Couronne en automnes 2017, 2018 et 2019 et en automne 2019 à la Canche.

Années	2017	2018	2019	
Sites	Petit-Couronne	Petit-Couronne	Petit-Couronne	Canche
Taux de survie	✓	✓	✓	✓
Croissance en poids	✓	✓	✓	✓
Indice de condition K	✓	✓	✓	✓
Teneurs en protéines	✓	✓	✓	✓
ARN/ADN	✓	✓	✓	✓
TAG/ST	✓	✓	✓	✓
%DNA Tail	✓	✓	✓	✓
OTM	✓	✓	✓	✓
MN	✓	✓	✓	✓
EROD	X	✓	✓	✓
AChE	X	✓	✓	✓
Protéomique haut débit (Shot gun)	✓	X	✓	✓

Les protéines, les ARN et les ADN ont été mesurés dans les muscles de la face ventrale antérieure des flets suivant la procédure décrite par Clemmsen (1989) légèrement modifiée. Les lipides totaux ont été extraits dans les muscles de la face dorsale des flets selon la méthode de Folch. Les classes de lipides ont été séparées et quantifiées à partir des lipides totaux par chromatographie sur couche mince en utilisant le latroscan (MK-6s instrument Analyser latron Laboratories, Tokyo, Japan) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Les classes de lipides ont été identifiées suivant leur temps de rétention et l'aire des pics a été calculée en utilisant un logiciel (ChromStar CHS-1). Les taux de dommages à l'ADN ont été mesurés dans les érythrocytes sanguins par électrophorèse sur microgel.

L'activité de la 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) des cytochromes P450-1A est mesurée dans le foie des flets par l'utilisation d'un substrat artificiel (7-éthoxyrésorufine). La mesure de l'activité EROD a été réalisée selon les recommandations de la norme expérimentale XP ISO/TS 23893-2 et la mesure de l'activité de l'AChE a été réalisée sur le cerveau selon le protocole de référence publié par Bocquené & Galgani en 1998.

2 Réponses des flets engagés en automne 2019 à leur environnement : comparaison entre les flets engagés à Petit-Couronne et dans la Canche

2.1 Taux de survie, croissance en poids et indices de fitness des flets

Le taux de survie était de 100 % et de 93,33 % après 15 jours d'encagement à Petit-Couronne et en Canche et de 96,67 % et 100 % après 30 jours d'encagement.

Les résultats sur la croissance pondérale montrent qu'à Petit-Couronne, après 15 et 30 jours d'encagement, tous les poissons ont gagné du poids. La croissance pondérale par jour était de 0,07g/jour et 0,072g/jours pour les poissons mis en cage à Petit-Couronne durant 15 et 30 jours respectivement montrant ainsi une croissance graduelle et continue pour ces poissons contrairement à ceux de la Canche qui ont perdu du poids durant l'encagement. La perte de poids des poissons de la Canche est plus importante dans les poissons engagés durant 15 jours comparés à ceux engagés durant un mois. L'analyse des contenus stomacaux des poissons de ces deux estuaires confirme ces résultats. Les taux de vacuité moyens étaient de 3% à Petit-Couronne et de 7% en Canche à T15 et de 0 % à Petit-Couronne et de 13% en Canche après 30 jours d'encagement. Le nombre moyen d'individus par estomac était de 5 et 2 individus par estomac à T15 et de 6 et 9 individus par estomac à T30 respectivement pour les sites de Petit-Couronne et de la Canche.

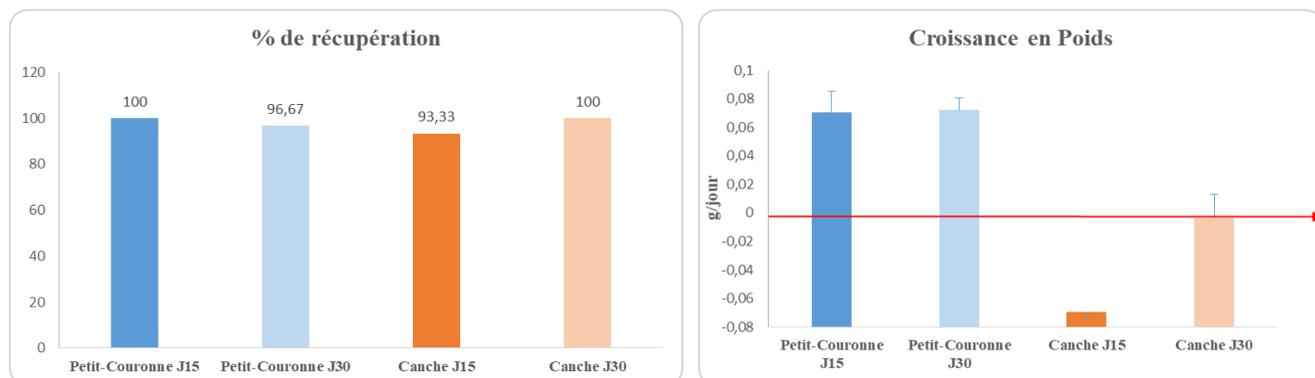


Figure 3 : Taux de survie (%) et croissance en poids (g/jour) des flets engagés à Petit-Couronne et en Canche durant 15 jours et un mois en automne 2019.

L'indice de condition de Fulton et le rapport TAG/Chol augmentent avec la durée d'encagement à Petit-Couronne et en Canche (J30 > J15). Une augmentation significative ($p < 0,05$) est observée entre les valeurs de ces indices mesurées dans les poissons de Petit-Couronne par rapport aux poissons témoins. Le rapport ARN/ADN et la concentration en protéines totales musculaires sont plus importants à Petit-Couronne comparés avec la Canche. Pour la même durée d'encagement, les flets de Petit-Couronne présentent les indices de conditions (indice K, TAG/Chol et concentrations en protéines totales) significativement plus élevés que ceux de la Canche (Figure 4).

Les indices de fitness des individus (taux de survie, indice de condition, croissance, concentration en protéines, rapports TAG/Chol et ARN/ADN) témoignent des conditions d'encagement des organismes. La comparaison des valeurs de ces indices mesurées dans les poissons mis en cage par rapport aux témoins ne montre pas d'impacts négatifs de

l'encagement sur la fitness des flets dans les deux estuaires. Néanmoins, les poissons de Petit-Couronne présentent les meilleures performances physiologiques par rapport aux flets de la Canche. Autrement dit, il n'apparaît pas d'impact de l'incendie du 26 septembre 2019 sur la survie, la croissance et le développement des flets mis en cages dans le site de Petit-Couronne, 50 jours après l'accident.

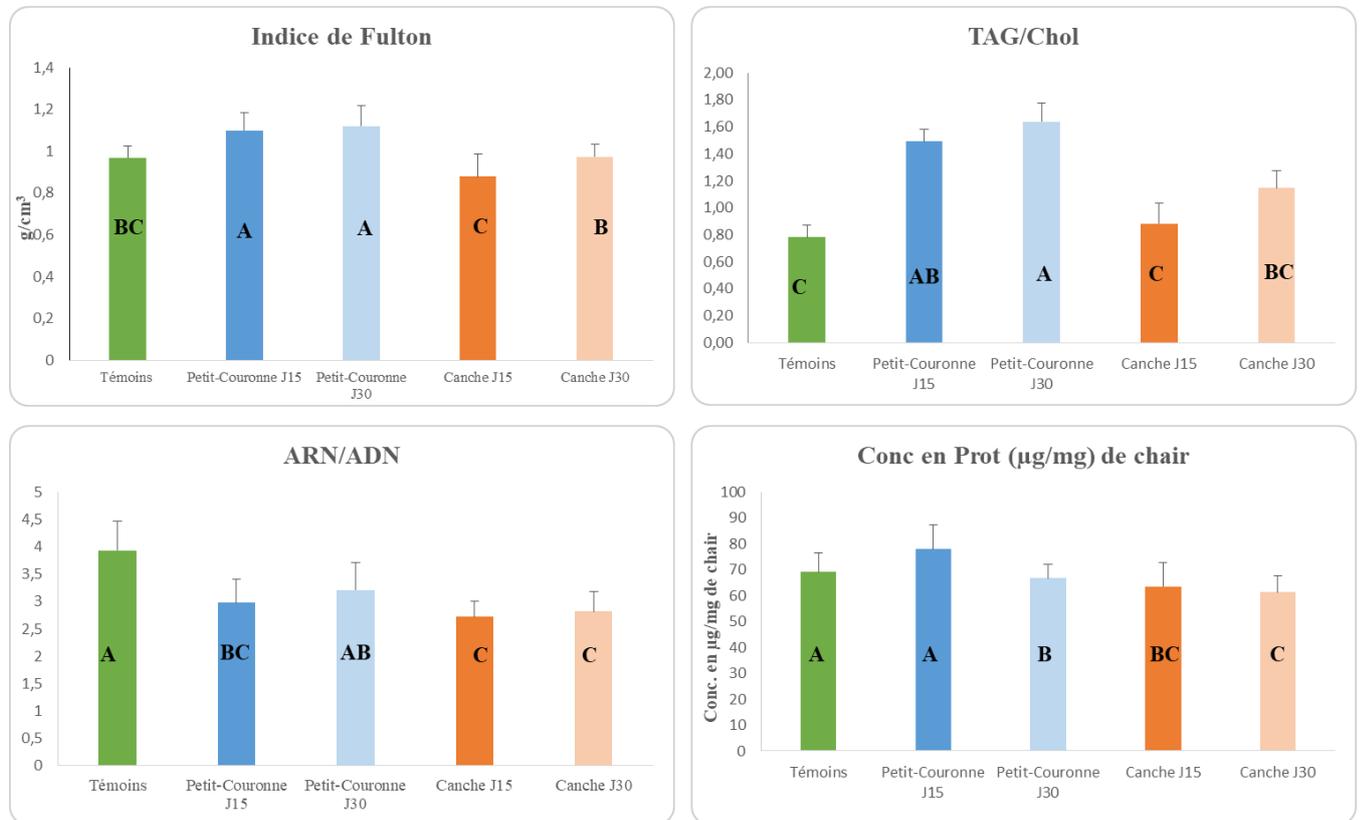


Figure 4 : Indice de condition K de Fulton ; indice lipidique (rapport TAG/Chol) ; rapport ARN/ADN ; et concentrations en protéines des juvéniles de flets encagés durant 15 jours et un mois au niveau des sites de Petit-Couronne et de la Canche en automne 2019. Les valeurs du témoin correspondent aux flets de la Canche stabulés avant mise en cage.

Ces résultats montrent un taux de survie équivalent dans les deux estuaires mais une meilleure fitness (indice de condition et de croissance) des flets dans la Seine (site de Petit-Couronne) en novembre 2019.

2.2 Biomarqueurs de dommages

Les contaminants chimiques présents dans l'environnement peuvent soumettre aux organismes à un stress pouvant porter atteinte à la fitness des individus ou bien cibler des fonctions spécifiques, comme la reproduction, le système immunitaire ou le système nerveux. Pour évaluer ce stress, différents biomarqueurs ont été mesurés. Il s'agit de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) mesurée dans le cerveau (neurotoxicité), du test des Comètes

mesuré dans le sang (génotoxicité) et l'activité EROD mesurée dans le foie des flets (métabolisation des xénobiotiques).

L'activité de l'EROD est connue pour être induite par plusieurs xénobiotiques comme les HAPs et les PCBs (Castro et al. 2004 ; Devillier et al. 2005 ; Fragoso et al. 2006 ; Gagnon et Rawson 2017). Chez les poissons mis en cages, l'activité de cette enzyme tend à augmenter avec la durée d'encagement dans tous les sites. L'induction élevée de l'EROD après 30 jours d'encagement à Petit-Couronne et dans la Canche témoigne d'une activité de détoxification élevée qui pourrait être induite par une exposition des poissons aux HAPs et aux PCBs.

Le test des Comètes basé sur la mesure des cassures de l'ADN « simple ou double brin » est un outil sensible et permet de fournir une réponse précoce suite à l'exposition des organismes aquatiques à des agents génotoxiques. Les résultats du taux de cassures de l'ADN (% DNA tail) sanguin ne montrent pas de différences significatives ($p < 0,05$) entre les témoins et les flets mis en cages dans les deux estuaires (Figure 3). **Pour la même durée d'exposition, les taux de dommages de l'ADN sanguin mesurés chez les flets de Petit-Couronne sont inférieurs à ceux mesurés chez les flets du site de la Canche.** Les flets de Petit-Couronne semblent ne pas être exposés à des produits génotoxiques ou bien la durée d'exposition n'est pas suffisamment longue pour permettre l'apparition d'effet au niveau de l'ADN sanguin de ces flets.

Contrairement à l'activité de l'EROD, l'activité de l'achétylcholinestérase est fortement inhibée dans les flets de Petit-Couronne comparés aux flets de la Canche et aux témoins. L'inhibition de l'activité de l'AChE est apparue dès les 15 premiers jours d'encagement à Petit-Couronne. L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme clé dans la transmission de l'influx nerveux, qui peut dégrader l'acétylcholine dans l'espace synaptique et mettre fin à l'effet excitateur du neurotransmetteur sur la membrane postsynaptique, assurant ainsi la transmission normale des signaux nerveux dans l'organisme (Soreq et Seidman, 2001). L'inhibition de l'activité de l'AChE peut provoquer une hyperactivité, une perte de coordination, des convulsions, une paralysie et d'autres types de changements de comportement (Kuhr et Dorough, 1976). Plusieurs contaminants organiques (pesticides pyréthrénoïdes) et métalliques (cadmium, le zinc etc) sont connus pour inhiber l'action de l'AChE. Une inhibition de 47% de l'activité de l'AChE suite à une accumulation de cadmium a été observée dans les branchies des moules (Kopecka-Pilarczyk, 2010). De même, Balint et al. (1995) ont montré une inhibition de 20% de l'AChE mesurée dans le cerveau des carpes après trois jours d'exposition au deltaméthrine.

La forte inhibition de l'activité de l'AChE mesurée chez les flets après 15 et 30 jours d'encagement à Petit-Couronne et non dans la Canche témoigne d'une exposition probable de ces organismes à des agents neurotoxiques.

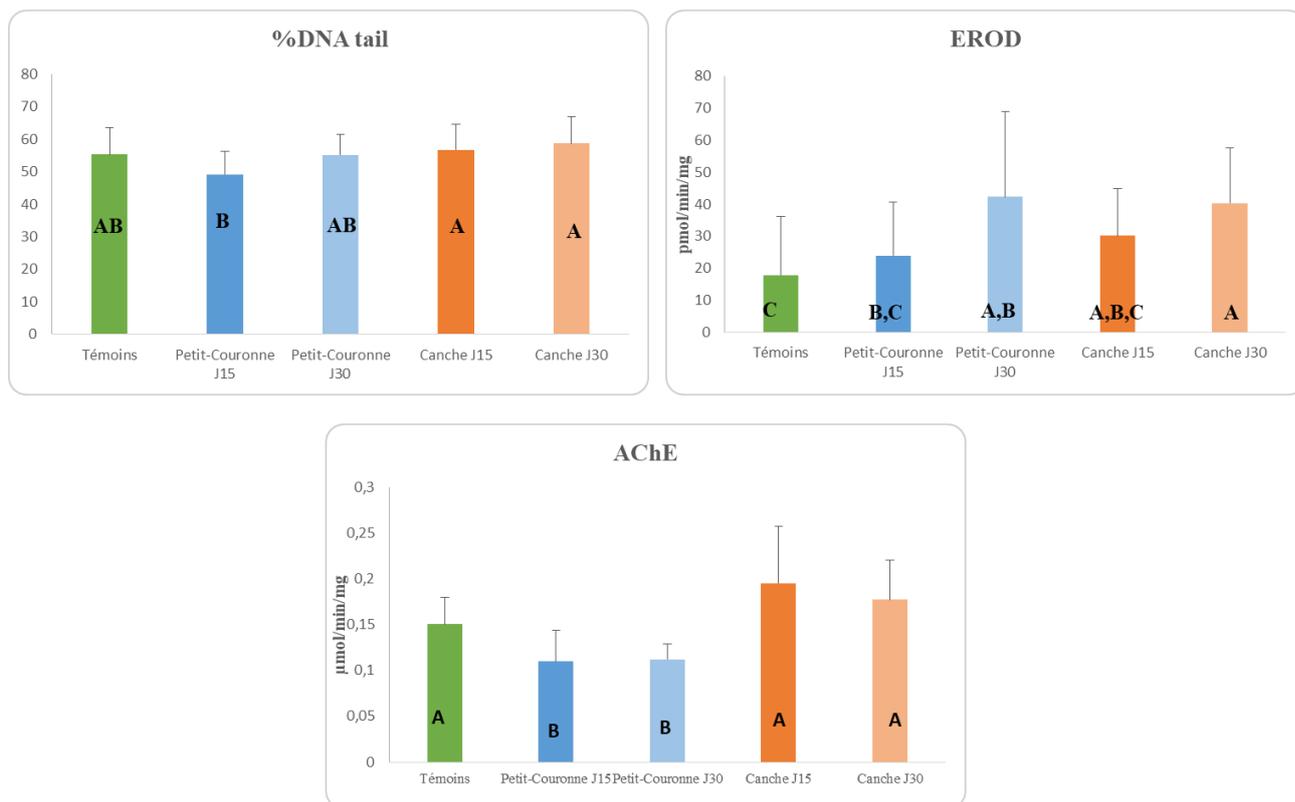


Figure 5 : Taux de dommages à l'ADN sanguin ; activité de l'EROD et activité de l'AChE mesurés chez les juvéniles de flets engagés durant 15 jours et un mois au niveau des sites de Petit-Couronne et de la Canche. Les valeurs du témoin correspondent aux flets de la Canche stabulés avant mise en cage.

Les mesures du taux de dommages à l'ADN et de l'activité enzymatique EROD ne montrent pas de différences significatives avec les poissons engagés en Canche. L'activité AChE mesurée sur le cerveau de flet du site de Petit-Couronne montre une légère inhibition en 2019. Elle pourrait être associée à une exposition à des agents neurotoxiques, mais l'activité mesurée reste dans la gamme de variations des mesures antérieures, que ce soit sur des flets engagés ou prélevés *in natura* à l'embouchure de la Seine (Amara et Laroche, 2020 ; Couteau, 2020).

2.3 Réponses du protéome hépatique des flets européens

Les approches de protéomique globale permettent d'enregistrer une image quasi exhaustive du contenu protéique d'un organe à un moment donné, révélant les grandes (ré)-orientations métaboliques consécutives à une situation environnementale donnée. Dans le domaine de l'écotoxicologie, l'analyse du protéome hépatique de poissons donne accès à l'expression de milliers de protéines, donnant des informations essentielles sur l'état physiologique des poissons, mais également sur leur exposition éventuelle à des substances toxiques.

Nous avons donc analysé les protéomes hépatiques des poissons encagés pendant 15 et 30 jours, dans les deux sites évoqués plus haut, à raison de 5 échantillons par condition. Au total, nous avons pu identifier environ 1850 protéines, résultantes de l'acquisition de pas moins de 500 000 spectres de masses. La quantification a été réalisée en utilisant le logiciel PatternLab.

La comparaison des contenus protéiques des foies des poissons encagés à Petit-Couronne a été comparée à celle des poissons encagés dans l'estuaire de la Canche. Après 30 jours d'encagement, nos expériences ont révélé l'accumulation de 75 protéines, et la diminution de 38 protéines.

En examinant les fonctions cellulaires de ces protéines, nous voyons dans les poissons encagés à Petit-Couronne, une accumulation des protéines impliquées dans la synthèse du cholestérol. Nous retrouvons en effet quasiment toutes les enzymes impliquées dans cette voie de biosynthèse, ainsi que quelques protéines participant à sa régulation. Avec une vingtaine de protéines (plus du quart des protéines accumulées), c'est ici l'élément le plus spectaculaire que nous observons.

Nos résultats suggèrent également d'autres réorientations du métabolisme cellulaire, en particulier une augmentation de la biosynthèse de certains acides aminés (proline, thréonine, acides aminés branchés), et une diversion du métabolisme glucidique vers des voies génératrices de NADPH (notamment voie des pentoses phosphates).

Concernant les protéines connues pour être associées à l'exposition aux xénobiotiques, nous observons ici l'accumulation d'un cytochrome P450 (2G1) après 30 jours de caging. Dans les foies de poissons encagés pendant 15 jours, nous trouvons en plus le cytochrome P450 1A1, mais également son partenaire protéique dans les Mixed-Function Oxidases (ces enzymes de détoxification de phase 1 recherchées par l'activité EROD), ie. la NADPH-Cyt. P450 réductase. Dans cette condition, nous observons également l'accumulation d'une glucuronosyl transférase (enzyme de détoxification de phase 2). Enfin, nous observons également ici l'accumulation de la Bétaïne-Homocystéine Méthyl Transférase (BHMT), enzyme que nous voyons régulièrement surexprimée dans des poissons exposés à des xénobiotiques.

Au-delà de ce niveau de contamination globale, que l'on révèle avec les biomarqueurs classiques, nos résultats suggèrent que les poissons aient pu être soumis à une contamination particulière, par une molécule ayant un impact sur le métabolisme des stérols.

Il faut rappeler que le cholestérol joue un rôle essentiel dans de très nombreux organismes, de par son rôle dans les membranes biologiques, mais également en tant que précurseur de molécules extrêmement importantes telles que les hormones stéroïdes (eg. cortisol, hormones sexuelles) ou les sels biliaires. Néanmoins, il est assez délicat en l'état de conclure quant à la cause et à l'impact physiologique d'une telle perturbation métabolique. En effet, nous voyons ici une accumulation très nette de l'ensemble des protéines impliquées dans la voie de biosynthèse du cholestérol, mais n'avons pas d'information sur les teneurs réelles en cholestérol dans l'organisme.

Il semblerait assez logique de penser que l'accumulation des enzymes ait pour effet de stimuler la voie, et donc entraîner une accumulation du cholestérol lui-même. Néanmoins, en considérant la régulation complexe de cette voie métabolique, nous pouvons également penser que cette réponse est au contraire la conséquence d'une déplétion majeure en cholestérol dans l'organisme, déplétion qui pourrait avoir été provoquée par un stimulus externe ; l'exposition à des molécules de type 'statines', par exemple, des molécules utilisées comme médicaments hypocholestérolémiants, ou d'autres analogues structuraux de l'HydroxyméthylGlutaryl-CoA (HMG-CoA, intermédiaire de la synthèse du cholestérol), pourraient tout à fait provoquer ce type de réponse. Alternativement, cette dérégulation du



métabolisme du cholestérol pourrait provenir de la bioaccumulation de composés polyfluoroalkylés (PFAS), composés utilisés dans les mousses anti-feu, et qui sont connus pour entraîner des symptômes d'hypercholestérolémie dans les populations exposées. À la lueur de nos résultats, il pourrait donc être intéressant, dans ce contexte, de rechercher la présence de ce type de molécules.

Les poissons encagés à Petit-Couronne montrent une accumulation des protéines impliquées dans la synthèse et la régulation du cholestérol. Ces résultats suggèrent que les poissons de Petit-Couronne aient pu être exposés à une molécule impactant le métabolisme des stérols. Néanmoins, il est assez délicat en l'état de conclure quant à la cause et à l'impact physiologique d'une telle perturbation métabolique.

3 Comparaison des réponses biologiques des flets encagés à Petit-Couronne en automne 2017, 2018 et en 2019

Le suivi des flets mis en cages à Petit-Couronne au cours de trois années successives (automne 2017, 2018 et 2019) nous permet de comparer la variation temporelle des réponses des juvéniles de flets et ainsi de quantifier l'impact de l'incendie du 26 septembre 2019 sur la qualité des eaux de l'estuaire de la Seine. La comparaison est basée sur une batterie de biomarqueurs en réponse avec la croissance et la survie des flets mais aussi à des biomarqueurs d'exposition et de dommages liés à l'exposition des poissons aux xénobiotiques. Une approche protéomique de type « shot gun » a été également développée en 2017 et en 2019 pour compléter la réponse de ces biomarqueurs. Les résultats présentés dans cette partie correspondent à ceux mesurés chez les flets encagés durant 30 jours.

3.1 Taux de survie, croissance en poids et indices de condition des flets.

Le taux de survie moyen est satisfaisant sur les trois années d'études. Le meilleur taux de survie est enregistré en 2019 avec un taux de 96,7% (Figure 6) et le taux le plus faible est mesuré sur les flets de 2017 avec 88,7% de poissons ayant survécu.

Pour la croissance pondérale, les flets de 2017 ont tous perdu du poids. La perte de poids moyenne était de 0,02g/jour pour ces flets contrairement aux flets de 2018 et de 2019 qui ont tous gagné du poids après 30 jours d'encagement. Il faut noter qu'en 2018 et 2019, un dispositif constitué de coquilles d'huitres qui permet le développement des proies pour les poissons a été ajouté contrairement à 2017.

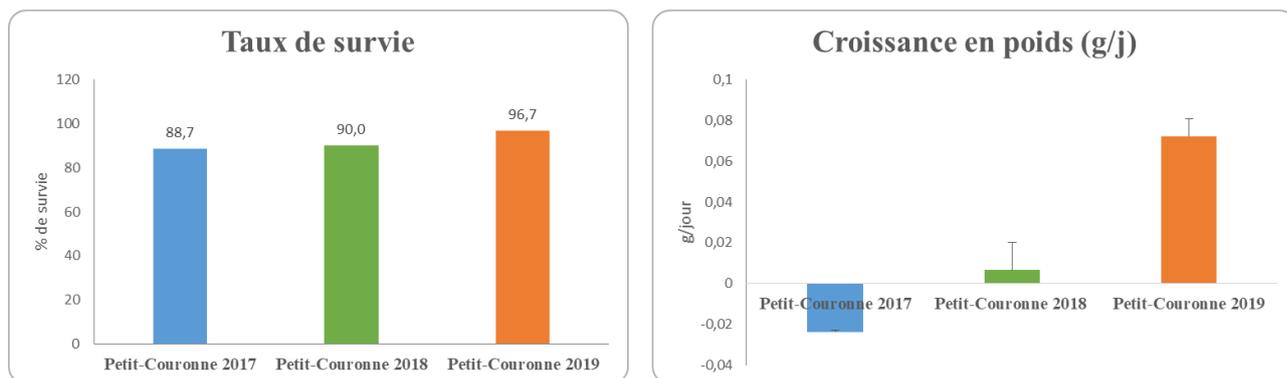


Figure 6 : Taux de survie (%) et croissance en poids (g/jours) des flets engagés à Petit-Couronne durant un mois en automnes 2017, 2018 et 2019.

Le suivi de l'indice de condition de Fulton, du rapport TAG/Chol et des protéines totales des flets au cours des trois années successives montre que les flets engagés en 2018 et 2019 présentent les meilleures performances physiologiques que les flets engagés en 2017. Pour ces biomarqueurs de fitness, une différence significative (Kruskall Wallis, $p < 0,05$) est observée entre les flets de 2018 et de 2017 d'une part et entre les flets de 2019 et de 2017 d'autre part. Par contre, aucune différence n'est observée entre les flets de 2018 et de 2019. Par comparaison avec les témoins, les valeurs les plus élevées de l'indice K de Fulton et du rapport TAG/Chol sont mesurées chez les flets de 2019. L'indice de Fulton est couramment utilisé comme indicateur du bien-être général d'un individu, ce qui représente un indicateur à plus long terme (Vasconcelos et al. 2009) comparé au rapport TAG/Chol qui répond à une échelle plus courte (Ferron, 2000). Ce qui signifie qu'il n'y a pas eu d'impacts à court ou à moyen terme de l'incendie du 26 septembre 2019 des installations Lubrizol/NL-Logistique sur la fitness des flets engagés à Petit-Couronne en 2019.

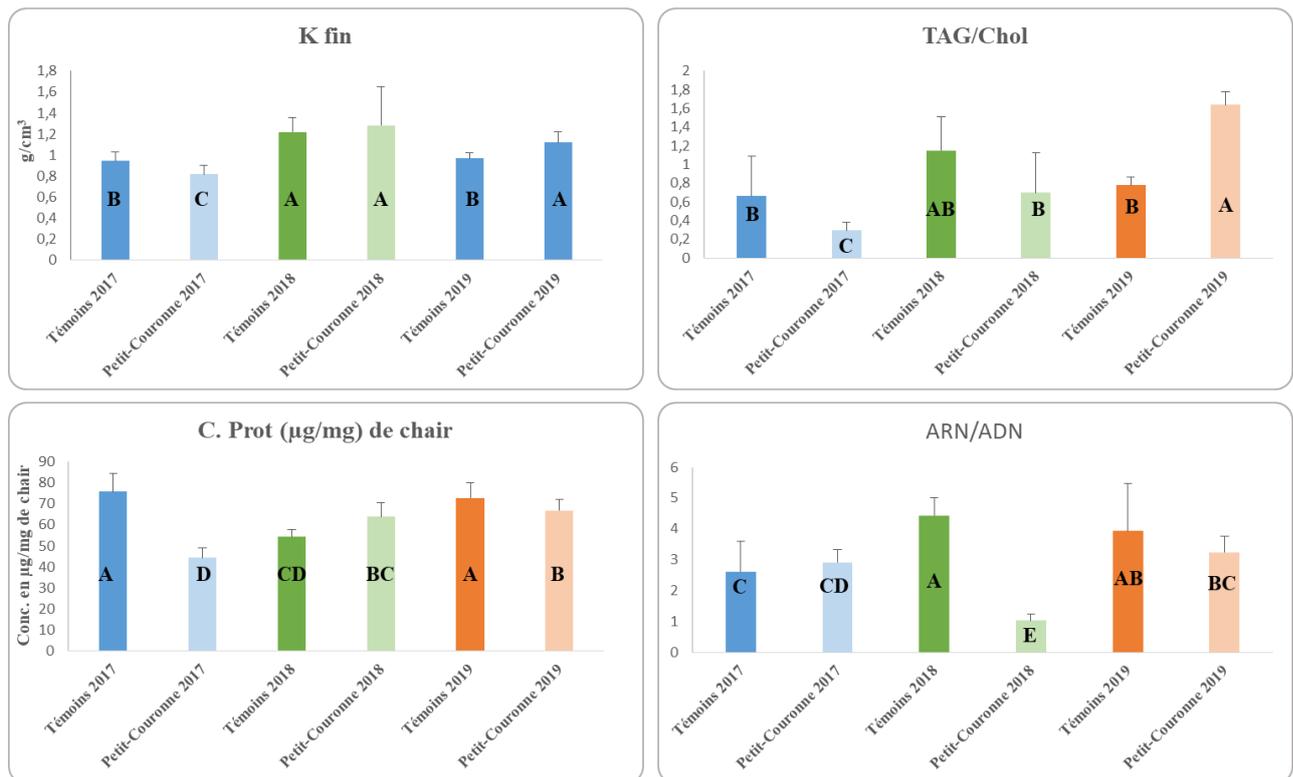


Figure 7 : Indice de condition K de Fulton ; rapport TAG/Chol ; rapport ARN/ADN ; et concentrations en protéines des juvéniles de flets encagés durant un mois dans le site de la Petit-Couronne à Rouen en automnes 2017, 2018 et 2019. Les valeurs des témoins (T0) correspondent aux flets de la Canche stabulés avant mise en cage.

La comparaison des résultats des indices de fitness mesurées au cours des trois années d'études ne nous permet pas de mettre en évidence un impact de l'incendie du 26 septembre 2019 sur les poissons mis en cages à Petit-Couronne en novembre 2019.

3.2 Biomarqueurs de dommages

Le suivi des biomarqueurs de dommages à l'ADN sanguin des flets sur les trois années d'études montre que les taux les plus faibles sont mesurés dans les flets de 2018 et les taux les élevés ont été mesurés dans les poissons de 2017. Cependant, la comparaison des taux de dommages à l'ADN des poissons mis en cages avec ceux des témoins, ne montre pas d'effets génotoxiques sur les flets de 2018 et de 2019 (Figure 8).

Les mesures de l'activité moyenne de l'EROD à Petit-Couronne, montrent une activité élevée en 2019 (34 pmol/min/mg de protéines) supérieure au niveau de base défini par le SGIMC (24 pmol/min/mg de protéines) pour le flet (SGIMC, ICES, 2012). **Cette augmentation de l'activité de l'EROD significativement plus élevée en 2019 par rapport en 2018 traduit potentiellement une augmentation de l'exposition des organismes à des molécules comme les HAPs et les PCBs induisant l'expression des CYP 450.**

Les profils de réponse de l'activité de l'ACHé montrent un effet entre les deux années d'études (2018 et 2019). En automne 2019, les poissons présentent une inhibition de 27 % de

l'activité de l'AChE alors qu'en 2018, cette inhibition était de 8 % pour la même durée d'encagement. Ce résultat tend à suggérer l'exposition des poissons de 2019 à des contaminants neurotoxiques. Vieira et al. (2009) ont montré que des taux similaires d'inhibition de l'AChE peuvent induire des troubles du comportement chez les poissons.

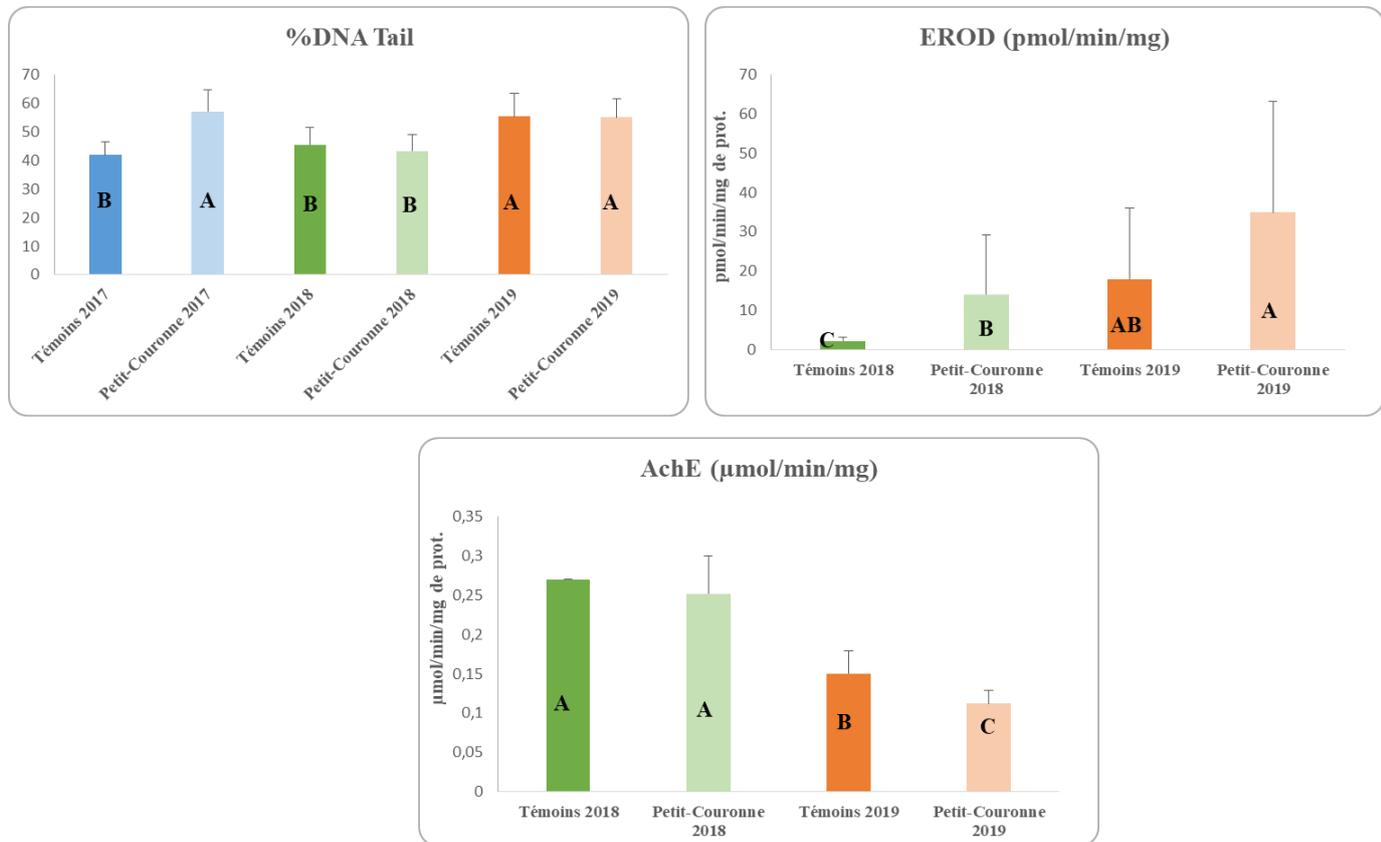


Figure 8 : Taux de dommage à l'ADN sanguin ; activité de l'EROD et activité de l'AChE mesurés dans les juvéniles de flets encagés durant un mois dans le site de la Petit-Couronne à Rouen en automnes 2017, 2018 et 2019. Les valeurs des témoins (T0) correspondent aux flets de la Canche stabilisés avant mise en cage.

La comparaison des résultats des biomarqueurs de dommages obtenus au cours des trois années sur le site de Petit-Couronne suggère que les flets encagés en 2019 sont exposés à la fois à des contaminants induisant l'induction des CYP450 et à des produits neurotoxiques.

3.3 Comparaisons des réponses protéomiques haut-débit « shotgun » entre l'automne 2017 et et l'automne 2019

L'étude réalisée en 2019 est la réplique exacte d'une précédente expérimentation réalisée en septembre 2017, dont la méthodologie détaillée et l'essentiel des résultats sont décrits dans la publication (Borcier et al., 2019). Cette expérience de 2017 nous donne ainsi une sorte

d'état initial, et une opportunité unique de comparer les réponses protéomiques des flets encagés et ainsi de quantifier l'impact de l'incendie Lubrizol/NL-Logistique sur la qualité des eaux de l'estuaire de la Seine.

En automne 2017, nous avons déjà noté une perturbation du métabolisme lipidique dans les poissons transplantés à Petit-Couronne. Néanmoins, cette perturbation touchait une voie fondamentalement différente de ce que l'on observe aujourd'hui (ie. synthèse du cholestérol), puisque c'était la biosynthèse des acides gras qui apparaissait alors stimulée.

Mais le point le plus spectaculaire en 2017 résidait dans l'accumulation de nombreuses protéines associées à la détoxification des xénobiotiques, parmi lesquelles la NADPH-cyt. P450 reductase, pas moins de 5 cytochromes P450 (1A1, 4B1, 4V2 et 2 isoformes de la 2G1), epoxyde hydrolase, DMA mono oxygenase, 3 isoformes de glucuronosyl transférase, 2 de glutathion-S-transferase... ainsi que la BHMT. La surabondance de ces protéines, couplée aux analyses chimiques et biologiques que nous avons effectuées par ailleurs, reflétait bien le haut niveau de contamination de ce site de Petit-Couronne, en comparaison des autres sites examinés dans cette étude (ie. Fosse Nord et Canche, Borcier et al., 2019).

Dans cette nouvelle étude réalisée en novembre 2019, nous n'avons retrouvé que quelques-uns de ces marqueurs protéiques (cf. paragraphe précédent) ; force est donc de constater que nous ne retrouvons pas une réponse de détoxification aussi claire.

L'analyse de l'expression des protéines associées aux processus de détoxification ne montre pas de réponse particulière des flets encagés à Petit-Couronne suite à l'incendie du 26 septembre 2019, le niveau d'expression observé pouvant être à relier à la contamination chronique de la Seine.

4 Conclusion

L'expérience d'encagement de juvénile de flet réalisée en novembre 2019 en Seine à Petit-Couronne et dans la Canche visait à apporter de nouveaux éléments dans l'évaluation de l'impact écologique de l'incendie Lubrizol/NL-Logistique survenu quelques semaines plus tôt. Nous avons analysé une batterie de biomarqueurs en réponse avec la fitness des poissons et des biomarqueurs de dommages pour mesurer les effets potentiels de l'accident sur les poissons. La comparaison des résultats obtenus en 2019 à Petit-Couronne d'une part avec ceux de la Canche de la même année considérée dans cette étude comme notre site témoin et d'autre part avec les résultats obtenus au niveau du même site en 2017 et en 2018 nous permet de conclure que :

- Les poissons exposés au niveau du site de la Petit-Couronne en novembre 2019 présentent de meilleurs indices de fitness par rapport aux flets de la Canche et par rapport aux flets encagés en 2017 et 2018.
- Les poissons encagés à Petit-Couronne en 2019 sont exposés à des molécules induisant l'expression des CYP 450 et l'inhibition de l'activité de l'ACHé. Toutefois, l'activité mesurée reste dans la gamme de variations des mesures antérieures, que ce soit sur des flets encagés ou prélevés *in natura* à l'embouchure de la Seine. Le niveau d'effet observé peut s'expliquer par l'exposition aux apports chroniques de la Seine. L'analyse de l'expression des protéines hépatiques chez le flet suggère cependant une exposition particulière à une molécule impactant le métabolisme des stéroïdes, sans pour autant avoir les éléments pour la relier aux apports de l'incendie.

PARTIE II : ÉVALUATION DE L'IMPACT DE L'INCENDIE DU 26 SEPTEMBRE 2019 SUR DES CREVETTES

5 Matériels et méthodes

5.1 Matériel biologique

Des spécimens de *Palaemon longirostris* ont été collectés au niveau du pont de Tancarville (49°28'29.49"N ; 0°27'44.99"E), au moyen d'un filet à crevette, le 17 septembre (*i.e.* avant l'accident), le 17 octobre, le 6 et le 28 novembre 2019. Immédiatement après prélèvement, les crevettes étaient rapatriées jusqu'aux locaux du laboratoire SEBIO (Université du Havre), dans des containers en polypropylène de 30 L remplis sur place avec l'eau du site et maintenues sous oxygénation constante. Les spécimens mâles étaient alors triés par observation de la présence de l'appendice *masculina*, puis maintenus dans des containers en polypropylène à une salinité ajustée à celle du site de prélèvement et sous oxygénation constante et filtration, jusqu'à utilisation.

La figure 9 récapitule les différentes expérimentations et/ou analyses faites à partir des prélèvements. Brièvement, tous les organismes utilisés étaient systématiquement pesés et mesurés. Pour chaque prélèvement, des mesures de l'intégrité de l'ADN spermatique ont été effectuées dans les 24 h post-rapatriement selon la méthode décrite en section IV.c. Une partie des spécimens échantillonnés le 6 novembre ont été redéployés dans des systèmes d'encagements (*i.e.* casiers cylindriques en polypropylène 0,60 x 0,26 m ; 5 mm de maille), du 13 au 28 novembre (*i.e.* 15 jours), sur les stations de Tancarville et de Petit-Couronne (Figure 10). Deux casiers ont été déployés sur chacune des deux stations, à raison de 40 crevettes par casier. Les spécimens prélevés le 28 novembre à Tancarville, ainsi que ceux récupérés à l'issus de la période d'encagement sur les deux stations, ont fait l'objet d'une estimation de leur indice de condition, de dosages de réserves énergétiques (*i.e.* lipides, glycogène et protéines) et de mesures de l'activité phagocytaire (*i.e.* réponse immunitaire), selon les méthodes décrites en section IV.b, IV.d et IV.e.



Figure 9 :Récapitulatif des différentes actions entreprises dans le cadre l'étude durant l'automne 2019. Les dates indiquées en bleu correspondent au prélèvement de crevettes au niveau de la station du pont de Tancarville. Les dates encadrant le déploiement de crevettes dans des systèmes d'encagement sur les stations de Tancarville et Petit Couronne, sont indiquées en vert. Les différentes analyses effectuées ont été repositionnées vis-à-vis de leurs dates respectives.



Figure 10 : Positionnement des stations de prélèvement et/ou d'engagement de Tancarville (A) et Petit-Couronne (B).

5.2 Calcul de l'indice de condition

L'indice de condition (IC) des organismes a été calculé à partir d'un rapport entre le poids (M) et la taille totale sans le rostre (LT) des organismes au cube selon la formule :

$$IC = 10000 \times \frac{M}{LT^3}$$

5.3 Mesure de l'intégrité de l'ADN spermatique

L'intégrité de l'ADN spermatique était mesurée au moyen du test des comètes selon la méthode développée par Erraud *et al.* (2018a,b, 2019a,b) dans le cadre du projet ECOTONES¹ (Programme Seine Aval 5), sur 10 spécimens par condition. Les spermatozoïdes étaient extraits par une légère pression entre la cinquième paire de périopodes, permettant l'expulsion des spermatozoïdes des ampoules terminales. Les spermatozoïdes étaient alors transférés dans un microtube de 1.5 ml puis pesés, immergés dans 300 µL d'eau de mer artificielle (*i.e.* ajustée à l'osmolarité hémolympatique de *P. longirostris*, soit 350 mOsmol.kg⁻¹) et dilacérés par pipetage jusqu'à lacération entière des spermatozoïdes.

La mortalité de la suspension de spermatozoïdes était 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).

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 µL de suspension cellulaire (*i.e.* 10⁶ spermatozoïdes.mL⁻¹) étaient mélangés dans 60 µL 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 issus 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 × 60 mm) pour assurer une

¹ Projet ECOTONES : Effets de la contamination sur les organismes de l'estuaire de Seine ; financement Seine Aval 5. <https://www.seine-aval.fr/projet/ecotones/>

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 x 27 cm x 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 réappariement 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). Les dommages à l'ADN ont été mesurés en utilisant la notation visuelle selon une grille de lecture adaptée à partir de Collins et *al.* (1997). Un minimum de 150 spermatozoïdes par lame étaient comptés et classés en cinq catégories de Comet en fonction du degré de dommage à l'ADN (Figure 11), 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 N_i indiquant le nombre de noyaux comptabilisés dans chaque classe (l'indice i indiquant la classe) et N_t correspondant au nombre total de noyaux analysés. Les résultats étaient exprimés en Unité Arbitraire (UA) sur une échelle de 0 à 400.

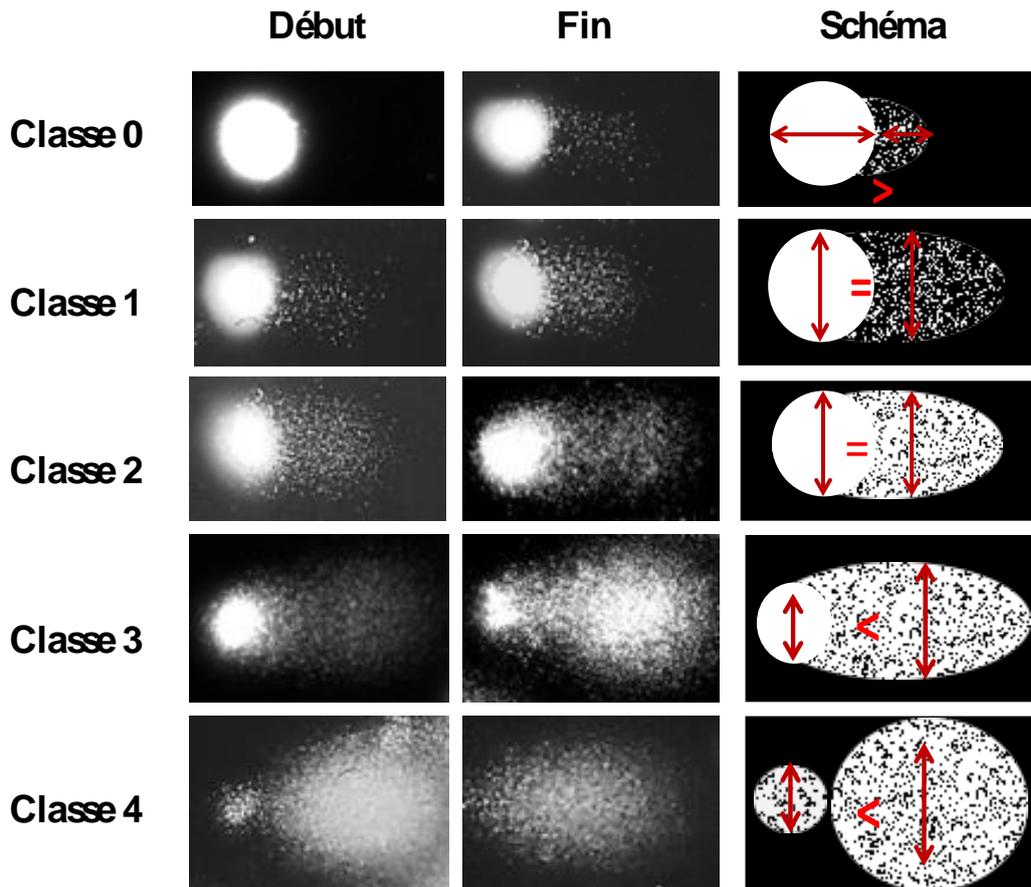


Figure 11 : Classification visuelle de l'endommagement de l'ADN spermatique de *Palaemonidae* mesuré par le test Comet après marquage au DAPI, adaptée de Collins (1997) : classe 0 : aucun dommage à très faibles dommages ; classe 1 : faibles dommages ; classe 2 : dommages moyens ; classe 3 : dommages élevés ; classe 4 : totalement endommagés (Erraud, 2018 ; Source: A. DufLOT & A. Erraud).

5.4 Dosage des réserves énergétique

Les dosages des réserves énergétiques ont été effectués sur des extraits d'hépatopancréas selon la méthode initialement développée chez la dreissène *Dreissena polymorpha* (Palais et al., 2011) adaptée ici à l'espèce *P. longirostris*. Pour chaque condition, 10 spécimens ont été utilisés. Les quantités de protéines totales, de lipides totaux et de glycogène ont ainsi été évaluées *via* des dosages colorimétriques par spectrophotométrie d'absorbance, adaptés en plaque 96 puits. Les différentes lectures d'absorbances étaient réalisées au moyen d'un lecteur de plaque Infinite® M200 (Tecan).

Après dissection, les hépatopancréas ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C. Au moment de la préparation des échantillons, ces derniers ont été broyés au moyen d'un broyeur à billes (Precellys® 24 ; Ozyme) dans du tampon phosphate (50 mM, pH 5.6), selon un ratio masse /volume de 1/10. Les protéines totales ont été directement dosées à 595 nm, sur une fraction de l'homogénat, au moyen de la méthode du Bradford (1976). Les résultats ont été exprimés en µg de protéines / mg de tissus, utilisant de l'albumine de sérum bovin comme standard. Le reste de l'homogénat a ensuite été traité afin de permettre le dosage des lipides totaux et du glycogène.

Brièvement, 100 µl d'homogénat ont été ajoutés à 50 µl de sulfate de sodium 20 g/L et à 1350 µl d'un mélange de chloroforme / méthanol (1:2, v:v). Après 1 h d'incubation à 4°C, les échantillons ont été centrifugés à 3000 x g, pendant 10 min, à 4°C. Le surnageant, a été congelé à -80°C afin d'être utilisé pour le dosage des lipides totaux. La fraction culottée, quant à elle, a été incubée à 95°C pendant 4 min, puis congelés à -80°C en perspective du dosage du glycogène.

Pour réaliser le dosage des lipides totaux, 50 µL d'échantillon ont tout d'abord été chauffés en bain-marie à 95°C pendant 10 min. Puis, 100 µL d'acide sulfurique ont été ajoutés et une nouvelle incubation de 10 min à 95°C a été effectuée. Après refroidissement de pendant 5 min dans un bain de glace, 2.4 mL d'une solution de vanilline (1.2 g/L, 70 % d'acide ortho-phosphorique) ont été ajoutés. Le milieu réactionnel a été incubé à l'obscurité pendant 10 min, à température ambiante. La densité d'absorbance a été mesurée à 525 nm, et convertie en µg de lipides / mg de tissus au moyen d'une gamme étalon d'huile d'olive hautement raffinée. En ce qui concerne le dosage du glycogène, les culots ont d'abord été incubés à 4 °C dans 400 µL d'eau ultra-pure, puis homogénéisés avec en broyeur à billes Precellys® 24 (Ozyme). 50 µL d'homogénat ont été ensuite ajoutés à 2.45 mL d'une solution d'antrone (1,4 g/L, 75% d'acide sulfurique) puis incubés 17 min à 95°C. Enfin, les tubes ont été refroidis pendant 5 minutes dans un bain de glace. Après refroidissement de 5 min dans la glace, la densité d'absorbance a été mesurée à 630 nm et convertie en µg de glycogène / mg de tissus au moyen d'une gamme étalon de glucose.

5.5 Mesure de l'activité phagocytaire

L'activité phagocytaire était mesurée en cytométrie en flux selon la méthode développée par Tremolet *et al.* (*en cours de valorisation* ; Projet SASHIMI²). Brièvement, un échantillon de 50 µL d'hémolymphe était prélevé directement au niveau du bulbe cardiaque, au moyen d'une seringue pré-chargée avec du milieu Alsever pour prévenir l'agrégation cellulaire.

Dans le but de déterminer la concentration et la viabilité hémocytaire de l'échantillon, 100 µL d'hémolymphe étaient déposés dans 100 µL d'ALS et 10 µL d'IP (Iodure de Propidium) puis immédiatement analysés au moyen d'un cymomètre Novocyte® (ACEA) sur les canaux side scatter et forward scatter et PE-Cy7 (*i.e.* 488 nm excitation et 780 nm émission). Environ 80 000 cellules étaient déposées dans une plaque 96 puits. Le volume était ajusté à 100 µL avec de l'ALS, puis le mélange était incubé à 15°C durant 30 min. Une solution iso-osmotique contenant des microbilles de polystyrène fluorescentes était additionnée à raison de 250 billes par cellule, puis le mélange était incubé 2 h à 15°C. Le surnageant était collecté et le culot de cellules était décollé à la trypsine et mélangé au surnageant. L'échantillon était alors analysé en cytométrie (PE-H, 488 nm excitation et 572 nm émission). L'activité phagocytaire des hémocytes était étudiée au moyen de trois métriques : 1) La capacité qui exprime le pourcentage de cellules ayant phagocyté au moins une bille ; 2) L'efficacité qui correspond au pourcentage de cellules ayant phagocyté au moins 3 billes ; 3) l'avidité qui est une estimation du nombre de billes moyen par cellule au sein de la population d'hémocytes efficaces.

² Projet SASHIMI : Surveillance active de l'impact de la pression chimique par des biomarqueurs ; Financement de l'Office National de la Biodiversité.

6 Résultats et discussion

6.1 Évaluation de l'évolution des dommages à l'ADN spermatique de crevettes autochtones au niveau du site de Tancarville

Les niveaux de dommages à l'ADN spermatique mesurés sur les spécimens de crevettes prélevés au niveau de la station de Tancarville aux différentes dates de suivi étaient respectivement de 47.4 ± 17.2 , 63.9 ± 39.0 , 88.3 ± 22.7 et 101.4 ± 20.0 U.A. Il peut être souligné que les niveaux d'endommagement observés le 17 septembre et le 17 octobre 2019 étaient les plus bas jamais observés depuis que le test des comètes est appliqué sur spermatozoïdes de *P. longirostris* en Seine (*i.e.* campagnes d'automne et printemps de 2015 à 2017, et campagnes d'automne en 2018 et 2019). Globalement, les niveaux d'endommagements augmentent progressivement après l'incendie du 26 septembre 2019 de manière significative (ANOVA, $p.value < 0,05$), pour atteindre des niveaux supérieurs au seuil de significativité (*i.e.* intervalle de confiance unilatéral à 95 % déterminée à partir d'une distribution de référence ; Erraud et al., 2018b et 2019a) durant les deux derniers prélèvements, en novembre. Bien que les niveaux de dommages atteints soient importants, ils restent dans la gamme des observations antérieures faites en Seine (Figure 12 ; Erraud et al., 2019a).

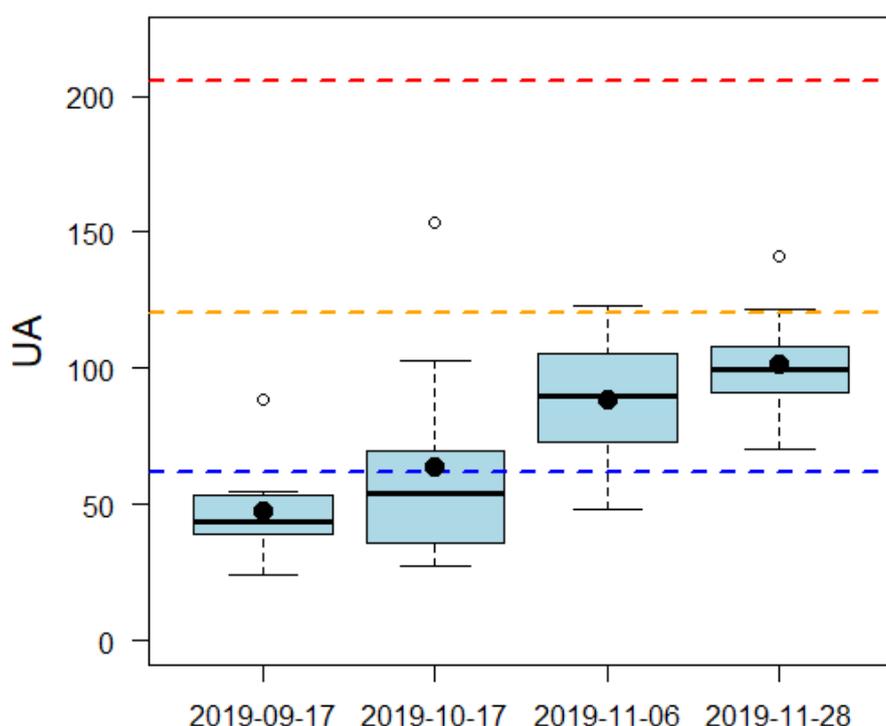


Figure 12 : Dommage à l'ADN des spermatozoïdes mesurés à l'aide du test Comet chez des spécimens de *Palaemon longirostris* prélevés au niveau du pont de Tancarville le 17 septembre (*i.e.* avant l'accident), 17 octobre et 6 et 28 novembre 2019. Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles ($n = 10$). La moyenne (point noir) a été ajoutée. La ligne hachurée bleue représente le seuil de significativité (*i.e.* intervalle de confiance unilatéral à 95 % déterminée à partir d'une distribution de référence ; Erraud et al., 2018b et 2019a). La ligne hachurée orange représente le niveau de dommages moyen observé lors des différents suivis de l'estuaire entre 2015 et 2019. La ligne hachurée rouge représente le niveau de dommages maximum observé lors des différents suivis de l'estuaire entre 2015 et 2019 (*i.e.* au printemps 2018 au niveau de la confluence avec la Risle).

6.2 État de santé des crevettes engagées sur les stations de Tancarville et Petit Couronne.

L'expérimentation de caging de crevettes a permis d'appréhender l'état de santé des organismes après 15 jours d'exposition aux eaux de la Seine (à Petit-Couronne et Tancarville), à travers la mesure d'un panel de biomarqueurs.

Les taux de survie des crevettes observés à l'issue des 15 jours d'encagement des crevettes étaient de 82.50 % (i.e. 33 spécimens survivants sur les 40 de départ, dans chacun des deux casiers) pour la station de Tancarville et 61.25 % (i.e. 23 et 26 spécimens survivants respectivement pour chacun des deux casiers) pour la station de Petit Couronne. Il peut être souligné que pour chacun des 2 lots déployés à Petit-Couronne, 4 spécimens (i.e. 10 %) sont morts durant le rapatriement au laboratoire malgré les précautions mises en œuvre. Ces taux de mortalité restent largement acceptables. Il ne peut être exclu que la fragilité des individus observés sur la station de Petit-Couronne puisse être liée aux très faibles salinités observées sur cette station (e.g. 0,34 ‰ et 0,38 ‰ mesurées respectivement à T0 et T15), en limite de la capacité osmorégulatrice de l'espèce (constat personnel, non publié).

L'indice de condition et l'état des réserves énergétiques (protéines, lipides, glycogènes) sont des indicateurs de l'état physiologique global des organismes. Les valeurs de ces indicateurs sont similaires entre les deux sites après les 15 jours d'exposition. Il n'a pas été mis en évidence d'effets significatifs entre les lots de crevettes engagés à Tancarville et Petit Couronne, telle qu'une diminution de l'indice de condition ou mobilisation particulière du glycogène, qui traduirait une stratégie métabolique de défense au contact d'une contamination chimique (Figure 13 et 14). Il peut cependant être souligné une diminution significative du taux de glycogène (ANOVA, p.valeur < 0,001) ainsi de l'indice de condition (ANOVA, p.valeur < 0,001) entre les spécimens avant et après encagement (i.e. T0, T15 Petit-Couronne et T15 Tancarville). Ce constat est très probablement le résultat de la semaine de stabulation en laboratoire dans un milieu de salinité constante et en l'absence de courant, qui aurait dopé la condition des individus. Cette hypothèse est supportée par les valeurs d'indice de condition et de concentration de glycogène mesurées immédiatement après prélèvement (Autochtones) qui sont proches de celles observées chez spécimens à l'issue des 15 jours d'encagement.

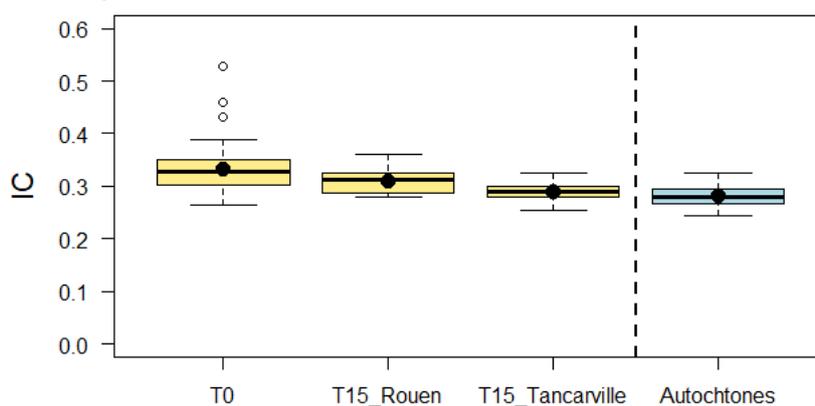


Figure 13 : Indices de condition (IC) des spécimens de *Palaemon longirostris*. Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles. La moyenne (point noir) a été ajoutée. Les box plot verts présentent les IC d'individus prélevés au niveau de la station de Tancarville le 6 Novembre, après 7 jours de stabulation en laboratoire (i.e. T0 ; n = 40) et après redéploiement de 15 jours sur la station de Tancarville (i.e. T15 Tancarville ; n = 53) et la station de Petit-Couronne (i.e. T15 Petit-Couronne ; n = 26). Le box plot bleu présente les IC mesurés sur des individus de la station de Tancarville, immédiatement après le prélèvement du 28 novembre (i.e. Autochtones T15 ; n = 40).

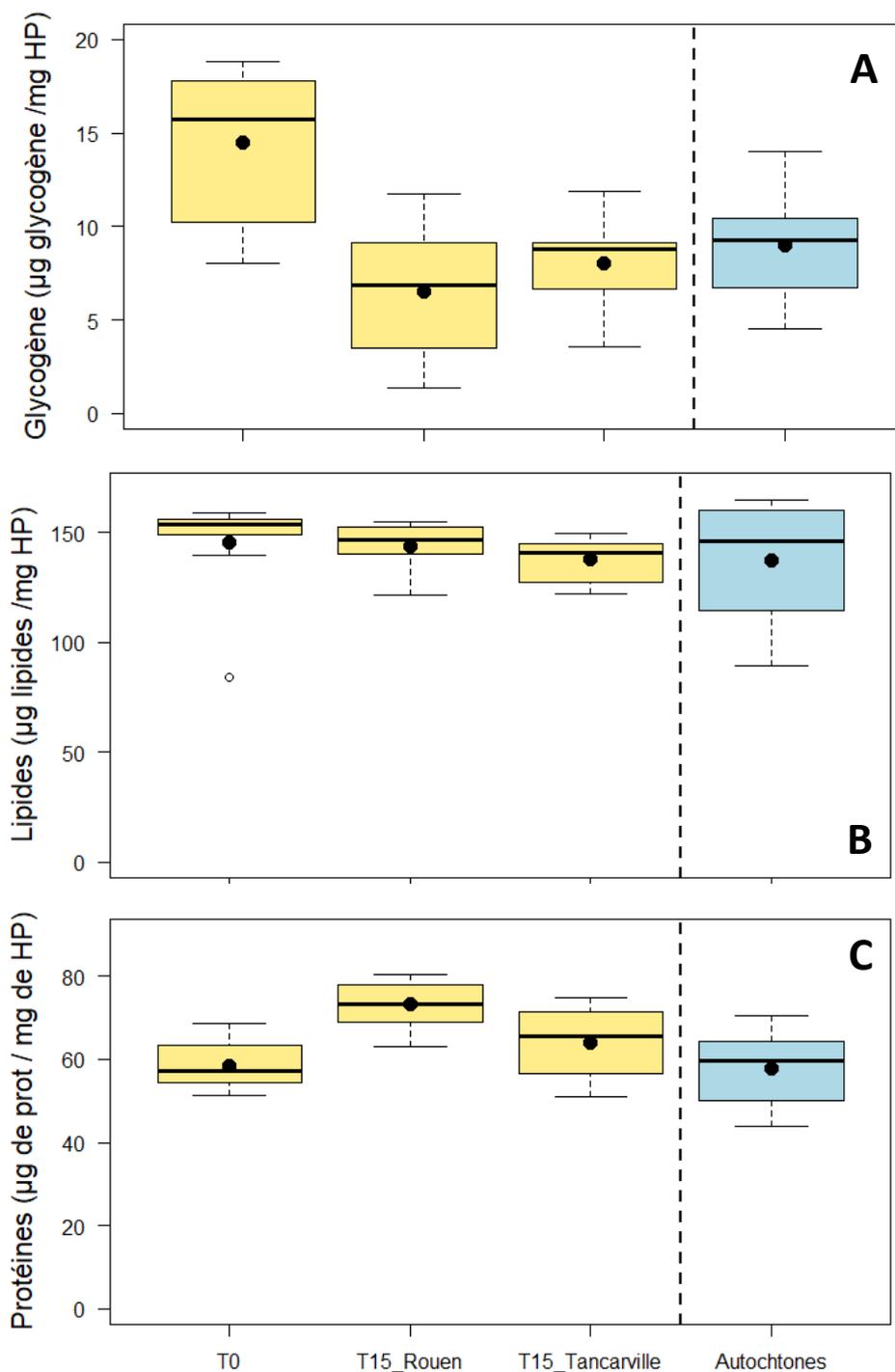


Figure 14 : Concentrations hépatopancréatiques en protéines (A), lipides (B) et glycogène (C) mesurées chez des spécimens de *Palaemon longirostris*. Les résultats sont exprimés en box plot contenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles ($n = 10$). La moyenne (point noir) a été ajoutée. Les box plot jaunes présentent les réserves énergétiques mesurées chez les individus prélevés au niveau de la station de Tancarville le 6 Novembre, après 7 jours de stabulation en laboratoire (i.e. T0) et après redéploiement de 15 jours sur la station de Tancarville (T15_Tancarville) et la station de Petit-Couronne (T15_Petit-Couronne). Le box plot bleu présente les réserves énergétiques mesurées chez les individus de la station de Tancarville, immédiatement après le prélèvement du 28 novembre (i.e. Autochones T15).

Le suivi de l'intégrité de l'ADN spermatique indique une génotoxicité significativement marquée en Seine quelques semaines après l'incendie, et ce dès l'encagement et après 15 jours d'exposition (*i.e.* 88.3 ± 22.7 , 102.6 ± 28.7 , 113.8 ± 25.2 et 101.4 ± 20.0 U.A pour T0, T15 Petit-Couronne, T15 Tancarville et Autochtone T15 ; Figure 15). Aucune différence significative n'est cependant observée entre les deux stations (Petit-Couronne et Tancarville), ni avec le T0, ni avec les individus autochtones (ANOVA, *p.value* = 0,16). Comme précédemment, bien que les niveaux de dommages atteints soient importants, ils restent dans la gamme des observations antérieures faites en Seine (Erraud et *al.*, 2019a).

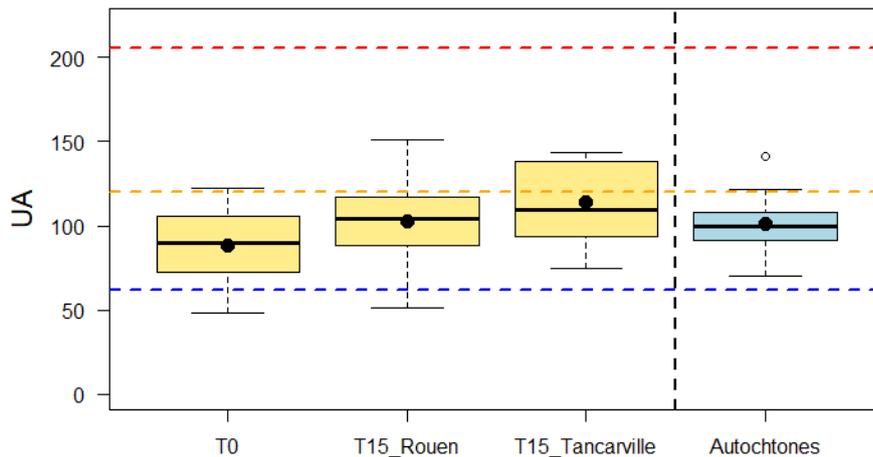


Figure 15 : Dommage à l'ADN des spermatozoïdes mesurés à l'aide du test Comet chez des spécimens de *Palaemon longirostris*. Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles (*n* = 10). La moyenne (point noir) a été ajoutée. Les box plot verts présentent les dommages mesurés chez les individus prélevés au niveau de la station de Tancarville le 6 Novembre, après 7 jours de stabulation en laboratoire (*i.e.* T0) et après redéploiement de 15 jours sur la station de Tancarville (T15_Tancarville) et la station de Petit-Couronne (T15_Petit-Couronne). Le box plot bleu présente les dommages mesurés chez les individus de la station de Tancarville, immédiatement après le prélèvement du 28 novembre (*i.e.* Autochtones). La ligne hachurée bleue représente le seuil de significativité (*i.e.* intervalle de confiance unilatéral à 95 % déterminée à partir d'une distribution de référence ; Erraud et *al.*, 2018b et 2019a). La ligne hachurée orange représente le niveau de dommages moyen observé lors des différents suivis de l'estuaire entre 2015 et 2019. La ligne hachurée rouge représente le niveau de dommages maximum observé lors des différents suivis de l'estuaire entre 2015 et 2019 (*i.e.* au printemps 2018 au niveau de la confluence avec la Risle).

Les échantillons d'hémolymphes des crevettes montraient tous d'excellents taux de survie cellulaire (*i.e.* 95,6 % en moyenne), quelle que soit la provenance des spécimens. La mesure de l'activité de phagocytose hémocytaire n'a pas non plus montré d'effet immunotoxique significatif, quel que soit le paramètre considéré (*i.e.* capacité, efficacité ou avidité), avec des valeurs comparables entre le moment de l'encagement et après 15 jours d'exposition pour les deux sites (ANOVA, *p.value* = 0,35 ; 0,06 et 0,68 pour respectivement la capacité, l'efficacité ou l'avidité). Ces niveaux sont également comparables à ceux mesurés sur des individus autochtones prélevés à Tancarville.



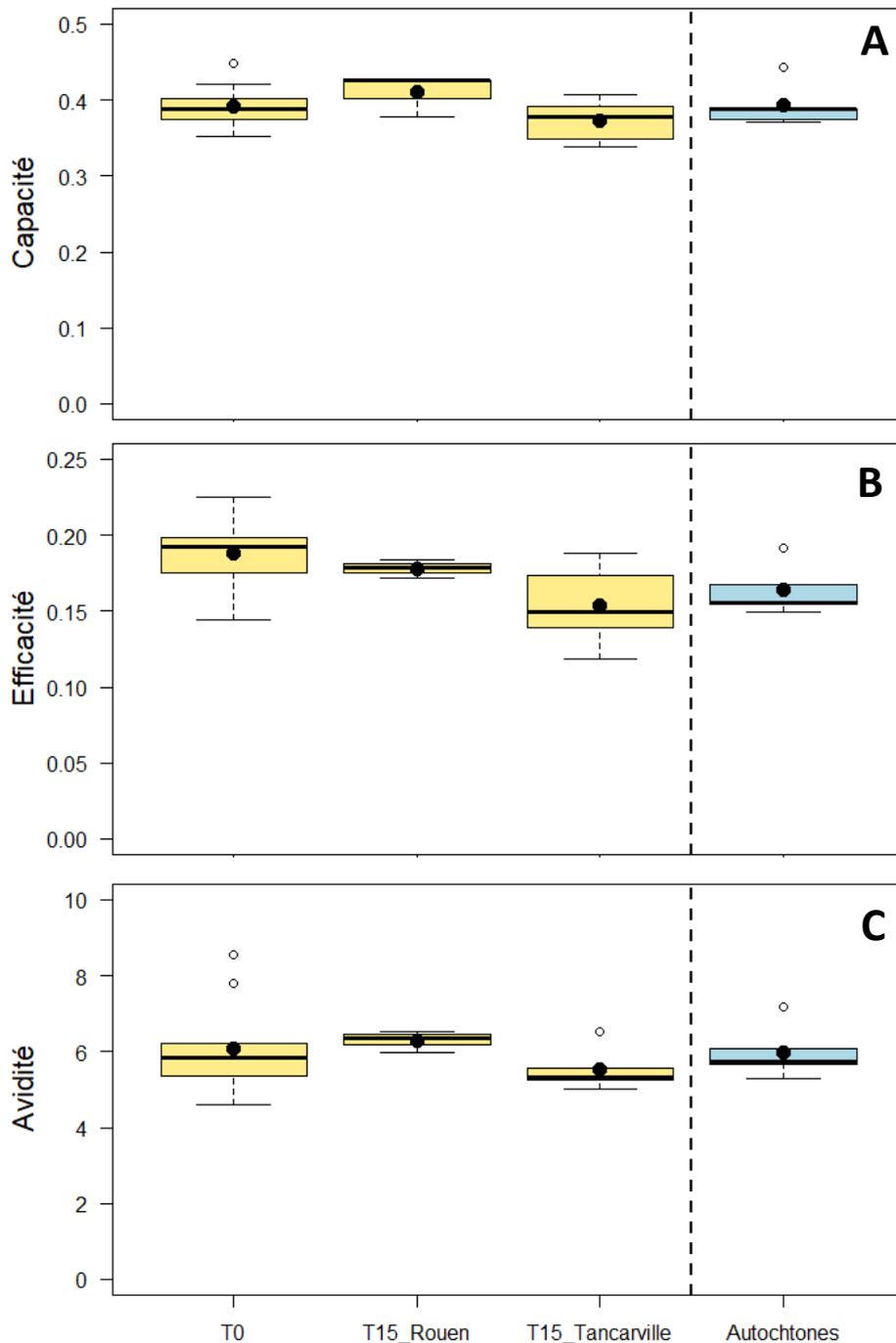


Figure 16 : Capacité (A), efficacité (B) et avidité (C) phagocytaire mesurées sur des prélèvements d'hémocytes de spécimens de *Palaemon longirostris*. Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles ($n = 10$). La moyenne (point noir) a été ajoutée. Les box plot jaunes présentent l'activité phagocytaire mesurée chez les individus prélevés au niveau de la station de Tancarville le 6 Novembre, après 7 jours de stabulation en laboratoire (i.e. T0) et après redéploiement de 15 jours sur la station de Tancarville (T15_Tancarville) et la station de Petit-Couronne (T15_Petit-Couronne). Le box plot bleu présente l'activité phagocytaire mesurée chez les individus de la station de Tancarville, immédiatement après le prélèvement du 28 novembre (i.e. Autochtones T15).

6.3 Conclusion

Aucun effet massif sur les marqueurs de conditions et la capacité de réponse immunitaire des organismes n'ont été observés chez les crevettes blanches déployées dans des systèmes d'encagement. Par ailleurs, le fait que 1) les dommages à l'ADN soient du même ordre de grandeur, voire plus importants, à Tancarville (à près de 100 km de Petit-Couronne) qu'à Petit-Couronne ; et que 2) les niveaux de dommages à l'ADN soient dans la gamme des observations antérieures sur la Seine, tend à relier les effets génotoxiques observés chez la crevette à une exposition à des contaminants chimiques véhiculés par la Seine et issus d'apports chroniques, plutôt qu'à un apport spécifique lié à l'incendie. Cependant, il n'est pas possible d'exclure qu'une part de ces effets soit attribuable à des apports de contaminants génotoxiques lors de l'incendie.

En outre, il peut être souligné que cette étude est la première qui mette en œuvre l'encagement de *Palaemon longirostris* et plus globalement l'encagement de crustacés dans un grand estuaire d'Europe. Les encagements se sont révélés relativement simples et rapides à mettre en œuvre et se sont plutôt bien déroulés. Les similitudes entre les données observées après 15 jours d'encagement sur deux stations positionnées à différents niveaux du gradient de salinité présentant des courantologies différentes, et celles mesurées sur les individus autochtones de Tancarville, tendent à montrer l'absence d'effets confondants, tant de la salinité que des conditions d'encagement, sur le niveau de réponses des marqueurs mesurés. Cette étude apparaît donc comme une première preuve de concept soulignant le potentiel d'application de l'encagement de crevettes palémonidés comme outils de biosurveillance dans le cadre d'enquête sur la qualité des masses d'eau estuariennes.

CONCLUSION

La présente étude a confirmé l'intérêt du biomonitoring actif (encagement d'organismes) pour le monitoring et le diagnostic du risque environnemental de sites d'intérêts par transplantation d'organismes calibrés issus d'une même population. Cette approche peut être utilisée comme un outil de diagnostic d'un site donné pendant une durée d'exposition donnée. Elle présente ainsi un fort intérêt pour évaluer l'impact d'un événement accidentel comme cela a été le cas suite à l'incendie Lubrizol/NL-Logistique du 26 septembre 2019, dont une partie des eaux d'extinction a rejoint le bassin aux bois, en connexion avec la Seine..

Deux espèces, un poisson (le flet) et un crustacé (la crevette blanche) ont été engagés avec succès en novembre 2019 au niveau du trou du chapon à Petit-Couronne, site situé à une dizaine de kilomètres en aval du bassin aux bois. Un panel de biomarqueurs a été mesuré sur les organismes exposés pendant 15 et 30 jours pour appréhender l'impact à moyen terme de l'incendie. Les résultats des biomarqueurs mesurés chez la crevette indiquent une exposition à des contaminants génotoxiques accrue dans la Seine à Petit-Couronne et à Tancarville dans les semaines qui ont suivi l'incendie. Le niveau d'effet mesuré reste cependant modéré et peut s'expliquer par l'exposition aux apports chroniques de la Seine. Les biomarqueurs mesurés chez le flet à Petit-Couronne ne montrent pas d'effets spécifiques, même si une légère inhibition de l'activité de l'ACHé et une augmentation de l'expression des CYP 450 a été noté chez les flets engagés en 2019 à Petit-Couronne. Là encore, l'activité mesurée reste dans la gamme de variations des mesures antérieures et le niveau d'effet observé peut s'expliquer par l'exposition aux apports chroniques de la Seine plutôt qu'à un apport spécifique lié à l'incendie. Cependant, que ce soit pour la crevette ou le flet, il n'est pas possible d'exclure qu'une part de ces effets soit attribuable à des apports de contaminants lors de l'incendie. L'analyse de l'expression des protéines hépatiques chez le flet suggère cependant une exposition particulière à une molécule impactant le métabolisme des stérols, sans pour autant avoir les éléments pour la relier aux apports de l'incendie.

En conclusion, aucun impact direct et significatif de l'incendie du 26 septembre 2019 sur les organismes aquatiques exposés en Seine n'a été mis en évidence plusieurs semaines après l'évènement.



LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1 : Localisation des sites d'implantation des cages en Seine (à Petit-Couronne) et en Canche. Il faut noter que les flets transplantés dans les deux sites ont été pêchés dans la Canche puis acclimatés au laboratoire avant d'être engagés..... 5
- Figure 2 :Cage développée dans le projet HQFISH et utilisée dans cette étude pour l'encagement des juvéniles de flets avec différentes améliorations et enrichissement pour favoriser le bien-être des poissons. 6
- Figure 3 : Taux de survie (%) et croissance en poids (g/jour) des flets engagés à Petit-Couronne et en Canche durant 15 jours et un mois en automne 2019..... 8
- Figure 4 : Indice de condition K de Fulton ; indice lipidique (rapport TAG/Chol) ; rapport ARN/ADN ; et concentrations en protéines des juvéniles de flets engagés durant 15 jours et un mois au niveau des sites de Petit-Couronne et de la Canche en automne 2019. Les valeurs du témoin correspondent aux flets de la Canche stabulés avant mise en cage. 9
- Figure 5 : Taux de dommages à l'ADN sanguin ; activité de l'EROD et activité de l'AcChE mesurés chez les juvéniles de flets engagés durant 15 jours et un mois au niveau des sites de Petit-Couronne et de la Canche. Les valeurs du témoin correspondent aux flets de la Canche stabulés avant mise en cage. 11
- Figure 6 : Taux de survie (%) et croissance en poids (g/jours) des flets engagés à Petit-Couronne durant un mois en automnes 2017, 2018 et 2019. 14
- Figure 7 : *Indice de condition K de Fulton ; rapport TAG/Chol ; rapport ARN/ADN ; et concentrations en protéines des juvéniles de flets engagés durant un mois dans le site de la Petit-Couronne à Rouen en automnes 2017, 2018 et 2019. Les valeurs des témoins (T0) correspondent aux flets de la Canche stabulés avant mise en cage.* 15
- Figure 8 : *Taux de dommage à l'ADN sanguin ; activité de l'EROD et activité de l'AcChE mesurés dans les juvéniles de flets engagés durant un mois dans le site de la Petit-Couronne à Rouen en automnes 2017, 2018 et 2019. Les valeurs des témoins (T0) correspondent aux flets de la Canche stabulés avant mise en cage.* 16
- Figure 9 : *Récapitulatif des différentes actions entreprises dans le cadre l'étude durant l'automne 2019. Les dates indiquées en bleu correspondent au prélèvement de crevettes au niveau de la station du pont de Tancarville. Les dates encadrant le déploiement de crevettes dans des systèmes d'encagement sur les stations de Tancarville et Petit Couronne, sont indiquées en vert. Les différentes analyses effectuées ont été repositionnées vis-à-vis de leurs dates respectives.*..... 18
- Figure 10 : *Positionnement des stations de prélèvement et/ou d'encagement de Tancarville (A) et Petit-Couronne (B).*..... 19
- Figure 11 : *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. Dufлот & A. Erraud).*..... 21
- Figure 12 : *Domage à l'ADN des spermatozoïdes mesurés à l'aide du test Comet chez des spécimens de Palaemon longirostris prélevés au niveau du pont de Tancarville le 17 septembre (i.e. avant l'accident), 17 octobre et 6 et 28 novembre 2019. Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles (n = 10). La moyenne (point noir) a été ajoutée. La ligne hachurée bleue représente le seuil de significativité (i.e. intervalle de confiance unilatéral à 95 % déterminée à partir d'une distribution de référence ; Erraud et al., 2018b et 2019a). La ligne hachurée orange représente le niveau de dommages moyen observé lors des différents suivis de l'estuaire entre 2015 et 2019. La ligne hachurée rouge représente le niveau de dommages maximum observé lors des différents suivis de l'estuaire entre 2015 et 2019 (i.e. au printemps 2018 au niveau de la confluence avec la Risle).* 23
- Figure 13 : *Indices de condition (IC) des spécimens de Palaemon longirostris. Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles. La moyenne (point noir) a été ajoutée. Les box plot verts présentent les IC d'individus prélevés au niveau de la station de Tancarville le 6 Novembre, après 7 jours de stabulation en laboratoire (i.e. T0 ; n = 40) et après redéploiement de 15 jours sur la station de Tancarville (i.e. T15 Tancarville ; n = 53) et la station de Petit-Couronne (i.e. T15 Petit-Couronne ; n =*



26). Le box plot bleu présente les IC mesurés sur des individus de la station de Tancarville, immédiatement après le prélèvement du 28 novembre (i.e. Autochones T15 ; n = 40). 24

Figure 14 : Concentrations hépatopancréatiques en protéines (A), lipides (B) et glycogène (C) mesurées chez des spécimens de *Palaemon longirostris*. Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles (n = 10). La moyenne (point noir) a été ajoutée. Les box plot jaunes présentent les réserves énergétiques mesurées chez les individus prélevés au niveau de la station de Tancarville le 6 Novembre, après 7 jours de stabulation en laboratoire (i.e. T0) et après redéploiement de 15 jours sur la station de Tancarville (T15_Tancarville) et la station de Petit-Couronne (T15_Petit-Couronne). Le box plot bleu présente les réserves énergétiques mesurées chez les individus de la station de Tancarville, immédiatement après le prélèvement du 28 novembre (i.e. Autochones T15)..... 25

Figure 15 : Dommage à l'ADN des spermatozoïdes mesurés à l'aide du test Comet chez des spécimens de *Palaemon longirostris*. Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles (n = 10). La moyenne (point noir) a été ajoutée. Les box plot verts présentent les dommages mesurés chez les individus prélevés au niveau de la station de Tancarville le 6 Novembre, après 7 jours de stabulation en laboratoire (i.e. T0) et après redéploiement de 15 jours sur la station de Tancarville (T15_Tancarville) et la station de Petit-Couronne (T15_Petit-Couronne). Le box plot bleu présente les dommages mesurés chez les individus de la station de Tancarville, immédiatement après le prélèvement du 28 novembre (i.e. Autochones). La ligne hachurée bleue représente le seuil de significativité (i.e. intervalle de confiance unilatéral à 95 % déterminée à partir d'une distribution de référence ; Erraud et al., 2018b et 2019a). La ligne hachurée orange représente le niveau de dommages moyen observé lors des différents suivis de l'estuaire entre 2015 et 2019. La ligne hachurée rouge représente le niveau de dommages maximum observé lors des différents suivis de l'estuaire entre 2015 et 2019 (i.e. au printemps 2018 au niveau de la confluence avec la Risle)..... 26

Figure 16 : Capacité (A), efficacité (B) et avidité (C) phagocytaire mesurées sur des prélèvements d'hémocytes de spécimens de *Palaemon longirostris*. Les résultats sont exprimés en box plot comprenant la médiane, les premiers et troisièmes quartiles (n = 10). La moyenne (point noir) a été ajoutée. Les box plot jaunes présentent l'activité phagocytaire mesurée chez les individus prélevés au niveau de la station de Tancarville le 6 Novembre, après 7 jours de stabulation en laboratoire (i.e. T0) et après redéploiement de 15 jours sur la station de Tancarville (T15_Tancarville) et la station de Petit-Couronne (T15_Petit-Couronne). Le box plot bleu présente l'activité phagocytaire mesurée chez les individus de la station de Tancarville, immédiatement après le prélèvement du 28 novembre (i.e. Autochones T15). 27

BIBLIOGRAPHIE

- Amara R. & Laroche J., en cours. Projet HQ-Fish : Impact de la qualité des habitats estuariens de la Seine sur le fonctionnement d'une population de poisson (flet). Projet Seine-Aval 6
- Balint, T., Szegletes, T., Szegletes, Z., Halasy, K., & Nemcsók, J. (1995). Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquatic Toxicology*, 33(3-4), 279-295.
- Bocquené G. & Galgani F., 1998. Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate compounds. *Tech. Mar. Environ. Sci.*, 22 : 1-12.
- Borcier E., Artigaud S., Gaillard J.C., Armengaud J., Charrier G., Couteau J., Receveur J., Ouddane B., Diop M., Amara R., Laroche J. & V. Pichereau, **2019.-** Coupling caging and proteomics on the European flounder (*Platichthys flesus*) to assess the estuarine water quality at micro scale. *Science of the Total Environment*, 695:133760. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.133760
- Bouillon C. et Adam D., 2020. Rapport d'information sur l'incendie d'un site industriel à Rouen. Enregistré à la Présidence de l'Assemblée nationale le 12 février 2020.
- Castro, B.B., Sobral, O., Guilhermino, L., Ribeiro, R., 2004. An in situ bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology*. 13, 667–681.
- Clemmesen, C. (1989). RNA/DNA ratios of laboratory-reared and wild herring larvae determined with a highly sensitive fluorescence method. *Journal of Fish Biology*, 35(SupplementA), 331-333.
- 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. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30, 139–146.
- Devillier, G., Palluel, O., Aliaume, C., Asanthi, H., Sanchez, W., Franco Nava, M.A., Blancheton, J.P., Casellas, C., 2005. Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 89–97.
- Erraud A., Bonnard M., Geffard O., Coulaud R. C., Poret A., Dufлот A., Forget-Leray J., Geffard A., Xuereb B. (2019). Signification of DNA integrity in sperm of *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Kinetic responses and reproduction impairment. *Marine Environmental Research* 144: 130-140.
- Erraud A., Bonnard M., Geffard O., Chaumot A., Dufлот A., Geffard A., Forget-Leray J., Xuereb B. (2019). Assessment of sperm DNA integrity within the *Palaemon longirostris* (H. Milne-Edwards, 1837) population of the Seine estuary. *Environmental Pollution*, 245: 485-493.
- Erraud, A., 2018. Développement d'un biomarqueur de qualité spermatique chez deux espèces de crevettes Palaemonidae : état des lieux le long du continuum estuaire / littoral de la Seine. (Thèse de doctorat, spécialité Physiologie et biologie des organismes – populations - interactions, Université Le Havre Normandie, Le Havre, France).
- Erraud A., Bonnard M., Chaumot A., Geffard O., Dufлот A., Forget-Leray J., Le Foll F., Geffard A., Xuereb B. (2018). Use of the sperm DNA integrity in *Palaemon serratus* (Pennant 1777) as an exposure marker to the contamination: intrinsic variability, baseline level and in situ deployment. *Water Research* 132: 124-134.
- Erraud A., Bonnard M., Dufлот A., Geffard A., Danger J.-M., Forget-Leray J., Xuereb B. (2018). Assessment of sperm quality in palaemonid prawns using Comet assay: methodological optimization. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 11226-11237.
- Ferron, A., 2000. An appraisal of condition measures for marine fish larvae with particular emphasis on maternal contribution, circadian periodicity, and the time response of nucleic acids and proteins. PhD thesis, McGill University. 309 pp.

- Fragoso, N.M., Hodson, P.V., Zambon, S., 2006. Evaluation of an exposure assay to measure uptake of sediment PAH by fish. *Environ. Monit. Assess.* 116, 481–511.
- Gagnon M. M., Rawson C. A., 2017. Bioindicator species for EROD activity measurements: A review with Australian fish as a case study. *Ecol. Indicator.* 76, 166-180.
- ICES: International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen (Denmark). (2012). Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects.
- Kopecka-Pilarczyk, J. (2010). The effect of pesticides and metals on acetylcholinesterase (AChE) in various tissues of blue mussel (*Mytilus trossulus* L.) in short-term in vivo exposures at different temperatures. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 45(4), 336-346.
- Kuhr, R. J., & Dorough, H. W. (1976). *Carbamate insecticides: chemistry, biochemistry, and toxicology*. CRC Press, Inc..
- Oikari, A. (2006). Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic Toxicology*, 78(4), 370-381.
- 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.
- Sanchez, W., Bado-Nilles, A., & Porcher, J. M. (2012). Biomarqueurs chez le poisson : un outil d'intérêt pour le contrôle d'enquête. *La Houille Blanche*, (2), 49-54.
- SDIS-76, 2019. Audition parlementaire – fiches thématiques consolidées. 90p.
- Soreq, H., & Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), 294-302.
- SGIMC, I., 2011. Report of the study group on integrated monitoring of contaminants and biological effects (SGIMC) 14-18 March, Copenhagen, Denmark. ICES CM.
- Vasconcelos, R. P., Reis-Santos, P., Fonseca, V., Ruano, M., Tanner, S., Costa, M. J., & Cabral, H. N. (2009). Juvenile fish condition in estuarine nurseries along the Portuguese coast. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 82(1), 128-138.
- Vieira L.R., Gravato C., Soares A.M.V.M., Morgado F., Guilhermino L., 2009. - Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere*, 76(10): 1416-1427.
- TOXEM, 2020f. Etude Lubrizol n°5 – prélèvements de sédiments des 10 et 11 février 2020.50p.
- Xuereb B. (coord.), Barjhoux I., Bustamante P., 2019. Projet ECOTONES : Effets de la contamination sur les organismes de l'estuaire de la Seine. Rapport de recherche du programme Seine-Aval 5, 42 p.

POUR PLUS D'INFORMATIONS SUR LE GIP SEINE-AVAL

www.seine-aval.fr

CONTACT

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

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

Amara R., Laroche J., Couteau J., Xuereb B., Pichereau V., Diop M., 2020. Biomonitoring actif (encagement de flets et de crevettes) pour le suivi de l'impact de l'incendie du 26 septembre 2019 des installations « Lubrizol / NL Logistique ». Rapport de recherche réalisé pour le GIP Seine-Aval, 34p.

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 :

