



# MESURE DE BIOMARQUEURS SUR *PLATICHTHYS FLESUS* PRELEVES EN ESTUAIRE DE SEINE EN SEPTEMBRE 2019

Janvier 2020

J. Couteau



## TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>4</b>
<b>A- BIOMARQUEURS MIS EN ŒUVRE</b>	<b>5</b>
1 Numération des micronoyaux	5
2 Test des COMETES	5
3 Mesure de l'activité AChE	5
4 Mesure de l'activité EROD	6
5 Dosage de la VTG	6
6 Mesure de l'intersexualité ( <i>ovotestis</i> )	6
7 Histopathologie hépatique	7
8 Maturation ovocytaire	7
9 Stabilité lysosomale	7
<b>B- RESULTATS</b>	<b>9</b>
1 Numération des micronoyaux	10
2 Test des COMETES	10
3 Activité AChE	11
4 Activité EROD	12
5 Dosage de la VTG chez les mâles	12
6 Ovotestis ou Intersexualité	13
7 Histopathologie hépatique	14
8 Maturation ovocytaire	15
9 Stabilité de la membrane lysosomale	16
<b>CONCLUSION</b>	<b>18</b>
<b>ANNEXE 20</b>	
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>21</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Evolution du taux de micronoyaux (‰) sur les cellules sanguines des individus de flets prélevés en estuaire de Seine dans le cadre du suivi « Biomarqueurs ».	10
Figure 2 : Evolution de la dégradation de l'ADN des érythrocytes de flets mesurée par le test des COMETES dans le cadre du suivi « Biomarqueurs » en estuaire de Seine.	11
Figure 3 : Evolution de l'activité AChE mesurée dans le cerveau des individus de flets prélevés en estuaire de Seine dans le cadre du suivi « Biomarqueurs ».	11
Figure 4 : Evolution de l'activité EROD mesurée dans le foie des individus de flets prélevés en estuaire de Seine dans le cadre du suivi « Biomarqueurs ».	12
Figure 5 : Evolution de la concentration plasmatique de VTG mesurée chez les flets mâles dans le cadre du suivi « Biomarqueurs » en estuaire de Seine.	13
Figure 6 : Evolution du taux d'intersexualité chez les flets mâles prélevés en estuaire de Seine dans le cadre du suivi « Biomarqueurs ».	14
Figure 7 : Evolution du Fish Diseases Index déterminé sur les flets prélevés en estuaire de Seine dans le cadre du suivi «Biomarqueurs».	15
Figure 8 : Evolution de l'indice de maturation ovocytaire déterminé chez les flets femelles prélevées en estuaire de Seine dans le cadre du suivi «Biomarqueurs».	16
Figure 9 : Stabilité de la membrane lysosomale mesurée chez des flets en 2019 (moyenne).	16
Figure 10 : Stabilité de la membrane lysosomale mesurée chez des flets en 2019 (par individu).	17
Figure 11 : Synthèse graphique de l'approche IBR menée différents biomarqueurs mesurés sur le flet dans le cadre du suivi « biomarqueurs » en estuaire de Seine.	19
Figure 12 : Indices Gonado-Somatiques obtenus sur les différents prélèvements de flets dans le cadre du suivi « Biomarqueurs » en estuaire de Seine.	20
Figure 13 : Indices Hépatato-Somatiques obtenus sur les différents prélèvements de flets dans le cadre du suivi « Biomarqueurs » en estuaire de Seine.	20
Tableau 1 : Liste des biomarqueurs recommandés par le CIEM chez le flet et mesurés dans le cadre du suivi biomarqueurs. ....	9
Tableau 2 : Catégorisation des lésions hépatiques proposée par le programme BELQUAM. ....	14

## INTRODUCTION

Dans le cadre des projets ECOTONES et HQFISH, financés par le GIP Seine-Aval, différentes mesures de biomarqueurs ont été réalisées et optimisées en 2015, 2016, 2017 et 2018 sur des poissons prélevés dans l'estuaire de la Seine. Suite à ces projets, la mesure de biomarqueurs sur une espèce représentative de l'estuaire de la Seine (*Platichthys flesus*) s'est imposée comme un outil de biosurveillance d'un intérêt majeur. L'interprétation des résultats basée sur l'approche IBR permet de réaliser un monitoring à moyen et long terme du grand système estuarien qu'est l'estuaire de la Seine en qualifiant l'impact de sa contamination sur le vivant et son évolution. C'est dans cette optique qu'une pêche de flets a été réalisée en septembre 2019 afin d'assurer une continuité dans la mesure des biomarqueurs et donc dans l'utilisation de cet outil de biosurveillance. 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 (Conseil International d'Exploitation de la Mer).

**Réception des échantillons** : 11 septembre 2019

**Début d'expérimentation** : 19 septembre 2019

**Fin d'expérimentation** : 21 octobre 2019



### 1 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 toutes deux à l'apparition de mutations chromosomiques stables et héréditaires. Les critères de détermination des micronoyaux (Med Pol Biomonitoring Programme, 1999) sont les suivants :

- 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 être parfaitement dissocié du noyau principal.

Suite à la prise de sang réalisée sur les poissons vivants, 10 µl ont été déposés sur une lame de microscopie puis étalés à l'aide d'une lamelle. Après séchage à température ambiante, les cellules sanguines ont été fixées par passage des lames 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). La fréquence de base du nombre de MN dans les érythrocytes de poisson représente une limitation à son utilisation (Bolognesi *et al.*, 2006). Ainsi, dans le cadre du suivi mis en place sur l'estuaire de la Seine et selon les recommandations de Machado Da Rocha *et al.* en 2009, l'analyse est réalisée sur 2000 cellules et sur un nombre constant d'animaux (n=30).

### 2 Test des COMETES

Complémentaire du test de numération des micronoyaux, le test des comètes est un outil sensible et capable de fournir une réponse précoce suite à l'exposition des organismes aquatiques à des agents génotoxiques. Il permet de mesurer les cassures « simple brin » ou « double brin » de l'ADN. Suite à la prise de sang sur les individus vivants, 10 µl de sang ont été ajoutés à 1 ml de liquide de cryoconservation Vindeloff dans un cryotube de 2 ml. Après une congélation rapide dans l'azote liquide, les tubes ont été conservés à -80°C jusqu'à analyse selon les recommandations de Tice *et al.* (1988) et Azqueta & Collins (2013). L'analyse automatisée des comètes (détermination du % d'ADN dans la queue de comète = % DNA Tail) a ensuite été réalisée grâce à une plateforme HCS CellInsight CX5 (Thermo).

### 3 Mesure de l'activité AChE

La mesure de l'activité acétylcholinestérase (AChE) chez les organismes marins permet 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 inhibée suite à l'exposition des organismes à de nombreuses molécules chimiques organiques et métalliques (Zinkl *et al.*, 1991 ; Brown *et al.*, 2004). Dans le cadre de cette étude, la mesure



de l'activité AChE a été réalisée sur le cerveau selon le protocole de référence publié par Bocquené & Galgani en 1998. Pour cela, après le sacrifice de l'individu, le cerveau a été prélevé puis conservé à -80°C jusqu'à analyse.

#### 4 Mesure de l'activité EROD

Les complexes enzymatiques de biotransformation interviennent, entre autre, dans la métabolisation des molécules xénobiotiques en vue d'augmenter leur hydrosolubilité et donc leur élimination. Les cytochromes P450 de la famille 1A sont des enzymes intervenant 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 ainsi 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.

#### 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 flets mâles via un ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indirect, en utilisant un anticorps polyclonal anti-VTG de Turbot et de la VTG purifiée de cette espèce pour la réalisation de la gamme étalon.

#### 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 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. Pour cette analyse, les gonades une fois prélevées ont été sectionnées en 3 parties distinctes puis placées dans une cassette histologique avant d'être conservées dans un liquide fixateur (formol à 4%). Après déshydrations et inclusions en paraffine, des sections de 3 à 5 µm des 3 parties différentes 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 distinctes par gonade mâle afin de mettre en évidence la présence potentielle de cellules sexuelles femelles.

## 7 Histopathologie hépatique

L'analyse histologique des dommages hépatiques est reconnue comme une réponse intégrée et utilisée depuis plusieurs années 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 la mise en place de cette analyse, un morceau de foie de 5mm x 5mm a été prélevé sur chaque individu puis placé dans une cassette histologique avant d'être conservé 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.

## 8 Maturation ovocytaire

L'analyse histologique des gonades est une méthodologie qui permet de déterminer précisément le stade de maturation des ovocytes chez les femelles. Plusieurs stades de maturation ovocytaires (de 1 à 4) ont été définis selon l'ICES WKMS report (2012), grâce auxquelles un indice global de maturation individuel peut être déterminé selon l'approche présentée par Daouk et collaborateurs en 2011. Pour cela, les gonades une fois prélevées ont été sectionnées en 3 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 5 µm des 3 parties différentes de la gonade ont été placées sur une lame de microscopie avant coloration hématoxyline/Eosine (H/E). L'observation à l'aide d'un microscope optique des différentes sections de la gonade femelle a été réalisée afin de valider l'homogénéité de la maturation. Ensuite, le pourcentage de chaque stade ovocytaire est déterminé sur un nombre total d'ovocytes supérieur à 100 afin de calculer un indice de maturité global.

## 9 Stabilité lysosomale

L'intégrité lysosomale est une cible pour les différents stress environnementaux chez l'ensemble des organismes eucaryotes (Cuervo, 2004). La mesure de la stabilité lysosomale est un biomarqueur de stress général (Moore *et al.*, 1976) dont l'application est recommandée par arrêté du ministère de l'Ecologie et du Développement Durable et de l'Energie du 17 décembre 2012 quant à la définition du « Bon état Ecologique » des eaux marines. La mesure de la stabilité lysosomale sur les hépatocytes de poissons, est basée sur l'évaluation de l'activité d'une enzyme lysosomale : la phosphatase acide. L'évaluation de la perturbation de l'intégrité de la membrane lysosomale chez le poisson consiste à évaluer l'augmentation de la perméabilité membranaire à un substrat de cette enzyme. Pour effectuer cette mesure, des cryocoupes (10 µM) de foie ont subi différents temps de labilisation acide (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40 min). Ensuite, les coupes ont été incubées

dans un tampon contenant un substrat de la phosphatase acide avant d'être transférées dans une solution de post-couplage (Fast blue RR salt à 0,1% dans du tampon phosphate 0,1 M). Les coupes ont été analysées au microscope optique (x40) afin de déterminer l'intégrité de la membrane lysosomale qui est exprimée en période de labilisation (LP, en min) et qui est corrélée à l'augmentation d'intensité de la coloration (Broeg *et al.*, 1999 ; UNEP/RAMOGÉ, 1999; ICES, 2004). Pour chaque coupe histologique, 4 zones distinctes ont été analysées pour déterminer une valeur finale de LP par individu et qui correspond à la moyenne des 4 zones.

## B- RESULTATS

Les biomarqueurs mesurés sur les filets pêchés en estuaire de la Seine depuis plusieurs années sont préconisés par le CIEM pour évaluer les effets de la contamination sur les organismes marins. Leur utilisation en routine 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 les seuils de stress significatif (EAC) ne sont pas tous déterminés [Tableau 1]. Ainsi, pour améliorer l'interprétation et l'utilisation des résultats obtenus par la mesure de biomarqueurs dans des programmes de gestion environnementales, une interprétation selon une approche IBR a été initiée avec le LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux). L'IBR (Integrated Biomarker Response) est un outil synthétique permettant d'intégrer les mesures de multiple biomarqueurs au sein d'un indice permettant de globaliser de façon simple et claire les différentes réponses biologiques. L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette campagne 2019 est intégré aux graphiques du suivi « biomarqueurs » en annexe 1.

**Tableau 1 : Liste des biomarqueurs recommandés par le CIEM chez le flet et mesurés dans le cadre du suivi biomarqueurs.**

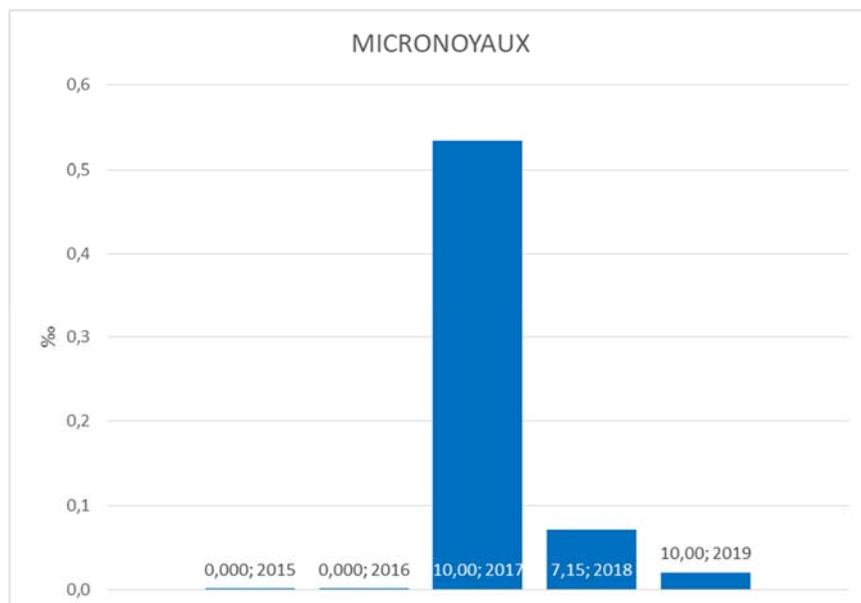
Effet biologique chez le Flet	BAC <sup>1</sup>	EAC <sup>2</sup>
Micronoyaux	0,3‰	-
EROD	24 pmol/min/mg prot	-
AChE (cerveau)	-	-
Test des comètes	-	-
Ovo testis	5%	-
Histologie hépatique	-	-
Vtg	0,13 µg/ml	-
Maturation ovocytaire		
Stabilité lysosomale	20 minutes	10 minutes

<sup>1</sup> BAC : Background Assessment Criteria

<sup>2</sup> EAC : Environmental Assessment Criteria

## 1 Numération des micronoyaux

Depuis la mise en place du suivi biomarqueurs en 2015, le taux moyen de micronoyaux le plus important a été observé en 2017 :  $0,53\text{‰} \pm 0,7$  ( $n = 30$  individus). Depuis 2017, le taux moyen de micronoyaux est inférieur à  $0,1\text{‰}$  ( $0,07\text{‰}$  en 2018 et  $0,02\text{‰}$  en 2019). Il est important de constater que le pourcentage d'individus présentant des cellules micronucléées est quasiment identique depuis 2017 est proche de 10% [Figure 1]. La BAC définie pour ce biomarqueur étant égale à  $0,3\text{‰}$ , seul l'échantillonnage de 2017 a permis de considérer à cette époque l'estuaire de la Seine comme « impacté » par une pression génotoxique significative.



Est indiqué en abscisse le nombre d'individus impactés par des cellules micronucléées et l'année d'échantillonnage.

Figure 1 : Evolution du taux de micronoyaux (% $\text{‰}$ ) sur les cellules sanguines des individus de flets prélevés en estuaire de Seine dans le cadre du suivi « Biomarqueurs ».

## 2 Test des COMETES

L'analyse des dommages à l'ADN par le test des COMETES sur les érythrocytes de flet a été initiée en estuaire de Seine en 2016. Les résultats obtenus depuis 2016, montrent que c'est en 2017 que le % DNA Tail le plus bas a été mesuré : 26,84% [Figure 2]. Ce résultat montre que le test des COMETES et le test de numération des micronoyaux traduisent des niveaux d'intégration de la génotoxicité différents et donc des conséquences différentes justifiant notamment leur association. Le test des COMETES traduit une réponse immédiate et précoce liée à des dommages à l'ADN généralement transitoires dans la mesure où ils sont susceptibles d'être réparés. Un micronoyau représente quant à lui un dommage génotoxique plus grave dans la mesure où il est irréversible et héréditaire. Cette année (2019), le % DNA Tail est statistiquement plus bas que celui mesuré en 2018 mais plus important que celui mesuré en 2017.

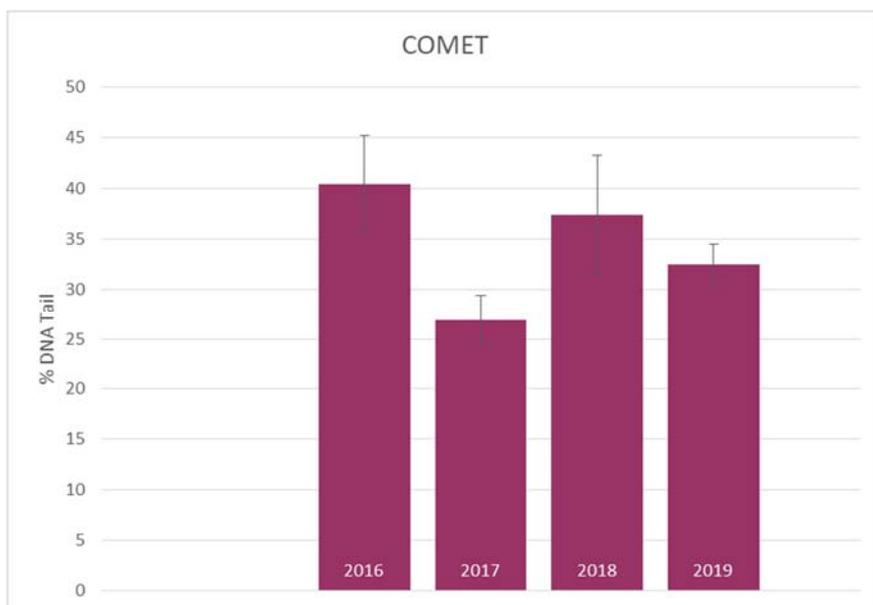


Figure 2 : Evolution de la dégradation de l'ADN des érythrocytes de flets mesurée par le test des COMETES dans le cadre du suivi « Biomarqueurs » en estuaire de Seine.

### 3 Activité AChE

Chez le flet, les activités AChE mesurées depuis 2016, montraient une inhibition constante et significative jusqu'en 2018. L'activité AChE mesurée cette année montre une augmentation par rapport à celle mesurée en 2018, inversant ainsi la tendance qui était observée depuis 2016 même si aucune différence statistique significative ne peut être mise en évidence [Figure 3]. **Les activités mesurées depuis 2017 tendent à montrer un niveau basal d'activité AChE compris entre 80 et 50 nmol/min/mg de protéines.**

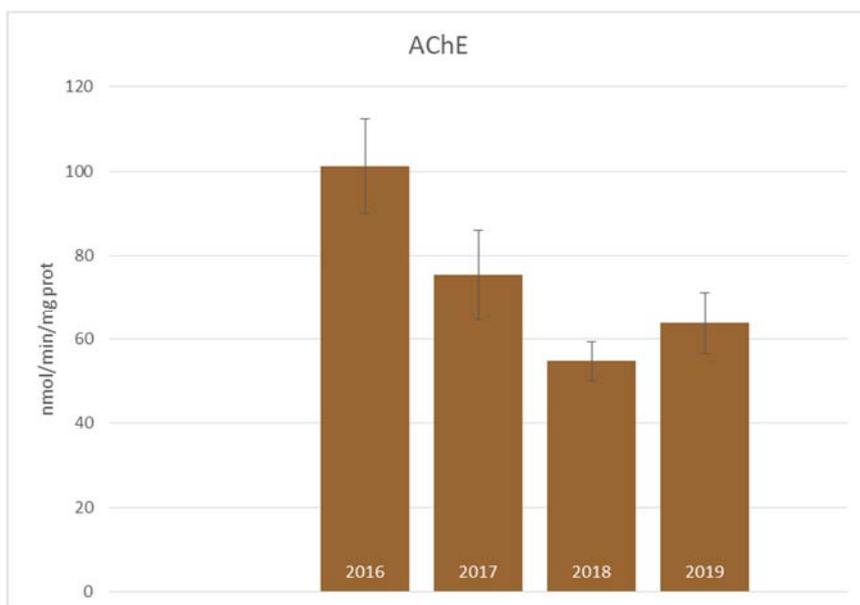


Figure 3 : Evolution de l'activité AChE mesurée dans le cerveau des individus de flets prélevés en estuaire de Seine dans le cadre du suivi « Biomarqueurs ».

## 4 Activité EROD

Les mesures d'activité EROD obtenues en estuaire de la Seine sur le flet montrent une activité moyenne très élevée en 2015 (>90 pmol/min/mg prot), largement supérieure au niveau de base défini par le SGIMC (24 pmol/min/mg de prot), permettant donc de considérer l'estuaire de la Seine en 2015 comme un milieu contaminé [Figure 4]. **A partir de 2016 et cela jusqu'à cette année 2019, les activités EROD se sont véritablement effondrées (respectivement 13,9 / 9,47 / 6,82 et 4,56 pmol/min/mg prot), traduisant potentiellement une diminution de l'exposition des organismes à des molécules induisant l'expression des CYP450s.**

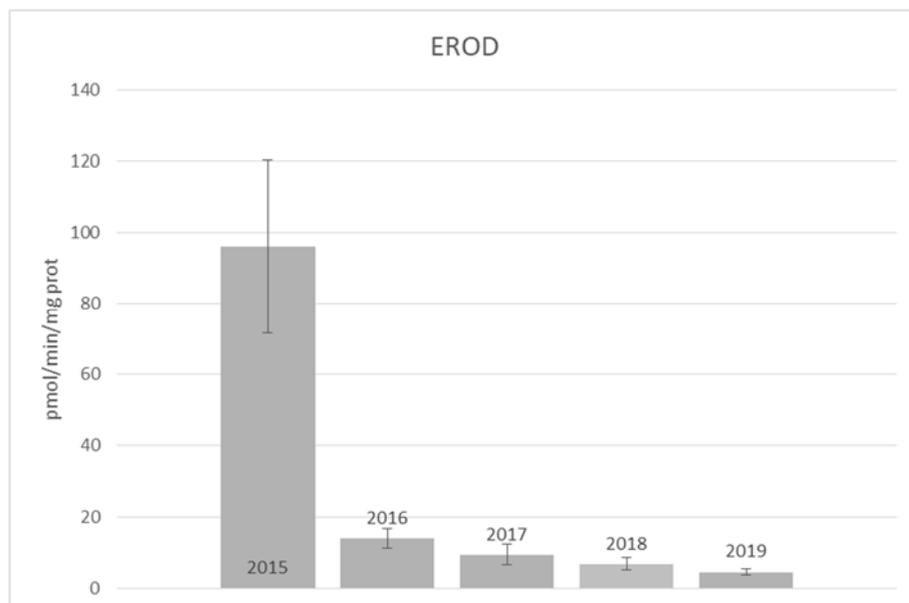


Figure 4 : Evolution de l'activité EROD mesurée dans le foie des individus de flets prélevés en estuaire de Seine dans le cadre du suivi « Biomarqueurs ».

## 5 Dosage de la VTG chez les mâles

En 1999, Allen et collaborateurs ont montré que la concentration plasmatique de VTG chez des flets mâles pêchés dans des estuaires anglais contaminés était de 7,9 µg/mL (Allen *et al.*, 1999). En 2008, Minier et collaborateurs ont montré que 100% des flets mâles analysés présentaient des concentrations plasmatiques en VTG supérieures à 1 µg/mL alors qu'ils n'étaient que 67% en 2001 (Minier *et al.*, 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 réalisé chez les flets mâles depuis 2015 met en évidence des concentrations plasmatiques moyennes relativement faibles ≤ 25 ng/mL. Ces niveaux, bien que très faibles par rapport à 2008, étaient en augmentation entre 2015 et 2018 passant de 3 ng/mL à 25 ng/mL [Figure 5]. Durant cette période, 100% des mâles analysés présentaient une concentration plasmatique inférieure à 45 ng/mL. **Cette année, la concentration moyenne de VTG est plus faible que celle mesurée en 2018 (19,75 ng/mL contre 25,15 ng/mL). Cependant, cette année et cela pour la première fois depuis la mise en place du suivi « Biomarqueurs », un mâle présente une concentration plasmatique de VTG supérieure à 130 ng/mL, niveau de base mentionné par le CIEM (individu 2019F14 à**

133,21 ng/mL). Le suivi de ce biomarqueur montre bien que l'estuaire de la Seine est nettement moins impacté qu'il y a une dizaine d'années mais que la problématique de féminisation des poissons mâles reste bien présente.

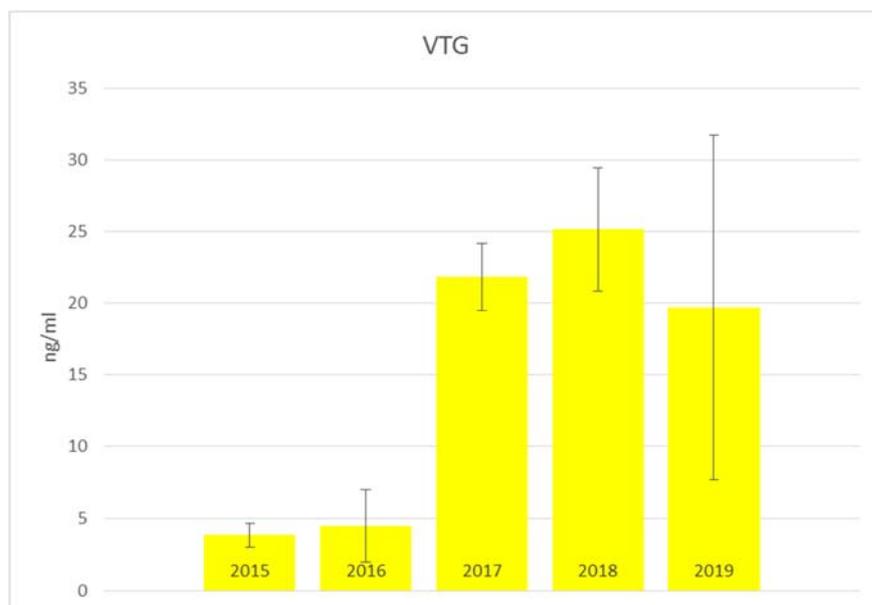


Figure 5 : Evolution de la concentration plasmatique de VTG mesurée chez les flets mâles dans le cadre du suivi « Biomarqueurs » en estuaire de Seine.

## 6 Ovotestis ou Intersexualité

La présence d'individus intersexués traduit une exposition précoce des individus à des perturbateurs endocriniens. Ce phénomène couramment observé lors d'expositions en laboratoire est finalement peu répandu *in natura*. 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 ; Projet ICON 2010).

Depuis 2010, seule l'année 2016 a permis de mettre en évidence la présence d'individus intersexués : 21% de mâles intersexués (4 sur 19 mâles) [Figure 6]. Ce résultat largement supérieur à l'EAC défini par le CIEM (5%) a permis de montrer que ce phénomène de féminisation était toujours bien présent en estuaire de la Seine. **Depuis 2016, aucun individu mâle échantillonné n'a présenté de signes d'intersexualité.** Cela peut cependant s'expliquer notamment par un nombre relativement faible d'individus mâles échantillonnés par campagne (moyenne de 14,3 sur 30 individus) combiné à une incidence basale de l'intersexualité relativement faible (5%). D'un point de vue statistique, une mesure représentative de ce biomarqueur nécessiterait l'analyse d'une trentaine de poissons mâles. Cependant, une pêche régulière et annuelle d'un tel nombre d'individus étant éthiquement inenvisageable, la mesure de ce biomarqueur pourrait être réalisée uniquement tous les deux ou 3 ans.



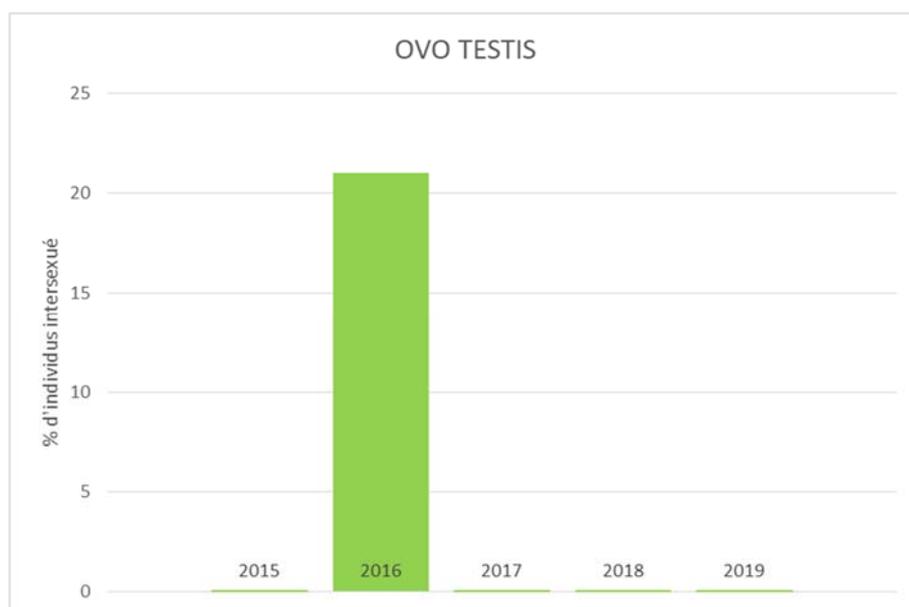


Figure 6 : Evolution du taux d'intersexualité chez les flets mâles prélevés en estuaire de Seine dans le cadre du suivi « Biomarqueurs ».

## 7 Histopathologie hépatique

Dans le but d'harmoniser la méthodologie d'évaluation des histopathologies hépatiques, le programme BEQUALM a développé une grille d'évaluation des différents dommages hépatiques [Tableau 2]. En donnant une note de gravité pour chaque catégorie de pathologie, nous avons déterminé une note globale pour chaque campagne d'échantillonnage qui correspond à un FDI (Fish Diseases Index) spécifique aux dommages hépatiques.

Tableau 2 : Catégorisation des lésions hépatiques proposée par le programme BELQUAM.

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



L'analyse histologique des foies de flets prélevés dans l'estuaire de la Seine depuis 2016, montre une prédominance de lésions non spécifiques qui sont majoritairement des infiltrations hémocytaires et/ou des surcharges lipidiques au niveau des hépatocytes (lipidose). Les altérations hépatiques les plus « graves » observées sont les Foyers de Cellules Altérées (FCA) et ont impacté au maximum 6% des individus en 2016 et 2018. Depuis la mise en place du suivi « biomarqueurs », le FDI est relativement stable et compris entre 0,8 et 1,4 [Figure 7].

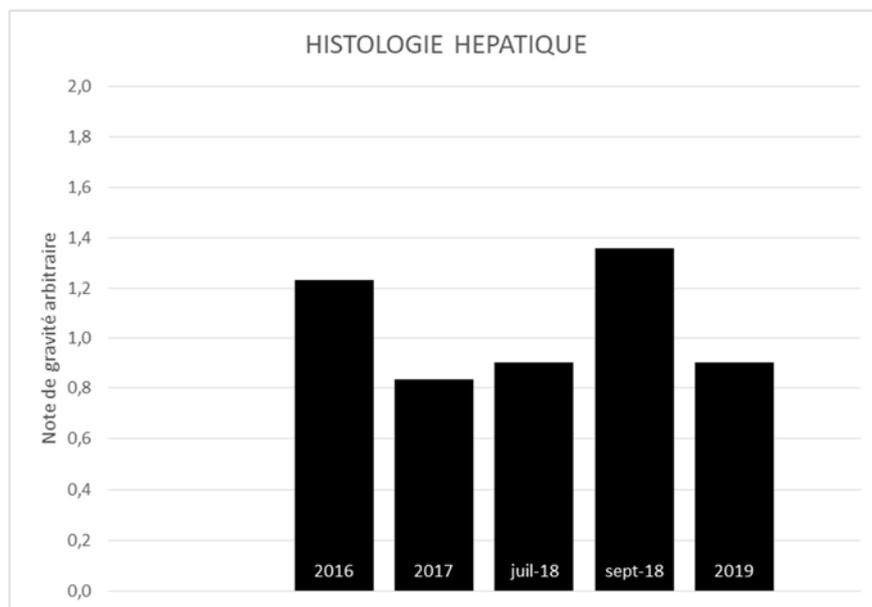


Figure 7 : Evolution du Fish Diseases Index déterminé sur les flets prélevés en estuaire de Seine dans le cadre du suivi «Biomarqueurs».

## 8 Maturation ovocytaire

La détermination de l'indice de maturation ovocytaire a été mis en place en 2019 en parallèle d'une analyse rétrospective sur l'ensemble des prélèvements jusqu'à 2015. Les résultats obtenus montrent que l'indice issu de l'analyse histologique permet bien de discriminer, en lien avec la période de reproduction, des femelles pêchées en janvier de celles pêchées en juillet [Figure 8]. Des analyses réalisées sur des flets femelles pêchées en Canche permettent d'obtenir des indices similaires à ceux obtenus en Seine à la même période (données HQFISH). Le suivi de la maturation ovocytaire sur le long terme doit mettre en évidence l'impact potentiel du réchauffement climatique sur les individus femelles de l'estuaire de la Seine et sur un décalage de la période de ponte vers les mois de mars, avril et/ou mai. Ceci explique notamment la présence d'individus G0 de petites tailles lors des prélèvements de septembre pouvant impacter potentiellement le recrutement des juvéniles.



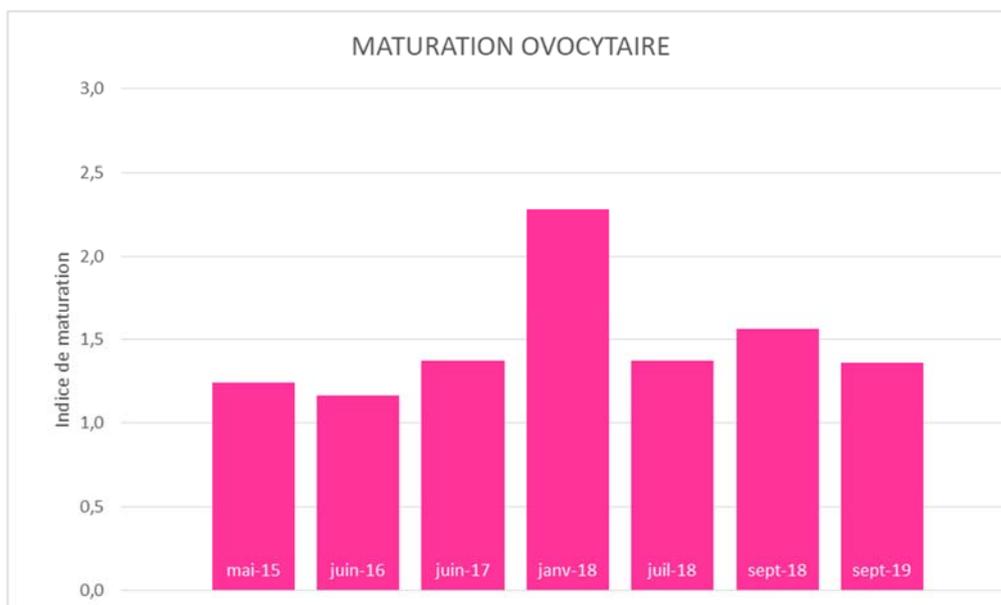


Figure 8 : Evolution de l'indice de maturation ovocytaire déterminé chez les flets femelles prélevées en estuaire de Seine dans le cadre du suivi «Biomarqueurs».

## 9 Stabilité de la membrane lysosomale

La valeur moyenne de la période de labilisation (LP) des 10 individus analysés en 2019 est de  $9,43 \pm 3,16$ . Cette valeur moyenne de LP est inférieure à l'EAC (=10 minutes) permettant de caractérisés les individus comme « sévèrement stressés et présentant probablement une pathologie » (Moore *et al.*, 2006). Sur les 10 individus analysés cette année, seul un individu présente une valeur moyenne de LP supérieure à l'EAC (17,5 min  $\pm$  2,89) [Figure 9 ; Figure 10]. A noter que la valeur moyenne obtenue en 2019 est relativement proche de celles observées chez des flets provenant de sites pollués (Broeg *et al.*, 1999, Barsiené *et al.*, 2006).

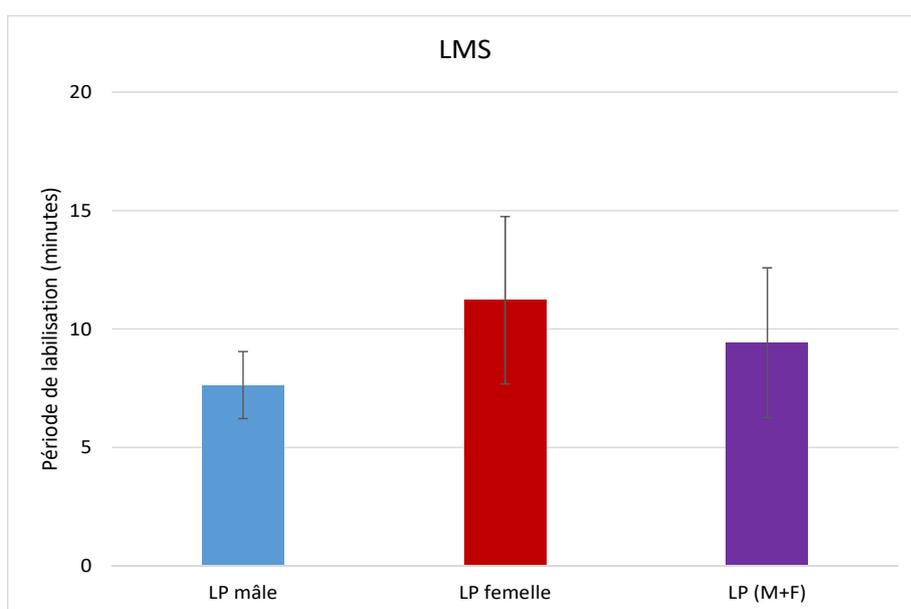


Figure 9 : Stabilité de la membrane lysosomale mesurée chez des flets en 2019 (moyenne).

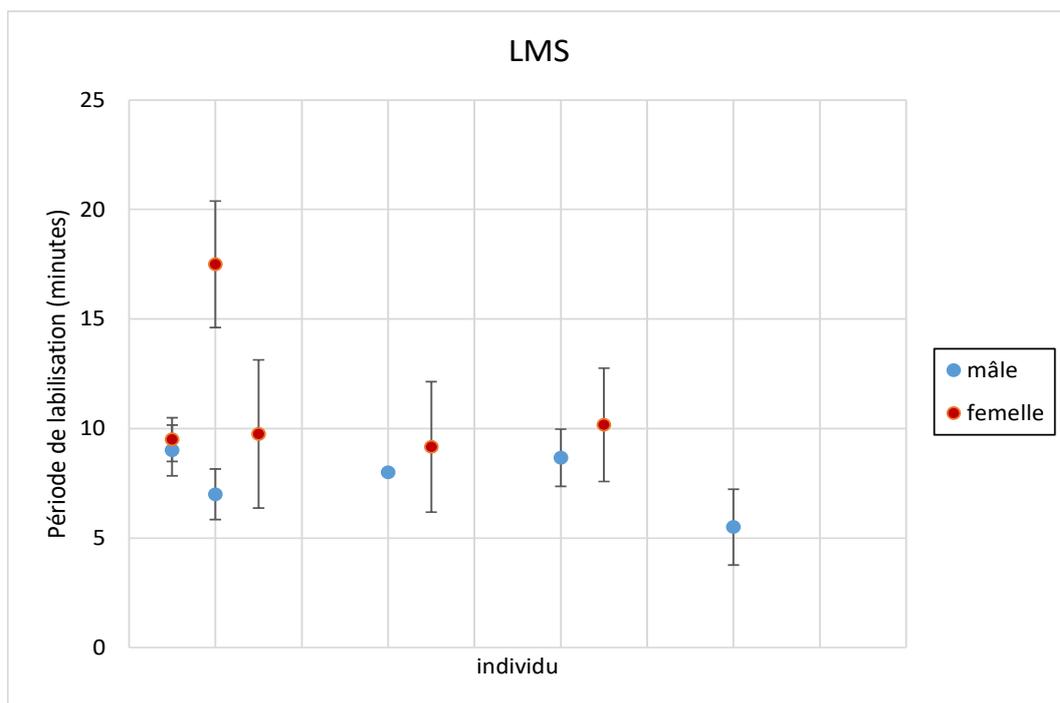


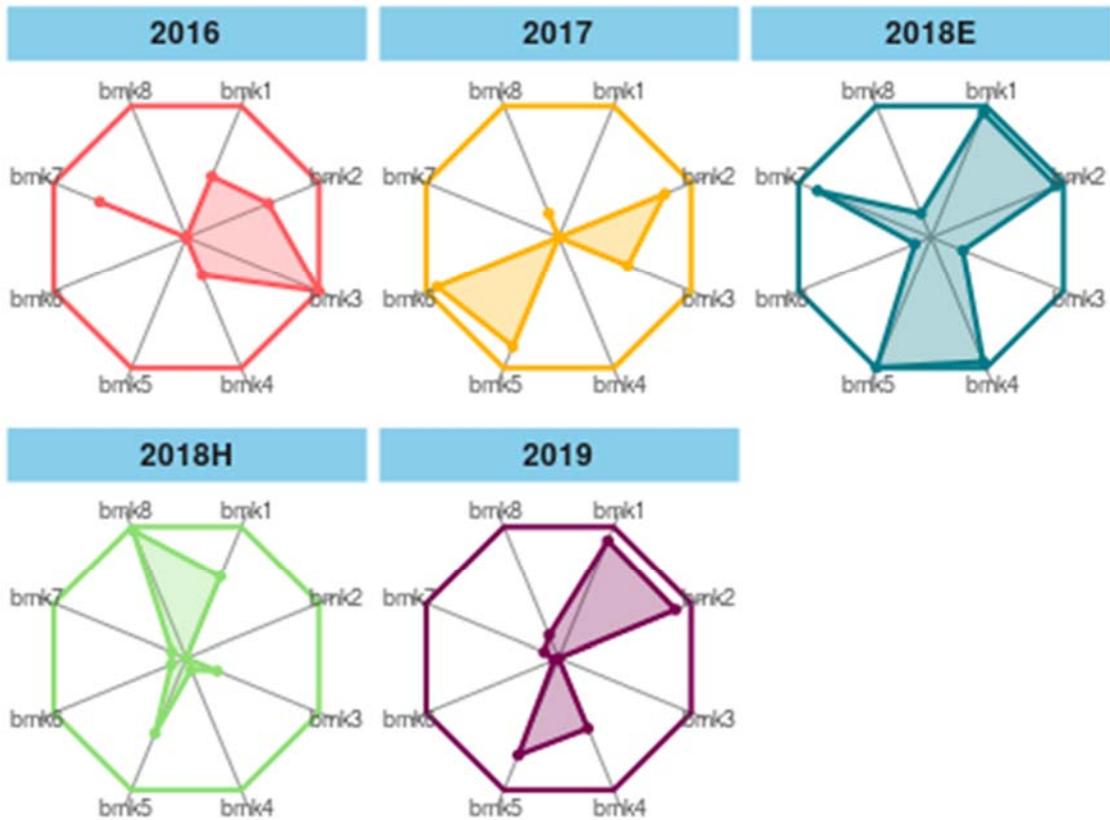
Figure 10 : Stabilité de la membrane lysosomale mesurée chez des flets en 2019 (par individu).

## CONCLUSION

De manière globale, le niveau de réponse des marqueurs biologiques mesurés chez le flet en 2019 est identique à celui observé les années précédentes et sont largement inférieures à ceux obtenus il y a une dizaine d'année.

Il semble important d'insister sur quelques réponses obtenues, indiquant cependant que l'estuaire de la Seine reste un écosystème perturbé impactant sur les individus qui y vivent. Cette année, et pour la première fois depuis le début du suivi « Biomarqueurs » dans l'estuaire de la Seine, un individu mâle présente une concentration plasmatique de VTG supérieure à l'EAC. De la même manière, la stabilité lysosomale qui n'avait jamais été mesurée sur des flets en estuaire de la Seine, permet de caractériser les individus pêchés cette année comme sévèrement stressés. Enfin, l'indice de maturation ovocytaire semble être un excellent moyen d'évaluer l'impact du réchauffement climatique sur les périodes de pontes des femelles adultes mais également sur le recrutement des flets juvéniles en estuaire de Seine. Une analyse régulière de ce marqueur en période pré-ovulatoire (janvier/février) permettrait d'estimer un décalage potentiel des périodes de pontes.

Les réponses obtenues pour les autres biomarqueurs mettent en évidence l'établissement de niveaux de base qui permettent de caractériser l'estuaire de la Seine dans son état « normal » d'écosystème soumis à divers stress, notamment chimiques. L'établissement de ces niveaux de base donne beaucoup d'intérêt à une analyse de données selon l'approche intégrée de biomarqueurs (IBR) dans la mesure il est nécessaire de parfaitement caractériser les réponses biologiques afin d'en connaître les variations naturelles et ainsi d'en dégager les modifications indicatrices de perturbations. (Devin *et al.*, 2014). L'IBR est une approche multi-biomarqueurs aisée à intégrer dans le cadre des politiques environnementales et 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. Cette méthode présente l'avantage de fournir une synthèse graphique des différentes réponses de biomarqueurs [Figure 11] et une valeur numérique intégrant l'ensemble des réponses. La représentation graphique apportée par l'approche IBR met en exergue une grande variabilité des profils au début du suivi « biomarqueur » sur l'estuaire de la Seine (2016, 2017 et 2018E) caractéristique d'un milieu soumis à des stress multiples. On remarque une diminution de cette variabilité ces deux dernières années (2018 et 2019 ; prélèvements de septembre) ce qui tend à montrer une certaine homogénéisation des stress dans l'estuaire de la Seine ces deux dernières années. Cela montre également que le suivi régulier mis en place permet de dessiner les niveaux de base des biomarqueurs mesurés, permettant de qualifier l'état dit « normal » de cet écosystème. Ainsi, dans la mise en place dans la durée du suivi « biomarqueur » il sera possible d'estimer l'évolution de ce grand système estuarien : dégradation, maintien ou restauration. Il est important de noter que les profils IBR permettent de discriminer « Été » et « Hiver », c'est-à-dire « période de reproduction et pré-ovulatoire » et « hors période de reproduction » (voir année 2018). De ce fait, afin d'utiliser cet outil comme un indicateur de contamination ponctuelle et/ou accidentelle, il paraît pertinent d'établir les niveaux de base également en période de reproduction. Enfin, en gardant à l'esprit que l'IBR synthétise les réponses biologiques mesurées, il paraît indispensable que pour le consolider et donc l'optimiser pour son utilisation dans le cadre d'un suivi régulier il est nécessaire d'y intégrer régulièrement des biomarqueurs pertinents et/ou discriminants (maturation ovocytaire, stabilité lysosomale).



*bmk1* : Indice Hépat-Somatique / *bmk2* : Activité AChE / *bmk3* : Activité EROD / *bmk4* : Comet %DNA Tail / *bmk5* : Taux plasmatique de VTG / *bmk6* : Micronoyaux / *bmk7* : Dommages Hépatiques / *bmk8* : Maturation ovocytaire.

**Figure 11** : Synthèse graphique de l'approche IBR menée différents biomarqueurs mesurés sur le flet dans le cadre du suivi « biomarqueurs » en estuaire de Seine.

## ANNEXE

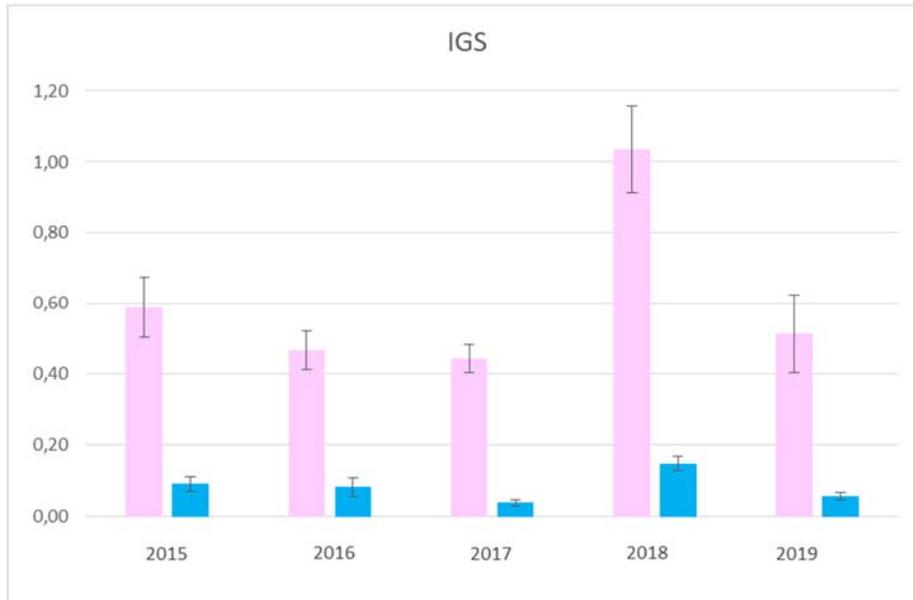


Figure 12 : Indices Gonado-Somatiques obtenus sur les différents prélèvements de flets dans le cadre du suivi « Biomarqueurs » en estuaire de Seine.

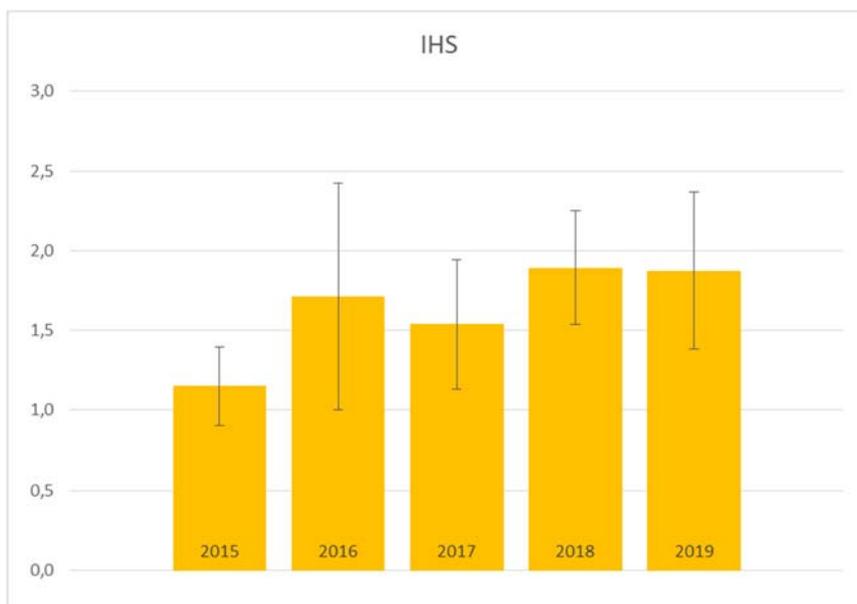


Figure 13 : Indices Hépat-Somatiques obtenus sur les différents prélèvements de flets dans le cadre du suivi « Biomarqueurs » en estuaire de Seine.

## BIBLIOGRAPHIE

- Allen Y., Scott A.P., Matthiessen P., Haworth S., Thain J.E. & Feist S., 1999. Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 1790–1800.
- 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., Lehtonen K. K., Köhler A., Broeg K., Vuorinen P. J., Lang T., Pempkoxiak J., Syvokiene J., Dedonyte V., Rybakovas A., Repecka R., Vuontisjärvi H., Kopecka J., 2006. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipėda-Butinge area (Baltic Sea). *Marine Pollution Bulletin*, 53: 422-436.
- Bocquené G. & Galgani F., 1998. Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate b compounds. *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.
- Broeg K., Zander S., Diamant A., Korting W., Krüner G., Paperna I., Westernhagen V. H., 1999. The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring I. North Sea. *Helgoland Marine Research*, 53: 171-194.
- 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.
- 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.
- Cuervo A. M., 2004. Autophagy: in sickness and in health. *Trends in Cell Biology*, 14: 70-77.
- Daouk T., Larcherc T., Rounsard F., Lyphout L., Rigaud C., Ledevin M., Loizeau V. & Cousin X., 2011. Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. *Aquatic Toxicology*, 105: 270-278.
- Devin S, Burgeot T, Giambérini L, Minguéz L and Pain-Devin S. 2014. The Integrated Biomarker Response revisited: optimization to avoid misuse. *Environ Sci Pollut Res* 21: 2448-2454.
- 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., Gerritson A., Bowmer T. & Komen H., 1996. Feminization of male carp. *Nature*, 384: 221-222.
- ICES (2004) Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability. By M.N. Moore, D. Lowe, and A. Kohler. *ICES TIMES* 36, 31 pp.
- ICES, 2012. *ICES Cooperative Research Report N°315, Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects*: 71pp.

- 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.
- Sanchez W., Katsiadaki I., Piccini B., Ditché 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.
- 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.
- UNEP/RAMOGGE (1999) Manual on the biomarkers recommended for the MEDPOL biomonitoring program. UNEP, Athens, 40 pp.
- 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 fish. Mineau (Ed.), *Cholinesterase Inhibiting Insecticides*, Elsevier, Amsterdam (1991), pp. 233-254.

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

[www.seine-aval.fr](http://www.seine-aval.fr)

#### CONTACT

Groupement d'Intérêt Public Seine-Aval  
Pôle Régional des Savoirs  
115 boulevard de l'Europe  
76100 ROUEN  
Tél : 02 35 08 37 64  
[gipsa@seine-aval.fr](mailto:gipsa@seine-aval.fr)

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

Couteau J., 2020. **Mesure de biomarqueurs sur *Platichthys flesus* prélevés en estuaire de Seine en septembre 2019**. Rapport réalisé par TOXEM pour le GIP Seine-Aval, 22p.

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 :

