

CAMPAGNE DEDIEE A L'EVALUATION DES EFFETS BIOLOGIQUES INDUITS PAR LA CONTAMINATION CHIMIQUE EN BAIE DE LOIRE

SELILOIRE 2020

—

RAPPORT FINAL

Janvier 2025

Auteurs

Aourell Mauffret¹, Nathalie Wessel², Farida Akcha¹, Yann Aminot¹, Nadège Bély¹, Denis Benito³, Sandrine Bruzac¹, Tifanie Briaudeau³, Tiphaine Chouvelon¹, Jérôme Couteau⁴, Yoann Godfrin¹, Karine Héas-moisan¹, Urtzi Izagirre³, Pauline Le Monier¹, Romuald Le Roux¹, Kelig Mahé⁵, Catherine Munsch¹, Nathalie Olivier¹, Charles Pollono¹, Teddy Sireau¹, Bastien Thomas¹, Thierry Burgeot¹

¹ Ifremer, RBE/CCEM, Nantes, France

² Ifremer, REM/BEEP/LEP, Brest, France

³ Toxem, Le Havre, France

⁴ CBET+ Research Group, University Of The Basque Country, Spain

⁵ Ifremer, RBE/HMMN/LRHBL, Boulogne-sur-mer, France

Version

Décembre 2023 : 1ere version du rapport final (v1, pour relecture).

Janvier 2025 : version finale du rapport final (vf)

Diffusion

Publique

Citation

Aourell Mauffret, Nathalie Wessel, Farida Akcha, Yann Aminot, Nadège Bély, Denis Benito, Sandrine Bruzac, Tifanie Briaudeau, Tiphaine Chouvelon, Jérôme Couteau, Yoann Godfrin, Karine Héas-moisan, Urtzi Izagirre, Pauline Le Monier, Romuald Le Roux, Kelig Mahé, Catherine Munsch, Nathalie Olivier, Charles Pollono, Teddy Sireau, Bastien Thomas, Thierry Burgeot (2024). Campagne dédiée à l'évaluation des effets biologiques induits par la contamination chimique en baie de Loire – SELILOIRE 2020, Rapport (103 pages).

Conventions

Le suivi SELILOIRE 2020 et les analyses présentées dans ce rapport ont été co-financés par l'Agence de l'eau Loire Bretagne (AELB) et l'Ifremer ; le temps agent des Responsables Thématiques DCSMM D8 (Aourell Mauffret, Nathalie Wessel) dédiées à cette action (responsabilité de la mission en mer, gestion des échantillons, analyses, données, bancarisation, rédaction du rapport) a été financé sur la convention Ifremer-MTES/DEB.

Convention Ifremer/AELB : CONTRAT SPECIFIQUE D'APPLICATION DE LA CONVENTION CADRE DE COOPERATION (REF. 20/1000954)

Campagnes en Mer

SELI : [10.18142/285](https://doi.org/10.18142/285).

SELILOIRE. N/O Côtes De La Manche 01/09/2020 - 09/09/2020 [10.17600/18001054](https://doi.org/10.17600/18001054)

Table des matières

Résumé	6
1 Introduction – Dispositif SELI	7
1.1 La DCSMM	7
1.2 Campagnes « SELI »	7
1.3 Espèces suivies au cours des SELI	7
1.4 Analyses des SELI	8
1.5 Utilisation des seuils	8
Objectifs	14
2 Matériels et méthodes	15
2.1 Echantillonnage	15
2.1.1 Collecte et dissection des poissons plats.....	15
2.1.2 Collecte et dissection des moules	18
2.2 Analyse des biomarqueurs	20
2.2.1 Test des comètes sur érythrocytes de soles et hémocytes de moules	20
2.2.2 Micronoyaux dans les érythrocytes de soles et les hémocytes de moules.....	20
2.2.3 Activité acétylcholinestérase (AChE)	20
2.2.4 Métabolites de HAP dans les biles de poissons plats (HAP mono-hydroxylés (OH-HAP))	20
2.2.5 Intégrité des lysosomes	20
2.2.6 Analyse histologique des tissus de poissons (foie et gonades) et de moules (glande digestive et gonades)	20
2.3 Analyses des contaminants chimiques chez les poissons plats.....	23
2.3.1 Contaminants organiques dans les muscles de soles.....	23
2.3.2 Mercure dans les muscles de soles	23
2.3.3 Contaminants inorganiques dans les foies de soles	23
2.4 Analyses des contaminants chimiques chez la moule.....	23
2.5 Analyses statistiques	23
2.5.1 Gestion des données censurées (<LOQ).....	24
2.5.2 Comparaison aux seuils	24
2.5.3 Analyses statistiques univariées.....	24
2.5.4 Analyses multivariées et évaluation intégrée	25
3 Résultats – Réponses des biomarqueurs et bioaccumulation des contaminants chez les poissons plats en baie de Loire et Vilaine	26

3.1	Echantillonnage et adaptation aux conditions de terrain	26
3.2	Réponses des biomarqueurs chez les poissons plats prélevés en Baie de Loire.....	30
3.2.1	Biomarqueurs d'état de santé général : Intégrité des lysosomes.....	30
3.2.2	Biomarqueurs de génotoxicité : test des comètes et des micronoyaux	33
3.2.3	Biomarqueurs de neurotoxicité.....	35
3.2.4	Biomarqueurs d'exposition aux HAP : concentrations en métabolites biliaires de HAP	37
3.2.5	Histologie	39
3.3	Concentrations en contaminants	45
3.3.1	Contaminants organiques.....	45
3.3.2	Contaminants métalliques.....	49
3.4	Approche intégrée.....	53
3.4.1	Analyse multivariée	53
3.4.2	Approche par indice cumulé.....	60
3.4.3	Approche par taux de déclassement : Fiche Indicateur proposée pour l'évaluation DCSMM 2024 et Quality Status Report OSPAR (QSR 2023)	62
4	Résultats – Réponses des biomarqueurs et bioaccumulation des contaminants chez les moules en Baie de Loire et Vilaine.....	63
4.1	Biométrie	63
4.2	Biomarqueur d'état de santé général : LMS.....	63
4.3	Biomarqueurs de génotoxicité : tests des comètes et des micronoyaux.....	65
4.4	Biomarqueur de neurotoxicité : activité AChE	66
4.5	Analyse histologique chez la moule	66
4.5.1	Sex-ratio et stades de maturité chez la moule.....	66
4.5.2	Pathologies chez la moule	66
4.6	Approche intégrée par indice.....	69
4.6.1	Approche par indice cumulé.....	69
4.6.2	Approche par taux de déclassement : Fiche Indicateur proposée pour l'évaluation DCSMM 2024	71
5	Conclusions.....	72
	Références.....	75
Annexe 1.	Description des biomarqueurs sélectionnés dans le cadre des SELI	82
Annexe 2.	MM. Age des soles, limandes et flets (Ifremer, RBE/HMMN/LRHBL)	83
Annexe 3.	MM. Test des comètes (Ifremer, RBE/CCEM/LEX)	84
Annexe 4.	MM. Analyse de l'activité AChE (Ifremer, RBE/CCEM/LEX).....	86
Annexe 5.	MM. Métabolites de HAP dans les biles de poissons plats (Université de Bordeaux, LPTC) ..	88
Annexe 6.	MM. Analyses des lysosomes (Université de Bilbao)	89

Annexe 7.	MM. Histologie	91
Annexe 8.	MM. Catégorisation des rangs d’intersex chez les poissons	97
Annexe 9.	MM Contaminants organiques dans les muscles de soles et flets (Ifremer, RBE/CCEM/LBCO) 98	
Annexe 10.	MM Contaminants inorganiques (Ifremer, RBE/CCEM/ LBCM)	101
Annexe 11.	Complément aux analyses statistiques	102

Résumé

Le dispositif « SELI » est mis en place depuis 2017 pour acquérir des données sur les effets biologiques intégrateurs de la contamination chimique chez des organismes marins (poissons et bivalves). Il permet de renseigner la base de données du Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM), et ainsi d'alimenter le groupe de travail ICES/BEC (Biological Effect of Contaminants) et de renseigner le critère 2 du descripteur 8 de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM : Le niveau de concentration des contaminants ne provoque pas d'effets dus à la pollution). Le présent rapport concerne le volet SELILOIRE 2020. Des poissons plats (n=142 soles) ont été collectés du 29 Août au 8 Septembre 2020 dans le cadre d'une campagne réalisée sur le Navire Océanographique (N/O) Côte de la Manche, et des bivalves (n= 120 moules) ont été prélevées en février 2021 à 6 stations dans le cadre du suivi du Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du littoral dans la Matière Vivante (ROCCH MV). Les biomarqueurs suivis sont ceux listés dans l'arrêté national BEE 2019 et couvrent plusieurs modes d'action possibles des contaminants : indicateurs de la santé générale de l'organisme (indices somatiques (e.g. RGS, RHS), stabilité de la membrane lysosomale), biomarqueurs de génotoxicité (cassures de brins de l'ADN (test des comètes) et micronoyaux), biomarqueur de neurotoxicité (AChE), biomarqueur d'exposition aux HAP (métabolites de HAP chez les poissons) et des analyses histologiques (gonade et foie). Les contaminants suivis sont des contaminants organiques hydrophobes (historiques et d'intérêt émergent) et des éléments traces métalliques susceptibles de s'accumuler dans les organismes et/ou de s'amplifier dans les réseaux trophiques (éléments traces, PCB, PBDE, HBCDD, PFAS et pesticides organochlorés (OCP)). L'ensemble de ces analyses permette d'évaluer : 1) *les réponses biologiques observées chez les organismes marins (poissons plats, bivalves)* 2) *le niveau d'imprégnation des organismes marins (poissons plats, bivalves) par les contaminants chimiques*, et à moyen terme : 3) *si les réponses biologiques observées peuvent être associées à l'exposition à un stress chimique dans des zones de pressions anthropiques variées ?* Le présent rapport est organisé selon un niveau d'intégration croissant, il commence par décrire chaque biomarqueur et chaque famille de contaminants individuellement, puis des représentations intégrées sont ensuite proposées pour avoir une vision de plus en plus globale de la contamination chimique et de ses effets en baie de Loire et Vilaine.

1 Introduction – *Dispositif SELI*

1.1 *La DCSMM*

La Directive Cadre Stratégique pour le Milieu Marin (DCSMM 2017/848/EU) établit un cadre d'action communautaire dans le domaine de la politique pour le milieu marin et conduit chaque État membre à élaborer une stratégie en vue de l'atteinte ou du maintien du Bon État Écologique (BEE). Parmi la liste des descripteurs qui permettent de qualifier l'état écologique des eaux, le descripteur 8 concerne les contaminants chimiques et leurs effets sur les organismes marins. La définition du BEE et le Programme de Surveillance (PdS) de la DCSMM ont fait l'objet d'arrêtés français publiés en [2019](#) et [2015](#) respectivement, qui précisent les marqueurs biologiques pertinents et les substances chimiques à suivre pour évaluer l'atteinte ou non du BEE. Les biomarqueurs et les contaminants listés dans ces arrêtés se basent notamment sur les indicateurs communs définis par les conventions des mers régionales (OSPAR et Barcelone), et de plus pour les substances, la Directive cadre sur l'Eau (DCE 2013/39/EU). Les [programmes de surveillance](#) du deuxième cycle de la DCSMM sont intégrés dans le dispositif de suivi des documents stratégiques de façade adoptés fin 2021.

1.2 *Campagnes « SELI »*

Le bon état écologique selon le D8 est atteint quand le niveau de concentration des contaminants ne provoque pas d'effets dus à la pollution. Il est défini par 4 critères dont le 2 qui évalue si « Les caractéristiques liées à la santé des espèces et à l'état des habitats ne subissent pas d'effets néfastes dus aux contaminants, notamment des effets cumulatifs et synergiques ». Le dispositif de Suivi des Effets bioLogiques Induits (SELI) est mis en place depuis 2017 pour acquérir des données sur les effets biologiques intégrateurs de la contamination chimique chez des organismes marins (poissons et bivalves) et permettre l'évaluation du BEE selon le critère D8C2. Il se décline en 2 sous-dispositifs, chacun réalisé tous les 3 ans (deux fois par cycle de 6 ans) :

<https://campagnes.flotteoceanographique.fr/series/285/>; doi : [10.18142/285](https://doi.org/10.18142/285) :

- SELILOIRE : suivi des effets de la contamination chez les soles (*Solea solea*) et les moules (*Mytilus edulis*) dans les baies de Loire et de Vilaine (2017, 2020).
- SELISEINE/SELIMANCHE : suivi des effets de la contamination chez les soles (*Solea solea*), les flets (*Platichthys flesus*) et les moules (*Mytilus edulis*) de la baie de Seine (2018, 2021).

1.3 *Espèces suivies au cours des SELI*

Les espèces de poissons plats et de moules suivies dans le cadre des SELI correspondent aux espèces sentinelles de chaque sous-région et aux espèces recommandées par les conventions de mers régionales :

- La sole commune, *Solea solea*, espèce d'intérêt économique important en Atlantique, déjà étudiée dans plusieurs programmes nationaux de recherche et de surveillance visant notamment à estimer les stocks, étudier les traits d'histoire de vie, la migration, le réseau trophique (e.g. Laffargue et al., 2006, Le Pape et al., 2013, Lecomte et al., 2020, Champagnat et al., 2021), et le niveau de contamination chimique de la sole (e.g. Wessel et al., 2010, Munsch et al., 2011, Ballutaud et al., 2019, Mounier et al., 2020).
- Le flet, *Platichthys flesus*, l'une des espèces sentinelles recommandées par OSPAR pour la biosurveillance du milieu marin (e.g. Cuevas et al., 2015, Burgeot et al., 2017, Hylland et al., 2017, Laurent et al., 2023).

- Les moules (principalement *Mytilus edulis* sur les zones ciblées par les SELI en Atlantique) sont analysées pour le suivi de la contamination chimique historique et émergente, notamment dans le cadre du Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du littoral dans la Matière Vivante (ROCCH MV) (e.g. Briant et al., 2017, Chiffoleau, 2017, Araújo et al., 2021, Sussarellu et al., 2022). Les moules utilisées dans le cadre des SELI sont prélevées sur des stations ROCCH MV afin de bénéficier de la connaissance du site, des analyses de contaminants et des efforts d'échantillonnage mis en œuvre par le ROCCH MV.

La stratégie d'échantillonnage a pris en compte l'influence possible de plusieurs facteurs biotiques confondants, *i.e.* des facteurs qui peuvent avoir un effet sur les réponses des biomarqueurs sélectionnés et sur les niveaux d'imprégnation des organismes par les contaminants chimiques, tels que l'âge des individus. L'objectif était de gagner en précision et sensibilité sur l'analyse des variabilités spatio-temporelles. Pour cela, des poissons adultes entre 22 et 30 cm (pour cibler des individus d'âge similaire, appartenant aux groupes d'âge 2 et 3 ans) sont prélevés en dehors de leur période de reproduction. Mais les réalités du terrain ont conduit à des ajustements décrits ci-après.

1.4 Analyses des SELI

Le dispositif SELI permet de mesurer simultanément des effets biologiques et des concentrations en contaminants organiques et inorganiques chez des organismes marins. Les biomarqueurs suivis renseignent sur 1) l'état de santé général de l'organisme (intégrité des lysosomes, indice gonado-somatique GSI et hépato-somatique HSI, pathologies hépatiques), 2) le niveau d'atteinte génotoxique (cassures de brins de l'ADN et micronoyaux), 3) les effets reprotoxiques (pathologie des gonades), 4) les effets neurotoxiques (inhibition de l'activité acétylcholine estérase) (Tableau 1). Ces biomarqueurs sont décrits en Annexe 1. Le niveau de contamination chimique des individus par certains contaminants organiques hydrophobes (PCB, PBDE, HCBDD, PFAS et pesticides organochlorés, analysés par chromatographie gazeuse ou liquide couplée à la spectrométrie de masse), et des éléments traces métalliques (les 3 métaux toxiques, indicateurs communs d'OSPAR : Hg, Cd, Pb, et d'autres éléments traces métalliques (ETM) : Ag, As, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Sn, V, Zn, Sn mesurés par ICP-MS, Tableau 2) sont aussi mesurés.

1.5 Utilisation des seuils

Bien que les seuils permettent d'aider à évaluer le niveau de contamination et/ou l'ampleur des effets biologiques observés, ils sont à considérer avec attention. Dans certains cas, faute de pouvoir disposer de valeurs seuils spécifiques, les seuils existants sont extrapolés en dehors de leur domaine d'applicabilité (pour un autre tissu, une autre espèce, pour un autre objectif de protection...). Cela met en avant le besoin de poursuivre les travaux de développement et de mise à jour des seuils, qui passe notamment par l'acquisition et la transmission des données obtenues aux différents groupes de travail pour mutualiser les efforts et harmoniser les approches. Dans l'attente de ces développements, plusieurs considérations sont à prendre en compte pour l'utilisation des seuils en vue de l'évaluation de la qualité des habitats et des organismes. Ces considérations sont en lien notamment avec l'objectif de protection de l'évaluation, l'espèce et le tissu analysés.

Seuils et objectifs de protection. Des seuils permettent d'aider à l'identification de niveaux en contaminants ou réponses biologiques potentiellement indicateurs d'un risque pour l'environnement. Il existe plusieurs types de seuils (Tableau 1 et Tableau 2) :

- Seuils indiquant un niveau de base et donc un état sans pression chimique ou avec une pression chimique limitée. Ils constituent l'objectif ultime des conventions des mers régionales (e.g. OSPAR Objectif stratégique 2 (OSPAR, 2021)).

- Background Assessment Concentrations/Criteria (BAC) des contaminants et réponse des biomarqueurs dans les bivalves, les poissons et les sédiments, valeurs de fond développées par OSPAR. Ce type de seuil correspond à la concentration d'un contaminant indiquant la valeur de fond géochimique ou une valeur de contaminant ou de biomarqueurs mesurable dans une zone sans historique de contamination connue.
- Seuils suggérant un effet de la contamination chimique. Ils constituent l'objectif d'atteinte du bon état écologique pour la DCSMM et la DCE.
 - Environmental Assessment Criteria (EAC) des contaminants et réponse des biomarqueurs dans les bivalves, les poissons et les sédiments, critères d'évaluation environnementale développés par OSPAR. Ce type de seuil représente la concentration en contaminant dans le sédiment et le biote ou le niveau de réponse d'un biomarqueur en dessous (ou au-dessus pour les biomarqueurs dont un effet délétère est obtenu par une inhibition) de laquelle un effet chronique n'est pas attendu pour les espèces marines, autrement dit, le risque est jugé acceptable pour l'écosystème marin (OSPAR, 2023). Pour les PBDE, OSPAR a dérivé des seuils équivalents aux EAC sur la base des seuils Canadiens Federal Environmental Quality Guideline (FEQG). Les seuils EAC ne prennent pas en compte l'empoisonnement secondaire, ni les effets cocktails. Pour les biomarqueurs, des EAC ont été dérivés par Davies and Vethaak (2012).
 - Normes de Qualité Environnementale pour les contaminants dans le biote (NQE) et valeur de qualité environnementale spécifique (QS) développées par l'EU dans le cadre de la DCE (directive 2013/39/UE) pour des contaminants dans le biote (pour les seuils retenus dans la présente évaluation). La NQE est retenue dans la directive 2013/39/UE et correspond à la concentration d'un contaminant ou d'un groupe de polluants qui ne doit pas être dépassée, afin de protéger la santé humaine et l'environnement. La NQE est la plus faible des 5 valeurs de qualité environnementale spécifique (QS) déterminées pour 5 objectifs de protection : les communautés pélagiques (eaux douces et marines) et benthiques, les prédateurs supérieurs (via l'empoisonnement secondaire) et la santé humaine (via l'eau de boisson et l'ingestion des produits issus de la pêche). Parmi les 45 substances de l'état chimique DCE 2013/39/UE, 11 substances disposent de seuils NQE fixés sur la matrice biote. En pratique pour les SELI, les NQE utilisées sont les NQE biote si elles sont basées sur l'empoisonnement secondaire. Pour les NQE biote basées sur la santé humaine via la consommation de produits de la mer, la QS basée sur l'empoisonnement secondaire est considérée plus pertinente pour le D8. Dans ce dernier cas, la NQE (santé humaine) correspond en effet à l'objectif de protection du Descripteur 9 de la DCSMM, portant sur les questions sanitaires. En d'autres termes, parmi les seuils DCE pour le biote, le D8 utilise préférentiellement ceux qui sont basés sur l'empoisonnement secondaire (NQE ou QS).
- Concentrations maximales permmissibles des contaminants dans les produits de la pêche (MPC) développés par la Commission Européenne afin de protéger spécifiquement la santé de l'homme via la consommation de produits de la mer (Commission Regulation no 1881/2006). Les limites sont fixées à "un niveau strict qui peut raisonnablement être atteint en suivant de bonnes pratiques agricoles, de pêche et de fabrication et en tenant compte du risque lié à la consommation de l'aliment ». Donc, s'il y a des améliorations dans les pratiques (*i.e.* une diminution des niveaux de contaminants environnementaux), les MPC peuvent être revues. Elles sont utilisées dans le cadre des SELI quand il n'y a pas de seuils visant à la protection des organismes, *i.e.* l'objectif du D8 et notamment du D8C2 et des SELI.

Pour l'exercice actuel, les seuils retenus sont : (1) les seuils reconnus au niveau international avec un objectif de protection environnementale puis (2) la BAC en l'absence d'autre seuil. Les questions sur la pertinence des seuils sont donc à considérer dans l'évaluation et pour le niveau de confiance associé.

Seuils et espèces. A ce stade (2023), certains paramètres (biomarqueurs et contaminants) suivis ne disposent pas de seuils spécifiques pour les espèces suivies (sole et moules). Pour les biomarqueurs, les seuils développés pour d'autres poissons plats (*e.g.* limande) sont appliqués dans les SELI. La variabilité des réponses biologiques entre soles, flets et limandes a été étudiée pendant la campagne SELISEINE 2018 (Mauffret et al., 2021, Roubeix et al., 2023) et les résultats ont montré que certains seuils peuvent s'appliquer à plusieurs espèces. Par exemple, la distribution des données AChE chez la sole et la limande prélevée en Baie de Seine, a semblé similaire, et différente de celle du flet : nous appliquons donc le seuil AChE développé pour la limande à la sole, tandis que le flet a son propre seuil (**Tableau 1**). Pour les contaminants, OSPAR recommande de suivre un nombre restreint d'espèces (limande, plie, flet, morue, merlan, merlu) et n'inclue parfois pas des espèces plus pertinentes dans les sous-régions marines françaises, notamment la sole. Pour les contaminants, la DCE recommande de suivre le poisson pour les substances qui se bioamplifient sans préciser l'espèce. **L'utilisation de plusieurs seuils pour les biomarqueurs et les contaminants a nécessité de faire des hypothèses/approximations importantes sur la variabilité inter-espèces. Dans ce rapport, ces approximations sont faites dans l'attente de paramètres d'évaluation plus adaptés pour les espèces modèles françaises.** Une action ciblée sur le développement de seuils sur un plus large panel d'espèces françaises permettra de limiter les incertitudes liées aux approximations.

Seuils et tissus. Pour les substances suivies, les seuils sont développés pour un tissu spécifique ou pour l'organisme entier. Des travaux sont en cours, notamment à OSPAR, pour permettre la conversion de seuil d'un tissu à un autre (*e.g.* foie <-> muscle) ou d'une unité à l'autre (*e.g.* poids lipidique <-> poids sec). Dans les SELI, les contaminants organiques et le Hg sont suivis dans le muscle pour 2 raisons techniques principales : 1) disposer de suffisamment de tissu (matière) pour effectuer l'ensemble des analyses ciblées, 2) limiter les effets liés aux lipides dans le foie qui augmentent le bruit de fond pour l'analyse des contaminants organiques. Les autres ETM sont suivis dans le foie. **Dans ce rapport, des approximations sont faites dans l'attente de paramètres d'évaluation plus adaptés qui prennent en compte l'organotropisme :**

- Les seuils (EAC ou (N)QE) des substances lipophiles (*e.g.* PCB, pesticides organochlorés...) sont normalisés par le % de lipides, il est donc attendu que ces seuils s'appliquent dans le foie comme dans d'autres tissus, tel que le muscle, sous l'hypothèse que la composition lipidique dans le poisson entier est similaire aux lipides dans le foie.
- Les normes sanitaires (MPC) sont indiquées en l'absence d'autres seuils par OSPAR. Elles concernent les métaux Cd, Hg, Pb et les PFAS. Les MPC sont initialement développés par l'EFSA dans le muscle (partie consommée). Dans les SELI, les ETM sont mesurés dans le foie, où le Cd et le Pb sont plus concentrés. OSPAR suggère dans ce cas, d'utiliser les MPC bivalve, qui se rapprochent plus des valeurs dans le foie de poisson que celles dans le muscle de poisson.

Seuils et méthodes analytiques. Les seuils développés (contaminants et biomarqueurs) sont donnés pour une utilisation calibrée sur la base de différents paramètres comme l'espèce, le sexe, ou la méthode analytique. Chacun de ces paramètres peut avoir une influence sur la valeur du seuil. La participation à des exercices d'intercalibration ou à des protocoles d'assurance qualité peut permettre de s'assurer de la robustesse des seuils proposés.

Pour la mesure du niveau de cassures de brins de l'ADN par le test de comètes, suivant la méthode utilisée (manuelle, semi-automatisée ou automatisée), la robustesse de l'analyse et le bruit de fond peuvent varier. Les seuils disponibles ont été développés pour une méthode analytique similaire à celle utilisée ici, qui est une méthode manuelle.

Tableau 1– Biomarqueurs suivis dans le cadre des campagnes SELI et seuils associés.

Biomarqueur	Type de contaminants ¹	Mode d'action ²	Pertinence écologique ²	SELILOIRE		Seuils d'interprétation disponibles ³	
				Pois.	Moule	Poisson	Moule
Pathologie externe	Non spécifique	Altération tissulaire et maladie (histopathologie, immunologie, effets combinés sur le système immunitaire)	Elevée (malformation possiblement induisant un mauvais fonctionnement de l'individu)	x		Limande : EAC en fonction du sexe et des pathol. observées.	<i>Non suivi chez la moule</i>
Indice de pathologie hépatique				x		Limande : EAC = FDI _{moy} ≥ 2	<i>Non suivi chez la moule</i>
Indice de pathologie gonadique	Perturbateurs endocriniens	Reprotoxicité, altération tissulaire	Très élevée (lié à la reproduction et mesuré sur un haut niveau organisationnel jusqu'à la population)	x		Aucun	<i>Non suivi chez la moule</i>
Test des comètes Test des micronoyaux	Clastogènes, mutagènes, génotoxiques	Génotoxicité, mutagénotoxicité	Modérée-élevée (possiblement indicateur d'un effet négatif au niveau individuel et sur le long terme)	x	x	Limande : BAC = 5 % Tail DNA Flet : BAC = 0,0-0,3 (sang) Limande : BAC = 0,5 (sang) mn ‰ cellules	<i>M. edulis</i> : BAC = 10 % Tail DNA <i>M. gallo.</i> : BAC = 3,9 (sang) <i>M. edulis</i> : BAC = 2,5 (sang ou branchies) mn ‰ cellules
Métabolites biliaires HAP	HAP	Détoxification	Faible à élevée	x		OH-pyrène/ OH-phénanthrène : EAC (Morue) = 483/528 ng/g BAC (Flet/Limande) : 16/3.7 ng/mL	<i>Non pertinent</i>
Inhibition de l'Acetylcholinestérase (AChE)	Neurotoxiques e.g. pesticides organophosphates et carbamates	Neurotoxique, comportement, fitness, survie, reproduction	Elevée (peut conduire à des effets au niveau individuel)		x	Flet : EAC/BAC = 165/235 nmol/min /mg protéine (muscle) Limande : EAC/BAC = 105/150 nmol/min /mg protéine (muscle)	<i>M. edulis</i> : EAC/BAC = 21/30 nmol/min /mg protéine (branchies) <i>M. gallo.</i> : EAC = 20/29 nmol/min /mg protéine (branchies)
Stabilité de la membrane lysosomale (LMS)	Non spécifique	Détoxification, régulation interne, fonction immunitaire	Modérée (lié à plusieurs fonctions physiologiques)	x	x	Ttes espèces : EAC = 10 min (cytochimie) Ttes espèces : EAC = 50 min (Temps de rétention du rouge neutre).	

¹ (Dallas and Jha, 2015); ² EU (WFD), in prep; ³(Davies and Vethaak, 2012). FDI : Fish Disease Index

Tableau 2 – Contaminants chimiques suivis dans le cadre des campagnes SELI et seuils associés : les « seuils considérés » sont le même pour les poissons et les moules mais ils sont adaptés à chacun des groupes d'espèces ¹.

Famille	Substance	Seuil considéré	Seuil sole (pf, Poisson maigre) ¹	Seuil moule (ps, organisme entier)
HAP	2 cycles : Naphtalène	EAC = 340 µg/kg ps	↑ Non pertinent ↓ Métabolisés par le poisson → ↓ Non mesuré	EAC = 340 µg/kg ps
	3 cycles : Anthracène	EAC = 290 µg/kg ps		EAC = 290 µg/kg ps
	3 cycles : Phénanthrène	EAC = 1700 µg/kg ps		EAC = 1700 µg/kg ps
	4 cycles : Benzo(a)anthracène	EAC = 80 µg/kg ps		EAC = 80 µg/kg ps
	4 cycles : Chrysène&triphenylène	BAC = 8.1 µg/kg ps		BAC = 8.1 µg/kg ps
	4 cycles : Fluoranthène	EAC = 110 µg/kg ps		EAC = 110 µg/kg ps
	4 cycles : Pyrène	EAC = 100 µg/kg ps		EAC = 100 µg/kg ps
	5 cycles : Benzo(k)fluoranthène	EAC = 260 µg/kg ps		EAC = 260 µg/kg ps
	5 cycles : Benzo(a)pyrène	EAC = 600 µg/kg ps		EAC = 600 µg/kg ps
6 cycles : Benzo(g,h,i)perylene	EAC = 110 µg/kg ps	EAC = 110 µg/kg ps	EAC = 110 µg/kg ps	
6 cycles : Indéno(1,2,3-cd)pyrène	BAC _{Med} = 2.9 µg/kg ps	BAC _{Med} = 2.9 µg/kg ps	BAC _{Med} = 2.9 µg/kg ps	
PCB	CB28	EAC = 67 µg/kg pl	EAC = 161.3 ng/kg pf (<i>muscle</i>)	EAC = 5.6 µg/kg ps
	CB52	EAC = 108 µg/kg pl	EAC = 260.0 ng/kg pf (<i>muscle</i>)	EAC = 9.0 µg/kg ps
	CB101	EAC = 121 µg/kg pl	EAC = 291.3 ng/kg pf (<i>muscle</i>)	EAC = 10.1 µg/kg ps
	CB118	EAC = 25 µg/kg pl	EAC = 60.2 ng/kg pf (<i>muscle</i>)	EAC = 2.1 µg/kg ps
	CB138	EAC = 317 µg/kg pl	EAC = 763.1 ng/kg pf (<i>muscle</i>)	EAC = 24.5 µg/kg ps
	CB153	EAC = 1 585 µg/kg pl	EAC = 3815.5 ng/kg pf (<i>muscle</i>)	EAC = 132.4 µg/kg ps
	CB180	EAC = 469 µg/kg pl	EAC = 1129.0 ng/kg pf (<i>muscle</i>)	EAC = 39.2 µg/kg ps
Pesticides	DDT	BAC(<i>p,p'</i> -DDE) = 0.10 µg/kg pf (<i>foie</i>) BAC(<i>p,p'</i> -DDE) = 0.63 µg/kg ps (<i>moule</i>)	Non appliqué : seuil se réfère au foie de poisson gras	BAC(<i>p,p'</i> -DDE) = 0.63 µg/kg ps
	HCH	EAC(lindane) = 1.1 µg/kg pf (<i>entier</i>) EAC(lindane) = 11 µg/kg pf (<i>foie</i>)	Non compatible avec LOQ actuelles (EAC<3*LOQ)	Non compatible avec LOQ actuelles (EAC<3*LOQ)
Composés bromés	PBDE (28, 47, 99, 100, 153 et 154)	NQE(hh) = 0.0085 µg/kg pf (<i>muscle</i>)	NQE(hh) = 0.0085 µg/kg pf (<i>muscle</i>)	Non applicable
	BDE28	FEQG = 2400 µg/kg pl	FEQG = 5777.3 ng/kg pf (<i>muscle</i>)	FEQG = 200.5 µg/kg ps
	BDE47	FEQG = 880 µg/kg pl	FEQG = 2118.4 ng/kg pf (<i>muscle</i>)	FEQG = 73.5 µg/kg ps
	BDE99	FEQG = 20 µg/kg pl	FEQG = 48.1 ng/kg pf (<i>muscle</i>)	FEQG = 1.7 µg/kg ps
	BDE100	FEQG = 20 µg/kg pl	FEQG = 48.1 ng/kg pf (<i>muscle</i>)	FEQG = 1.7 µg/kg ps
	BDE153	FEQG = 80 µg/kg pl	FEQG = 192.6 ng/kg pf (<i>muscle</i>)	FEQG = 6.7 µg/kg ps
	BDE154	FEQG = 80 µg/kg pl	FEQG = 192.6 ng/kg pf (<i>muscle</i>)	FEQG = 6.7 µg/kg ps
PFAS	PFOS	NQE(hh) = 9.1 µg/kg pf (<i>muscle</i>)	QS(sec.pois.) = 33 µg/kg pf (<i>entier</i>) MPC = 0.2 µg/kg pf (<i>muscle</i>) MPC = 2 µg/kg pf (<i>muscle</i>) MPC = 0.2 µg/kg pf (<i>muscle</i>) MPC = 0.2 µg/kg pf (<i>muscle</i>) MPC = 0.5 µg/kg pf (<i>muscle</i>)	QS (sec.pois.) = 201 µg/kg ps
	PFOS	QS(sec.pois.) = 33 µg/kg pf (<i>entier</i>)		
	PFHxS	MPC = 0.2 µg/kg pf (<i>muscle</i>)		
	PFOS	MPC = 2 µg/kg pf (<i>muscle</i>)		
	PFOA	MPC = 0.2 µg/kg pf (<i>muscle</i>)		
	PFNA	MPC = 0.5 µg/kg pf (<i>muscle</i>)		
Métaux	Mercuré (Hg)	NQE (sec.pois.) = 0.02 mg/kg pf (<i>entier</i>)	NQE(sec.pois.) = 0.02 mg/kg pf (<i>entier</i>)	NQE (sec.pois.) = 122 µg/kg ps
	Cadmium (Cd)	MPC = 1.0 (<i>foie-bivalve</i>) ; 0.05 (<i>muscle</i>) mg/kg pf	MPC = 1.0 mg/kg pf (<i>foie</i>)	MPC = 6098 µg/kg ps
	Plomb (Pb)	MPC = 1.5 (<i>foie-bivalve</i>) ; 0.3 (<i>muscle</i>) mg/kg pf	MPC = 1.5 mg/kg pf (<i>foie</i>)	MPC = 9146 µg/kg ps

ps : poids sec ; **pf** : poids frais ; **pl** : poids lipidique, **hh** : human health

¹ Le « seuil considéré » est celui indiqué dans les directives ou dans les recommandations OSPAR pour le biote ; il doit ensuite être ajusté à l'espèce ou taxon et au tissu selon si le contaminant est lipophile ou non.

Le « seuil sole (poisson maigre) » est le seuil dérivé pour la sole, un poisson maigre, à partir du « seuil considéré » :

1) pour les contaminants lipophiles :

1ere étape (pl) : le « seuil considéré » est exprimé soit en **pl** (EAC PBC et FEQG PBDE), soit en **pf** ((N)QE PBDE). Dans ce dernier cas (**pf**), le seuil est converti en **pl** pour un poisson théorique ayant un taux de lipides de 5% (x 20).

2eme étape nécessaire pour les poissons maigres comme la sole (<3 % lipides) : les seuils en **pl** de la 1ere étape sont convertis en **pf** avec le taux de lipide moyen de l'espèce (**0,24 % pf** dans le *muscle*, données SELILOIRE 20) ; le contaminant est évalué en **pf** (*dans le muscle*).

2) pour les contaminants non lipophiles (métaux, PFAS) : les « seuils considérés » sont exprimés en **pf** et utilisés en **pf**.

Le « seuil moule (ps) » est le seuil dérivé pour la moule à partir du « seuil considéré » ; le taux d'humidité des bivalves étant variable dans le temps, les concentrations dans les bivalves sont évaluées en **ps**. Si le « seuil considéré » est en **pl** ou **pf**, il est ensuite converti en **ps** avec les taux d'humidité et de lipide moyen de l'espèce (*M. edulis* : 1.4 % **pl** 16.4% **pf** :

https://dome.ices.dk/ohat/trDocuments/2024/help_ac_basis_conversion.html).

EAC, FEQG et BAC : Environmental Assessment Criteria, Federal Environmental Quality Guideline (seuils du Canadian Environmental Protection Act, 1999 utilisés comme EAC) and Background Assessment Concentration dérivés par OSPAR : https://dome.ices.dk/ohat/trDocuments/2024/help_ac_biota_contaminants.html#Introduction

MPC : Maximum Permissible Concentration dérivée dans les normes sanitaires : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0915> (RÈGLEMENT (UE) 2023/915 DE LA COMMISSION du 25 avril 2023 concernant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et abrogeant le règlement (CE) no 1881/2006)

(N)QE : (Norme) de Qualité Environnementale dérivée dans le cadre DCE : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02008L0105-20130913> (DIRECTIVE 2008/105/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amended by the Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013)

Objectifs

Le dispositif « SELI » est mis en place depuis 2017 en Atlantique pour évaluer les effets biologiques intégrateurs de la contamination chimique chez des organismes marins (poissons et bivalves). Les données acquises renseignent également le critère 2 du descripteur 8 de la **DCSMM** (Le niveau de concentration des contaminants ne provoque pas d'effets dus à la pollution) et alimentent la base de données du Conseil International pour l'Exploration de la Mer (**CIEM**) sur le suivi de la contamination chimique et de ses effets afin de contribuer aux travaux régionaux sur les substances dangereuses et leurs effets. Les biomarqueurs suivis couvrent plusieurs types d'effets toxiques (génotoxicité, reprotoxicité, neurotoxicité) et incluent des mesures de la santé générale de l'organisme (pathologies, indices somatiques (*e.g.* RGS, RHS), stabilité de la membrane lysosomale). Les contaminants suivis chez les organismes sont des éléments traces métalliques (ETM) et des contaminants organiques hydrophobes (historiques et émergents) susceptibles de s'accumuler dans les organismes et/ou de s'amplifier dans les réseaux trophiques. **L'ensemble de ces analyses permet de répondre aux questions :**

1. Quelles sont les réponses biologiques observées chez les organismes marins (poissons plats, bivalves) ?
2. Quel est le niveau d'imprégnation de ces organismes marins à la contamination chimique ?
3. Les réponses biologiques peuvent-elles être associées à l'exposition à un stress chimique dans des zones de pressions anthropiques variées ?

2 Matériels et méthodes

2.1 Echantillonnage

2.1.1 Collecte et dissection des poissons plats

Huit stations ont été prospectées pour collecter des poissons plats de taille moyenne de 25 cm pour essayer de cibler une classe d'âge (*i.e.* des individus de 2-3 ans ayant atteint leur maturité sexuelle, selon les recommandations du protocole OSPAR (2012)). Théoriquement, un seul sexe (les mâles) était ciblé pour limiter l'influence de facteurs biotiques confondants sur les réponses des marqueurs sélectionnés. Mais il a été nécessaire d'inclure des femelles par manque d'individus mâles capturés. Les précédentes missions SELI, toutes déployées en dehors de la période de reproduction, n'ont pas mis en avant un effet évident du sexe sur les réponses observées. Nous continuerons cependant à évaluer l'effet du sexe sur les réponses des biomarqueurs et les concentrations en contaminants au fur et à mesure des SELI pour s'assurer que la combinaison des mâles et des femelles dans l'échantillonnage n'apporte pas un biais important.

Les poissons ont été prélevés à l'issue de traits de chalut à perche de 20 minutes (max) à une vitesse de 3 nœuds (chalut utilisé lors des campagnes Orhago : Observation des Ressources HALieutiques benthiques du Golfe de Gascogne, <https://doi.org/10.18142/23>). La durée des traits de chalutage était inférieure à 20 min au niveau des fonds vaseux (notamment en Baie de Vilaine) pour augmenter les chances de récupérer le poisson vivant. Cent-quarante-deux (142) soles ont été collectées (dont 10 soles arrivées mortes le soir en L2 pour lesquelles seules quelques analyses ont été faites (voir ci-après)). Bien que le flet fût également ciblé lors de cette campagne, aucun individu n'a été observé sur la zone prospectée. Malgré l'absence de flet, SELILOIRE 2020 a été beaucoup plus productive qu'en 2017, où seules 23 soles avaient pu être collectées, avec le petit chalut à perche des campagnes Nurse.

Quelques difficultés ont été rencontrées :

- Le protocole COVID a compliqué l'organisation de la campagne, et a nécessité une équipe embarquée qui tournait tous les jours et une équipe à terre pour les dissections le soir.
- Le chalut à perche utilisé n'était pas adapté aux stations très vaseuses comme en Vilaine (stations V2 et V3 n'ont pas pu être réalisées avec ce chalut) causant plusieurs casses au niveau du chalut, ces casses ont été réparées par l'équipage permettant une reprise de la pêche le lendemain.
- Une avarie a eu lieu en fin de journée le 1^{er} Septembre : les funes du chalut se sont rompues lors de la pêche sur la station L1. L'équipage a organisé la récupération du chalut par des plongeurs le 2 Septembre. Cette avarie a fait perdre 1 journée de mer au nombre de jour attribués la campagne.

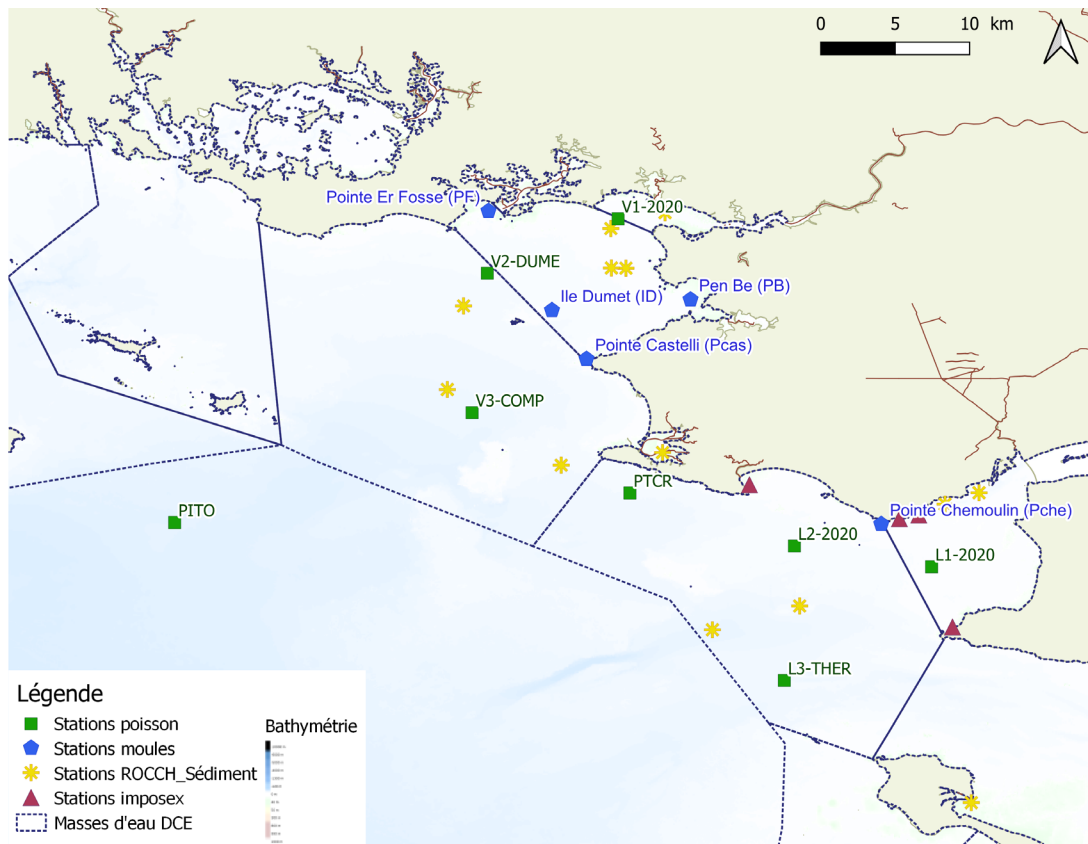


Figure 1 – Localisation des 8 stations d'échantillonnage de soles, des 6 stations d'échantillonnage de moules de la campagne SELILOIRE 2020 ainsi que des stations ROCCH imposex et ROCCH SED pour visualiser l'ensemble du suivi lié aux contaminants et ses effets sur la zone.

Tableau 3 – Nombre d'individus prélevés par station et utilisés pour l'analyse des paramètres biologiques (Bio.) et des contaminants chimiques (Organiques et Inorganiques) dans le cadre de la campagne SELILOIRE 2020.

Station 2020	Station 2017	Station ORHAGO	Latitude	Longitude	Nb. analyses Bio.	Nb analyses Organiques	Nb analyses Inorganiques
L1-2020	L1	—	47,19533	-2,25517	30 (14M+15F+1I)	5 (4M, 1F) ¹	5 (4M, 1F) ¹
L2-2020	L2	—	47,21378	-2,37628	10 (7M, 3F) 10 (4M, 4F, 2I) ²	5 (5M)	5 (5M)
PTCR (L4)	—	Pte du Croisic	47,2605	-2,5215	30 (18M+12F)	8 (8M)	8 (8M)
V1-2020	V1	—	47,50268	-2,53192	25 (11M+14F)	6 (6M)	6 (6M)
V2-DUME	V2	Dumet	47,45453	-2,64737	2 (2F)	0	
V3-COMP	V3	Compagnon	47,33148	-2,66080	0	0	
L3-THER	L3	Theresia	47,0949409	-2,3852006	5 (2M+3F)	0	
PITO	—	Ancre Pitochet	47,23444	-2,92333	30 (13M+17F)	6 (6M)	13 (12M, 1F) ¹
Total					132 (65M, 66F, 1I) 142(69M, 70F, 3I)²	30 (29M, 1F)¹	37 (35M, 2F)¹

M : mâles, F : femelles, I : indéterminés

¹ Analyse des contaminants chimiques prévus uniquement chez des mâles, mais après vérification histologique 2 individus sélectionnés en L1 et PITO étaient des femelles.

² Individus utilisés pour l'analyse des indices (RGS, RHS, Fulton) et l'analyse des métabolites de HAP uniquement (10 individus morts à la remontée du chalut), et nombre total de soles utilisées (142) pour la recherche d'indices de conditions et métabolites de HAP

Les poissons sont observés pour détecter la présence de pathologies externes. Ils sont ensuite pesés (poids totaux et éviscérés), mesurés et disséqués à bord en vue de l'analyse de 6 biomarqueurs et de contaminants chimiques sélectionnés (Figure 2) :

- 1- Le sang total du poisson est prélevé directement dans la veine caudale à l'aide d'une seringue héparinée.

- a. Le sang total est ensuite dilué dans un milieu de congélation (milieu RPMI 1640 à 25 % de sérum foetal de veau et 20 % de DMSO) à raison d'une goutte de sang par mL de milieu de congélation, préalablement aliquoté dans des cryotubes. Les tubes sont ensuite stockés dans l'azote liquide jusqu'à la réalisation du **test des comètes à CCEM**.
 - b. Une goutte de sang (10 à 20 µL) est étalée sur une lame de verre préalablement nettoyée à l'alcool. Après avoir été séché à température ambiante, le frottis est fixé à l'éthanol absolu pendant 20 minutes. Une fois séchées à température ambiante, les lames ont été conservées à l'obscurité jusqu'au **comptage des micronoyaux par le laboratoire Toxem**.
 - c. Un aliquot de sang total (500 µL) est préservé dans un cryotube stocké dans l'azote liquide jusqu'à la réalisation du **test de la longueur des télomères à CCEM** dans le cadre de la mutualisation de l'effort d'échantillonnage pour développement de nouveau biomarqueur, développement soutenu par d'autres projets que SELILOIRE.
 - d. L'individu est ensuite décérébré.
- 2- La vésicule biliaire est prélevée puis conservée en cryotube dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse des **métabolites de HAP au LPTC (Université de Bordeaux)**.
 - 3- Les individus sont sexés et les gonades sont prélevées, pesées pour le calcul du rapport gonadosomatique (**RGS = poids des gonades/poids éviscéré de l'individu*100**) puis conservées individuellement dans une cassette histologique, conservée dans le formol (formaldéhyde 4%) pendant 24 h puis transférée dans de l'alcool à 70° afin d'arrêter le processus de fixation et de préserver la qualité du tissu jusqu'à son utilisation pour l'analyse du **stade de maturité et des pathologies des gonades à l'University of the Basque Country**.
 - 4- Le foie est prélevé, pesé pour le calcul du rapport hépato-somatique (**RHS = poids du foie/poids éviscéré de l'individu*100**) puis divisé en 3 :
 - a. Une partie du foie est conservée en cassette histologique conservée dans le formol (formaldéhyde 4%) pendant 24 h puis transférée dans de l'alcool à 70° afin d'arrêter le processus de fixation et de préserver la qualité du tissu jusqu'à son utilisation pour l'analyse de **pathologies hépatiques à l'University of the Basque Country**,
 - b. Une partie du foie est conservée en cryotube dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse de la **stabilité de la membrane lysosomale et différents paramètres de structure et de contenu lysosomaux à l'University of the Basque Country**,
 - c. Une partie du foie est conservée à -20°C dans un pilulier en verre préalablement lavé et calciné, recouvert d'une feuille d'aluminium calcinée, jusqu'à l'**analyse des éléments traces métalliques à Ifremer/CCEM**.
 - 5- Une portion de muscle (~1 * 0,5 * 0,5 cm) est prélevée et conservée dans l'azote liquide pour l'analyse de l'**activité AChE par l'unité CCEM (Ifremer)**.
 - 6- Le poisson (avec restes, *e.g.* viscères) est ensuite placé dans une feuille d'aluminium calcinée, et conservé à -20°C jusqu'à dissection du muscle sous atmosphère contrôlée à CCEM (Ifremer/Nantes) pour l'**analyse des contaminants organiques (HBCDD, PCB, PFAS, PBDE, OCP) et du Hg total dans le muscle, par l'unité CCEM (Ifremer/Nantes)**.
 - 7- Au laboratoire (CCEM, Ifremer/Nantes), les otolithes des poissons ont été prélevés pour l'**ageage** des poissons qui est réalisé au **Laboratoire Ressources Halieutiques (Ifremer/Boulogne-sur-mer)** selon les procédures internationales en vigueur (Vitale et al., 2019) (Annexe 2).

Parmi l'équipe de dissection, Farida Akcha était titulaire de l'habilitation à travailler sur animaux vivants délivrée par l'Ecole vétérinaire de Nantes, habilitation requise pour ces dissections.

SELILOIRE 2020: soles/flets 22-30 cm

Préparation de la paillasse : Nouvelle feuille d'aluminium calcinée sur la planche à découper tous les poissons ET rincer à l'eau milli-Q et à l'éthanol entre chaque poisson le coin de dissection et les instruments de prélèvement du foie. Changer les lames de scalpel très régulièrement (entre chaque lot d'individus au minimum), et rincer à l'eau milli-Q et/ou essuyer avec le papier absorbant entre les différents tissus.

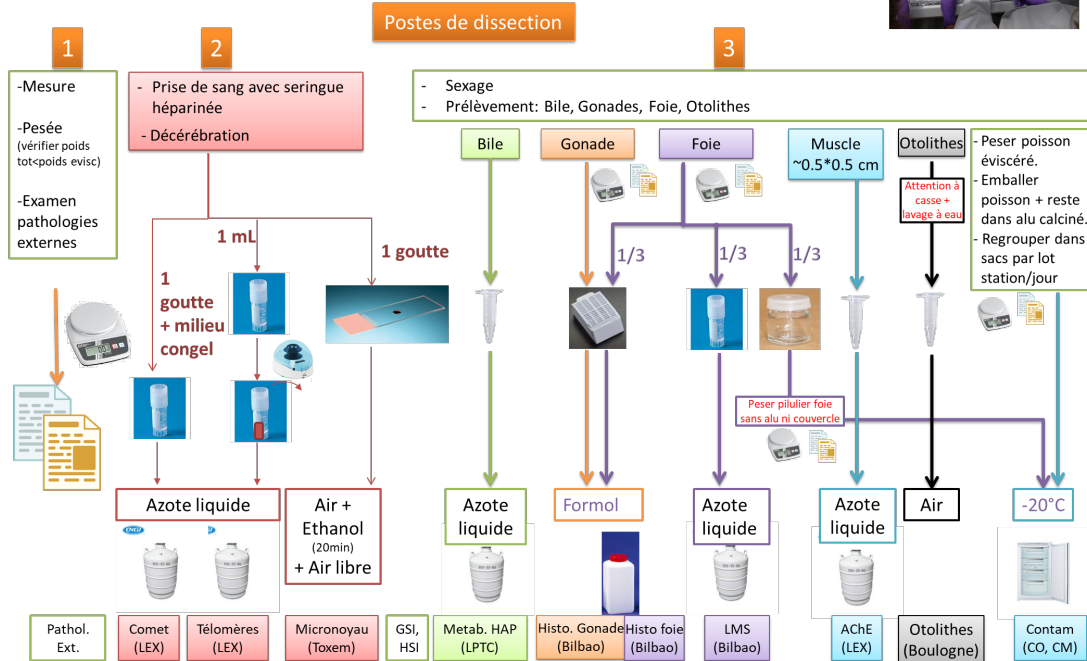
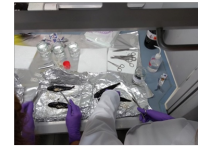


Figure 2 – Préparation des échantillons pour l'analyse de biomarqueurs et des contaminants organiques et inorganiques chez les poissons plats lors de la campagne SELILOIRE 2020 (Septembre 2020). LEX, LBCM, LBCO : Equipes d'Ecotoxicologie, de Biogéochimie des Contaminants Métalliques et de Biogéochimie des Contaminants Organiques de l'unité Contaminants Chimiques des Ecosystèmes Marins (CEM) de l'Ifremer/Nantes. LPTC : Laboratoire de Physico-ToxicoChimie des systèmes naturels de l'Université de Bordeaux 1. CBET+, Bilbao : groupe de Cell Biology in Environmental Toxicology + One Health de l'University of the Basque Country.

2.1.2 Collecte et dissection des moules

Des moules *Mytilus edulis* ont été collectées en même temps que l'échantillonnage du ROCCH MV (Février 2021) sur les 5 stations prévues (15 moules/station, Figure 1). Le gisement de Pointe de Chemoulin est en déclin. Lors du passage dans le cadre du ROCCH (février 2021), seuls des naissains étaient observés en cette station (A. Schmitt, communication personnelle). Ceci risque de rendre ce site inexploitable dans le cadre du ROCCH pour au moins plusieurs années. Pour anticiper le cas, une station à proximité a été prélevée aussi cette année pour comparer les résultats : Bonne source.

- Bonne source (prélèvement 10/02/2021)
- Ile Dumet (prélèvement 22/02/2021)
- Pen Bé (prélèvement 03/02/2021)
- Pointe Castelli (prélèvement 03/02/2021)
- Pointe de Chemoulin (prélèvement 10/02/2021)
- Pointe er Fosse (prélèvement 01/02/2021)

Après le prélèvement, les moules sont conservées à 4°C dans l'obscurité et disséquées le lendemain. Les paramètres biométriques (taille, poids) sont mesurés lors de la dissection. Les concentrations en contaminants chimiques sont déterminées dans le cadre du ROCCH MV sur des pools de ≥ 50 moules de 45 à 55 mm (intervalle max 35 à 65 mm) par station. Les données ont été récupérées *via* Quadrige. Les analyses de biomarqueurs sont effectuées individuellement sur 15 moules par station. Les moules sont disséquées pour l'analyse de 4 biomarqueurs (Figure 3) :

- 1- L'hémolymphe est prélevée directement dans le muscle adducteur à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue préalablement rincée avec du tampon Alsever (113,7 mM glucose, 27,2 mM sodium citrate, 58,44 mM sodium chloride, pH 6,1).
 - a. L'hémolymphe est ensuite récupérée dans un cryotube de 1,5 mL et conservée dans la glace jusqu'à analyse par **le test des comètes à l'unité CCEM** (Ifremer). Contrairement à ce qui a été réalisé chez les poissons, le test a été appliqué dans les 30 min suivant le prélèvement, sans aucune étape préalable de congélation.
 - b. Une goutte d'hémolymphe (100 µL) est placée sur une lame polylysine puis incubée 30 minutes en chambre humide (boite Tupperware avec papier absorbant humide). L'excédent de liquide est retiré en le laissant couler de la lame puis le frottis est fixé par un mélange éthanol/acide acétique (3/1, v/v) pendant 20 minutes. Ensuite, la lame est séchée à température ambiante, puis conservée jusqu'à **l'analyse des micronoyaux par le laboratoire Toxem**.
- 2- Une fois l'hémolymphe prélevée, la moule est ouverte à l'aide d'un scalpel. Les branchies de chaque individu sont prélevées à l'aide d'une pince et d'une paire de ciseaux fins. Elles sont ensuite récupérées dans un cryotube et conservées dans l'azote liquide jusqu'à **la mesure de l'activité acétylcholinestérase à l'unité CCEM (Ifremer)**.
- 3- Les gonades (et une partie du manteau) sont prélevées et conservées dans une cassette histologique plongée dans le formol (formaldéhyde 4%) pendant 24 h puis transférée dans de l'alcool à 70° jusqu'à l'analyse de **stade de maturité et pathologie des gonades à l'University of the Basque Country**.
- 4- Enfin, la glande digestive est prélevée, une partie est conservée dans une cassette histologique plongée dans le formol (formaldéhyde 4%) pendant 24 h puis transférée dans de l'alcool à 70° pour **l'analyse de pathologies de la glande digestive** et une autre partie est conservée en cryotube dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse de **la stabilité de la membrane lysosomale à l'University of the Basque Country**.

SELILOIRE 2020/ ROCCH FEV 2021

Préparation de la paillasse : Nouvelle feuille d'alu calcinée sur la planche à découper au moins tous les 4-5 moules ET rincer à l'eau milli-Q et à l'éthanol **entre chaque moule** le coin de dissection et les instruments de prélèvement. Changer les lames de scalpel très régulièrement (entre chaque lot d'individus au minimum).

MN

- Dépôt de 100 µL d'hémolymphe, prélevé au niveau du muscle adducteur, au milieu d'une lame polylysine sans l'étaler et incubé 20 minutes en chambre humide (boite tupperware avec papier absorbant humide).
 - Enlever l'excédent de liquide en le laissant couler de la lame puis fixer avec un bain d'éthanol/acide acétique (3V/1V) pendant 20 minutes.
 - Laisser sécher à température ambiante.
- Gonade:**

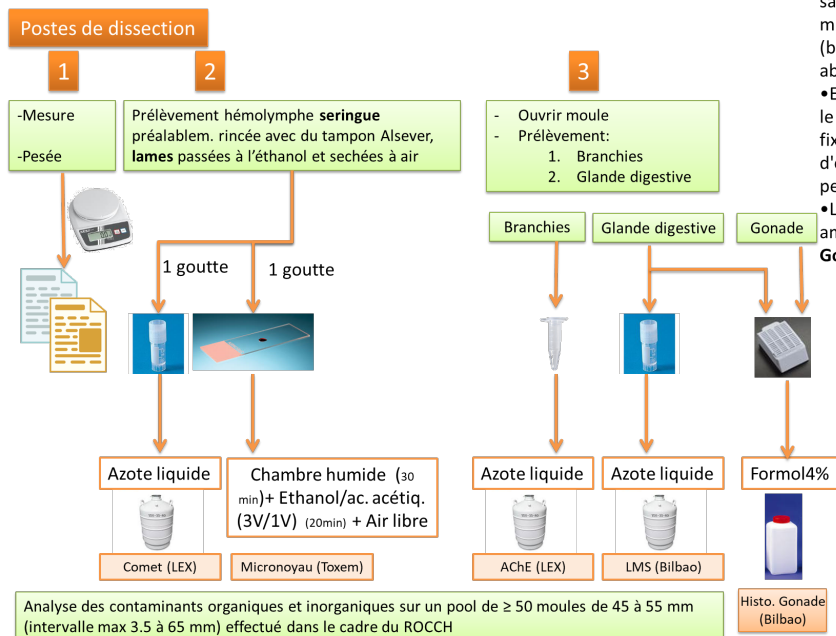


Figure 3 – Préparation des échantillons pour l'analyse de biomarqueurs chez la moule. LEX : Equipe d'Ecotoxicologie de l'unité Contaminants Chimiques des Ecosystèmes Marins (CCEM) de l'Ifremer/ Nantes. CBET+, Bilbao : groupe de Cell Biology in Environmental Toxicology + One Health de l'University of the Basque Country.

2.2 Analyse des biomarqueurs

2.2.1 Test des comètes sur érythrocytes de soles et hémocytes de moules

Le test des comètes a été réalisé comme précédemment décrit (Akcha et al., 2003, Akcha et al., 2004). La méthode est détaillée en Annexe 3.

2.2.2 Micronoyaux dans les érythrocytes de soles et les hémocytes de moules

Afin de permettre un comptage semi-automatisé des micronoyaux au niveau des érythrocytes de soles et des hémocytes de moules, les cellules sanguines ont été colorées au DAPI selon Vincent-Hubert et al. (2011). Pour cela, les lames ont été rincées 2 fois 3 minutes dans du PBS avant coloration dans une solution de DAPI à 1 µg/mL de méthanol pendant 15 minutes à température ambiante. Après 3 rinçages de 3 minutes dans du PBS, une lamelle a été placée sur la lame avec un liquide de montage Mowiol. Les lames ont été gardées à l'abri de la lumière jusqu'au comptage semi-automatisé des micronoyaux sur **5000** cellules par échantillon (lame) sur plate-forme CellInsight CX5 HCS® (Thermo).

2.2.3 Activité acétylcholinestérase (AChE)

L'activité acétylcholinestérase a été mesurée dans les muscles des poissons et les branchies des moules selon le protocole Bocquene and Galgani (1998). La procédure est détaillée en Annexe 4.

2.2.4 Métabolites de HAP dans les biles de poissons plats (HAP mono-hydroxylés (OH-HAP))

Les concentrations en métabolites de HAP mono-hydroxylés (OH-HAP) sont mesurées dans des échantillons de biles de poissons par extraction sur phase solide (SPE) et couplage Chromatographie en phase Liquide et Spectrométrie de masse en tandem (LC/MSMS) selon un protocole adapté de Le Dû-Lacoste (2008) décrit en Annexe 5. Les analyses sont faites au LPTC à l'Université de Bordeaux par Hélène Budzinski et Karyn Le Menach.

2.2.5 Intégrité des lysosomes

L'intégrité de la membrane lysosomale a été analysée par histochimie dans les cellules de foie des poissons selon Broeg et al. (1999) et UNEP/RAMOGÉ (1999) et dans les cellules de la glande digestive de moules selon Martinez-Gomez et al. (2015). La méthode est détaillée en Annexe 6.

2.2.6 Analyse histologique des tissus de poissons (foie et gonades) et de moules (glande digestive et gonades)

Les échantillons de foie et gonades de poissons plats ainsi que de glandes digestives et de gonades des moules dédiés aux analyses histo(patho)logiques ont été prélevés individuellement dans une cassette histologique et conservés dans du formol (4% dans de l'eau de mer) pendant 24 h à 4°C (Annexe 7). Après fixation, les tissus ont été déshydratés dans une série d'éthanol (70° ; 96° ; éthanol pure ; Annexe 7) puis inclus en paraffine (Leica ASP 300S ; Annexe 7). Pour chaque échantillon, 3 sections de 5 µm ont été obtenues au microtome rotatif (Leica RM 2125RTS) et colorées à l'Hématoxyline/Eosine (H/E). Le protocole de coloration est décrit en Annexe 7. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique (Nikon

Eclipse E200) à différents objectifs (4x, 10x, 20x, 40x, 100x) par le groupe de recherche CBET+ Bilbao (Cell Biology in Environmental Toxicology+ One Health de l'University of the Basque Country).

2.2.6.1 Soles : Analyses des pathologies hépatiques

L'analyse histologique des dommages hépatiques est utilisée comme une réponse biologique intégrée pour la surveillance des effets des contaminants chimiques, pour l'évaluation de l'état de santé général aussi bien au niveau individuel qu'au niveau populationnel. La standardisation méthodologique de l'analyse histologique des pathologies hépatiques chez les poissons marins au travers notamment du programme BEQUALM (www.bequalm.org) a permis de recommander l'application de cette analyse dans la surveillance des effets biologiques (Davies and Vethaak, 2012). La méthodologie et les critères de diagnostic de la surveillance des dommages hépatiques ont été développés sur la base d'expériences réalisées chez la limande et le flet, mais peuvent être adaptés à d'autres poissons plats et aux poissons démersaux (Davies and Vethaak, 2012). Les observations des atteintes hépatiques ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique. Les 28 lésions hépatiques recherchées ont été catégorisées selon les recommandations de Feist et al. (2004) dont le détail est donné en Annexe 7 avec des illustrations.

L'analyse histologique des dommages hépatiques était principalement basée sur les recommandations de (ICES, 1997) et du programme BEQUALM (www.bequalm.org). Les recherches publiées par Costa et al. (2009) et Zorita and Cuevas (2014) ont été utilisées comme guide pour l'identification de dommages hépatiques décrits chez la sole. Selon les critères suivis, les lésions hépatiques peuvent être classées par type de lésions (Davies and Vethaak, 2012) ou selon le type de dommage (Costa et al., 2009). L'Annexe 7 présente une correspondance entre les deux types de classification utilisés pour cette campagne :

- La première différencie les lésions non-spécifiques (*e.g.* nécrose, infiltration lymphocytaire...), non néoplasiques (*e.g.* polymorphisme nucléaire), pré-néoplasiques (*e.g.* foyer d'altération cellulaire) et néoplasiques (*e.g.* tumeurs bénignes et malignes).
- En comparaison, la classification de Costa et al. (2009) se réfère aux types de dommages observés avec notamment des troubles circulatoires (*e.g.* hémorragie) et inflammatoires (*e.g.* accumulation d'agrégats mélanomacrophagiques) et des changements régressifs (*e.g.* nécrose) et progressifs (*e.g.* vacuolisation lipidique) ainsi que des lésions prénéoplasiques et néoplasiques.

2.2.6.2 Soles : Détermination du sexe, des stades de développement et des lésions histopathologiques de la gonade

Pour les mâles, les stades de maturité ont été identifiés selon García-López et al. (2006) : Stade I (spermatogenèse précoce) ; Stade II (spermatogenèse) ; Stade III (spermatogenèse tardive) ; Stade IV (maturité) ; Stade V (Récupération). Les caractéristiques de chaque stade sont décrites en Annexe 7.

Pour les femelles, les stades de maturité ont été identifiés selon Murua and Motos (2006) : Stade I (croissance) ; Stade II (vitellogénèse précoce) ; Stage III (vitellogénèse tardive) ; Stage IV (maturité). Les caractéristiques de chaque stade sont décrites en Annexe 7.

L'analyse histologique des pathologies était principalement basée sur les recommandations de ICES (1997) et du programme BEQUALM (www.bequalm.org) et les recherches publiées par Blazer (2002) utilisées comme guide pour l'identification de lésions de la gonade décrites chez la sole (Annexe 7). L'analyse de l'intersex stade est décrite en Annexe 8. De même que pour le foie, les lésions identifiées dans la gonade peuvent être classées par type de dommage avec des troubles circulatoires (*e.g.* hyperémie) et inflammatoires (*e.g.* infiltration de lymphocytes), et des changements régressifs (*e.g.* atrésie) et progressifs (*e.g.* accumulation de lipides dans l'ovocyte).

2.2.6.3 Soles : Prévalences (%) des pathologies hépatiques et de la gonade identifiées et indices histopathologiques

La prévalence de chacune des pathologies identifiées est calculée comme le pourcentage d'individus d'un même site d'échantillonnage montrant cette pathologie. Dans le cas des gonades, les prévalences sont calculées pour chaque genre (Male/Femelle).

$$Prevalence (\%) = \frac{\text{Nb. d'individus présentant cette pathologie}}{\text{Nb. total d'individus analysés}} * 100$$

Deux indices histopathologique semi-quantitatifs sont calculés pour chaque individu :

- 1) selon la classification et les notes de gravité de chaque lésion indiqués par Davies and Vethaak (2012). Dans ce premier cas, la note de gravité totale individuelle correspond à la somme des notes de gravité de toutes les lésions identifiées, et ne prend pas en compte le degré de dissémination observé pour chaque lésion. L'indice correspond à la moyenne des notes de gravité individuelle.
- 2) le deuxième indice est calculé par organe (et par sexe dans le cas des gonades) selon Bernet et al. (1999) adaptée par Costa et al. (2009). Il prend en compte la note de gravité de chaque lésion identifiée ainsi que le degré de dissémination observé (mesure semi-quantificative évaluée de 0, 2, 4 et 6). Un indice total individuel est calculé par la somme des indices de tous les organes analysés (ici, le foie et la gonade) :

$$I_h = \sum_1^j w_j a_{jh}$$

w_j : note de gravité de la pathologie j déterminée selon l'importance pathologique de la lésion: (1) minimale; (2) modérée and (3) sévère.

a_{jh} : score donné à la pathologie j identifié chez l'individu h . Les scores sont classifiés de 0 à 6 selon le degré de diffusion de la lésion (0 : absence ; 6 : diffusion élevée).

2.2.6.4 Moules : Détermination du stade de maturité

L'analyse histo(patho)logique des échantillons de gonades a été réalisée au microscope optique pour la détermination du sexe, du stade de développement de la gonade, et la recherche de lésions histopathologiques. Les stades de développement des gonades chez la moule ont été déterminés selon Kim et al. (2006): Stade I (stade de repos, inactif ou non-différencié) ; Stade II (gamétogénèse précoce) ; Stade III (gamétogénèse avancée) ; Stade IV (maturation) ; Stade V (ponte) ; Stade VI (période de post-ponte).

2.2.6.5 Moules : Analyses des lésions histopathologiques et infections parasitaires des glandes digestives et de la gonade

Les observations des lésions histopathologiques et l'identification de parasites dans les échantillons de glande digestive et de gonades chez la moule ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique. La liste des 25 différentes pathologies et parasites analysés chez la moule est présentée dans l'Annexe 7. Pour chaque lésion et chaque parasite, la proportion d'individus présentant la pathologie (en %) a été calculée pour chaque site.

2.3 Analyses des contaminants chimiques chez les poissons plats

Les contaminants sont analysés chez une sélection d'individus. Le muscle de 45 soles a été disséqué sous atmosphère contrôlée pour l'analyse du Hg, et pour 30 d'entre elles, l'analyse de contaminants organiques. Les ETM (hors Hg) ont été analysés dans les foies de 37 poissons disséqués à bord.

2.3.1 Contaminants organiques dans les muscles de soles

Les contaminants organiques ciblés (Tableau 2) ont été analysés selon différents protocoles décrits dans Munsch et al. (2016) pour les PCB, Munsch et al. (2017) pour les PBDE, Munsch et al. (2020) pour les HBCDD et Munsch et al. (2019) pour les PFAS. Les techniques de détection et de quantification par dilution isotopique sont la CPG-SMHR et la LC/MSMS. Les méthodes analytiques sont brièvement décrites en Annexe 9.

2.3.2 Mercure dans les muscles de soles

Le mercure (Hg) est un élément non-essentiel pour les organismes vivants (sans rôle biologique connu) et constitue un indicateur commun d'OSPAR. Les concentrations en Hg total dans les muscles de soles ont été déterminées par spectrométrie d'absorption atomique avec amalgamation sur un piège d'or (Advanced Mercury Analyser AMA-254, Altec Ltd.), suivant une méthode interne appliquée au laboratoire Ifremer CCEM et adaptée de Cossa et al. (2002). Cette méthode est détaillée en Annexe 10.

2.3.3 Contaminants inorganiques dans les foies de soles

Les contaminants inorganiques recherchés dans les foies de poissons incluent des éléments non-essentiels et/ou ayant une toxicité particulièrement élevée chez les bivalves et les poissons : le cadmium (Cd) et le plomb (Pb) (deux des indicateurs communs d'OSPAR), l'argent (Ag) ainsi que des éléments essentiels tels que le chrome (Cr), le nickel (Ni), le cuivre (Cu), le zinc (Zn). Les concentrations en ETM ciblés dans les foies de poissons ont été déterminées par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS, modèle ICAP-Qc de ThermoFisher), après minéralisation des échantillons par voie humide et acide assistée par micro-ondes (ETHOS-UP, Milestone), suivant une méthode interne multi-élémentaire adaptée de la méthode ANSES/LSAliments/LSA-INS-0084 (ex ANSES CIME 08) et détaillée en Annexe 10.

2.4 Analyses des contaminants chimiques chez la moule

Les analyses des contaminants chez les moules ont été faites dans le cadre du ROCCH MV. Brièvement, des lots d'une cinquantaine de moules ont été prélevés en février 2021 sur les stations ROCCH (dont sont issues les stations SELI). Les analyses des contaminants organiques ont été faites par le LABERCA Nantes (Vaccher et al., 2020) et les analyses de contaminants inorganiques ont été faites à CCEM (Ifremer, Nantes) suivant des protocoles similaires à ceux présentés pour les poissons. Les données de niveaux de contamination obtenues dans le cadre du ROCCH sont extraites de la base de données Quadrige.

2.5 Analyses statistiques

2.5.1 Gestion des données censurées (<LOQ)

Les concentrations en contaminants organiques inférieures à la limite de quantification (< LOQ) sont remplacées par la LOQ si disponible, sauf indication contraire (e.g. remplacement par 0 pour certains traitements statistiques sur les contaminants organiques). Les valeurs estimées des concentrations en ETM proches de la limite de quantification (< LOQ) et avec des taux de récupération des matériaux de référence utilisés (CRM) satisfaisants sont représentées et utilisées. Pour le Ni et Cr, les CRM ne sont pas satisfaisants, les valeurs estimées sont représentées mais elles ne sont pas utilisées pour les analyses statistiques. Les masses des gonades inférieures à la limite de précision de la balance (< 0,10 g) sont remplacées par 0,05 g.

2.5.2 Comparaison aux seuils

Les résultats sont comparés aux valeurs seuils disponibles (Tableau 1 et Tableau 2) sous les hypothèses et approximations discutées en introduction (section 1.5). Le nombre d'échantillons dépassant les seuils est indiqué sur chaque figure. Un dépassement d'EAC, de NQE ou d'EC est indiqué en rouge. Un dépassement de BAC quand il n'y a pas d'EAC est indiqué en orange.

2.5.3 Analyses statistiques univariées

2.5.3.1 Effet Station

Les analyses statistiques sont effectuées sous R (version 3.4.1 (2017-06-30)). Une p-value < 0,05 ou < 0,10 est considérée significative ou légèrement significative, respectivement.

Dans un premier temps, les réponses de chaque biomarqueur et les concentrations en chaque contaminants (ou somme de concentrations de contaminants d'une même famille) sont illustrées séparément. La variabilité spatiale des réponses est évaluée sur un sous-échantillon du jeu de données pour limiter l'importance des facteurs confondants biologiques dans l'analyse : les individus ont une taille entre 19 et 30 cm, un âge entre 1 et 2 ans, les stations sont considérées si $n > 5$ /station, et les données sont retenues si elles sont validées (bonne qualité). Sur ce jeu de données, l'effet de la station, du sexe et de l'âge sont testés pour évaluer s'ils peuvent (seuls ou en interaction) influencer l'ANOVA. Ensuite, un test post hoc (Tukey HSD) est effectué sur la/les variables ou interactions significatives. Si les conditions de normalité des résidus (Test de Shapiro, si besoin les données sont log-transformés pour satisfaire cette condition, c'est le cas notamment des concentrations) et d'homoscédasticité (Test de Levene $p > 0.05$) ne sont pas respectées, ou quand cela est précisé, une approche non paramétrique est utilisée (Test de Kruskal Wallis avec test post hoc Dunn). Pour les données avec beaucoup de 0 (occurrence des micronoyaux), les analyses sont seulement visuelles, les analyses statistiques de ce type de données requièrent des méthodes non mises en œuvre dans le cadre de ce rapport.

Pour les métaux, les concentrations en éléments traces (pf) se révélant variables entre individus à partir de l'âge de 2 ans, seuls les individus analysés âgés d'1 an ont finalement été considérés pour la comparaison statistique (différences spatiales) entre stations de Loire et de Vilaine pour SELILOIRE 2020. Cette approche exclut la station PITO du large dans cette comparaison, du fait du faible nombre d'individus âgés d'1 an prélevés et analysés sur cette station ($n=2$). Un test de Kruskal-Wallis (KW) complété d'un test de comparaison deux à deux avec correction de Holm a été utilisé pour tester les différences entre stations de la campagne SELILOIRE 2020 (L1 vs. L2 vs. PTCR vs. V1).

2.5.3.2 Effet âge

Sur la station PITO, des individus d'une large gamme d'âges ont été prélevés (1 à 10 ans) et ont permis d'appréhender l'effet potentiel de l'âge sur les biomarqueurs et les concentrations en contaminants mesurés. Des régressions linéaires ont été effectuées entre chaque variable et l'âge.

2.5.3.3 Comparaison entre campagne pour les concentrations en métaux

Un test de Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) a ensuite été utilisé pour tester les différences de concentrations mesurées entre années pour un même estuaire (*i.e.* Loire 2017 vs. Loire 2020, puis Vilaine 2017 vs. Vilaine 2020), ou entre estuaires pour une même année (*i.e.* Loire 2017 vs. Vilaine 2017, puis Loire 2020 vs. Vilaine 2020). Un test de KW complété d'un test de comparaison deux à deux avec correction de Holm a également été appliqué pour inclure la campagne SELISEINE 2018 dans une comparaison inter-estuaires et inter-années.

2.5.3.4 Comparaison des données d'occurrence (histopathologie)

Un test de Z-score ($p < 0.05$) a été utilisé pour tester les différences entre sites sur les données de prévalence (%) des lésions identifiées lors de l'analyse histopathologique (logiciel SPSS).

2.5.4 Analyses multivariées et évaluation intégrée

Différentes méthodes d'évaluation intégrée sont utilisées :

- *Analyses multivariées* : L'Analyse en Composante Principale (ACP) permet d'illustrer la variabilité de plusieurs paramètres ensemble. L'analyse de redondance partielle (RDA) est une extension de la régression multiple qui permet de modéliser l'effet des concentrations en contaminants (matrice explicative) sur la réponse des biomarqueurs (matrice réponse) en tenant compte des variables biologiques (covariables).
- *Approche par indice cumulé* soit en étudiant les écarts à la moyenne, ce qui permet d'inclure l'ensemble des variables étudiées, soit en étudiant l'écart au seuil (CHASE, (Andersen et al., 2019)) qui informe sur la qualité environnementale à cette station sur la base des variables pour lesquelles un seuil est disponible.
- *Approche par pourcentage de déclassement* (Vethaak et al., 2017), qui a été utilisée dans le rapport scientifique d'évaluation du bon état écologique au regard du D8C2 de la DCSMM en 2024 (Mauffret et al., 2023). Les indicateurs candidats ont été proposés par l'équipe scientifique (Responsables Thématiques D8) mais n'ont pas été retenus par la gouvernance DCSMM pour l'évaluation du BEE et donc non rapportés à la commission.

Les différents choix et étapes de ces approches sont détaillés dans les parties correspondantes.

3 Résultats – Réponses des biomarqueurs et bioaccumulation des contaminants chez les poissons plats en baie de Loire et Vilaine

3.1 Echantillonnage et adaptation aux conditions de terrain

Cent quarante-deux (142) individus ont été prélevés.

Plan d'échantillonnage

Huit stations ont été prospectées (Figure 1). Vingt (20) à 30 soles ont été prélevées par station au niveau de 5 de ces 8 stations : 3 proches de la Loire : L1, L2, PTCR, une station en Baie de Vilaine : V1, et une station un peu plus au large : PITO (Tableau 3). Le nombre d'individus pêchés au niveau des zones V2 et V3 (Baie de Vilaine), ainsi que la station L3 (Sud Ouest Loire) était respectivement de 2, 0 et 5, ce qui a été considéré trop faible pour représenter ces 3 zones. De plus, 10 individus à la station L2 étaient mort à la remontée : pour cette station, les indices biométriques ont été mesurés et une sélection de 2 types de biomarqueurs a été analysée : les métabolites de HAP mesurés dans la bile et les pathologies analysées dans le foie.

Parmi les 142 individus prélevés, l'âge a pu être estimé pour 132 d'entre eux ; 10 individus avaient des otolithes non-interprétables dus à des phénomènes de décalcification pour la plupart. Les individus prélevés avaient une taille comprise entre 18 et 46,5 cm et un âge compris entre 0 et 10 ans (Figure 4). La majorité d'entre eux (80 %) était âgée de 1 ou 2 ans (76 individus de 1 et 29 individus de 2 ans). L'échantillonnage a donc permis de cibler les gammes de taille visées. Les individus pêchés étaient néanmoins une année plus jeune que prévu selon les recommandations d'OSPAR (25 cm environ pour un âge de 2-3 ans (OSPAR, 2012)) et les estimations taille-âge des sole du Golfe de Gascogne (Leaute and Mahe, 2008). Le sex-ratio de l'échantillonnage était équilibré (64 mâles, 65 femelles).

Biométrie par station

Afin d'évaluer la variabilité spatiale des réponses des biomarqueurs et de la contamination, l'effet « station » est évalué dans un sous-échantillonnage d'individus pour ne pas confondre l'effet du paramètre explicatif avec des paramètres confondants (*e.g.* poids, taille, âge, Figure 4). Pour les biomarqueurs, les individus de taille (19 à 30 cm) et âge (1 à 2 ans) homogène ont été sélectionnés et seulement les stations avec $n \geq 5$ individus pour les biomarqueurs sont comparées ($n=100$ individus, 5 stations). Pour les contaminants chimiques, les 30 (contaminants organiques) et 37 (ETM) et 45 (Hg) sont analysés parmi ces 100 individus. Ce sous-échantillonnage ($n=30$) devait être constitué uniquement de mâles mais l'analyse des gonades a montré qu'un des individus sélectionnés était une femelle et non un mâle. Pour certaines analyses, cette sélection peut amener à n'avoir que 4 mesures quand un souci analytique n'a pas permis l'analyse de l'ensemble du sous-échantillon, *e.g.* PFAS en L2. Aucune différence significative de taille ou poids n'a été observée entre station ($p > 0,05$ par le test de Kruskal Wallis (test post hoc Dunn) et son équivalent paramétrique ANOVA (test post hoc sur les moyennes marginales), pour les soles utilisées pour l'analyse de la variabilité spatiale de la réponse des biomarqueurs $n=100$, ou de la contamination $n=30$ (Figure 4). Par contre, le sous-échantillonnage pour l'analyse de la variabilité spatiale de la réponse des biomarqueurs est composé de plus d'individus de 1 an à V1 et L1 qu'aux autres stations ($p < 0,05$, ANOVA, nombre d'individu de 1-2 ans : L1 : 16-4 ; L2 : 13-6, PITO : 4-9, PTCR : 18-8, V1 : 22-0).

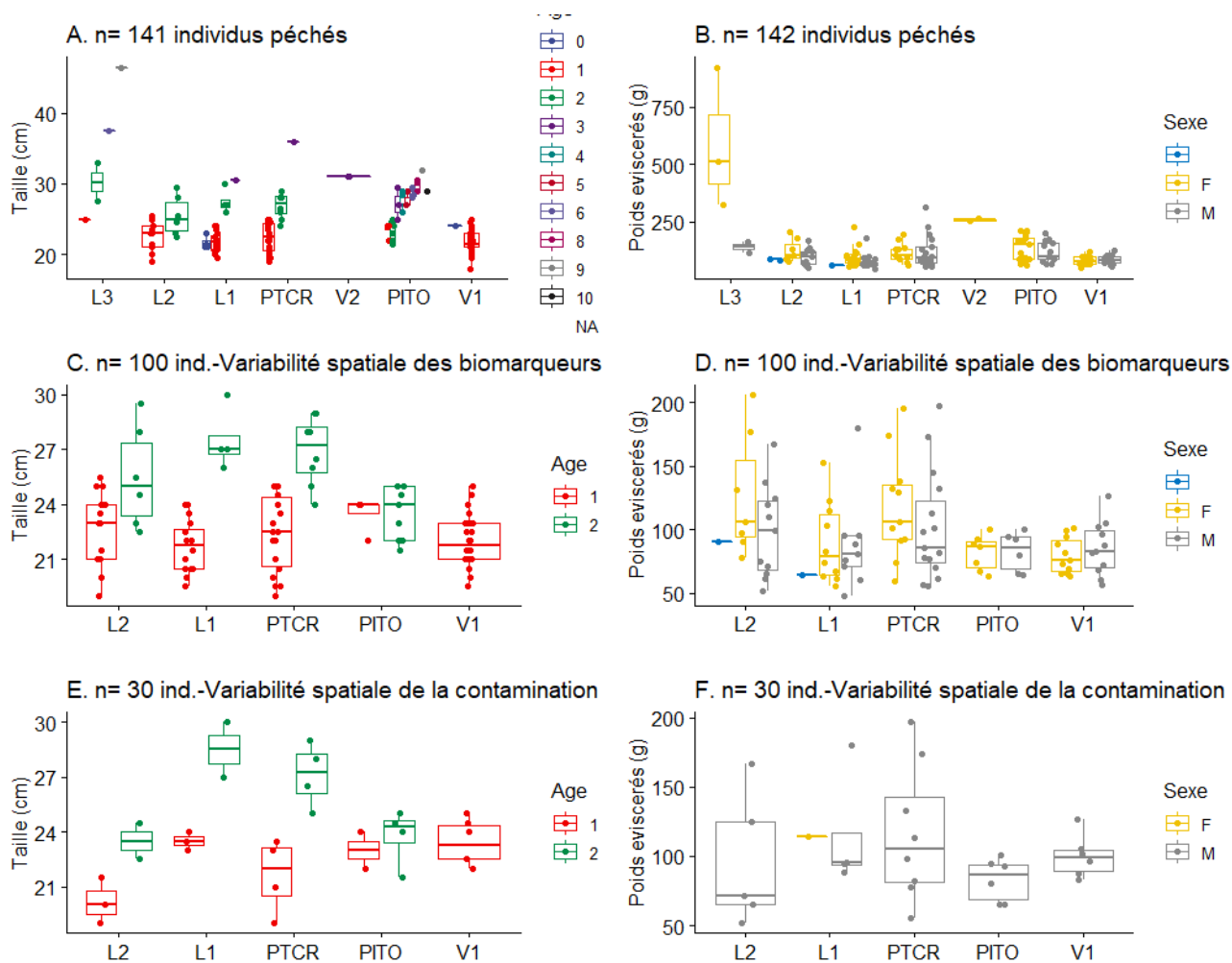


Figure 4 – Biométrie et âge des soles prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020. A et B : ensemble des soles collectées, n (taille) = 141 et n (poids) = 142 (pas de taille reportée pour 1 sole) ; **C-D :** soles sous-échantillonnées pour l'analyse de la variabilité spatiale de la réponse des organismes aux contaminant. $N = 100$, critère de sélection : taille entre 19 et 30 cm, âges de 1 et 2 ans, $n > 5$ /station, pas de différence de taille et poids entre station ($p > 0,05$), mais davantage d'individus de 1 an à L1 et V1 qu'aux autres stations ($p < 0,05$). **E-F :** soles sous-échantillonnées pour l'analyse de la des contaminants chimiques organiques et inorganiques. $N = 30$, critère de sélection : idem C-D + mâles (5 à 8 par station) + RGS, RHS et indice de Fulton homogène (un individu en L1 a été identifié initialement (à bord) comme mâle, mais l'analyse des gonades a montré que c'était une femelle). Pas de différence de taille, poids et âge entre station ($p > 0,05$). A noter que les contaminants inorganiques ont été faits sur plus d'individus à PITO pour analyser l'effet de l'âge sur la contamination.

Indices de condition

Les rapports gonado-somatiques (RGS) et hépato-somatiques (RHS) permettent d'informer sur le stade de développement des gonades et de déterminer les périodes de ponte au cours du cycle sexuel d'une espèce, ainsi que le niveau d'énergie stockée par les individus. L'évolution annuelle du RGS d'un poisson mature suit généralement trois phases : une première phase où le RGS commence à augmenter pour atteindre un pic qui correspond à la phase de maturation, une seconde phase où il diminue, correspondant à la ponte, puis une troisième phase où le rapport est au minimum, correspondant à la période de repos biologique ou sexuel. Les variations en poids du foie (augmentation, diminution) accompagnent celles des ovaires : les réserves lipidiques du foie seraient utilisées par les géniteurs pour l'élaboration des gamètes et notamment des dernières réserves vitellines (Deniel, 1981, Deniel and Tassel, 1985, Le Bec, 1985). Ces dernières études ont montré que chez des soles en période de repos sexuel, le RGS et le RHS moyen ne semblent pas dépasser 1

à 2 % et 1%, respectivement. Ces valeurs de RGS et RHS moyen par station (< ca. 1%) confirment que les poissons sont hors de leur période de reproduction (Figure 5). L'intérêt de suivre les indices de condition sur du long terme est d'utiliser leurs évolutions temporelles pour détecter d'éventuels effets délétères des contaminants sur le système endocrinien et la reproduction. Certains individus ont néanmoins des valeurs plus élevées ($\geq 1,2\%$) : 6 femelles ont des RGS entre 1,2 et 1,6 (âge de 1 à 10 ans, en L1, PTCR et PITO) et une 7^{ème} femelle a un RGS à 3,3 en L1 (L1-S14). Cette 7^{ème} sole avait 1 an et ses gonades étaient visuellement pleines confirmant la valeur de RGS ; ce qui est aussi confirmée par l'analyse du stade de maturité des gonades : stade III (vitellogénèse tardive, voir 3.2.5.1). Onze individus ont des RHS entre 1,2 et 2,2 %, 2F de L3, 3 (1F et 2M) de PTCR, 1M de PITO et 5 (3F, 2M) de V1. Un douzième individu (F) de L2 a un RHS de 4,6%. Il fait partie des 10 individus morts de L2, chez qui nous avons mené uniquement l'analyse des métabolites biliaires de HAP et les analyses histopathologiques. Les résultats chez ces deux individus avec les RGS et RHS maximaux n'étaient pas particulièrement remarquables, *i.e.* ne sont pas dans les quelques individus présentant des valeurs aux extrémités de la distribution des biomarqueurs. Les contaminants n'ont pas été analysés chez ces 2 individus. Dans le sous échantillonnage pour l'étude de la variabilité spatiale des biomarqueurs (n = 100), les RGS et RHS sont similaires entre stations, âge et sexe (sans interaction significative, $p > 0,05$) sauf pour le RGS qui est supérieur chez les femelles que les mâles comme attendu.

L'indice K de Fulton (Poids / Taille³) se base sur l'hypothèse que plus un poisson est gros à une taille donnée, plus sa condition est bonne. L'indice de Fulton des soles des baie de Loire et Vilaine varie de 0,48 à 1,13 (n=141), avec seulement 2 individus en L2 présentant des indices de Fulton > 1 (Figure 5). Dans le sous-jeu de données pour la comparaison des stations (n = 100), les indices de Fulton étaient différents entre stations avec les soles de PITO présentant des indices de Fulton plus faibles que celles de L2, PTCR et V1.

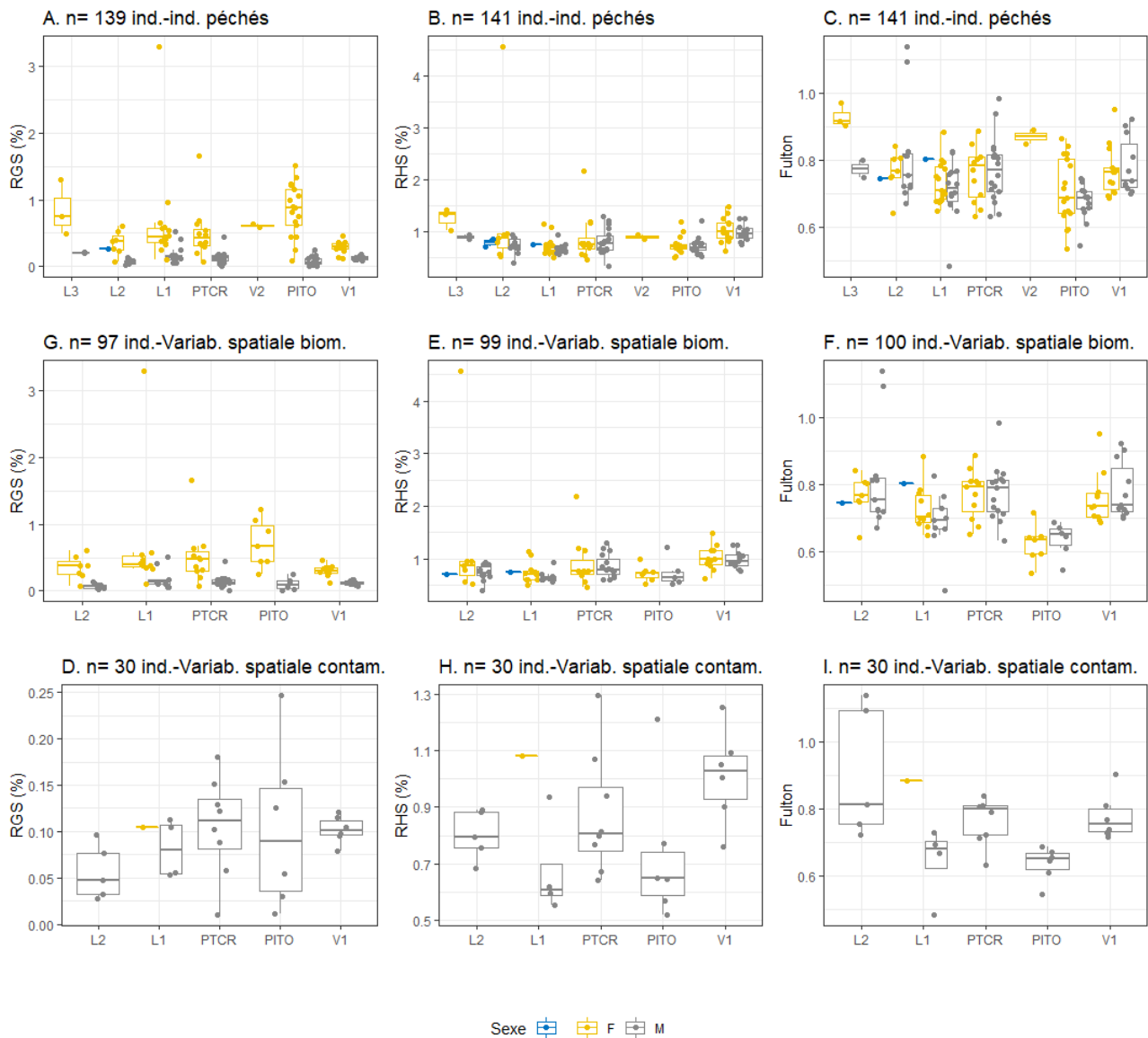


Figure 5 – Indices de condition de l'ensemble des soles prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020. RGS, RHS et Indice de Fulton pour les différents groupes (bleu : indéterminé, F : femelle, M : male) : A,B,C : échantillonnage complet (N = 139-141) ; D,E,F sous-échantillonnage pour l'analyse de la variabilité spatiale de la réponse des organismes aux contaminants (N = 97-100, critère de sélection : taille entre 19 et 30 cm, âges de 1 et 2 ans, $n > 5$ /station) ; pas de différence de taille et poids entre station ($p > 0,05$), mais plus d'individus de 1 an à L1 et V1 qu'aux autres stations ($p < 0,05$) ; G,H,I : sous-échantillonnage pour l'analyse des contaminants chimiques organiques et inorganiques (N = 30, critère de sélection : idem C-D + 5 à 8 mâles par station de RGS, RHS et indice de Fulton homogène (un individu en L1 a été identifié comme mâle, mais l'analyse des gonades a montré qu'il s'agissait d'une femelle)). Pas de différence de taille, poids et âge entre station ($p > 0,05$). Différences analysées par des approches paramétriques (ANOVA) et non paramétriques (Kruskal Wallis).

3.2 Réponses des biomarqueurs chez les poissons plats prélevés en Baie de Loire

3.2.1 Biomarqueurs d'état de santé général : Intégrité des lysosomes

L'intégrité fonctionnelle lysosomale est hautement conservée sur le plan de l'évolution. La stabilité de la membrane lysosomale (LMS : Lysosomale membrane stability) est un biomarqueur de l'état de santé individuel ; le dysfonctionnement des processus lysosomaux est lié à de nombreux aspects de pathologies associées à la toxicité de contaminants chimiques et des maladies dégénératives (Davies and Vethaak, 2012). Pour ce paramètre, une réduction du temps de labilisation indique une baisse dans l'état de santé général.

Sur les 142 poissons échantillonnés lors de la campagne, 19 échantillons comportaient trop peu de tissu (foie) pour être analysés et 1 n'a pu être analysé, dû à la mauvaise qualité de l'échantillon (classé « Faux »). Sur les 122 individus analysés, le temps de labilisation de la membrane lysosomale varie de 6,00 à 21,25 min au niveau individuel et de $8,95 \pm 1,46$ min (site L2) à un maximum de $13,68 \pm 3,43$ min (site V1) au niveau des moyennes par station. Pour toutes les espèces marines, une période de labilisation (LP) inférieure à 10 min est considérée comme indicatrice d'un état de santé altéré, et la valeur de la BAC est estimée à 20 min selon Davies and Vethaak (2012). A l'échelle de la zone de prospection de la campagne, un individu avait une valeur de LMS supérieure ou égale au BAC, 73 (60%) avaient des valeurs entre le BAC et l'EAC, et 48 (39%) avaient des valeurs égales ou inférieures à l'EAC indiquant une atteinte de la stabilité membranaire des lysosomes hépatiques.

Le temps de labilisation des lysosomes hépatiques des soles est différent entre stations ($p = 0,0005$), avec des soles présentant une intégrité des lysosomes hépatiques plus altérée à L2, puis de manière intermédiaire à PTCR, L1 et PITO et moins altérée à V1 ($p < 0,05$, **Figure 6**). Nous n'avons donc pas détecté de gradient clair depuis l'estuaire de la Loire vers Belle Ile pour ce biomarqueur. Par contre, la réponse du biomarqueur LMS semble diminuer avec l'âge ($p = 0,0072$, Pearson $R = -0,56$) ce qui pourrait s'expliquer par un effet cumulé de la contamination au cours des années et/ou une capacité de récupération plus lente chez les individus plus âgés (Köhler et al., 2002).

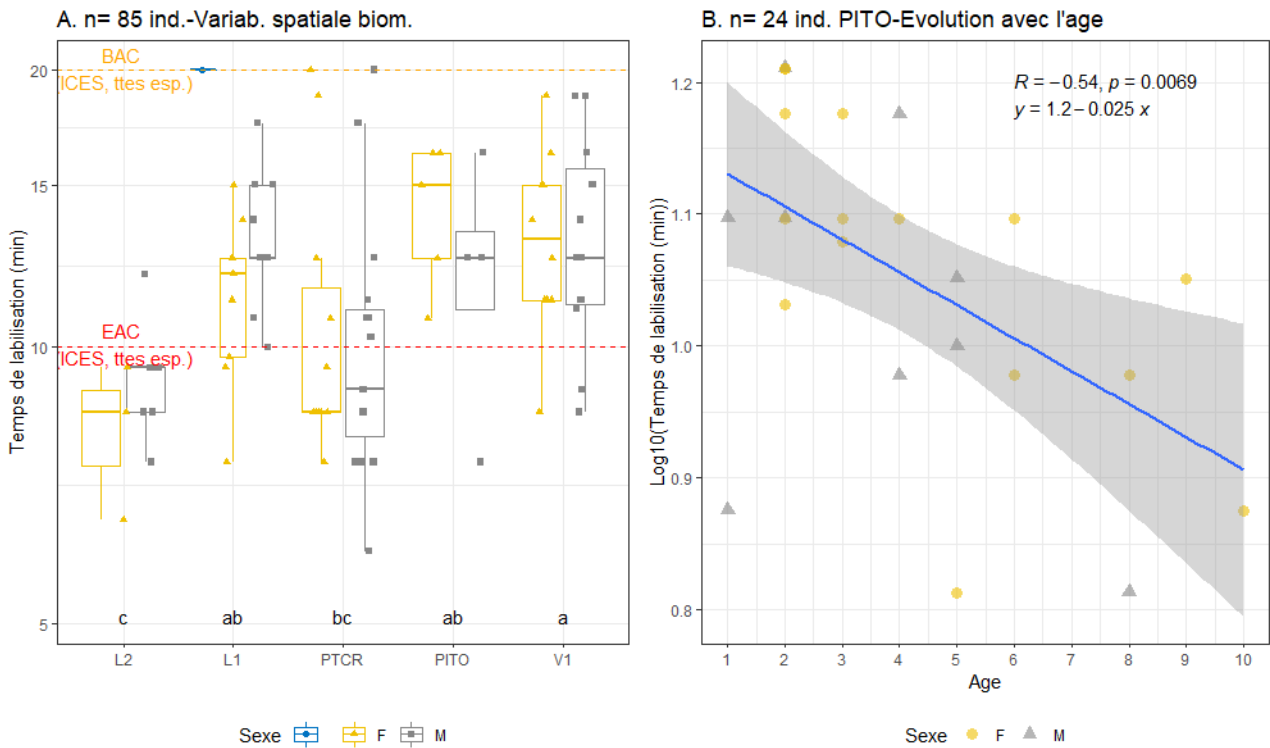


Figure 6 - Stabilité de la membrane lysosomale dans le foie de soles prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020. Bleu : indéterminé, F : femelle, M : male. **A** : soles sous-échantillonnées pour l'analyse de la variabilité spatiale : taille entre 19 et 30 cm, âges de 1 et 2 ans, $n > 5$ /station et données LMS validées. Pour l'effet Station*Age*Sexe: seul l'effet Station est significatif (ANOVA sur données log-transformées : $p < 0,0001$, QQplot linéaire : test de Shapiro $p > 0,05$, Test de Levene $p > 0,05$). Les lettres en bas du plot correspondent aux stations significativement différentes selon le test post hoc de Tukey ($p < 0,05$). **B** : régression linéaire sur les soles de PITO et corrélation de Pearson, station avec une gamme d'âge étendue, gris : intervalle de confiance à 95% des prédictions du modèle.

Tableau 4 - Biomarqueurs de lysosomes analysés chez les soles prélevées sur l'ensemble de la campagne (All), et pour les 5 stations auxquelles plus de 5 poissons ont été analysés lors de la campagne SELILOIRE 2020 en baie de Loire et Vilaine (moyenne \pm écart type, tous âges prélevés). LMS : Stabilité de la membrane lysosomale. LSC : Changements de structure lysosomale : Vv : densité volumétrique lysosomale, S/V : ratio surface/volume (inversement proportionnel à la taille des lysosomes), Nv : densité numérique lysosomale, Vv (NL) : accumulation intracellulaire de lipides neutres.

	n (LMS/LSC/ VvNL)	LMS min	Vv $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	S/V $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$	Nv $1/\mu\text{m}^3$	Vv(NL) $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$
All	123/120/123	11,70 \pm 3,50	0,0010 \pm 0,0008	7,7 \pm 1,4	0,0052 \pm 0,0019	0,0870 \pm 0,6230
L2	10/10/10	8,95 \pm 1,46	0,0008 \pm 0,0003	7,8 \pm 1,0	0,0049 \pm 0,0012	0,0015 \pm 0,0024
L1	27/28/28	12,29 \pm 3,12	0,0008 \pm 0,0003	8,1 \pm 1,1	0,0056 \pm 0,0020	0,0009 \pm 0,0036
PTCR	30/29/30	10,78 \pm 4,07	0,0010 \pm 0,0009	7,2 \pm 1,9	0,0047 \pm 0,0017	0,0145 \pm 0,0666
PITO	25/24/25	11,72 \pm 2,94	0,0015 \pm 0,0011	7,3 \pm 1,8	0,0066 \pm 0,0021	0,0257 \pm 0,0460
V1	24/24/24	13,68 \pm 3,43	0,0006 \pm 0,0003	8,2 \pm 1,0	0,0044 \pm 0,0014	0,0011 \pm 0,0017

Ce biomarqueur lysosomal de stress général avait également été analysé lors de la campagne SELILOIRE 2017 (sites L1, L2, L3 V1, V2 et V3 (Mauffret et al., 2019)) et SELISEINE 2018 (Mauffret et al., 2021). En 2017, les valeurs maximales de LP avaient aussi été observées chez les individus provenant de V1 ($LP_{V1-2017} = 10,15 \pm 1,43$ min) et les minimales du site L2 ($LP_{L2-2017} = 7,46 \pm 2,87$ min). Les valeurs globales du paramètre LP mesurées pour l'ensemble de la campagne SELILOIRE 2020 ($LP_{SLL-2020} = 11,70 \pm 3,50$ min) sont semblables aux valeurs pour SELILOIRE 2017 ($LP_{SLL-2017} = 8,48 \pm 2,36$ min) et SELISEINE 2018 ($LP_{SLS-2018} = 11,04 \pm 4,96$ min), tous sites confondus.

Dans le cas de la campagne SELILOIRE 2017, les valeurs de LP peuvent être comparées par site avec les valeurs obtenues en 2020. Pour chaque site, les valeurs de LP mesurées en 2020 sont égales ou supérieures aux valeurs obtenues en 2017, en particulier pour LP_{L1} (LP_{L1-2017} = 8,23 ± 2,37 min ; LP_{L1-2020} = 12,29 ± 3,12 min) et LP_{V1} (LP_{V1-2017} = 10,15 ± 1,43 min ; LP_{V1-2020} = 13,68 ± 3,43 min) qui varient significativement entre 2017 et 2020 (test Mann-Whitney, p<0,05). Comme observé pour les échantillons de moules de PC, cette augmentation en valeurs de LP entre les deux campagnes suggère de meilleures conditions environnementales pour ces sites (L1 et V1) en 2020 qu'en 2017.

Afin de compléter le biomarqueur basé sur la stabilité de la membrane lysosomale, les changements structuraux et de contenu des lysosomes ont été mesurés (Tableau 4 et Figure 7). Pour ces paramètres, chez des individus d'âge et taille similaires, la densité numérique lysosomale (Nv) est la plus faible chez les individus de V1 et la plus élevée à PITO (p < 0,05, Figure 7). La densité volumétrique lysosomale (Vv), le ratio surface/volume (S/V) et l'accumulation des lipides neutres semblent similaires entre stations pour des individus d'âge et taille similaires (p > 0,05). Selon plusieurs observations, les effets d'un stress sur la structure des lysosomes peuvent engendrer une augmentation de la densité volumétrique (Vv) associée à une diminution du ratio surface/volume (S/V) et/ou à une augmentation de la densité numérique (Nv) (Alvarado et al., 2005, Briaudeau et al., 2021, Briaudeau et al., 2023). Sur la base des valeurs de Nv chez les soles de SELILOIRE 2020, il semblerait que les individus soient moins stressés à V1 et plus stressés à PITO qu'aux autres stations. Ces observations sont en partie en accord avec les mesures de stabilité de la membrane lysosomale suggérant que les individus provenant du site V1 seraient moins exposés à un stress environnemental que ceux des autres sites.

Il n'existe pas de seuil de référence concernant les paramètres de structure lysosomale. Néanmoins, en comparant les résultats présents aux valeurs indiquées dans des études précédentes et dans d'autres espèces de poissons, la population de lysosomes analysée lors de la campagne SELILOIRE 2020 est constituée de nombreux lysosomes de petite taille (valeurs moyennes de S/V inférieure et Nv supérieure) (Alvarado et al., 2005, Izagirre, 2007, Briaudeau et al., 2020, Briaudeau et al., 2021, Briaudeau et al., 2023). De la même manière, l'accumulation moyenne de lipides neutres (Vv_{NL}) est supérieure aux valeurs reportées chez la sole cultivée (Briaudeau et al., 2020, 2021, 2023). Chez les poissons, l'accumulation hépatocytaire de lipides neutres, représentées par Vv_{NL} est utilisée comme indicateur de changements physiologiques notamment en réponse à une exposition à un stress chimique et peut être considéré comme un précurseur de lésions hépatiques (Köhler et al., 1992, Viarengo et al., 2007). Dans le cas présent, les deux individus avec les valeurs d'accumulation de lipides neutres les plus élevées (5,92 μm³/ μm³ et 3,61 μm³/ μm³, respectivement) proviennent du site L3.

En comparaison avec la campagne SELILOIRE 2017, les paramètres de structure lysosomale diminuent significativement (MW : p<0,05) entre 2017 et 2020 pour les sites L1, L2 et V1, en particulier pour la densité volumétrique Vv (en μm³/ μm³ ; L1₂₀₁₇ = 0,0010 ± 0,0000 > L1₂₀₂₀ = 0,0008 ± 0,0003 ; L2₂₀₁₇ = 0,0015 ± 0,0011 > L2₂₀₂₀ = 0,0008 ± 0,0003 ; V1₂₀₁₇ = 0,0016 ± 0,0008 > V1₂₀₂₀ = 0,0006 ± 0,0003) et la densité numérique Nv (en 1/ μm³ ; L1₂₀₁₇ = 0,0080 ± 0,0012 > L1₂₀₂₀ = 0,0056 ± 0,0020 ; L2₂₀₁₇ = 0,0082 ± 0,0022 > L2₂₀₂₀ = 0,0049 ± 0,0012 ; V1₂₀₁₇ = 0,0076 ± 0,0029 > V1₂₀₂₀ = 0,0044 ± 0,0014). Un des effets de la contamination sur la structure lysosomale est l'augmentation de la taille et/ou du nombre de lysosomes des hépatocytes. Par conséquent dans le cas présent, la diminution en Vv et Nv entre 2017 et 2020 pour certains sites (L1, L2 et V1) suggèrent de meilleures conditions environnementales pour ces zones en 2020 qu'en 2017. Ces données sont en accord avec les mesures faites sur le temps de labilisation de la membrane lysosomale (LP, en min) chez la moule et les poissons, en particulier pour PC chez la moule et L1 et V1 pour les poissons plats.

En résumé, l'intégrité des lysosomes hépatiques est plus altérée à L2 pour la stabilité de la membrane (LMS, et de manière intermédiaire les 2 autres stations de Loire) et PITO pour la densité numérique (Nv, et de

manière intermédiaire les 3 stations de Loire) qu'en Vilaine ($p < 0,05$, **Figure 6**). L'altération de la stabilité de la membrane lysosomale et de la structure des lysosomes (Vv et S/V) augmente avec l'âge (Figure 7).

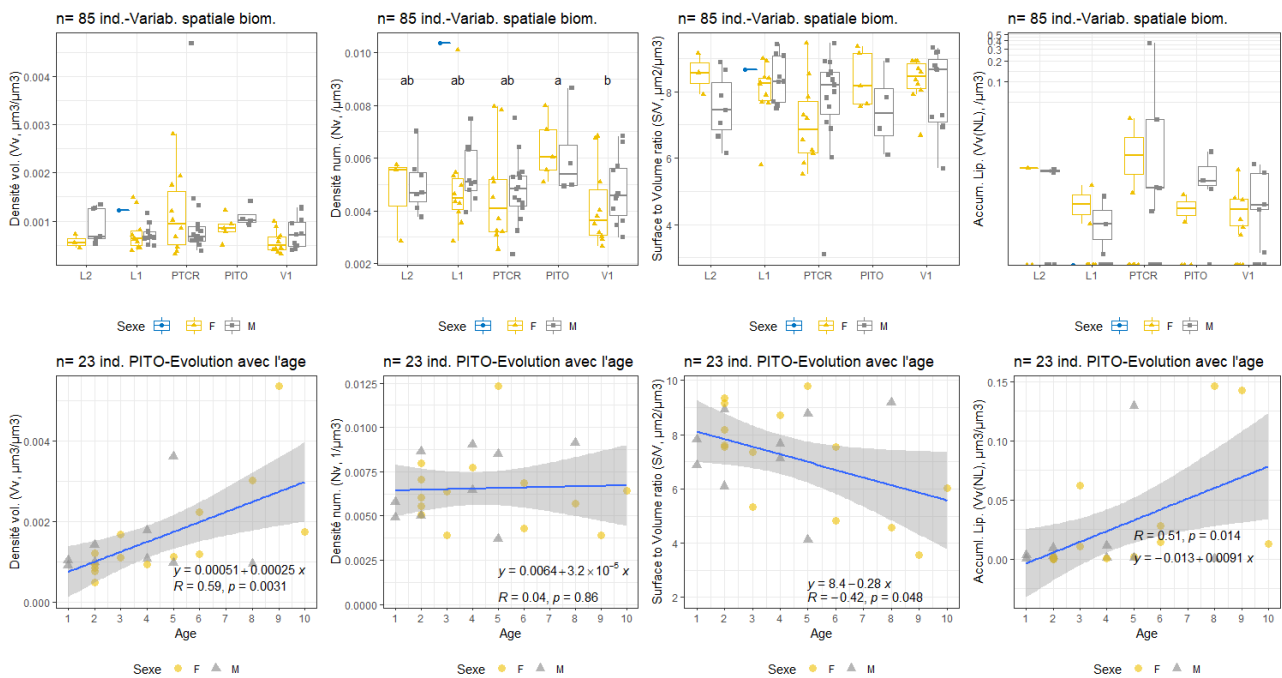


Figure 7 - Changement dans la structure des lysosomes (LSC) dans le foie selon la station (haut) ou l'âge (bas) des soles prélevées à PITO lors la campagne SELILOIRE 2020 (corrélations de Pearson). Bleu : indéterminé, F : femelle, M : male. Vv : densité volumétrique lysosomale, Nv : densité numérique lysosomale, S/V : ratio surface/volume (inversement proportionnel à la taille des lysosomes), Vv (NL) : accumulation de lipides neutres. **Haut** : soles sous-échantillonnées pour l'analyse de la variabilité spatiale : taille entre 19 et 30 cm, âges de 1 et 2 ans, $n > 5$ /station et données LSC validées. Pour l'effet Station*Age*Sexe sur Nv, Vv et S.V: ANOVA sur données Nv et Vv log-transformées, S.V naturelle (non log) : seul l'effet Station pour Nv est significatif $p < 0,03$. Les lettres en haut du plot correspondent aux stations significativement différentes selon le test post hoc de Tukey ($p < 0,05$). QQplot linéaires, normalité des résidus vérifiée par un test de Shapiro et variances homogènes (Test de Levene $p > 0,05$) pour les 3 ANOVA. Pour l'effet Station sur Vv(NL) : données non normalement distribuées après transformation mathématique, Test Kruskal Wallis $p > 0,05$. **Bas** : régression linéaire sur les soles de PITO et corrélation de Pearson, station avec une gamme d'âge étendue, gris : intervalle de confiance à 95% des prédictions du modèle.

3.2.2 Biomarqueurs de génotoxicité : test des comètes et des micronoyaux

3.2.2.1 Test des comètes

L'exposition à des substances chimiques ou à leurs sous-produits issus du métabolisme (métabolites ou oxyradicaux) peut conduire à des atteintes du matériel génétique. Plusieurs types de dommages au matériel génétique peuvent être observés dont des lésions structurales primaires de l'ADN telles que des cassures de brins. Lorsqu'elles ne sont pas réparées ces lésions peuvent avoir des conséquences sur l'expression du génome et sur la physiologie des organismes exposés.

Sur les 132 individus prélevés vivants, les niveaux de cassures de brins de l'ADN ont pu être mesurés pour 113 d'entre eux pêchés aux 7 stations échantillonnées au cours de la campagne. Les niveaux varient de 10,6 à 38,8 % de l'ADN dans la queue de la comète. Chez les limandes et les morues, un pourcentage de 5 % est considéré comme une valeur BAC selon Davies and Vethaak (2012). Par ailleurs, d'après les précédentes études menées chez les limandes échantillonnées en 2001, 2005 et 2006, en Baie de Seine, les plus faibles valeurs de cassures de brins de l'ADN (% Tail DNA ou % de l'ADN dans la queue de la comète) obtenues

étaient de 16 % et correspondaient à la zone prospectée la plus éloignée de l'estuaire, au milieu Est de la Baie de Seine (Akcha et al., 2003, Devier et al., 2013). En Seine, la sole semblait plus sensible aux atteintes génotoxiques que le flet et la limande, suggérant que les seuils développés pour le flet et la limande seraient peu protecteurs pour la sole (Mauffret et al., 2021, Roubeix et al., 2023). Dans tous les cas, les niveaux de cassures de brins de l'ADN mesurés chez les soles en Loire et Vilaine en 2020 sont supérieurs à ces niveaux de fond (BAC) ou au large de l'estuaire de Seine, ce qui suggère que les soles échantillonnées au cours de cette étude étaient exposées à un stress génotoxique.

Les niveaux de cassures de brins de l'ADN sont similaires entre station pour des individus d'âge et taille similaires (n=78, Figure 8). A PITO, où les soles prélevées ont de 2 à 10 ans, les niveaux de cassures de brins de l'ADN n'évoluent pas significativement avec l'âge (p = 0,22, Figure 8).

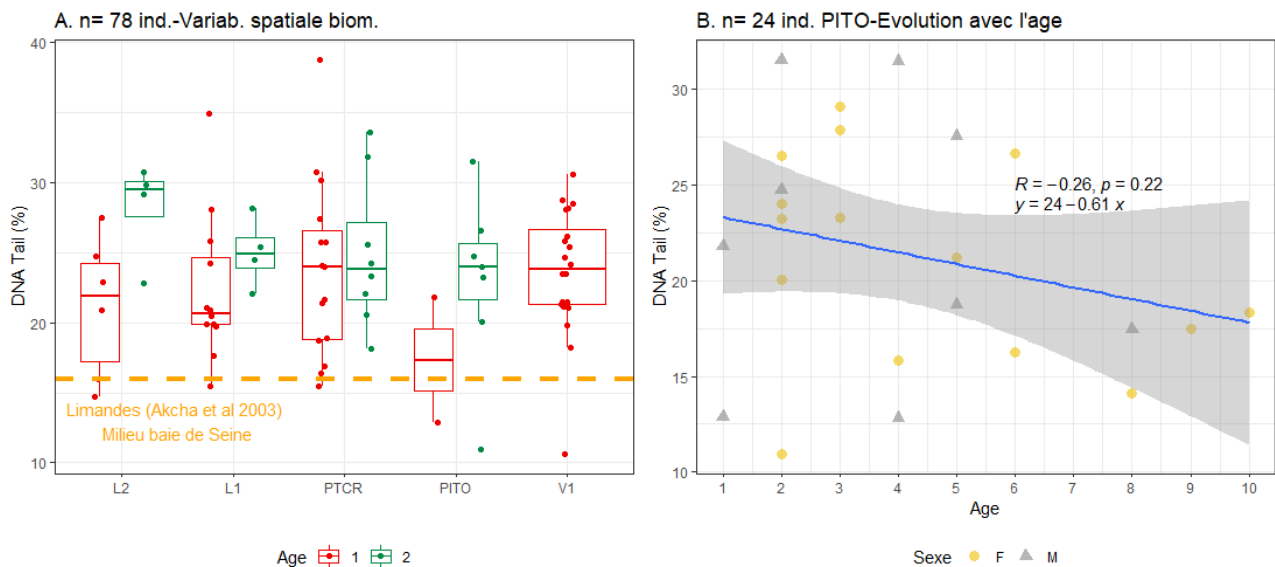


Figure 8 – Niveau de cassures de brins de l'ADN (%DNA Tail) mesuré par le test des comètes dans les érythrocytes de soles prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020. Gauche : soles sous-échantillonnées pour l'analyse de la variabilité spatiale : taille entre 19 et 30 cm, âges de 1 et 2 ans, n>5/station, données Comet validées. Pas de différence du DNA tail entre stations, âges (1-2 ans) et sexes (M-F) ou leur interaction (3-way ANOVA, $p>0,05$, Test de Shapiro $p>0,05$: données distribuées normalement, Test de Levene $p>0,05$: variances homogènes). **Droite :** régression linéaire sur les soles de PITO, station avec une gamme d'âge étendue, gris : intervalle de confiance à 95% des prédictions du modèle.

3.2.2.2 Test 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 qui aboutit à l'apparition de mutations chromosomiques non réparables, stables dans le temps et héréditaires. L'évolution de la fréquence des micronoyaux représente donc une réponse intégrée dans le temps.

Sur les 132 individus prélevés vivants, le test des micronoyaux a été effectué sur 131 échantillons, dont 103 qui ne présentaient pas de micronoyaux (0 micronoyau sur 5000 cellules comptées, 79% des soles) et 28 qui présentaient de 0,4 à 1,4 micronoyaux pour 1000 cellules. La BAC pour la fréquence de cellules micronucléées développée dans le cadre du CIEM dépend de l'espèce et est comprise entre 0,3 et 0,5 ‰ selon les espèces étudiées (flet : 0 – 0,3 ‰, limande : 0,5 ‰, morue : 0,4 ‰, rouget barbet : 0,3 ‰ (Davies and Vethaak, 2012)). Les valeurs de BAC se rapportent à la moyenne d'occurrence par station ; elle est inférieure aux différentes

BAC dans les 5 stations étudiées pour la variabilité spatiale, ce qui suggère que la fréquence de cellules micronucléées chez les soles de Loire et Vilaine sont de l'ordre des valeurs de fond.

La fréquence des micronoyaux est faible et présente de nombreux « 0 » (zéro, Figure 9). Nous nous sommes limités à une interprétation visuelle des différences entre station ; leurs analyses statistiques demandent des précautions qui ne sont pas prises dans le cadre des analyses mises en place pour ce rapport. Visuellement, il n'y a pas de nette différence entre stations ou entre sexes (M-F, Figure 9). A PITO, où les soles prélevées ont de 2 à 10 ans, la fréquence des micronoyaux ne semble pas évoluer avec l'âge (Figure 9).

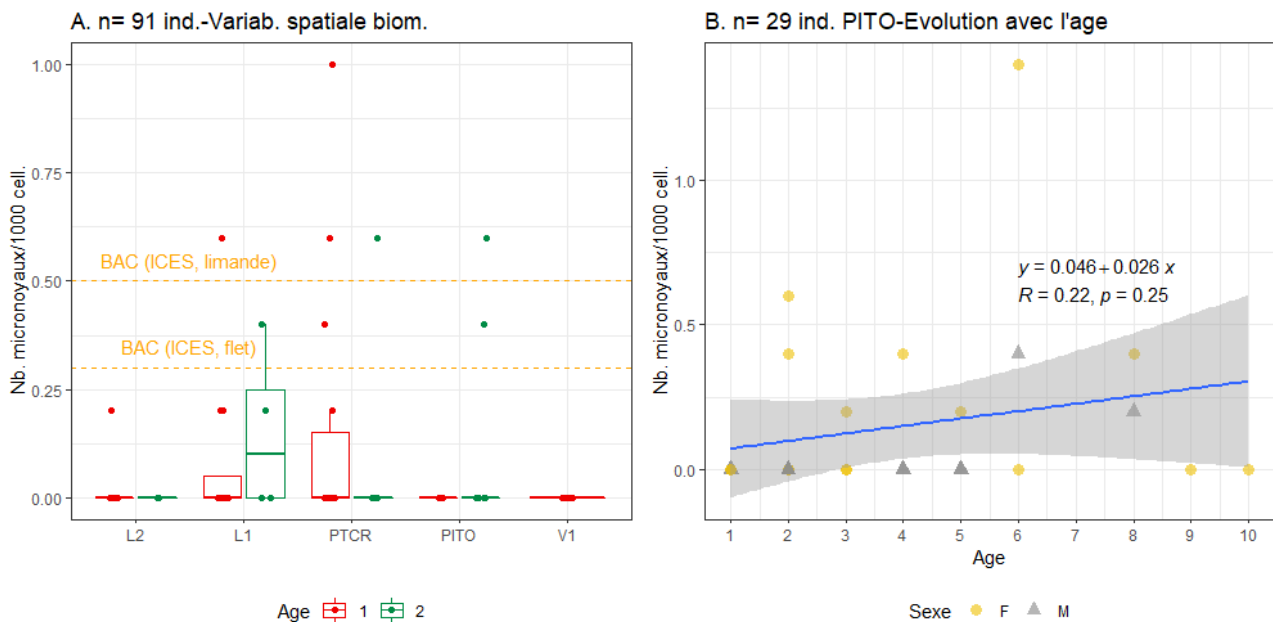


Figure 9 – Fréquence de cellules micronucléées (MN, ‰) dans les érythrocytes de soles prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020. Gauche : soles sous-échantillonnées pour l'analyse de la variabilité spatiale : taille entre 19 et 30 cm, âges de 1 et 2 ans, n>5/station, données MN validées. **Droite :** régression linéaire sur les soles de PITO et corrélation de Pearson, station avec une gamme d'âge étendue, gris : intervalle de confiance à 95% des prédictions du modèle.

3.2.3 Biomarqueurs de neurotoxicité

L'enzyme AChE joue un rôle clef dans la transmission nerveuse. La présence de cette enzyme a été démontrée dans divers tissus d'organismes marins, y compris les tissus musculaires et cérébraux de poissons, les muscles, les hémocytes et les branchies des crustacés (Bocquené et al., 1990). Elle a pour rôle d'hydrolyser un neurotransmetteur, l'acétylcholine, présent dans les récepteurs cholinergiques et qui intervient dans la contraction musculaire. L'enzyme AChE limite le temps de la contraction musculaire en hydrolysant l'acétylcholine. L'inhibition de l'activité enzymatique AChE conduit à l'accumulation du neurotransmetteur qui entraîne une sur-stimulation spécifique de neurones de la jonction neuromusculaire et donc des perturbations dans la transmission de l'influx nerveux. Les contaminants neurotoxiques peuvent inhiber l'activité catalytique de l'enzyme AChE, et ainsi être responsables de graves dysfonctionnements neurologiques. Chez les vertébrés, l'inhibition de l'activité enzymatique AChE cérébrale constitue un des principaux mécanismes de l'action toxique des insecticides organophosphorés et des carbamates (Bocquene and Galgani, 1998). Chez la moule, l'inhibition de l'activité enzymatique AChE peut entraîner une faiblesse de la fixation byssale et un entrebâillement valvaire. Cette mesure est applicable à un large éventail d'espèces et présente l'avantage de détecter et de quantifier l'exposition à des substances neurotoxiques sans avoir de connaissance détaillée des contaminants en présence. Bien que l'activité AChE mesurée chez la moule soit

plus faible que celle mesurée chez les vertébrés, sa mesure a été proposée comme biomarqueur d'exposition à la contamination chimique dans le cadre de programme de surveillance (Bocquené et al., 1993).

Sur l'ensemble de la campagne SELILOIRE 2020, l'activité de l'enzyme AChE a été mesurée chez 123 soles parmi les 132 pour lesquelles du muscle a pu être prélevé et varie de 21,6 à 223,9 nmol min⁻¹ µg protéine⁻¹. Des critères d'évaluation (BAC/EAC) ont été développés pour l'activité AChE mesurée dans le muscle de flets, limandes et rougets : 235/165, 150/105, 155/109 nmol min⁻¹ mg protéine⁻¹, respectivement (Davies and Vethaak, 2012). Ils se rapportent à la moyenne des données par station. Selon les données que nous avons obtenues en Baie de Seine en 2018, l'activité de l'enzyme AChE des soles était similaire à celle mesurée chez les limandes, suggérant que le seuil développé pour la limande pourrait être appliqué à la sole dans l'attente de développement d'un seuil spécifique à la sole (Mauffret et al., 2021). Une large majorité des soles de SELILOIRE 2020 présente des activités AChE plus faibles (inhibées) que cet EAC (nb. de soles ≤ EAC : 118/123) suggérant que les soles en Loire et Vilaine sont soumises à un stress neurotoxique.

L'activité de l'AChE est similaire entre mâles et femelles mais dépend de l'âge (1 et 2 ans) et de la station (ANOVA : AChE en fonction de « Station x âge x Sexe » : tous les effets sont non significatifs (p>0,05) sauf pour les « Station » et l'interaction « âge x Station » : p<0,05, n=85, Figure 10). De manière globale, l'activité AChE est moins inhibée à PITO qu'aux 4 autres stations et l'effet de l'âge dépend de la station. Par ailleurs, à PITO, où les soles prélevées ont de 2 à 10 ans, l'activité de l'AChE n'évolue pas significativement avec l'âge (p = 0,32, n=24, Figure 10).

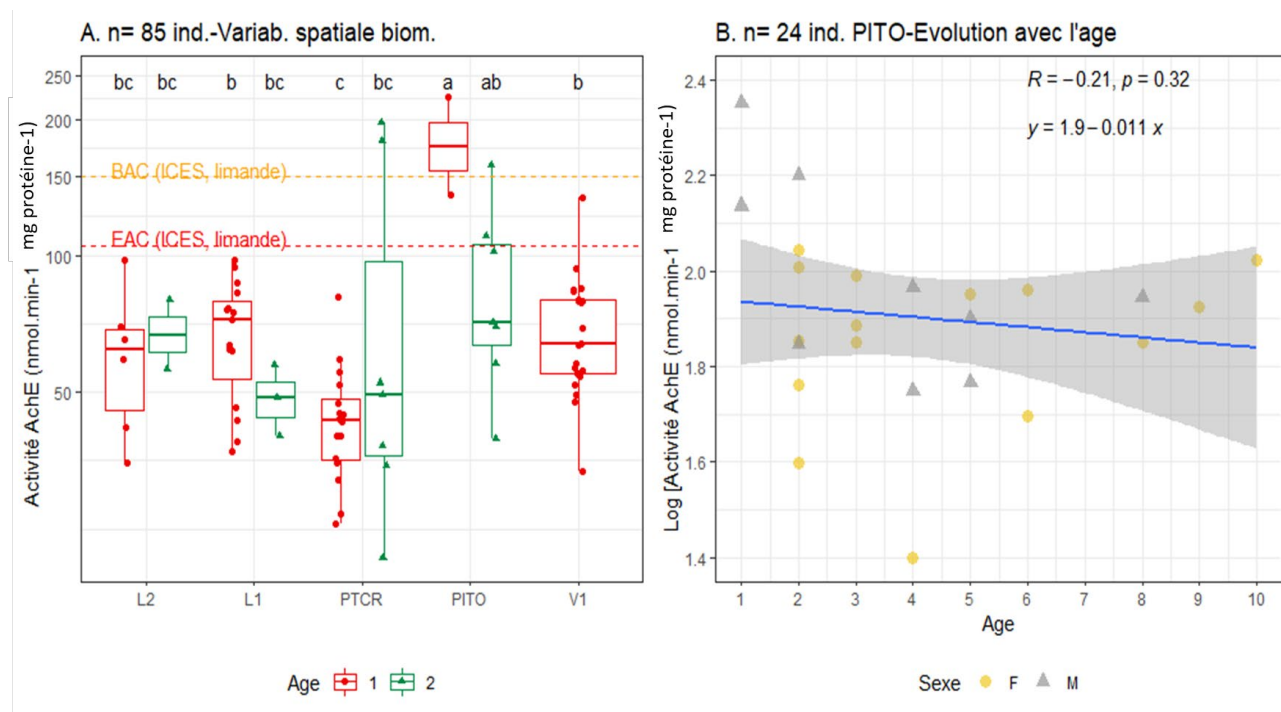


Figure 10 – Activité acétylcholine estérase (AChE) dans le muscle de soles prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020. A : soles sous-échantillonnées pour l'analyse de la variabilité spatiale : taille entre 19 et 30 cm, âges de 1 et 2 ans, n>5/station et données AChE validées. Pour l'effet Station x Age x Sexe : seul l'effet Station et Age x Station sont significatifs (ANOVA sur données log-transformées : p < 0,05, Test de Shapiro p > 0,05, Test de Levene p > 0,05). Les lettres en haut du plot correspondent aux groupes Age*Station significativement différents selon le test post hoc de Tukey (p<0.05). **B :** régression linéaire sur les soles de PITO et corrélation de Pearson, station avec une gamme d'âge étendue, gris : intervalle de confiance à 95% des prédictions du modèle.

3.2.4 Biomarqueurs d'exposition aux HAP : concentrations en métabolites biliaries de HAP

Les HAP sont métabolisés chez les poissons, ils sont conjugués puis accumulés dans la bile. La recherche des métabolites hydroxylés de HAP dans cette matrice permet ainsi d'évaluer l'exposition récente et spécifique des organismes à cette famille de contaminants et leur capacité métabolique (Devier et al., 2013, Kammann et al., 2017). Sur les 142 poissons échantillonnés, 86 échantillons de bile ont pu être analysés. Pour 16 individus, la bile n'a pas pu être prélevée, pour 40 autres, la quantité de bile était insuffisante pour refaire l'analyse suite à une erreur de manipulation. Parmi les 86 échantillons analysés, 22 échantillons étaient en limite de quantité (prise d'essai <0,01 g).

Tableau 5 – Quantification des métabolites de HAP dans la bile des soles prélevées aux 6 stations de la campagne SELILOIRE 2020 en baie de Loire et Vilaine.

Contaminants	>LOQ n	<LOQ n	<LOD N	>LOQ %	Min ng/g bile	Max ng/g bile	LOQ/LOD ng/g bile	BAC/EAC ng/g bile ¹
1 OH Naphthalène	8	76	2	9%	0,7	5,9 (1 outlier à 104,9)	0,7/2,0	
2 OH Naphthalène	16	0	70	19%	6,0 (1 outlier à 2,4)	213,1	2,0/6,0	
2+3 OH Phénanthrène	50	0	36	58%	0,3	25,6 (1 outlier à 212,3)	0,3/1,0	
1+9 OH Phénanthrène	61	11	14	71%	0,2	97,9	0,2/0,5	3.7/528
4 OH Phénanthrène	6	60	20	7%	0,1	2,0	0,1/0,3	
1 OH Pyrène	81	0	5	94%	1,0	261,4 (1 outlier à 916,8)	0,3/1,0	16/483
9 OH Benzo(a)pyrène	39	34	13	45%	0,7	19,3	1,0/3,0	
3 OH Benzo(a)pyrène	0	81	5	0%	16,7	50,0	16,7/50,0	

¹ : EAC dérivé de données obtenues sur la morue, et BAC dérivé de données obtenues sur le flet et la limande (Vethaak et al., 2017) et **Tableau 1**

L'hydroxy-pyrène (1-OH-Pyr) est le métabolite le plus quantifié (94% des échantillons) et retrouvé aux niveaux les plus élevés dans les soles de Loire et Vilaine (1 à 261 ng/g bile avec une valeur à 917 ng/g bile (L3-S3), Figure 11). Ce métabolite hydroxylé est couramment utilisé comme indicateur d'exposition aux HAP. Bien que la toxicité du pyrène soit faible, cet HAP présente l'avantage d'être métabolisé en un seul métabolite dont le dosage permet ainsi une mesure complète de sa biotransformation. Ensuite, les autres métabolites sont quantifiés dans l'ordre suivant : 1+9-OH-phénanthrène (71%) > 2+3-OH-phénanthrène : 58%) > 9-OH-Benzo(a)pyrène (45%) > autres métabolites (1 et 2-OH-naphthalène, 4-OH-phénanthrène, 3-OH-Benzo(a)pyrène : <20%). Les analyses qui suivent dans ce présent rapport décrivent la variabilité des concentrations pour les 4 métabolites de HAP majoritairement retrouvés.

Pour les autres HAP, différents métabolites sont produits, et pas uniquement des métabolites hydroxylés. Par exemple, la part des dihydrodiols et du 7,8-dihydro-epoxyde de BaP peut être importante (Wessel et al, 2013).

Les concentrations en métabolites de HAP chez une espèce varient principalement en fonction de la station et du régime alimentaire qui représente une voie majeure de contamination ainsi que du stade de digestion (Kammann et al., 2017). Ils illustrent une exposition récente. Les concentrations pour les 4 métabolites majoritairement retrouvés semblaient similaires entre âges et sexes ($p > 0,05$) mais variaient en fonction des stations ($p < 0,05$, Figure 11). Les poissons présentant les concentrations en métabolites de HAP les plus élevées ont été prélevés à L1 et PTCR (>L2 et V1, Figure 11).

Un EAC est disponible pour les concentrations en 1-OH Pyr et pour le 1-OH—phénanthrène (Tableau 5). En Baie de Loire et Vilaine, les concentrations sont au moins 5 et 2 fois inférieures à l'EAC pour le 1-OH Pyr et les OH—phénanthrènes, respectivement.

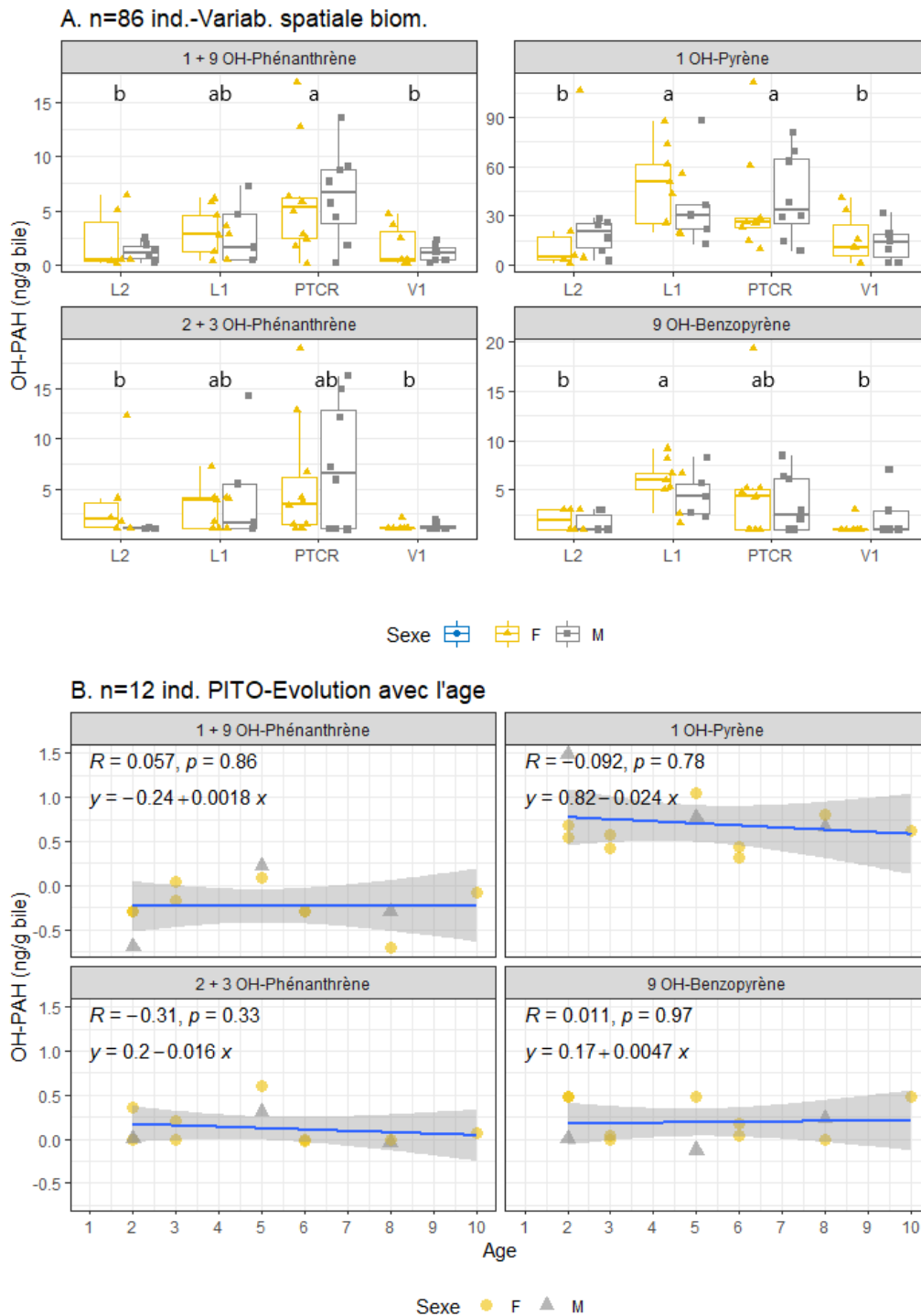


Figure 11 – Concentrations en métabolites de HAP dans les biles de soles prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020. A : soles sous-échantillonnées pour l'analyse de la variabilité spatiale : taille entre 19 et 30 cm, âges de 1 et 2 ans, $n > 5$ /station. Selon Kruskal Wallis sur données log-transformées : Sexe et âge : non significatif ($p > 0,05$), Station : $p < 0,05$. Les lettres en haut du plot correspondent aux stations significativement différentes selon le test post hoc de Dunn ($p < 0,05$). ANOVA effectuée pour vérifier qu'il n'y a pas d'interaction évidente, mais données non homogènes (QQplot non linéaire, Test de Levene $p < 0,05$, sur données log-transformées). B : régression linéaire (données log-transformées) sur les soles de PITO, station avec une gamme d'âge étendue, corrélation de Spearman, gris : intervalle de confiance à 95% des prédictions du modèle.

3.2.5 Histologie

3.2.5.1 Stades de maturité des soles

Les proportions (en %) de mâles et femelles identifiées histologiquement chez les poissons plats sont présentées dans le Tableau 6.

Tableau 6 - Sex ratio calculé chez les soles prélevées sur l'ensemble de la campagne et analysés histologiquement (All), et pour les 5 stations auxquelles plus de 5 poissons ont été analysés lors de la campagne SELILOIRE 2020 en baie de Loire et Vilaine.

Station	All	L1	L2	L3	PTCR	PITO	V1
Sex Ratio M:F (nb. Individus analysés)	1 : 1,25 (117)	1 : 1,36 (26)	1: 0,67 (10)	1 : 1,5 (5)	1: 1,3 (23)	1 : 1,14 (30)	1 : 1,33 (21)

Les stades de développement des gonades sont déterminés histologiquement et pour chaque sexe (Figure 12). Les pourcentages de chaque stade de développement des gonades par sexe et par station sont présentés dans le Tableau 7. Pour les femelles sur l'ensemble de la campagne, 93,8% des individus étaient en période de pré-vitellogénèse alors que 3,1% et 3,1% étaient en périodes précoce et tardive de vitellogénèse. Les individus femelles montrant des stades de développement des gonades plus avancés (stades 2 et 3) proviennent du site L1. Chez les poissons plats mâles, 13,5% sont immatures ; 80,8% sont en spermatogénèse (stades 1, 2 et 3) et seulement 5,8% des individus mâles sont matures. Les individus mâles immatures proviennent tous du site V1. Tout comme l'âge, l'avancée dans le cycle de reproduction est un paramètre important à prendre en compte lors de l'estimation de l'état général de santé d'un individu puisque différents stades de développement des gonades supposent différents niveaux d'énergie requis. Dans le cas présent, une grande partie des individus femelles (95,5%) sont en stade 1 et la plupart des individus mâles sont en cours de spermatogénèse, sauf pour le site V1 pour lesquels la plupart des individus sont immatures (77,8%), ce qui correspond aux individus les plus jeunes de la campagne. L'ensemble des individus est bien en dehors de la période de reproduction (période de reproduction de *Solea solea*: janvier à avril (Gilliers et al., 2006); campagnes SELI organisées fin août/début septembre) ce qui était primordial pour la campagne afin de pouvoir limiter l'influence potentielle de facteurs biotiques confondants sur les réponses des marqueurs sélectionnés.

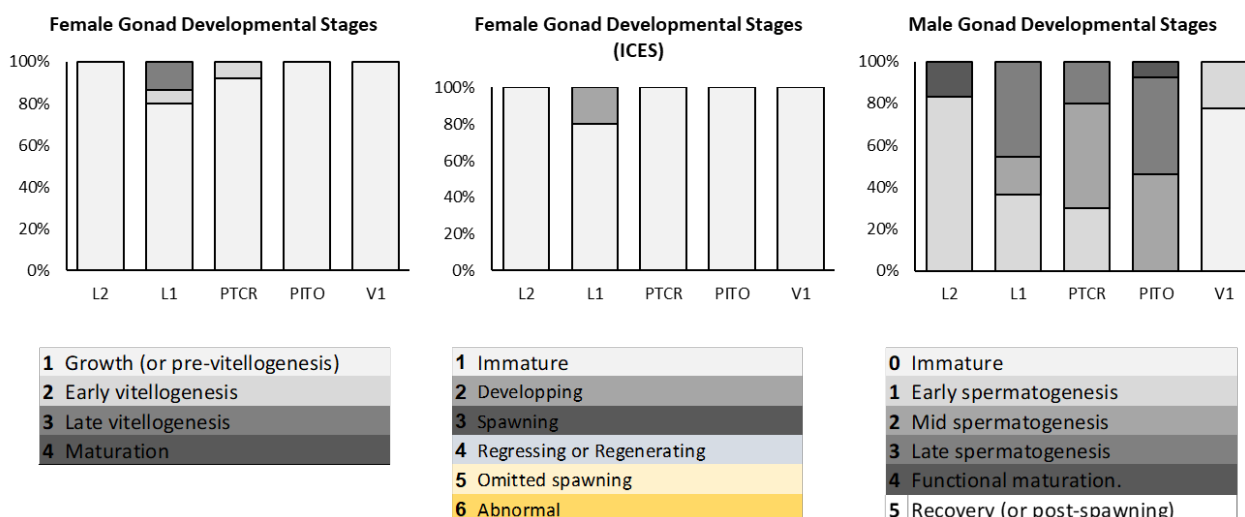


Figure 12 - Stades de développement des gonades déterminés chez les soles prélevées aux 5 stations avec n>5 de la campagne SELILOIRE 2020 en baie de Loire et Vilaine.

Tableau 7 - Proportions (en %) des stades de développement des gonades identifiés par analyses histologiques chez les soles prélevées sur l'ensemble de la campagne (All), et pour les 5 stations auxquelles plus de 5 poissons ont été analysés lors de la campagne SELILOIRE 2020 en baie de Loire et Vilaine (tous les âges prélevés). Les stades étaient identifiés selon (Murua and Motos, 2006) pour les femelles et (García-López et al., 2006) pour les mâles.

		All	L1	L2	PTCR	PITO	V1
Males	n	52	11	6	10	14	9
0	Immature	13,5	0	0	0	0	77,8
1	Early spermatogenesis	26,9	36,4	66,7	30,0	7,1	22,2
2	Mid spermatogenesis	26,9	18,2	16,7	50,0	42,9	0
3	Late spermatogenesis.	26,9	45,5	0,0	20,0	42,9	0
4	Functional maturation	5,8	0	16,7	0,0	7,1	0
5	Recovery	0	0	0	0	0	0
Females	n	65	15	4	13	16	12
1	Growth	93,8	80,0	100	92,3	100	100
2	Early vitello.	3,1	6,7	0	7,7	0	0
3	Late vitello.	3,1	13,3	0	0	0	0
4	Maturation	0	0	0	0	0	0

3.2.5.2 Intersex

Une 'féminisation' des tissus gonadiques mâles (phénomène d'intersexe) peut apparaître suite à l'action de perturbateurs endocriniens et entraîne une perte du potentiel reproducteur des individus. Bien que des ovotestis aient été observés chez des poissons plats comme la limande au début des années 2000 en mer du Nord (Stentiford et al., 2005), aucun des 52 mâles analysés (sur 69 mâles prélevés) sur l'ensemble de la campagne (dont 50 et 60 aux 5 stations avec n>5) ne présentait d'intersex. L'analyse de l'intersex renseigne des effets à haut niveau biologique qui résultent de mécanismes biologiques complexes apparaissant en cascades après plusieurs années d'exposition. Il ne renseigne pas sur les effets précoces sur la reproduction qui ne peuvent donc pas être écartés sur la base de cette analyse. Nous complétons donc l'intersex avec l'analyse des pathologies des gonades.

3.2.5.3 Pathologies hépatiques chez les soles

La présence de tumeurs hépatiques et de lésions associées est reconnue comme indicatrice d'une exposition antérieure à des contaminants chimiques (Myers et al., 1991, Schiewe et al., 1991, Reichert et al., 1998, Myers et al., 2003). Dans une étude sur les limandes en Mer du Nord, Stentiford et al. (2010) ont démontré que l'âge d'apparition de la carcinogenèse différaient selon le site mais étaient souvent supérieur à 3 ans. La contribution de l'apparition des tumeurs hépatiques sur la mortalité des poissons plats n'a pas été montré mais, chez les poissons-chat (*Ameiurus nebulosus*), Baumann et al. (1990) ont rapporté un lien entre la présence de tumeurs du foie et la mortalité des individus.

L'analyse histologique a pu être validée pour 121 des 135 individus prélevés (135 ind. prélevés / 142 ind. pêchés : foie non prélevé pour 7 des 10 soles prélevées mortes à L2). Pour 13 individus, les analyses histologiques n'ont pu être effectuées dû au manque d'échantillon (n = 9) ou à un problème lors du traitement de ces échantillons (n = 4).

Les lésions telles que l'hyperémie, les centres de mélanomacrophages, les infiltrations lymphocytaires, les zones de tissu nécrotique et les foyers d'altération cellulaire étaient principalement identifiés chez les individus provenant de la station PITO (Tableau 8). Ces lésions peuvent être considérées indicatrices de différentes sources de stress environnemental tel qu'une contamination chimique. De plus, les foyers d'altération cellulaire identifiés chez 4 individus à l'échelle de la campagne, sont des lésions pré-néoplasiques considérées précurseurs du développement de tumeurs bénignes ou malignes (Simpson et al., 2000). Dans le cas des centres de mélanomacrophages, d'autres facteurs tel que l'âge peuvent aussi expliquer leur

apparition (Zorita and Cuevas, 2014). En effet, les individus les plus âgés provenaient du site PITO ce qui pourrait expliquer la forte prévalence de cette lésion pour ce site (86,67%). Au total, 37,50% des poissons montraient une vacuolisation lipidique des hépatocytes, dont 80,0% (4/5) provenant de L3. Puisque le rôle principal du foie est de stocker de l'énergie sous forme de lipides, il est fréquent d'observer la formation de vacuoles lipidiques dans les hépatocytes mais son accumulation excessive a été enregistrée chez les poissons plats, en réponse à des stress chimiques (Costa et al., 2009, Costa et al., 2011).

Tableau 8 - Prévalence (en %) des pathologies hépatiques identifiées chez les soles prélevées sur l'ensemble de la campagne (All), et pour les 5 stations auxquelles plus de 5 poissons ont été analysés lors de la campagne SELILOIRE 2020 en baie de Loire et Vilaine (tous les âges prélevés). La prévalence de chaque pathologie était similaire entre les 5 stations analysées selon un test z-score ($p < 0,05$).

Hepatic alterations	All (n=128)	L2 (n=11)	L1 (n=28)	PTCR (n=28)	PITO (n=30)	V1 (n=24)
<i>Circulatory disturbances</i>						
Haemorrhage	5,47	0	10,71	0,00	3,33	12,50
Hyperaemia	5,47	0	3,57	7,14	6,67	8,33
<i>Inflammatory responses</i>						
Melanomacrophage Centres (MMCs)	57,0	63,64	57,14	50,00	86,67	16,67
Lymphocytic infiltration	40,63	45,45	32,14	46,43	50,00	29,17
<i>Regressive changes</i>						
Necrosis	22,66	0	28,57	21,43	26,67	25,00
Hepatocellular Nuclear Pleomorphism (HNP)	0,78	0	3,57	0	0	0
<i>Progressive changes</i>						
Fat Vacuolation of hepatocytes	37,50	18,18	17,86	39,29	33,33	62,50
Hydropic Vacuolation of epithelial cells of bile duct	16,00	0	0	37,50	18,18	0
Concentric periductal fibrosis of bile duct	6,00	0	0	6,25	9,09	12,50
<i>Pre-neoplastic lesions</i>						
Foci of Cellular Alteration	3,13	0	3,57	3,57	6,67	0
<i>Neoplastic lesions</i>						
	0	0	0	0	0	0

3.2.5.1 Pathologies des gonades chez les soles

Les prévalences des lésions au niveau des gonades ont pu être analysées pour 65 femelles et 52 mâles sur l'ensemble de la campagne, dont 60 femelles et 50 mâles sur les 5 stations avec $n > 5$ ont pu être analysés. Elles sont présentées par station dans le Tableau 9 pour les mâles et le Tableau 10 pour les femelles.

Pour les mâles, un cas d'hyperémie ($n = 1$) et un cas de centres de mélanomacrophages ($n = 1$) sont identifiés chez une sole de la zone Loire (L2). L'hyperémie est une perturbation circulatoire qui indique généralement une pathologie, bien souvent d'origine inflammatoire (Zorita and Cuevas, 2014). Seul un cas d'infiltration lymphocytaire est identifié chez l'ensemble des individus de la campagne, il est observé à PITO. Enfin, un cas de granulome est observé chez un poisson de la zone Vilaine (V1). Cette lésion est une réponse inflammatoire qui peut indiquer une infection virale, bactérienne ou parasitaire (Feist et al., 2004).

Pour les femelles, la plupart des lésions sont observées chez les individus en Loire, l'atrésie est un phénomène naturel du cycle de reproduction mais qui est aussi enregistré en réponse à des conditions environnementales défavorables ou des cas d'exposition à des contaminants (Blazer, 2002, Reynolds et al., 2003, Cuevas et al., 2015, Briaudeau et al., 2021, Briaudeau et al., 2023). La présence de lipides dans les ovocytes est détectée plus fréquemment pour le site PITO (47,1%). Cette lésion a été reporté précédemment pour des soles sauvages (Briaudeau et al., 2019) et en réponse à une exposition en laboratoire au Cd (Briaudeau et al., 2023).

Tableau 9 - Prévalence (en %) des pathologies de la gonade identifiées chez les soles mâles prélevées sur l'ensemble de la campagne (All), et pour les 5 stations auxquelles plus de 5 poissons ont été analysés lors de la campagne SELILOIRE 2020 en baie de Loire et Vilaine (tous les âges prélevés). La prévalence de chaque pathologie était similaire entre les 5 stations analysées selon un test z-score ($p < 0,05$).

Gonad alterations (in males)	All (n= 52)	L2 (n=6)	L1 (n=11)	PTCR (n=10)	PITO (n=14)	V1 (n=9)
<i>Circulatory disturbances</i>						
Hyperaemia	1,9	0	9,09	0	0	0
<i>Inflammatory responses</i>						
Melanomacrophage Centres (MMCs)	5,8	0	9,09	0	14,29	0
Granulomatous	1,9	0	0	0	0	11,11
Lymphocytic infiltration	1,9	0	0	0	7,14	0
<i>Regressive changes</i>						
Pycnotic oocytes/spermatocytes	0	0	0	0	0	0
Necrosis	1,9	0	0	0	7,14	0
Intersex	0	0	0	0	0	0
<i>Neoplastic lesions</i>						
	0	0	0	0	0	0

Tableau 10 - Prévalence (en %) des pathologies de la gonade identifiées chez les soles femelles prélevées sur l'ensemble de la campagne (All), et pour les 5 stations auxquelles plus de 5 poissons ont été analysés lors de la campagne SELILOIRE 2020 en baie de Loire et Vilaine (tous les âges prélevés). La prévalence de chaque pathologie était similaire entre les 5 stations analysées selon un test z-score ($p < 0,05$).

Gonad alterations (in females)	All (n=65)	L2 (n=4)	L1 (n=15)	PTCR (n=12)	PITO (n=17)	V1 (n=13)
<i>Circulatory disturbances</i>						
Hyperaemia	9,2	25,00	20,00	8,33	0	7,69
<i>Inflammatory responses</i>						
Melanomacrophage Centres (MMCs)	0	0	0	0	0	0
Granulomatous	1,5	0	0	0	5,88	0
Lymphocytic infiltration	6,2	25,00	0	16,67	5,88	0
<i>Regressive changes</i>						
Pycnotic oocytes/spermatocytes	0	0	0	0	0	0
Necrosis	3,1	50,00	0	0	5,88	0
Atresia	7,5	0,00	6,67	0	5,88	0
<i>Progressive changes</i>						
Lipid in oocytes	18,75	25,00	6,67	0	47,06	0
<i>Neoplastic lesions</i>						
	0	0	0	0	0	0

3.2.5.2 Indices d'histopathologie du foie

Les indices d'histopathologie ont été développés pour compenser le caractère descriptif des données histopathologiques et permettre d'obtenir des données numériques qui deviennent donc comparables. Ces indices sont basés sur l'identification d'une liste déterminée de lésions hépatiques (présence/absence) et un facteur d'impact reflétant l'importance de la lésion pour l'hôte affecté.

- Note de gravité moyenne : Dans le cas du premier indice histopathologique présenté ici, la note de gravité, ce facteur est basé sur la catégorisation des lésions : (1) lésions non spécifiques ; (2) lésions non néoplasiques ; (3) lésions pré-néoplasiques (foyer d'altération cellulaire) ; (4) néoplasmes bénins ; (5) tumeurs malignes (Davies and Vethaak, 2012). La note de gravité est calculée selon le nombre de lésions identifiées pour chaque catégorie et prend en compte la présence/absence de lésion et la note de gravité correspondante.

- Indice pondéré : Le second indice présenté ici est développé par Bernet et al. (1999) et adapté au cas particulier des soles par Costa et al. (2009) qui y inclut aussi la sévérité de chaque lésion, pour chaque

individu. Il est défini par 3 valeurs selon le stade d'avancement et de dissémination de la lésion. De cette manière, des individus présentant la même lésion mais à des degrés de sévérité différents peuvent être différenciés. De plus, l'indice total histopathologique calculé selon Bernet et al. (1999) et Costa et al. (2009) regroupe les résultats d'analyse histopathologique pour le foie et les gonades (mâles et femelles) pour chaque site (Tableau 12 et Figure 14).

Pour ces deux indices, les calculs sont faits sur les jeux de données discutés au niveau 2.5.3 pour tester l'effet de la station (chez individus d'âge et taille similaire) et de l'âge à PITO. En plus, l'effet de l'âge est aussi testé sur l'ensemble des données de la campagne ; les données de prévalence nécessitent souvent beaucoup d'observation pour être robuste.

3.2.5.2.1 Note de gravité moyenne : Indice d'histopathologie du foie selon Davies and Vethaak (2012)

Sur les 127 individus pour lesquels les analyses ont été classées à « bonne », les notes de gravité individuelles allaient de 0 à 8. Au niveau de chaque station où $n > 5$, les valeurs les plus basses sont mesurées à la station L2 ($0,70 \pm 0,21$) et les valeurs maximales pour PITO ($1,87 \pm 0,31$). La note de gravité augmente avec l'âge ($p < 0,05$, Pearson R varie de 0,2 à 0,5 selon si l'ensemble des données de la campagne ou seulement les individus de PITO sont considérés).

Tableau 11 – Note de gravité moyenne : Indice histopathologique (moyenne \pm déviation standard) calculé selon Davies and Vethaak (2012) pour le foie chez les soles prélevées lors de la campagne SELILOIRE 2020 en baie de Loire et Vilaine. All : l'ensemble de la campagne ; ¹ : individus âgés de 1 et 2 ans au niveau des 5 stations où $n > 5$; ² : l'ensemble des individus à PITO (âgés de 1 à 10 ans). La prévalence de chaque pathologie était similaire entre les 5 stations analysées où $n > 5$ selon un test z-score ($p < 0.05$).

	All	L2 ¹	L1 ¹	PTCR ¹	PITO ¹	V1 ¹	PITO ²
N	127	11	18	24	14	21	n=30
Age	0-10	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-10
Note de gravité moyenne	1,33 \pm 0,12	0,70 \pm 0,21	1,11 \pm 0,28	1,46 \pm 0,28	1,43 \pm 0,33	1,14 \pm 0,28	1,87 \pm 0,31

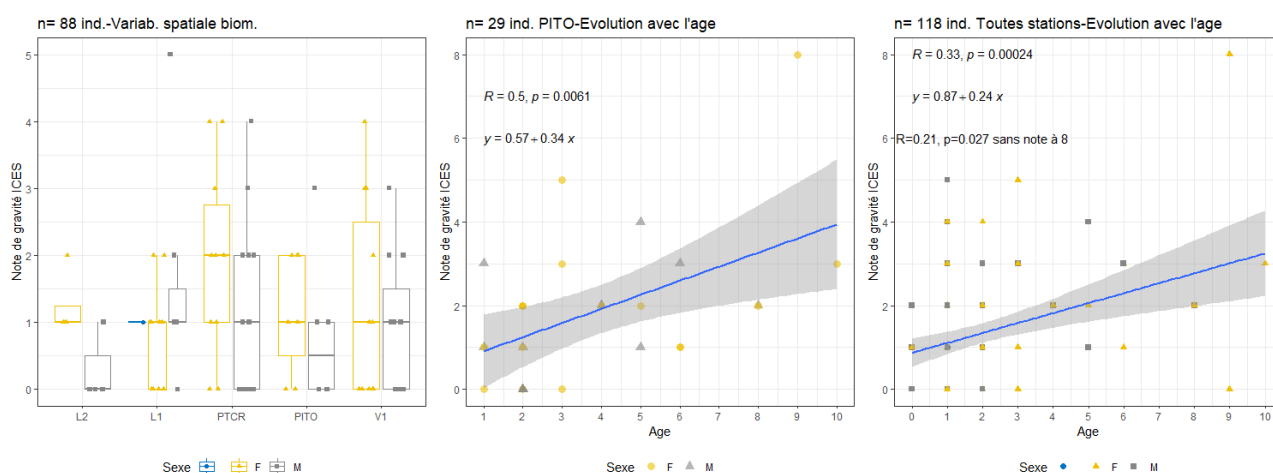


Figure 13 – Note de gravité moyenne calculée selon Davies et Vethaak (2012) dans le foie des soles prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020. Droite : soles sous-échantillonnées pour l'analyse de la variabilité spatiale : taille entre 19 et 30 cm, âges de 1 et 2 ans, $n > 5$ /station et données histopathologiques validées. Effet Station sur la note de gravité : données non normalement distribuées, Test Kruskal Wallis $p > 0,05$. Milieu : régression linéaire sur les soles de PITO et corrélation de Pearson, station avec une gamme d'âge étendue, gris : intervalle de confiance à 95% des prédictions du modèle. Droite : régression linéaire sur les soles de toutes les stations et corrélation de Pearson, station avec une gamme d'âge étendue, gris : intervalle de confiance à 95% des prédictions du modèle.

3.2.5.2 Indice pondéré : indice d'histopathologie selon Bernet et al. (1999) adapté par Costa et al. (2009)

Les valeurs minimales ont été mesurées pour les stations V1 et L1 et les valeurs maximales pour PITO. Le détail des indices histopathologiques pour chaque organe est présenté Figure 14 pour le foie, les gonades femelles et les gonades mâles. Pour des individus d'âge et taille similaire, les indices dans le foie et des gonades mâles sont similaires entre stations, mais les indices histopathologiques des gonades femelles sont plus élevés à L2 qu'aux autres stations ($p < 0,05$, Figure 14). La stabilité de la membrane lysosomale (LMS) est aussi la plus altérée à L2 (Figure 6). Les indices histopathologiques des gonades femelles et du foie augmentent avec l'âge des individus ($p < 0,05$, Pearson $R = 0,3$), et en conséquence l'indice histopathologique total augmente aussi avec l'âge ($p < 0,05$, Pearson $R = 0,45$). L'effet de l'âge sur l'occurrence des lésions et pathologies a été mis en avant dans de précédentes études, e.g. Stentiford et al. (2010).

Tableau 12 - Indice pondéré : indice histopathologique (moyenne \pm écart type) calculé selon Bernet et al. (1999) adapté par Costa et al. (2009) pour le foie et la gonade (mâles et femelles) chez les soles prélevées lors de la campagne SELILOIRE 2020 en baie de Loire et Vilaine (All), et pour les 5 stations auxquelles plus de 5 poissons ont été analysés (tous les âges prélevés).

Indice pondéré	Foie	Gonade femelle	Gonade mâle	INDICE TOTAL	n
All	7,01 \pm 0,52	1,75 \pm 0,40	0,36 \pm 0,19	8,15 \pm 0,69	128/65/39/101
L2	4,18 \pm 1,03	6,50 \pm 2,63	0	7,11 \pm 2,21	11/4/6/9
L1	5,89 \pm 1,05	1,80 \pm 1,60	0,50 \pm 0,33	7,06 \pm 1,42	18/10/8/17
PTCR	7,29 \pm 1,19	0,83 \pm 0,46	0	7,74 \pm 1,51	24/12/8/19
PITO	9,47 \pm 1,21	2,00 \pm 0,61	1,00 \pm 0,50	11,00 \pm 1,40	30/16/14/30
V1	6,27 \pm 1,34	0	0,44 \pm 0,44	6,60 \pm 1,44	22/11/9/20

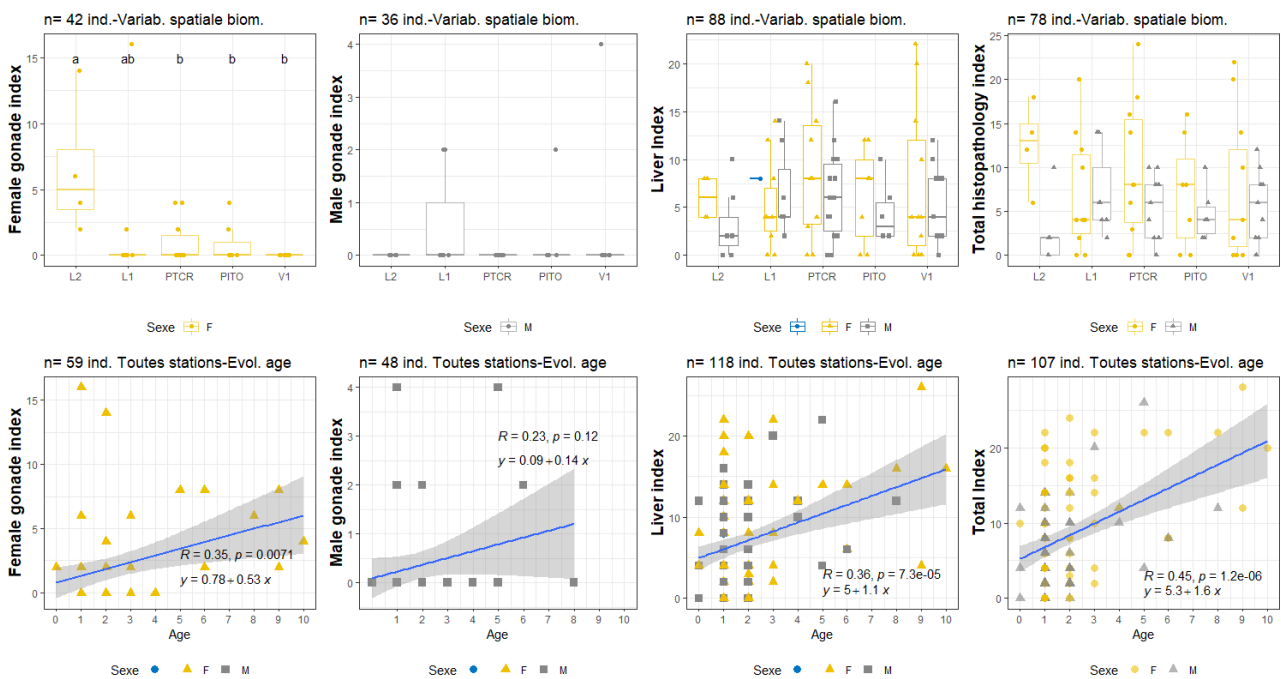


Figure 14 – Indice histopathologique pondéré calculés selon Bernet et al. (1999), adapté par Costa et al. (2009) chez les soles prélevées lors de la campagne SELILOIRE 2020 en baie de Loire et Vilaine. De gauche à droite : des gonades femelles, des gonades mâles, des foies et de l'ensemble des pathologies recherchées. Haut : soles sous-échantillonnées pour l'analyse de la variabilité spatiale : taille entre 19 et 30 cm, âges de 1 et 2 ans, $n > 5$ /station et données validées. Pour l'effet Station : données non normalement distribuées même sur données transformées, Test Kruskal Wallis : $p < 0,05$ pour l'indice histopathologiques des gonades femelles et $p > 0,05$ pour les 3 autres indices. Les lettres en haut du plot correspondent aux stations significativement différentes selon le test post hoc de Dunn ($p < 0,05$). Bas : régression linéaire sur les soles prélevées sur l'ensemble de la campagne, gris : intervalle de confiance à 95% des prédictions du modèle.

3.3 Concentrations en contaminants

3.3.1 Contaminants organiques

Les analyses des contaminants organiques ont été réalisées dans le muscle de 30 soles (5 par station à L1 et L2, 8 à PTCR, 6 à PITO et 6 à V1) d'âges 1 ou 2 à CCEM (Ifremer/Nantes). Pour les PFAS, 27 parmi ces 30 individus ont pu être analysés par manque de matière pour 3 individus. Si les 30 individus sélectionnés avaient été identifiés comme des mâles par les analyses visuelles faites à bord, les analyses histologiques ont montré qu'un des individus était une femelle (L1-S10). Les effets de l'âge et du sexe sur les niveaux de contamination organique ont été considérés comme étant négligeables pour des individus entre 1 et 2 ans. Les individus d'âges 1 et 2 sont donc considérés conjointement. Les teneurs en lipides des échantillons sont comprises entre 0,1 et 0,4 % pf et sont statistiquement homogènes entre station.

PCB

Les 7 PCB indicateurs (les 6 indicateurs + le dioxin-like (DL) CB-118) ont été quantifiés individuellement dans la totalité des échantillons analysés, à des concentrations comprises entre 2,8 pg/g pf pour le CB-28 (PITO) et 4745 pg/g pf pour le CB-153 (L1). Les concentrations en Σ 7PCB varient de 510 (PITO) à 9531 pg/g pf (L1, Tableau 13). Ces concentrations sont donc de 1 à 2 ordres de grandeur inférieures aux seuils sanitaires fixés par la Commission Européenne pour la consommation humaine (75 ng/g pf). Par contre, ils sont supérieurs aux EAC des congénères pris individuellement. Pour un poisson avec un taux de lipide < 3% comme la sole, la comparaison à l'EAC se fait en pf (EAC et concentration en pf, Tableau 2). Pour le CB 118, le seul congénère de type dioxine de la somme des 7 congénères, 80% (24/30) des individus présentant des concentrations supérieures à l'EAC (Figure 15). Pour les autres congénères : CB-28, -52, -101, -138, -153 et -180, les EAC sont dépassés dans 0/30, 2/30 (L1-S4 et PTCR-S18), 7/30 (3 à L1, 2 à L2, 2 à PTCR), 7/30 (3 L1, 2 à L2, 3 à PTCR et 1 à PITO), 0/30 et 0/30 individus.

Les profils de contamination en PCB sont ceux classiquement observés chez les poissons, avec la prédominance des congénères hexachlorés CB-153 et CB-138, ces deux congénères comptant pour 67 % de la somme des 18 congénères (indicateurs et DL), heptachlorés (CB-180, 10 %) et pentachlorés (CB-101 et -118, 8 % et 7 %). Le ratio entre les 6 PCB indicateurs et PCB DL (Σ CB-77, -81, -126, -169, -105, -114, -118, -123, -156, -157, -167, -189) est en moyenne de $8,1 \pm 1,8$.

Les concentrations en PCB (Σ 7PCB) déterminées dans les échantillons prélevés en Loire et Vilaine en 2020 (moyenne de $2,38 \pm 2,34$ ng/g pf) sont comparables à celles déterminées dans les échantillons prélevés en 2017 ($1,76 \pm 0,95$ ng/g pf) et 4 fois inférieures à celles déterminées en estuaire Seine en 2018 (en moyenne de $9,81 \pm 4,79$ ng/g pf). Ces résultats confirment les niveaux de contamination en PCB modérés en Loire/Vilaine comparativement à la Seine (Mauffret et al., 2021)

Pesticides organochlorés (OCP)

Parmi les OCP recherchés, le *p,p'*-DDE est le composé majoritaire (quantifié dans 100 % des échantillons), à des concentrations comprises entre 29 (PITO) et 516 pg/g pf (L1, Tableau 13). La dieldrine est quantifiée dans tous les échantillons également, à des concentrations comprises entre 15 pg/g pf (PITO) et 66 pg/g pf (L2). Les isomères de l'HCH présentant les fréquences de détection les plus élevées sont les beta et alpha (90% et 63% des échantillons respectivement) ; les isomères gamma et delta présentent des fréquences de détection de 37% et 30% respectivement (Figure 15). Les concentrations en HCH totaux sont en moyenne de $2,8 \pm 2,0$ pg/g pf ; l'isomère gamma est le plus abondant.

Le profil des différents isomères de DDT montre la prédominance du *p,p'*-DDE (89 ± 4 % de la somme des isomères en moyenne) suivi du *p,p'*-DDD (9 ± 4 %).

Le ratio p,p' -DDT / p,p' -DDE, utilisé comme traceur du degré de dégradation du DDT, est en moyenne de $0,03 \pm 0,02$, suggérant une origine ancienne ($<0,3$). Le rapport o,p' -DDT/ p,p' -DDT, utilisé comme traceur de l'origine du DDT, est en moyenne de $0,38 \pm 0,22$ ($n=12$), indiquant le DDT technique comme source de la contamination, par exemple l'utilisation du DDT dans un autre pesticides *e.g.* dicofol dans lequel le ratio est plus élevé. Le ratio PCB/DDT est en moyenne de 17 ± 5 . Les profils en HCH indiquent que le lindane, interdit en 2008, est à l'origine de la contamination ($\alpha/\gamma <1$, $n=10$).

Les concentrations des différents OCP mesurées chez les soles en Loire et Vilaine en 2020 sont supérieures à celles mesurées en 2017 pour les DDT (facteur 1,5), et similaires pour la dieldrine et les HCH.

PBDE

Seul le BDE-100 est quantifié dans 100% des échantillons ; les autres congénères sont quantifiés dans 97% (BDE-154), 87% (BDE-49), 43% (BDE-153), 40% (BDE-47 et -28), 30% (BDE-99) et 8% (BDE-183) des échantillons (Figure 15). Les concentrations moyennes par congénère sont comprises entre $0,09 \text{ pg g}^{-1} \text{ pf}$ (BDE-183) et $14 \text{ pg g}^{-1} \text{ pf}$ (BDE-154, Tableau 13). Les concentrations de la somme des 8 congénères recherchés varient entre 1,4 (PITO) et 35 (L2) $\text{pg g}^{-1} \text{ pf}$. Elles dépassent la NQE de $8,1 \text{ pg g}^{-1} \text{ pf}$, basée sur la santé humaine dans 1/3 des échantillons (10 échantillons sur 30, notamment en en L1 (3/5), L2 (3/5) et PTCR (4/8). Les concentrations en congénère individuel de PBDE sont tous inférieurs aux seuil FEQG (Tableau 2).

Les concentrations en Loire et Vilaine sont similaires ($7.7 \pm 7.6 \text{ pg g}^{-1} \text{ pf}$) à celles déterminées en 2017 (Campagne SELILOIRE 2017 $8,6 \pm 6,3 \text{ pg g}^{-1} \text{ pf}$) pour la somme des 8 congénères.

Les profils moyens en congénères de PBDE montrent la prédominance du BDE-154 (37% de la somme des 8 congénères). Ce résultat est assez atypique, le BDE-47 étant généralement prédominant dans le biote marin. Il est lié à des LOQ plus élevées (en lien avec des blancs plus élevés) pour le BDE-47 que pour le BDE-154. Le BDE-100 et le BDE-47 comptent respectivement pour 34% et 28% de la somme des congénères. Comme rapporté sur les soles de SELILOIRE 2017 et SELISEINE 2018 (Mauffret et al., 2019, Mauffret et al., 2021), une contribution relativement importante du BDE-154 est donc observée ici.

HBCDD

Les 3 isomères majoritaires de l'HBCDD ont été recherchés. Ils sont tous $<LOQ$ dans tous les échantillons, sauf l'isomère α qui a été quantifié dans 1 échantillon à une concentration proche des LOQ.

PFAS

Le PFOS, le PFDA et le PFUnDA sont retrouvés dans 100% des échantillons. Les PFNA, PFTTrDA et PFDoDA sont retrouvés dans 85-96% des échantillons, le PFTeDA est $>LOQ$ dans 74% des échantillons et le PFOA dans 22% (Figure 15). Le PFOS est le PFAS majoritaire, composant en moyenne 62-65% de la somme des PFAS aux stations L1, L2, PTCR et PITO et 52% en V1, à des concentrations comprises entre 191 (V1) et 2019 $\text{pg g}^{-1} \text{ pf}$ (L1, voir composition de la somme Tableau 13). Ces concentrations sont inférieures à l'EQS du PFOS de $9,1 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ et la QE (empoisonnement secondaire) de $44\,000 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ (Figure 15). Les concentrations en PFCA quantifiés sont comprises entre $13 \text{ pg g}^{-1} \text{ pf}$ (PFOA, 8 C, en L1) et $392 \text{ pg g}^{-1} \text{ pf}$ (PFNA, 9 C, à PITO). Les concentrations en PFDA (10 C) sont également notables, il est retrouvé à des concentrations comprises entre 52 (L1) et 356 $\text{pg g}^{-1} \text{ pf}$ (L1). Les concentrations en PFOS, PFOA, PFNA et PFHxS sont inférieures aux seuils sanitaires appliqués depuis Janvier 2023 aux poissons plats (Tableau 2).

Les concentrations sont du même ordre de grandeur que celles observées en Loire/Vilaine en 2017 : ni le PFOS, ni ΣPFCA ne sont significativement différents (Kruskal Wallis entre tous les couples station (L1, L2, L3, PTCR, PITO, V1, V2, V3)*année (2017 et 2020)). Les différences entre la Loire et la Seine dépendent des stations considérées en Seine, puisqu'il avait été observé des niveaux contrastés entre les stations proches de l'estuaire (Z1) et distantes (Z4 ou Z5). Les niveaux de PFOS et ΣPFCA en Seine (Z1) en 2018 ne sont pas

significativement différents de ceux observés en Loire en 2020 (à l'exception de Σ PFCA entre Z1 et L2, cette dernière station ayant des niveaux plus faibles).

Différences inter-sites

La somme des PCB, les concentrations en CB-118, *p,p'*-DDE, dieldrine, PFOS et PFCA semblent similaires entre stations, que les concentrations soient considérées en ps, pf et pl ($p > 0,05$, PFOS et PFCA : test fait sur ps et pf (pas pl), Figure 15, Figure 16). Visuellement, les concentrations en ces contaminants ainsi que la variabilité inter-individuelle en L1 et/ou L2 semblent plus élevées qu'aux 3 autres stations. Pour les PBDE, les soles aux 2 stations en Loire présentent des concentrations en PBDE plus élevées qu'aux 3 autres stations quand les concentrations sont exprimées en pf et ps, elles ne sont pas significativement différentes entre stations pour les concentrations en pl (Figure 15).

Tableau 13 - Teneurs en lipides (% pf) et concentrations (min-max / moyenne, pg/g pf) en contaminants organiques dans les muscles de soles âgés de 2 ans prélevées en estuaires de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020 (n = nb d'individus, données <LOQ substituées par 0).

Zone	Lipides (%)	Σ 7CB ^a	Σ DDT ^b	Dieldrine	Σ HCH ^c	Σ 8PBDE ^d	α -HBCDD	PFOS	Σ 7PFCA ^e
L1 (n=5)	0,2-0,3 / 0,2	902-9531 / 4094	47-548 / 224	22-37 / 28	1-4 / 2	3-23 / 10	<LOQ	353-2019 / 1101	374-782 / 517
L2 (n=5; PFAS : 4)	0,2-0,3 / 0,2	861-6199 / 3268	55-479 / 182	22-66 / 37	1-9 / 5	3-35 / 13	<LOQ	406-860 / 587	222-356 / 296
PTCR (n=8, PFAS: 7)	0,2-0,4 / 0,2	584-7399 / 2389	41-417 / 164	18-58 / 36	<LOQ-6 / 3	3-15 / 9	<LOQ- 0.002 (n(>LOQ)=1)	345-1328 / 807	286-576 / 395
PITO (n=6)	0,2-0,3 / 0,3	510-4379 / 1366	34-156 / 68	15-28 / 22	<LOQ-2 / 1	1-6 / 3	<LOQ	427-948 / 748	223-798 / 485
V1 (n=6; PFAS: 5)	0,1-0,3 / 0,2	841-1563 / 1203	47-133 / 90	22-51 / 38	1-4 / 2,5	3-6 / 4	<LOQ	191-545 / 420	236-533 / 383

^a : CB-28, -52, -101, -118, -138, -153, -180

^b : *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT, *o,p'*-DDD

^c : α , β , γ -HCH

^d : BDE-28, -47, -49, -99, -100, -153, -154, -183

^e : PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA, PFTeDA

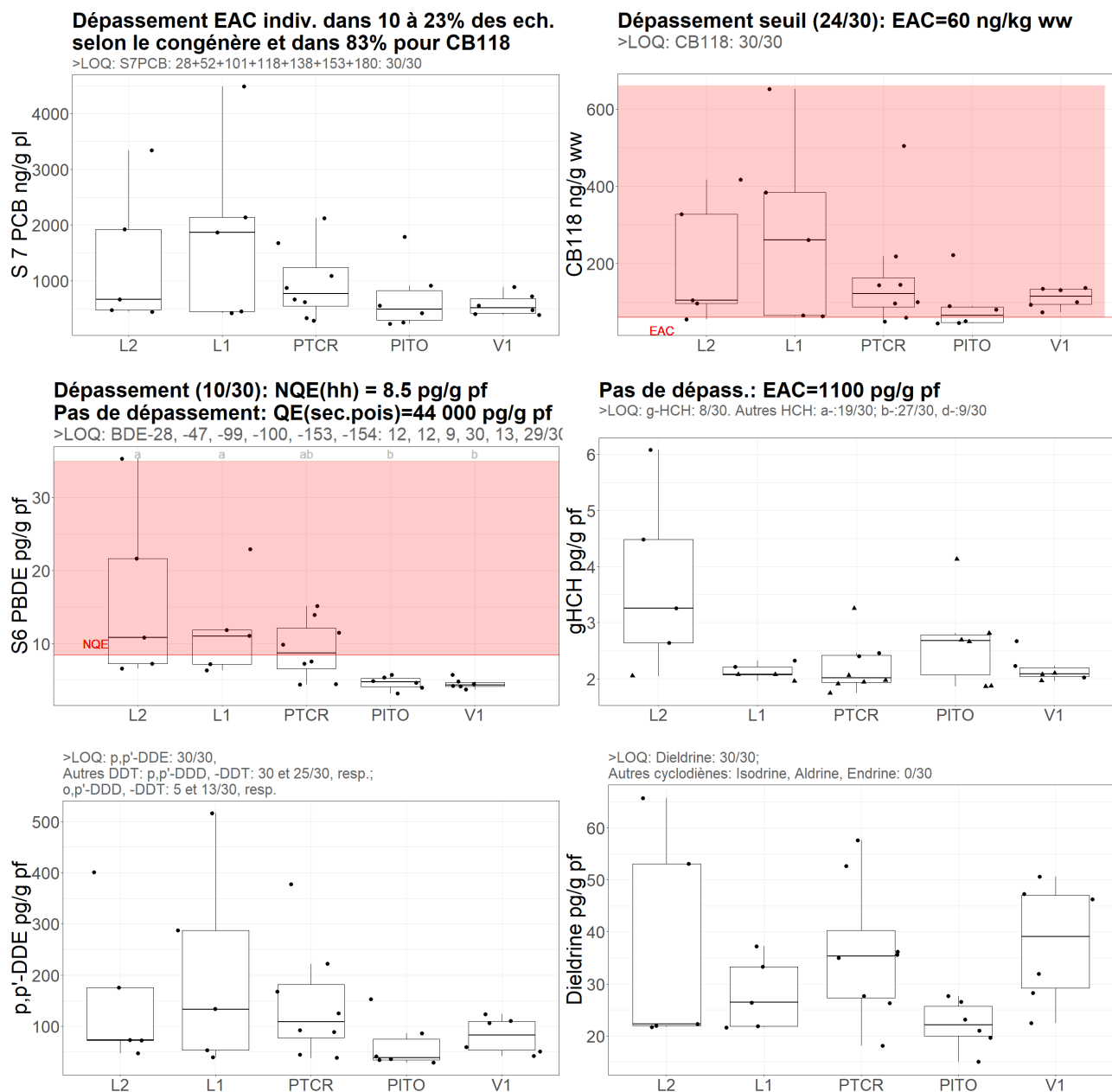


Figure 15 – Concentrations en contaminants organiques lipophiles dans les muscles de soles de 1 et 2 ans prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020. Les zones rouges indiquent les gammes de valeurs supérieures aux EAC. ● >LOQ ▲ <LOQ. Les lettres en haut du plot correspondent aux stations significativement différentes selon le test post hoc de Tukey sur les concentrations en PBDE en pf ($p < 0,05$ (même différence observée sur les concentrations en ps; à noter qu'en pl : pas de différence $p > 0,05$). Pas de différence significative entre stations pour les concentrations en PCB, CB-118, p,p'-DDE et dieldrine en ps, pf et pl, selon des ANOVA ($p > 0,05$). La normalité (test de Shapiro) et l'homogénéité des variances (test de Levene) des données de tous les tests sont vérifiées. Pas de test effectué pour le lindane, trop peu de données quantifiées. Données <LOQ remplacées par LOQ.

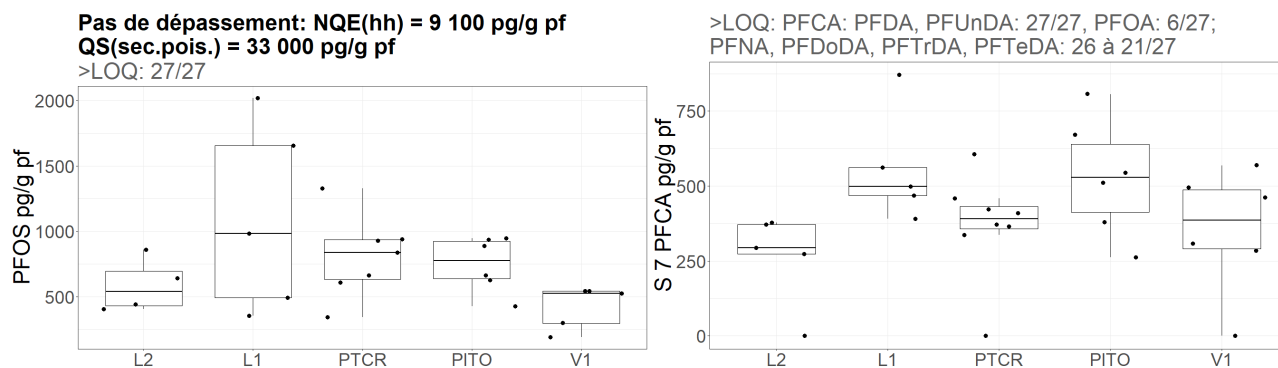


Figure 16 – Concentrations en PFAS dans les muscles de soles de 1 et 2 ans de soles prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020. Pas de différence significative entre stations pour les concentrations en PFOS et PFCA en ps et pf selon des ANOVA à $p < 0,05$. La normalité (test de Shapiro) et l'homogénéité des variances (test de Levene) des données de tous les tests sont vérifiées. Données <LOQ remplacées par LOQ.

3.3.2 Contaminants métalliques

Parmi les ETM recherchés, certains sont essentiels pour le vivant (oligoéléments *e.g.* Cr, Ni, Cu, Zn), mais présentent un optimum d'action dans une certaine gamme de concentrations. Ils deviennent ainsi déficients ou toxiques à des concentrations faibles ou élevées. D'autres n'ont aucun rôle biologique connu (Ag, Cd, Hg, Pb et Sn parmi les ETM ciblés) et présentent ainsi un risque de toxicité potentiel dès lors qu'ils sont présents dans le milieu et bioaccumulés par les organismes.

Au total, pour la campagne SELILOIRE 2020, 45 soles ont été analysées pour leur concentration en Hg dans le muscle. Sur ces 45 soles, 7 ont été prélevées en station L1, 9 en station L2 et 10 en station PTCR situées à l'embouchure de la Loire, 6 en station V1 à l'embouchure de la Vilaine, et 13 en station PITO au large. Sur ces 45 soles, 37 ont été analysées pour leurs concentrations en tous les autres éléments considérés dans le foie (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sn, V, Zn) : 5/7 issues de la station L1, 5/9 de la station L2 et 8/10 de la station PTCR à l'embouchure de la Loire, les 6 de la station V1 à l'embouchure de la Vilaine et les 13 de la station PITO au large.

Tous les échantillons analysés présentaient des valeurs supérieures aux LOQ (calculées par rapport à la prise d'essai par échantillon) pour la plupart des éléments, sauf 2 échantillons sur 37 pour le Cr, 3/37 pour le Co, 31/37 pour le Ni, 3/37 pour le Pb, 17/37 pour le Sn. Au regard des autres paramètres de qualité analytique (*i.e.* taux de recouvrement par rapport aux MRC), les résultats pour les deux éléments Cr et Ni ne sont donnés qu'à titre indicatif.

Variabilité des concentrations en fonction de l'âge (SELILOIRE 2020, station PITO du large)

Sur la station du large PITO, des individus âgés de 1 à 8 ans ont été collectés et ont pu être analysés (Figure 17). Pour de nombreux éléments, les concentrations apparaissent variables, même entre individus d'âge similaire (*e.g.* individus de 2 ans montrant une hétérogénéité des concentrations particulièrement importante pour As (*2 entre min et max), Cu (*13), Pb (*15), Se (*4), Sn (*3) et V (*6), sans qu'il s'agisse toujours du même individu présentant les concentrations les plus élevées pour ces éléments). Par ailleurs, certains éléments non-essentiels (*e.g.* Ag, Cd et Hg) montrent une tendance à l'augmentation des concentrations mesurées avec l'âge de individus (Figure 17). Cette bioaccumulation avec l'âge est particulièrement bien documentée dans la littérature pour le Hg, du fait de son élimination très lente voire nulle dans le temps une fois incorporé/bioaccumulé dans le muscle des poissons (Wang and Wong, 2003, Maulvault et al., 2016). Cette variabilité des concentrations mesurées en fonction de l'âge pour de nombreux éléments démontre une fois de plus l'importance de restreindre tant que possible la ou les classes d'âge

analysées pour suivre et évaluer les variations spatio-temporelles de la contamination en ETM, notamment Hg et aussi Ag et Cd, des poissons. Ci-après, lors de l'évaluation des différences de contamination entre stations échantillonnées sur SELILOIRE 2020, seules les soles âgées d'1 an sur l'ensemble des stations sont ainsi considérées. Par ailleurs, si tous les individus analysés sauf un seul (âgé d'1 an) de cette station PITO dépassent le seul environnemental (NQE) pour le Hg, les seuils sanitaires existant pour Cd, Hg et Pb ne sont jamais dépassés sauf dans le cas d'un individu âgé de 2 ans pour le Pb (Figure 17).

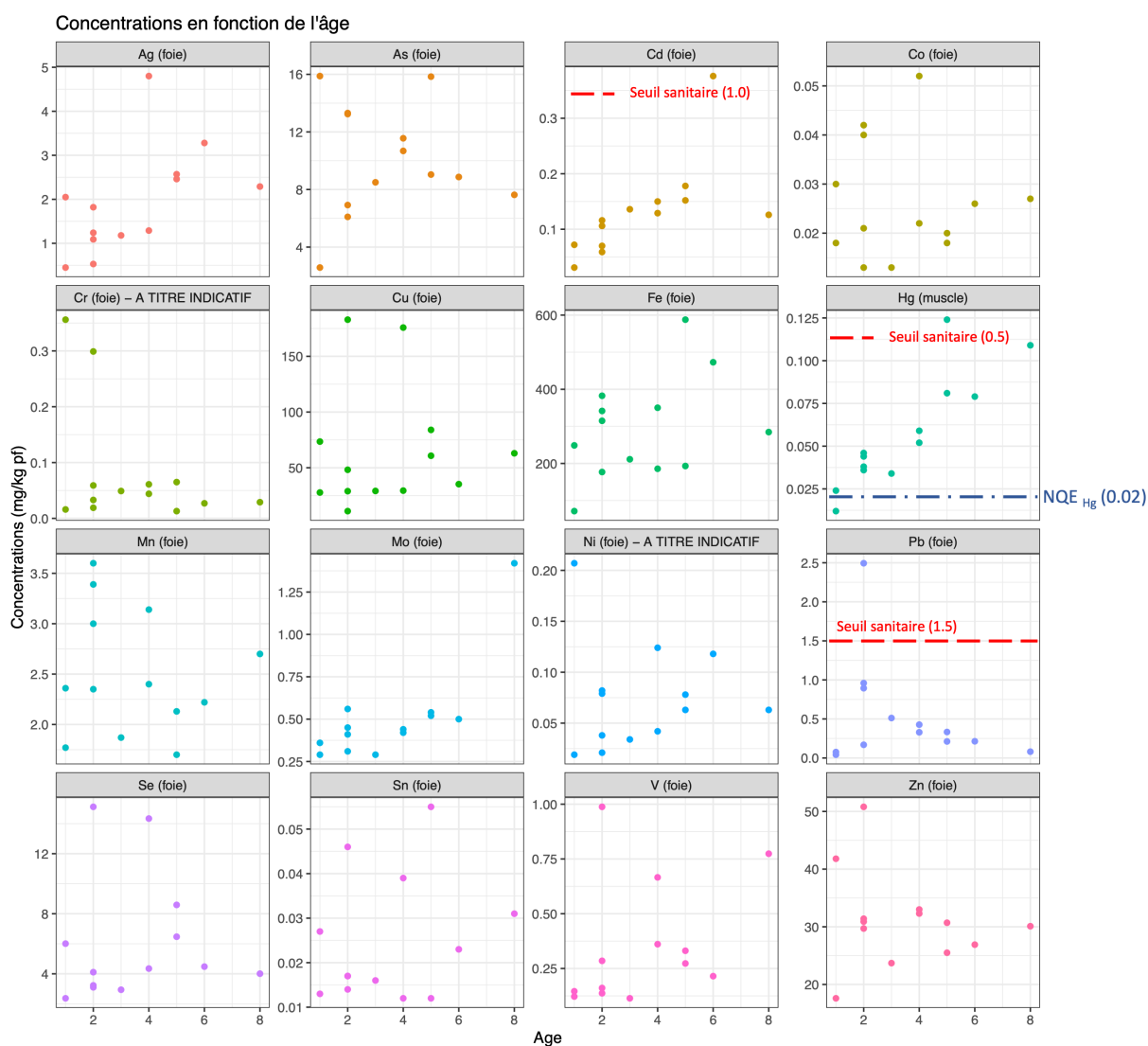


Figure 17 – Concentrations en éléments traces métalliques (ETM, en mg/kg poids frais) mesurées dans le muscle (Hg) ou le foie (autres éléments) de soles âgées de 1 à 8 ans prélevées sur la station PITO du large lors de SELILOIRE 2020. Les seuils sanitaires existants pour Cd, Hg et Pb (en mg/kg pf) sont indiqués en rouge, et le seuil environnemental (NQE) pour le Hg est indiqué en bleu. Les éléments sont présentés de gauche à droite et de haut en bas par ordre alphabétique. NB : du fait des indicateurs de qualité analytique moindre pour Cr et Ni (Annexe 10), les résultats pour ces éléments ne sont donnés qu'à titre indicatif.

Différences entre stations (SELILOIRE 2020, individus de 1 an)

Pour les soles d'âge 1 collectées sur SELILOIRE 2020, les différences de concentrations mesurées dans les individus issus des différentes stations (L1, L2 et PTCR à l'embouchure de la Loire, V1 à l'embouchure de la Vilaine et PITO au large) sont représentées Figure 18 et ont été testées statistiquement (tests excluant néanmoins les soles âgées d'1 an de PITO, du fait du faible effectif n=2).

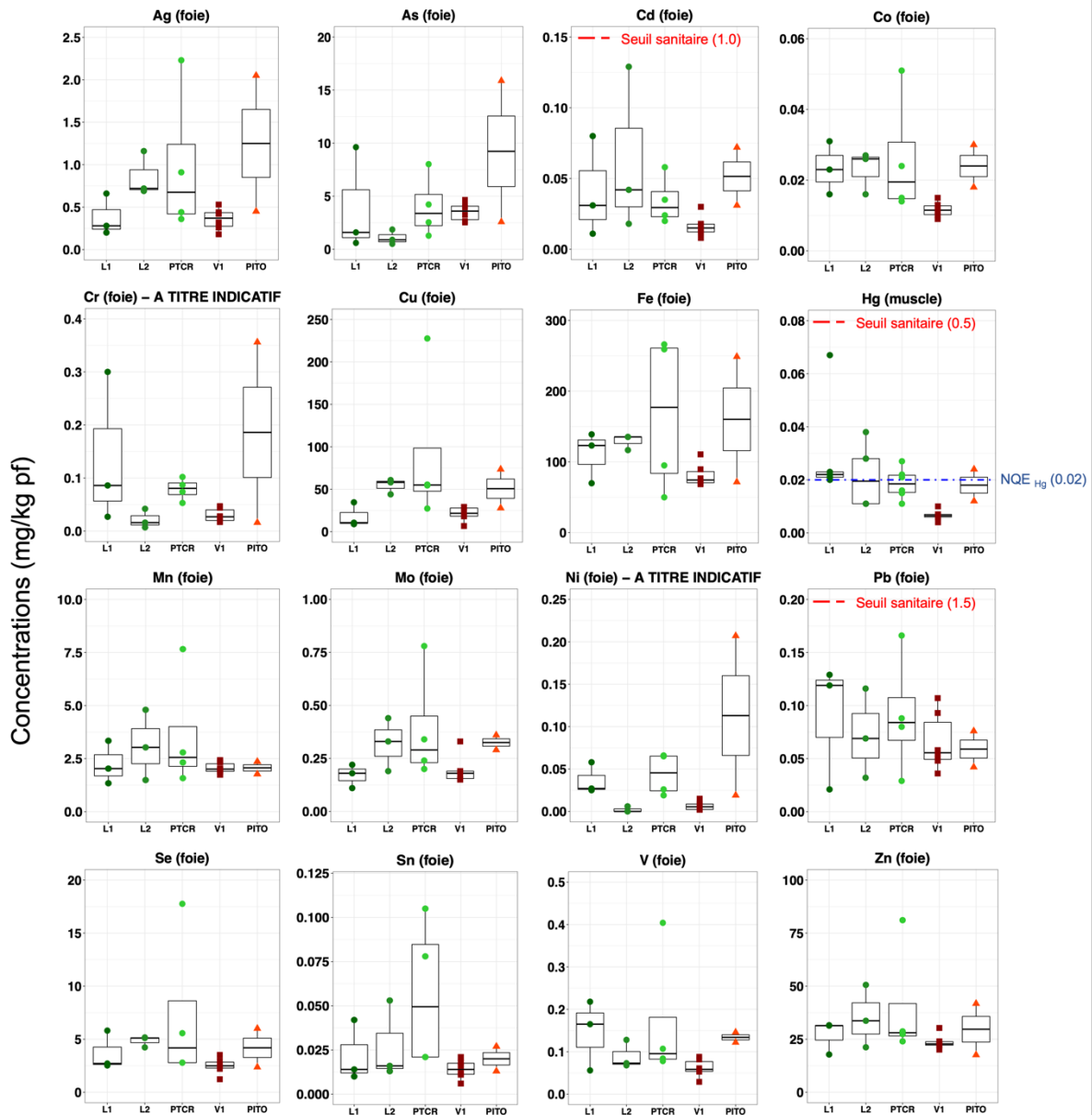


Figure 18- Concentrations en éléments traces métalliques (ETM, en mg/kg poids frais) mesurées dans le muscle (Hg) ou le foie (autres éléments) pour les soles âgées d'1 an et prélevées sur différentes stations (L1, L2 et PTCR à l'embouchure de la Loire, V1 à l'embouchure de la Vilaine, et PITO au large) lors de SELILOIRE 2020. Les seuils sanitaires existant pour Cd, Hg et Pb (en mg/kg pf) sont indiqués en rouge, et le seuil environnemental (NQE) pour le Hg en bleu. Les éléments sont présentés de gauche à droite et de haut en bas par ordre alphabétique. NB : du fait des indicateurs de qualité analytique moindre pour Cr et Ni (Annexe 10), les résultats pour ces éléments ne sont donnés qu'à titre indicatif.

Pour la plupart des éléments (Ag, As, Cd, Fe, Mn, Mo, Pb, Se, Sn, V, Zn), les tests ne révèlent aucune différence significative entre stations (tests de Kruskal-Wallis suivi de tests de comparaison deux à deux avec méthode d'ajustement de Holm, $p > 0,05$ dans tous les cas). Seuls le Hg, le Co et le Cu montrent une différence significative entre stations (tests KW avec $p < 0,05$ pour ces 3 éléments), avec i) des concentrations en Hg significativement plus élevées mesurées dans le muscle des soles de L1 par rapport à V1, et ii) des concentrations en Co et Cu plus faibles en V1 (Co) et/ou L1 (Cu) mais sans que cela ne soit significatif dans les tests de comparaison deux à deux suivants le test de KW. Globalement, peu de différences sont donc observées entre stations à l'échelle de la zone couverte par SELILOIRE 2020 (embouchures de la Loire et de la Vilaine). Ces résultats restent néanmoins à nuancer et à confirmer au regard i) des effectifs relativement

faibles à chaque station et ii) de la variabilité inter-individuelle relativement élevée au sein d'une station pour de nombreux éléments (Figure 17), bien que seuls les individus âgés d'1 an aient été ici considérés.

Différences entre estuaires (Loire vs. Vilaine) et années (2017 vs. 2020), et au regard également des résultats obtenus sur SELISEINE 2018

Les résultats obtenus par les différentes campagnes SELI permettent désormais d'amorcer des comparaisons selon 2 critères :

- Comparaison des résultats obtenus chez la sole entre les campagnes SELILOIRE 2017 et SELILOIRE 2020
- Comparaison des résultats obtenus dans la zone estuarienne de Loire/Vilaine avec ceux obtenus chez la sole dans la zone de l'estuaire de Seine (campagne SELISEINE 2018)

Pour ces comparaisons (métaux), les groupes sont : Vilaine2017 (V1+V2+V3), Vilaine2020 (V1), Loire2017 (L1+L2), Loire 2020 (L1+L22+PTCR) et Seine2018 (Z1+Z4+Z5). Cet exercice a pu être réalisé pour les ETM communs à toutes les campagnes uniquement (*i.e.* Cd, Cu, Hg, Pb et Zn ; Cr et Ni étant présentés à titre indicatif seulement mais non testés statistiquement). Aussi, seuls les individus de classes d'âges similaires aux 3 campagnes ont été considérés pour cette comparaison (âges 1 à 3 ans maximum).

Loire vs. Vilaine. En 2017, les soles des stations en embouchure de la Loire présentaient des concentrations significativement plus élevées que les stations en embouchure de Vilaine pour tous les éléments testés (tests de MWW, $p > 0,05$, Figure 19). En 2020, cette différence entre Loire et Vilaine est de nouveau observée pour tous les éléments excepté le Pb (test de MWW, $p = 0,334$).

2017 vs. 2020. En termes de différences entre années (2017 vs. 2020), les résultats sont assez similaires pour la Loire et la Vilaine. Ainsi, pour ces deux estuaires, aucune différence entre années n'est observée pour Cd, Pb et Zn (tests de MWW, $p \geq 0,05$), alors que les concentrations en Cu en 2020 sont significativement plus faibles qu'en 2017 (Figure 19). Seul le Hg montre un schéma de différence entre années différent entre les estuaires, avec des concentrations similaires mesurées dans le muscle des soles en 2017 et 2020 pour la Loire, alors que les concentrations en 2020 en Vilaine sont significativement plus faibles que celles mesurées en 2017 (test de MWW, $p = 0,02$). Pour cet élément en particulier, au regard de la bioaccumulation avec l'âge bien documentée, cette différence significative observée entre années peut en partie s'expliquer par le fait qu'en 2020, en Vilaine, seuls des individus âgés d'1 an ont pu être collectés et analysés alors qu'en 2017, des individus âgés de 2 à 3 ans avaient également été collectés et analysés.

Loire/Vilaine vs. Seine. En termes de différences avec l'estuaire de la Seine en 2018, les résultats ne montrent aucune différence de contamination en Zn entre les soles issues des différents estuaires (**Figure 19**), mais des concentrations globalement inférieures en Cd, Cu et Pb pour les soles de la Seine (notamment par rapport à la Loire en 2017). Il n'y a que pour le Hg que les soles de Seine présentent des concentrations significativement plus élevées que celles de Loire et Vilaine, malgré des âges similaires (âges 1 à 3 ans) pour les individus analysés (à l'exception de la Vilaine en 2020 où seuls des individus d'âge 1 ont été analysés).

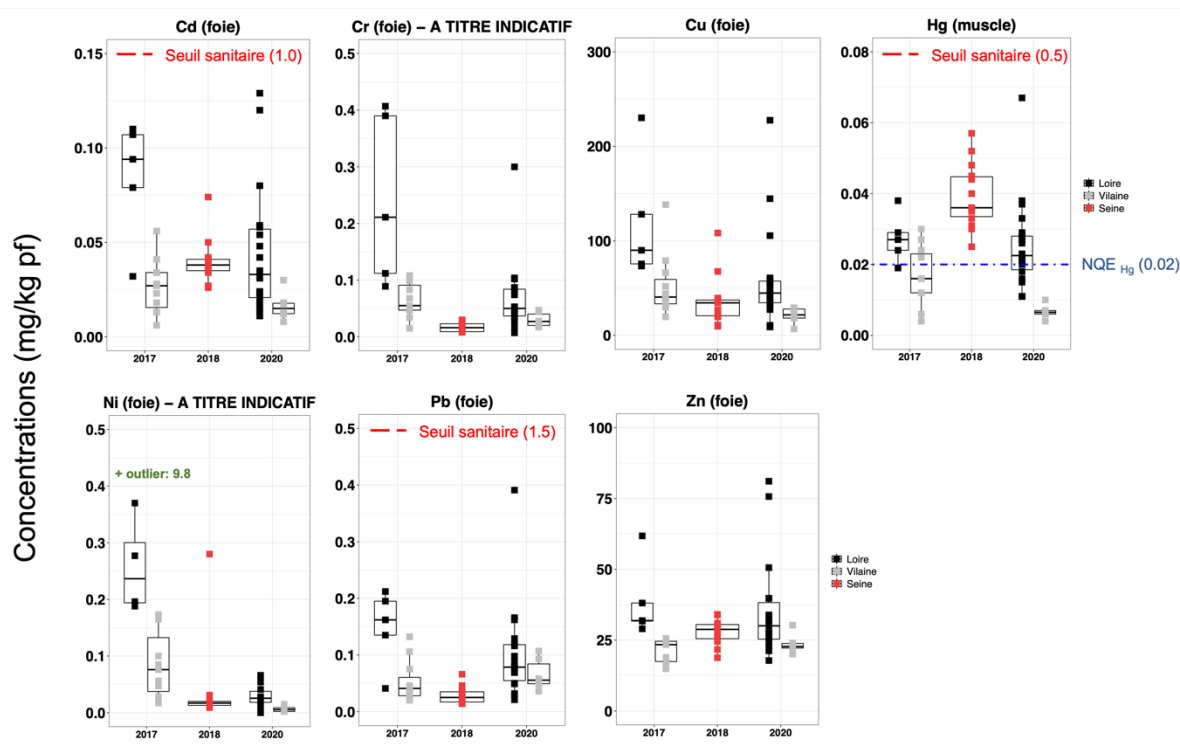


Figure 19 - Concentrations en éléments traces métalliques (ETM, en mg/kg poids frais) mesurées dans le muscle (Hg) ou le foie (autres éléments) des soles issues de différentes campagnes i) SELILOIRE 2017 (n=5 pools d'individus pour les stations L1 et L2 en embouchure de la Loire, n=11 pools d'individus pour les stations V1, V2 et V3 en embouchure de la Vilaine), ii) SELISEINE 2018 (stations Z1, Z4 et Z5 en embouchure de Seine, n=14 individus pour le Hg dans le muscle et n=13 individus pour les autres ETM dans le foie), et iii) SELILOIRE 2020 (n=26 pour Hg et N=18 pour les autres ETM pour les stations L1, L2 et PTCR en embouchure de la Loire, n=6 pour la station V1 en embouchure de la Vilaine). Seuls les ETM et âges (1 à 3 ans) en commun entre les trois campagnes ont été pris en compte. Les seuils sanitaires existant pour Cd, Hg et Pb (en mg/kg pf) sont indiqués en rouge, et le seuil environnemental (NQE) pour le Hg en bleu. Les éléments sont présentés de gauche à droite et de haut en bas par ordre alphabétique. NB : du fait des indicateurs de qualité analytique moindre pour Cr et Ni (Annexe 10), les résultats pour ces éléments ne sont donnés qu'à titre indicatif.

3.4 Approche intégrée

Plusieurs possibilités ont été explorées pour intégrer les données.

3.4.1 Analyse multivariée

Les analyses multivariées (e.g. Analyse en Composante Principale, ACP) sont possibles avec des individus pour lesquels il n'y a pas de données manquantes (NA). Dans le jeu de données SELILOIRE 2020, seuls 10 individus n'ont pas de donnée manquante pour l'ensemble des biomarqueurs, contaminants organiques et éléments traces métalliques (**N = 10** sans NA). Dans certains cas, les données manquantes sont remplacées par la médiane de la série pour éviter de perdre l'individu tout en minimisant le poids de cette valeur arbitraire dans l'analyse (valeur centrale). Ces cas sont précisés à chaque fois et sont considérés acceptables s'ils ne sont pas trop nombreux, i.e. quelques individus par série sans qu'il n'y ait de règle précise. Les variables pour lesquelles il y a trop de valeurs <LOQ ou de NA ne sont pas considérées dans l'analyse. Les données de concentrations sont log-transformées puis centrées-réduites. Les concentrations en contaminants organiques lipophiles sont normalisées par le taux de lipides (i.e. exprimé en pg/kg pl). Les données qualifiées de fausses ou douteuses sont retirées de l'analyse.

3.4.1.1 Analyse en Composante Principale (ACP)

Dans un premier temps, nous avons réalisé 3 ACP selon le type de variable (biomarqueurs « bio », contaminants organiques « orga » et éléments traces « ETM »). *L'objectif est d'observer la répartition des données, les liens entre variables et de rechercher un effet gradient géographique depuis l'embouchure de la Loire ou de la Vilaine.*

1- Jeu de données « Bio » : N = 110 individus de 0 à 10 ans, mâles (50) et femelles (54). Variables représentées : Taille, âge, Maturité, RGS, RHS, Fulton, COMET_Tail, LMS, AChE, Note de gravité, Vv, S/V, Nv et OH-Pyrène. Le OH-pyrène est utilisé comme représentant le plus quantifié des autres métabolites de HAP (Tableau 5). Le nombre de données manquantes remplacées par la médiane sur les 110 individus représentés est de 9 pour l'âge, 2 pour le RGS, 9 pour le test des comètes, 3 pour le temps de labilisation (LMS), 5 pour les paramètres des lysosomes (Sv, S/V, Nv) et 40 pour les concentrations en OH-pyrène.

Les 2 premiers axes de l'ACP expliquent 34% de la variabilité des données. *Individus sur axes.* On n'observe pas de gradient géographique, les ellipses correspondant aux stations se superposent sur le plot des axes 1 et 2 (Figure 20) ainsi que sur les axes 3 et 4, qui représentent ensemble 20% de la variabilité. *Variables sur axes 1 à 4.* L'axe 1 est principalement corrélé au ratio surface/volume des lysosomes (S/V) et anti-corrélé à l'âge, la taille et la densité volumétrique lysosomale (Vv) des individus (Tableau 14). L'axe 1 est aussi principalement construit par les individus de PITO et L3, qui sont les 2 stations avec des individus >3ans (dans le jeu n = 110 utilisé pour l'ACP). L'axe 2 est principalement corrélé au RHS et l'indice de Fulton, et anti-corrélé à la densité numérique lysosomale (Nv). L'axe 3 montre une corrélation entre les cassures de brins de l'ADN et l'inhibition de l'AChE. L'axe 4 montre une corrélation entre les cassures de brins de l'ADN, l'occurrence de micronoyaux et les concentrations en OH-pyrène ; or les HAP sont connus pour être génotoxiques. Néanmoins, la corrélation de Pearson entre les cassures de brins de l'ADN et l'OH-pyrène dans l'ensemble du jeu de données SELI n'est pas significative ($r = 0,15$ sur l'ensemble des données SELILOIRE ($n=75$) ; $r = 0,25$ si la valeur la plus élevée à 912 ng/g bile est retirée ($n = 74$) ; $r = 0,29$ sur les valeurs de cassures de brins de l'ADN et de OH-pyrène retenues dans le jeu de données « bio » ($n = 12$)).

2- Jeu de données « Orga » : N = 45 individus de 1 et 2 ans, mâles (1 seule femelle). Variables représentées : Taille, âge, RGS, RHS, Fulton, PCB.28lp, PCB.153lp, BDE.100lp, BDE.154lp, BDE.49lp, pp.DDElp, B.HCH, Dieldrin, PFNAww, PFDAww, PFUnDAww, PFDoDAww, PFTrDAww, PFOSww (ww : poids frais=pf (wet weight), dw : poids sec=ps (dry weight), lp : poids lipidiques=pl (lipid weight)). Parmi les PCB, tous les congénères sont corrélés entre eux, mais les plus chlorés (5 à 7 Cl) sont corrélés plus fortement entre eux (Pearson corrélation $r > 0,91$ entre les 5 congénères PCB-153, -180, -138, -118, -101) qu'avec les congénères les moins chlorés (e.g. corrélation de Pearson entre les PCB 5/7 Cl et CB-28 (3 Cl) : r entre 0,63 à 0,85, et entre les PCB 5/7 Cl et CB-52 (4 Cl) : 0,81 et 0,94). Le CB-153 a été pris comme représentant des PCB les plus chlorés et le CB-28 pour apprécier la spécificité des PCB moins chlorés. Parmi les PBDE, les congénères les plus quantifiés (> LOQ) sont conservés, i.e. le penta-BDE : BDE-100 (100%), hexa-BDE : BDE-154 (97%) et le tetra-BDE : BDE-49 (87%). Parmi les OCP, la dieldrine et le *p,p'*-DDE sont utilisés (quantifiés dans 100% des échantillons) et le beta-HCH est utilisé comme représentant le plus quantifié (90%) des HCH. Les PCB, PBDE et OCP sont exprimés en pl. Les congénères de HBCDD ne sont pas assez quantifiés (quantifié dans 1 seul échantillon). Les PFAS retenus sont ceux quantifiés dans >85% des échantillons, ils sont exprimés en ww. Sur les 3 individus pour lesquels les PFAS n'ont pas pu être mesurés (manque de matière) sont remplacés par la médiane.

Les 2 premiers axes de l'ACP expliquent 48% de la variabilité des données. *Individus sur axes.* On n'observe pas de gradient géographique, les ellipses correspondant aux stations se superposent sur le plot des axes 1 et 2 (Figure 20) ainsi que sur les axes 3 et 4, qui représentent ensemble 25% de la variabilité. *Variables sur*

axes 1 à 4. Les variables biologiques telles que l'âge, la taille, les indices RGS, RHS et de Fulton sont peu représentées sur les axes de l'ACP, probablement du fait de la sous-sélection des individus utilisés pour l'analyse de contaminants, qui avait justement pour but de limiter la variabilité biologique pour augmenter la capacité à identifier un gradient géographique (voir 3.3.1). Les contaminants lipophiles, notamment PCB (surtout le CB-28), les PBDE et *p,p'*-DDE sont principalement corrélés à l'axe 1 (Tableau 14). Ils sont peu corrélés aux autres axes. Le beta-HCH a une place intermédiaire entre les 2 axes. Les concentrations en PFAS, protéinophiles, sont quant à eux principalement corrélés à l'axe 2 (sauf le PFNA et le PFOS). Le PFOS est peu corrélé aux 2 premiers axes, il est surtout corrélé à l'axe 3 qui explique 15% de la variabilité et qui est anti-corrélé au RHS. Le PFNA est corrélé à l'axe 4 (10%), qui est aussi corrélé au RGS. Ces relations (distinction du PFNA par rapport aux autres PFAS, lien PFOS-RHS et PFNA-RGS) sont des tendances. Les données de SELILOIRE 2020 ne permettent pas plus d'expliquer ces observations ou de supposer des liens de causalités (e.g. avec RHS ou RGS), mais il sera intéressant de les approfondir avec d'autres données acquises de la même manière dans le suivi SELI.

3- Jeu de données « ETM » : N = 45 individus de 1 à 8 ans, principalement des mâles (3 femelles).

Variables représentées : Taille., âge, RGS, RHS, Fulton, et concentrations en V, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Sn et Pb dans le foie, et Hg dans le muscle. Le RGS manquant est remplacé par la médiane. *Individus sur axes.* Sur l'axe 1, les individus de PITO se distinguent légèrement des individus des autres stations, notamment de V1, avec des concentrations en V, Fe, Co, Ag, Cd et Hg plus élevées, probablement car la gamme d'âge à PITO est plus étendue qu'aux autres stations ; PITO est la seule station du jeu de données avec des individus de plus de 2 ans. *Variables sur axes 1 à 4.* Les concentrations en V, Fe, Co, Ag, Cd et Hg sont positivement corrélées à l'axe 1, qui est lui-même positivement corrélé à l'âge des individus et anti-corrélé au RHS (Tableau 14). Les concentrations en Mn, Zn sont positivement corrélées à l'axe 2 et As est anti-corrélé à cet axe 2 qui n'a pas de lien important avec les caractéristiques biologiques des individus.

Tableau 14 – Pourcentage de variance expliqué par les 4 premiers axes et scores des variables sur ces axes pour les 3 ACP biomarqueurs « Bio », contaminants organiques « Orga » et éléments traces métalliques « ETM »

PCA « Bio »	PC1	PC2	PC3	PC4	PCA « Orga »	PC1	PC2	PC3	PC4	PCA « ETM »	PC1	PC2	PC3	PC4
Proportion Explained Scores	0,215	0,123	0,102	0,095	Proportion Explained Scores	0,320	0,163	0,149	0,103	Proportion Explained Scores	0,405	0,138	0,092	0,081
Taille cm	-1,41	0,17	-0,11	0,27	Age	-0,53	-0,16	0,58	-0,60	Taille..cm.	0,70	0,38	-0,54	-0,03
Age	-1,44	-0,23	0,11	0,03	Taille cm	-0,29	-0,30	0,54	-0,51	Age	0,87	0,50	-0,30	0,32
RGS	-0,82	0,33	-0,14	0,19	RGS	-0,04	0,62	-0,13	0,66	RGS	-0,26	-0,11	0,90	0,22
RHS	-0,36	0,99	0,00	-0,66	RHS	0,17	0,19	-0,87	-0,17	RHS	-0,84	0,26	-0,05	0,45
Fulton	-0,39	0,91	-0,32	-0,61	Fulton	0,14	-0,03	-0,55	-0,54	Fulton	-0,52	-0,05	-0,51	0,43
COMET_Tail	0,03	0,68	-0,53	0,91	PFNAww	-0,66	0,23	0,02	0,63	X51V	0,96	-0,07	0,04	0,07
LMS	0,51	0,16	1,08	0,38	PFDAww	-0,19	0,55	0,03	0,20	X55Mn	0,34	-0,73	0,10	-0,40
ACHe	-0,07	-0,07	1,11	-0,01	PFUnDAww	-0,36	0,99	0,07	-0,15	X57Fe	1,05	0,08	0,19	-0,24
Note de gravité	-0,70	-0,12	-0,10	-0,81	PFDoDAww	0,19	0,78	0,44	-0,34	X59Co	0,87	-0,59	0,04	-0,01
Vv	-1,16	-0,61	0,12	0,16	PFTrDAww	-0,22	0,84	0,41	-0,23	X63Cu	0,69	-0,55	-0,35	0,29
S/V	0,96	-0,41	-0,34	-0,59	PFOSww	0,14	0,28	0,81	0,19	X66Zn	0,52	-0,73	0,35	0,19
Nv	-0,15	-1,26	-0,49	-0,32	PCB.28lp	1,00	0,13	-0,05	0,19	X75As	0,60	0,76	0,32	-0,03
MN (1000.C)	-0,39	-0,41	0,02	0,60	PCB.153lp	0,84	-0,22	0,53	0,22	X82Se	0,78	-0,55	-0,31	0,07
OH.Pyrène	0,42	0,05	-0,87	0,60	BDE.100lp	1,01	-0,06	0,36	0,03	X107Ag	1,05	-0,01	-0,18	0,15
					BDE.154lp	0,92	0,02	0,02	0,03	X111Cd	0,92	0,43	0,25	0,14
					BDE.49lp	0,98	0,19	-0,05	-0,37	X118Sn	0,04	-0,18	0,40	0,96
					pp.DDElp	0,98	-0,16	0,35	0,20	X208Pb	0,74	0,35	0,40	-0,32
					b.HCHlp	0,48	0,60	-0,36	-0,33	Hg	0,97	0,32	0,01	0,31
					Dieldrinlp	0,81	0,26	-0,33	-0,06					

ww : poids frais=pf (wet weight), dw : poids sec=ps (dry weight), lp : poids lipidiques=pl (lipid weight)

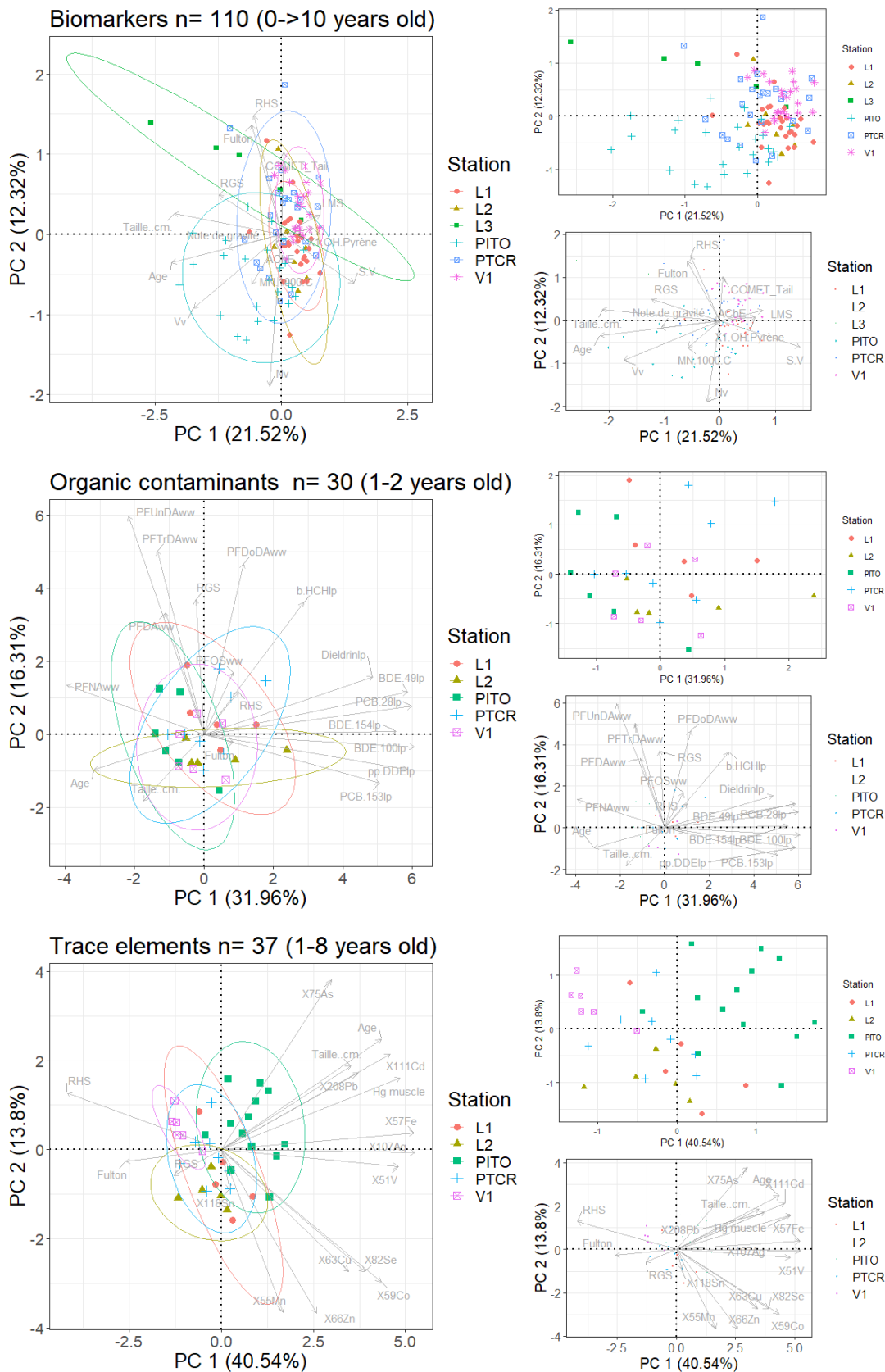


Figure 20 – Analyses en composantes principales des biomarqueurs (haut) et de la contamination organique (milieu) et inorganique (bas) des soles prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020. Les concentrations en PCB, PBDE et OCP sont exprimés en pl, les PFAS en pf, les éléments traces en ps, elles sont log-transformées. Les valeurs <LOQ sont remplacées par la LOQ. Les valeurs manquantes sont remplacées par la médiane de la série. Les ACP sont centrées réduites. Sur la gauche, l'ACP présente les individus regroupés par station sous les ellipses de dispersion (95 %) et les variables. Pour une meilleure visibilité, l'ACP présentant les individus (haut) ou les variables (bas) est présenté à droite de chaque plot complet.

3.4.1.2 Analyse de redondance partielle (RDA)

L'analyse de redondance (RDA) est une extension de la régression multiple. La régression multiple explique une variable réponse par une matrice explicative. *L'objectif d'une RDA partielle est de modéliser l'effet des concentrations en contaminants (matrice explicative) sur la réponse des biomarqueurs (matrice réponse) en tenant compte des variables biologiques (covariables).* Les matrices ont les mêmes individus et pour éviter trop de données manquantes, elle se base sur les 30 individus pour lesquels on a des données de contaminants organiques et par conséquent, inorganiques et biomarqueurs aussi sauf problème analytique pour lesquels les valeurs manquantes sont remplacées par la médiane (*i.e.* 2, 2, 5 et 3/30 pour les données Comet, paramètres des lysosomes (LMS, S.V, Nv), AChE, PFAS).

1. Sélection de variables. Contrairement à l'ACP, il est préférable de construire le modèle avec un nombre limité de variables et éviter la multi colinéarité entre variables. Il n'y a pas de consensus sur la valeur du facteur d'inflation de la variance (variance inflation factor (VIF)) au-delà de laquelle on doit considérer qu'il y a multicolinéarité. Selon Oksanen (2015), une règle commune est de considérer qu'une VIF>10 indique qu'une variable est fortement dépendante des autres et n'apporte pas d'information indépendante. Cette condition est vérifiée dans les modèles discutés ici. Deux modèles sont discutés ici :

Modèle 1, établi selon un raisonnement écotoxicologique *i.e.* les variables ont été sélectionnées à dire d'expert et non par un test statistique :

- Biomarqueurs = variables à expliquer : COMET_Tail (cassure simple brin de l'ADN), LMS (stabilité de la membrane lysosomale), S.V. (ratio surface/volume des lysosomes), Nv (densité numérique lysosomale), AChE (activité enzymatique de l'acétylcholine estérase). L'occurrence de micronoyau n'est pas retenue pour la RDA partielle car 26 individus sur les 30 représentés ne présentent pas de micronoyaux (26 valeurs à 0 micronoyaux/1000 cellules sur 30 individus). Le OH-pyrène n'est pas retenu dans cette analyse car sur les 30 individus utilisés, 12 (40%) avaient des valeurs de OH-pyrène validées.

- Contaminants = variables explicatives :

* Parmi les métaux, seuls ceux considérés non essentiels dont 3 indicateurs communs OSPAR sont retenus : Cd, Pb, Ag, Hg. L'arsenic (As), souvent considéré comme un élément non-essentiel, a été considéré initialement dans la construction du modèle 1. Mais la corrélation de l'As avec d'autres contaminants (Annexe 11, Figure 37) provoque l'augmentation du VIF d'autres variables (*e.g.* BDE-49) qui ont un pouvoir explicatif plus important que l'As (pouvoir explicatif analysé sur la base du R2 ajusté, du VIF des variables et de la p-value du modèle). Les corrélations positives entre l'As et les métaux Cd, Pb et Hg ainsi qu'avec certains PFAS, et les corrélations négatives entre l'As et les PCB, PBDE et *p,p'*-DDE (Annexe 11, Figure 37) ne sont pas discutées dans ce rapport mais seraient à approfondir. Enfin, le Sn, non essentiel également, n'a pas été considéré ici du fait du nombre relativement important de valeurs < LOQ (17/37).

* Les PCBs sont corrélés entre eux. Parmi les 2 les moins corrélés entre eux et qui avaient été retenus pour les ACP (voir 3.4.1.1) : le CB-28 est plus corrélés avec d'autres contaminants, notamment les PBDE et OCP, que le CB-153 (Annexe 11, Figure 37). Le CB-28 est donc retiré du modèle 1.

* Parmi les 3 PBDE les mieux quantifiés et retenus pour l'ACP (voir 3.4.1.1), le tetra-BDE, BDE-49 est retenu dans le modèle 1. Dans les différents tests effectués lors de la construction de ce modèle, il apporte plus d'explication au modèle que les 2 autres congénères plus bromés penta-, BDE-100

et hexa-, BDE-154 (pouvoir explicatif analysé sur la base du R2 ajusté, du VIF des variables et de la p-value du modèle).

* Parmi les OCP, le *p,p'*-DDE est fortement corrélé avec le CB-153 (Pearson $r = 0,92$, Figure 37) et donc retiré de la RDA. La dieldrine et la beta-HCH sont conservés dans le modèle 1.

* Parmi les PFAS (substances per- et polyfluoroalkyl) : 1) PFASs (perfluoroalkyl *sulfonic acids*) : le PFOS (perfluorooctane sulfonic acid) est le plus connu des PFASs, parmi les mieux quantifiés et retenu pour cette sous-famille dans le modèle 1. 2) PFCA (perfluoroalkyl *carboxylic acids*) : le PFDA (perfluorodecanoic acid) est retrouvé à des concentrations relativement importantes (3.4.1.1) et est retenu dans le modèle 1, avec le PFNA (perfluorononanoic acid) et le PFTrDA (perfluorotridecanoic acid). Ils sont sélectionnés car la longueur de leur chaîne carbonée diffère (Annexe 9) et ils sont quantifiés dans quasiment tous les échantillons (nombre de données >LOQ : PFDA : 27/27, PFNA : 26/27, PFTrDA : 25/27). Le PFOA (perfluorooctanoic acid) qui fait partie avec le PFOS des PFAS les plus connus, n'est pas retenu à cause de son niveau de quantification faible (6/27).

- Caractéristiques biologiques des individus = covariables : Taille, âge, RGS et RHS. La RDA partielle ajuste les effets des variables explicatives en fonction des covariables. Les covariables ne sont pas d'intérêt pour la question principale de la RDA, et ne sont donc pas représentées graphiquement.

Tous les VIF sont ≤ 10 dans le modèle 1. Ce modèle explique significativement 25% de la variabilité de la réponse des biomarqueurs ($p = 0,02$, Figure 21).

Modèle 2, établi par une sélection des variables par le critère d'Akaike (AIC) dans un algorithme pas à pas. Ce critère représente un compromis entre le biais diminuant avec le nombre de paramètres et la parcimonie, *i.e.* volonté de décrire les données avec le plus petit nombre de paramètres possible. La construction de modèles par étape est fragile, la stratégie de construction de modèle peut changer le modèle final (Oksanen, 2015). Deux méthodes de sélections sont testées :

- Méthode ascendante, sélection progressive (Forward selection) : On part du modèle sans variable explicative et on ajoute les variables du modèle complet (ici le modèle 1) jusqu'à ce que l'AIC ne diminue plus. Cette méthode donne un modèle non contraint, *i.e.* sans variable explicative pour expliquer la réponse des biomarqueurs (AIC = 49,27).

- Méthode descendante (Backward selection) : On part du modèle contenant toutes les variables explicatives du modèle 1 et on enlève les variables jusqu'à ce que l'AIC ne diminue plus. Cette méthode retire le PFOS du modèle 1 (AIC = 44,75 < méthode forward). Cette méthode sera utilisée comme **modèle 2**. Les variables explicatives de ce modèle 2 sont donc Cd + Pb + Hg + Ag + PFNA_{ww} + PFDA_{ww} + PFTrDA_{ww} + PCB.153_{lp} + BDE.49_{lp} + b.HCH_{lp} + Dieldrin_{lp}. Tous les VIF sont < 7 dans le modèle 2. Ce modèle 2 explique significativement 27% de la variabilité de la réponse des biomarqueurs ($p = 0,01$).

2. Résultats/Discussion. Dans les 2 modèles (1 et 2), autour de 25% de la variabilité des biomarqueurs est significativement expliquée par les contaminants chimiques ($p < 0,01$). La part de variation expliquée par les covariables est de 12% et 16% dans les modèles 1 et 2, respectivement (Figure 22). D'autres contaminants et notamment des contaminants d'intérêt émergents, non suivis, peuvent être aussi importants dans les effets observés, ou d'autres paramètres environnementaux. Un effet de gradient géographique n'est pas observé (les ellipses se recouvrent), comme dans les analyses univariées (voir 3.2 et 3.3) ou les ACP (3.4.1.1). Les liens entre variables ne seront pas discutés plus en détail avant d'avoir plus de données ; seul le 1^{er} axe est significatif ($p = 0,048$ et $0,036$ dans le modèle 1 et 2, respectivement).

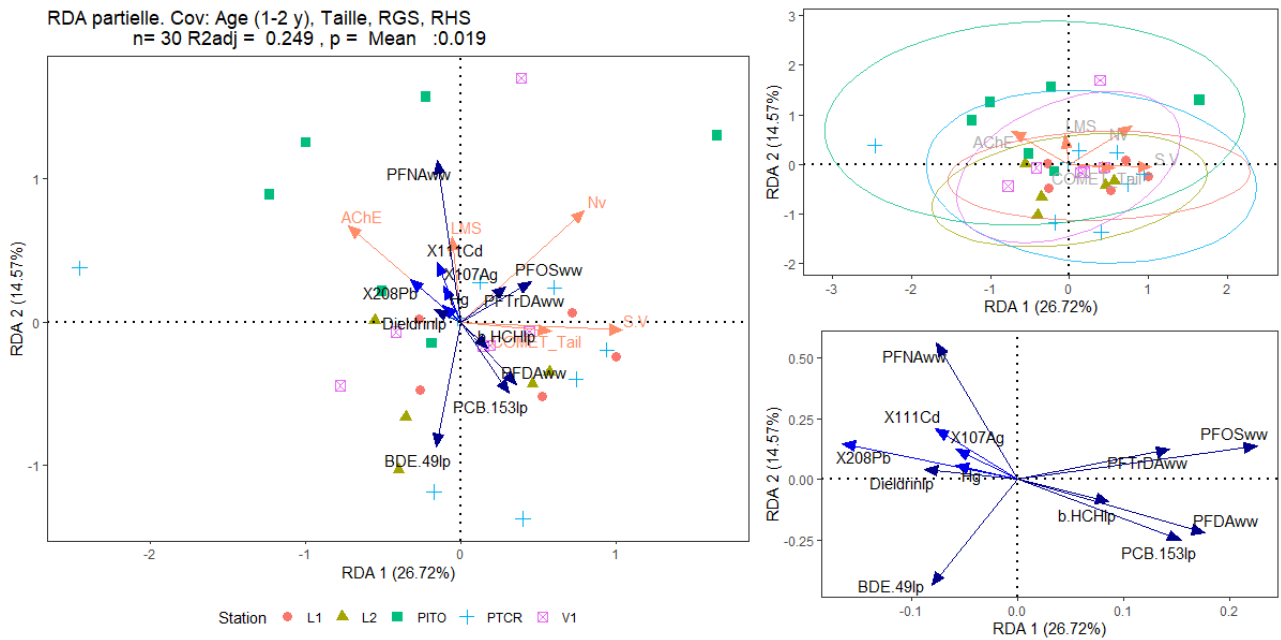


Figure 21 – Analyse de redondance (RDA) partielle représentant la modélisation de l’effet des concentrations en contaminants sur les réponses des biomarqueurs en tenant compte de (ajusté par) l’âge, la taille, le RGS et le RHS (covariables) selon un modèle de sélection des variables à dire d’expert (modèle 1). Les individus sont des soles de 1 et 2 ans prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020 (n = 30). Les concentrations en PCB, PBDE et OCP sont exprimés en pl, les PFAS en pf, les éléments traces en ps. Les valeurs <LOQ sont remplacées par la LOQ. Les valeurs manquantes sont remplacées par la médiane de la variable. Les concentrations sont log-transformées. Les variables sont centrées-réduites. Pour une meilleure visibilité, deux extraits de la RDA sont représentés : en haut à droite, réponses des biomarqueurs (variables réponses) et individus regroupés par station sous les ellipses de dispersion (95 %), en bas à droite, concentrations en contaminants (variables explicatives : bleu foncé : contaminants organiques, bleu clair : éléments traces) et individus. Les VIF des variables sont ≤ 10 . Le plot représente un cadrage de type 2 (scaling 2) : les angles entre variables \approx leur corrélation.

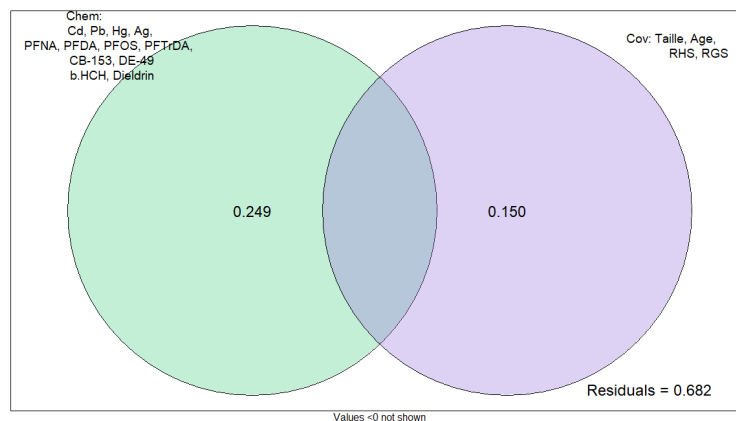


Figure 22 – Partition de la variation de l’effet des contaminants et des caractéristiques biologiques des individus sur la réponse des biomarqueurs des soles prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020 (n = 30) selon le modèle 1.

3.4.2 Approche par indice cumulé

3.4.2.1 Distance à la moyenne pour toutes les données disponibles

Le 1^{er} indice (Indice(moy)) représente la somme des rapports entre la moyenne d'une variable à une station par rapport à la moyenne à l'ensemble des stations de la campagne SELILOIRE 2020 moyennée (divisée par le nombre de variables) :

$$\text{Indice}(moy) = \frac{\sum \frac{\text{Valeur}_{\text{paramètre}}}{\text{Moyenne}_{\text{paramètre}}}}{\text{Nombre de paramètres}}$$

Par variable et par station, la distance à la moyenne de la zone est calculée et sommée pour les stations suivies $\sum \frac{\text{Valeur}_{\text{paramètre}}}{\text{Moyenne}_{\text{paramètre}}}$. Comme la première moyenne est calculée par paramètre et par station (Annexe 11, Figure 38), il est possible d'utiliser *l'ensemble des individus* analysés, et pas seulement des individus pour lesquels l'ensemble des paramètres a été analysé, comme c'est le cas dans l'analyse multivariée (3.4.1). Comme il est question de distance à la moyenne et non de distance à un seuil (3.4.2.2), *l'ensemble des variables* est considéré (9 biomarqueurs et 42 contaminants parmi 5 familles).

La distance à la moyenne des variables qui répondent à une inhibition ou une diminution (LMS et AChE), est calculée selon $\sum \frac{\text{Moyenne}_{\text{paramètre}}}{\text{Valeur}_{\text{paramètre}}}$. La distance à la moyenne donne plus d'importance aux réponses éloignées de la moyenne de la variable, et s'affranchit des différences de grandeurs entre variables :

- Une distance à la moyenne = 1 indique que la réponse de la variable est égale à la moyenne de la zone étudiée (*i.e.* Baie de Loire et Vilaine).
- Une distance à la moyenne >> 1 en une station indique que cette réponse est plus altérée que la réponse moyenne sur l'ensemble de la zone étudiée ; et inversement pour les distances << 1.

Pour toutes les variables et par station, l'indice moyen (Indice(moy)) est rapporté à 1 (/Nombre de paramètre) :

- L'indice moyen (Indice(moy)) = 1 indique qu'en moyenne, l'ensemble des variables sont proches de leurs moyennes respectives ou qu'elles se compensent entre elles.
- L'indice moyen (Indice(moy)) >> 1 indique que sur la station considérée, certaines (voire toutes les) réponses sont plus altérées que la moyenne sur l'ensemble de la zone étudiée ; et inversement pour les distances << 1.

Les variables sont regroupées par type : biomarqueurs (Figure 23 gauche) et contaminants (Figure 23 droite), puis au sein des contaminants, par famille de contaminants (code couleur).

La *variabilité* des réponses des biomarqueurs (*i.e.* hauteur de chaque couleur dans les histogrammes) semble similaire entre stations, comme discuté précédemment pour les analyses multivariées (3.2, Figure 23). *L'indice moyen* des biomarqueurs semble plus élevée/altérée à PITO que la moyenne des réponses en Loire et Vilaine (moyenne de la réponse cumulée = 1,14) et moins élevée à L2 (moyenne de la réponse cumulée = 0,83).

La contamination cumulée aux stations PITO et V1 (Indice(moy) = 0,73 et 0,60, respectivement) semble moins importante que la moyenne de la zone Loire/Vilaine. Le profil de contamination (proportion de chaque famille de contaminants dans la somme cumulée) en V1 semble similaire aux stations côtières L1, L2 et PTCR. Par contre, à PITO, la contamination dans les 4 familles de contaminants organiques est moins importante et la contamination en métaux est plus importante que la moyenne de la zone.

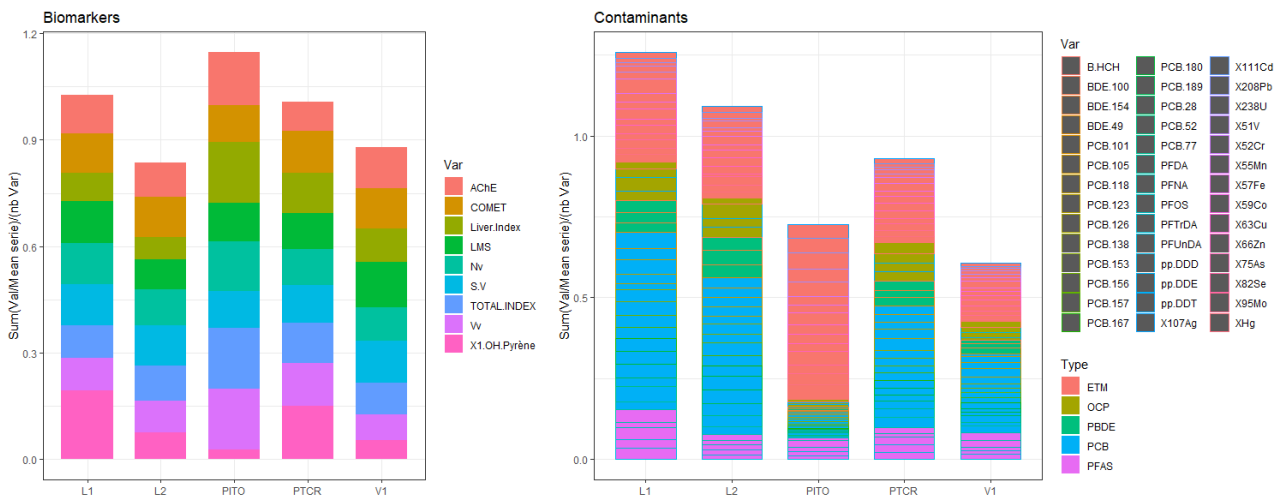


Figure 23 – L’indice moyen représentant la somme des rapports entre la moyenne d’une variable à une station par rapport à la moyenne à l’ensemble des stations, chez les soles prélevées durant la campagne SELILOIRE 2020. Les paramètres sont regroupés par type : biomarqueurs (gauche) et contaminants (droite). Chaque biomarqueur (gauche) ou famille de contaminants (droite) est représenté par une couleur dans le diagramme empilé. Pour les contaminants, le contaminant est indiqué pas un rectangle de couleur dans la famille à laquelle il est rattaché.

3.4.2.2 Distance au seuil pour toutes les variables avec un seuil (CHASE)

Les résultats de la campagne SELILOIRE 2020 ont été observés de manière cumulée par station par rapport aux seuils établis par paramètre selon l’approche CHASE (Chemical Status Assessment Tool, (Andersen et al., 2016, Andersen et al., 2019)) :

$$CS = \frac{\sum CR}{\sqrt{\text{Nombre de paramètres}}} \text{ où } CR = \frac{\text{Valeur}_{\text{paramètre}}}{\text{Seuil}_{\text{paramètre}}}, \text{ CR : contamination ration, CS : Contamination score.}$$

Les paramètres sont regroupés par type : biomarqueurs et contaminants, puis au sein des contaminants, par famille de contaminants. Le CS est divisé en 5 catégories :

- CS = 0-0,5 : « Zone sans problème » de très bonne qualité
- CS = 0,5-<1 : « Zone sans problème » de bonne qualité
- CS = 1-<5 : « Zone à problème », ayant une qualité environnementale modérée
- CS = 5-<10 : « Zone à problème » ayant une qualité environnementale faible
- CS = 1-<5 : « Zone à problème » ayant une qualité environnementale mauvaise

L’analyse CHASE sert à identifier les zones à problème ou en bon état, ainsi qu’à déterminer quel(s) groupe(s) de paramètre(s) a/ont déclenché le statut. Comme le CR ($\sum \frac{\text{valeur}_{\text{paramètre}}}{\text{Seuil}_{\text{paramètre}}}$) est calculé par paramètre et par station, il est possible d’utiliser l’ensemble des individus analysés, et pas seulement des individus pour lesquels l’ensemble des paramètres a été analysé, comme c’est le cas dans l’analyse multivariée (3.4.1). Seules les paramètres pour lesquels des seuils ont été développés sont considérés dans cette approche (4 biomarqueurs et 18 contaminants parmi 4 familles).

Pour les biomarqueurs, les seuils utilisés dans le CHASE sont l’EAC pour AChE et LMS, et une valeur observée historiquement en Seine pour le Comet (16 % de l’ADN dans la queue de la comète, Tableau 1). Pour le Comet un BAC a aussi été établi à 5% (Davies and Vethaak, 2012). Si nous l’avions utilisé, les dépassements auraient été encore plus importants que ceux discutés ici. Les concentrations en OH-pyrène sont systématiquement inférieures à l’EAC (EAC disponible est développé sur des données obtenues sur la morue, Figure 23). La LMS ne dépasse pas le seuil EAC à L1, PITO et V1. Dans les autres cas, les biomarqueurs dépassent les seuils, notamment pour l’AChE pour lesquelles les valeurs sont inférieures (inhibition) à plus de 2 fois l’EAC (2.1, 2.4

et 2.4 fois en L1, L2 et PTCR). De manière cumulée (CS), les 5 stations sont classées en zones à problème ayant une qualité environnementale modérée selon l'approche CHASE sur les biomarqueurs.

Pour les contaminants, les seuils utilisés sont les EAC pour les PCB, les seuils sanitaires pour le Cd et le Pb, la NQE pour le Hg, les seuils Canadiens FEQG pour les PBDE et les seuils sanitaires pour les PFAS (Tableau 2). Comme la sole est un poisson dit maigre (< 3% de lipides), l'évaluation est effectuée avec des seuils en poids humides (pour les substances lipophiles (PCB et PBDE), les seuils sont tous exprimés en poids lipidiques pour un poisson théorique de 5% de lipides, puis reconverti au poids humide avec le taux de lipides de l'individu ([AC contaminants biota \(ices.dk\)](https://www.ices.dk)). Le Cd et le Pb, les PBDE, les PCB (sauf CB-118 à toutes les stations et CB-101 en L1 et L2) et les PFAS (sauf le PFNA à PITO) ne dépassent pas leur seuil (Figure 24). Le Hg ne dépasse pas le seuil à V1. Dans les autres cas, les concentrations en contaminants dépassent les seuils, *i.e.* Hg à L1, L2, PITO et PTCR (1.5, 1.1, 2.8 et 1.1 fois le seuil, respectivement) ; CB-118 à toutes les stations notamment 4,7, 3,3, 1,4, 1,1 et 1,8 fois l'EAC en L1, L2, PITO, PTCR et V1, respectivement ; CB-101 en L1 et L2 (1.6 et 1,1 fois l'EAC, respectivement), et le PFNA à PITO (1,1 fois le seuil sanitaire). De manière cumulée (CS), L1, L2, PITO et PTCR sont classées en zones à problème ayant une qualité environnementale modérée selon l'approche CHASE sur les biomarqueurs. La station V1 a un CS = 0,96 et est donc classée en bonne qualité. Les principaux dépassements concernent le CB-118 à toutes les stations et le Hg à PITO.

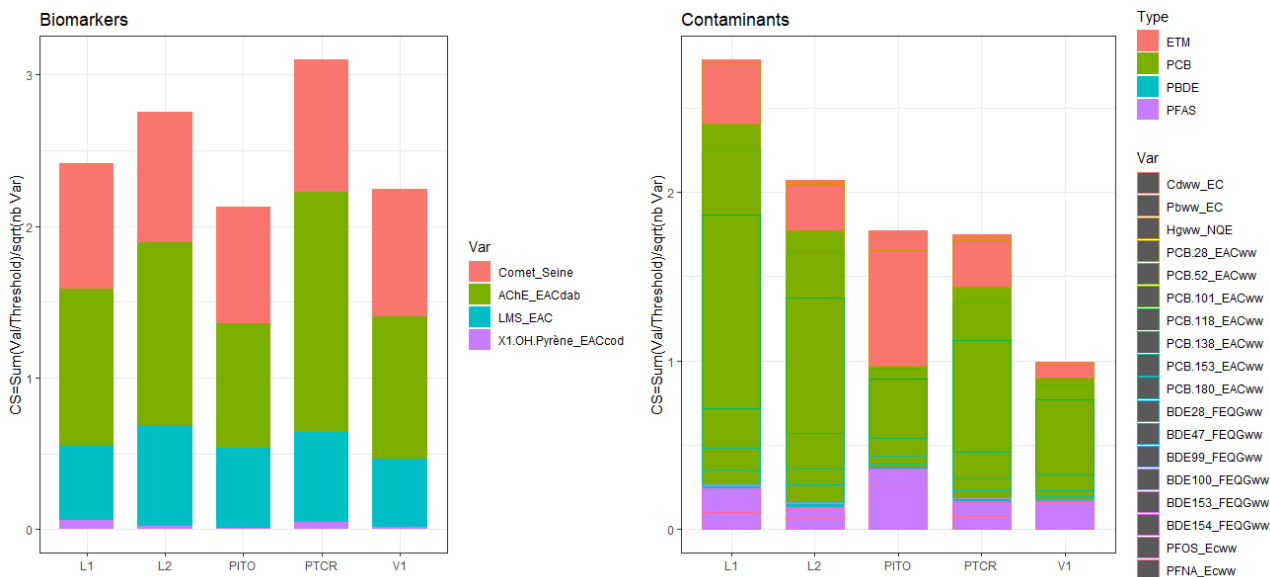


Figure 24 – Calcul de l'indice multiparamétrique CHASE pour les 5 stations prospectées lors de la campagne SELILOIRE 20. Les paramètres sont regroupés par type : biomarqueurs (gauche) et contaminants (en pf, droite). Chaque biomarqueur (gauche) ou famille de contaminants (droite) est représenté par une couleur dans le diagramme empilé. Pour les contaminants, le contaminant est indiqué pas un rectangle de couleur dans la famille à laquelle il est rattaché.

3.4.3 Approche par taux de déclassement : Fiche Indicateur proposée pour l'évaluation DCSMM 2024 et Quality Status Report OSPAR (QSR 2023)

Les données de biomarqueurs mesurées lors des campagnes SELILOIRE 2017 et 2020 ont été utilisées avec des données similaires des autres pays Européens pour le Quality Status Report OSPAR (QSR 2023) : <https://oap.ospar.org/en/ospar-assessments/quality-status-reports/qsr-2023/other-assessments/integrated-biological-effects/>. Elles sont aussi à la base d'une proposition d'indicateur pour l'évaluation du bon état écologique au regard du D8C2 de la DCSMM en 2024, dans la suite de l'évaluation du D8C2 en 2018. Cette proposition a fait l'objet d'une fiche indicateur candidat qui n'a pas été retenue par la gouvernance pour le rapportage DCSMM et est consultable en ligne : D8C2-poissons : 10.13155/97213.

4 Résultats – Réponses des biomarqueurs et bioaccumulation des contaminants chez les moules en Baie de Loire et Vilaine

4.1 Biométrie

Les moules prélevées sur 6 stations ROCCH en Baie de Loire et Vilaine (Bonne Source, Ile Dumet, Pen Bé, Pointe Castelli, Pointe de Chemoulin, Pointe er Fosse) mesuraient de 30 à 63 mm et pesaient de 3,1 à 30,3 g (poids humide avant ouverture de la moule). Les moules de l’Ile Dumet étaient plus grandes qu’aux autres stations et elles étaient plus grosses à Pointe er Fosse. L’Ile Dumet est la seule des 6 stations suivies à être sur filière et, tout le temps, immergée, les moules ont la possibilité de filtrer plus souvent.

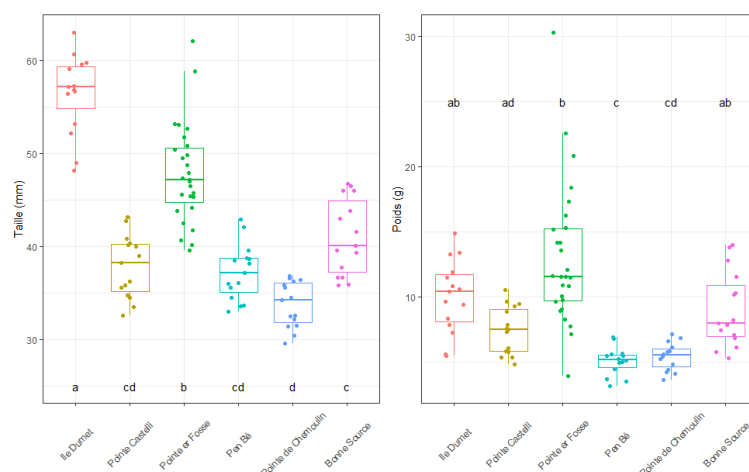


Figure 25 – Taille et poids des moules *M. edulis* collectées aux 6 stations ROCCH pour l’analyse de biomarqueurs dans le cadre de la campagne SELILOIRE en février 2021 (n = 101, n=15/station sauf Pen Bé : n=14 et Pointe er Fosse : n=27). Les lettres en haut des plots indiquent les groupes significativement différents selon une ANOVA suivie d’un test post hoc de Tukey ($p < 0,05$, test Shapiro et Levene : $p > 0,05$) pour la taille ; et selon un test de Kruskal Wallis suivi d’un test post hoc Dunn pour le poids (normalité et homoscedasticité non vérifiées).

4.2 Biomarqueur d’état de santé général : LMS

La stabilité de la membrane lysosomale a été analysée chez 52 individus issus de 5 stations. Les moules de Pointe de Chemoulin n’ont pas pu être échantillonnées pour la LMS. La période moyenne de labilisation (LP) mesurée par le test LMS dans les cellules digestives de moules en baie de Loire et Vilaine était de 19,4 min (min – max : 5 – 40 min, Figure 26). Le temps moyen de labilisation à Pointe er Fosse était inférieur à celui des individus aux autres stations ($p < 0,05$) et inférieur à 10 min (EAC), valeur considérée indicatrice d’un état de santé altéré selon Davies (Davies and Vethaak, 2012), suggérant que les individus de Pointe er Fosse sont soumis à des conditions environnementales non-favorables, ce qui peut inclure une exposition à un stress chimique. Le temps de labilisation à Bonne Source se situe entre le BAC et l’EAC. Il est inférieur aux valeurs retrouvées chez les individus des 3 autres stations : Ile Dumet, Pointe Castelli et Pen Bé.

Ce biomarqueur lysosomal de stress général avait également été analysé lors de la campagne SELILOIRE 2017 (sites Pointe de Chemoulin (CH), Pointe Castelli (PC), Pen Bé (PB) et Pointe er Fosse (PeF)) et SELISEINE 2018. Les valeurs globales du paramètre LP ne diffèrent pas significativement entre la campagne SELILOIRE 2017

($LP_{SLL-2017} = 19,35 \pm 6,63$ min), Seliseine 2018 ($LP_{SLS-2018} = 18,43 \pm 8,14$ min) et Seliloire 2020 ($LP_{SLL-2020} = 19,42 \pm 9,43$ min), tous sites confondus.

Dans le cas de la campagne SELILOIRE 2017, les valeurs du temps de labilisation de la membrane lysosomale (LP) peuvent être comparées par site avec les valeurs obtenues en 2020. Ainsi, en 2017, les valeurs maximales de LP avaient aussi été mesurées pour le site PB ($LP_{PB-2017} = 24,51 \pm 9,28$ min) et sont très comparables aux valeurs obtenues en 2020 ($LP_{PB-2020} = 26,67 \pm 7,44$ min). Dans le cas du site PC, les valeurs de LP obtenues en 2017 étaient bien inférieures ($LP_{PC-2017} = 15,99 \pm 4,78$ min) aux valeurs présentées dans ce rapport ($LP_{PC-2020} = 24,08 \pm 5,11$ min) et sont significativement différentes (test Mann-Whittney, $p < 0,05$). Cette différence suggère une amélioration des conditions environnementales pour ce site entre 2017 et 2020. Les valeurs basses mesurées en 2017 peuvent indiquer un évènement de contamination ponctuel en 2017 ou bien démontrer une amélioration progressive des conditions environnementales (depuis 2017 à 2020). Au contraire dans le cas du site PeF, les valeurs de LP enregistrées en 2017 ($LP_{PeF-2017} = 17,82 \pm 3,15$ min) étaient nettement supérieures aux valeurs mesurées en 2020 ($LP_{PeF-2020} = 8,56 \pm 3,10$ min). Cette différence significative (test Mann-Whittney, $p < 0,05$) suggère un changement dans les conditions environnementales pour le site PeF entre 2017 et 2020. Il est essentiel de continuer les analyses chimiques et de biomarqueurs de stress général notamment à PeF afin de déterminer s'il s'agit d'un stress ponctuel ou d'une dégradation continue des conditions environnementales.

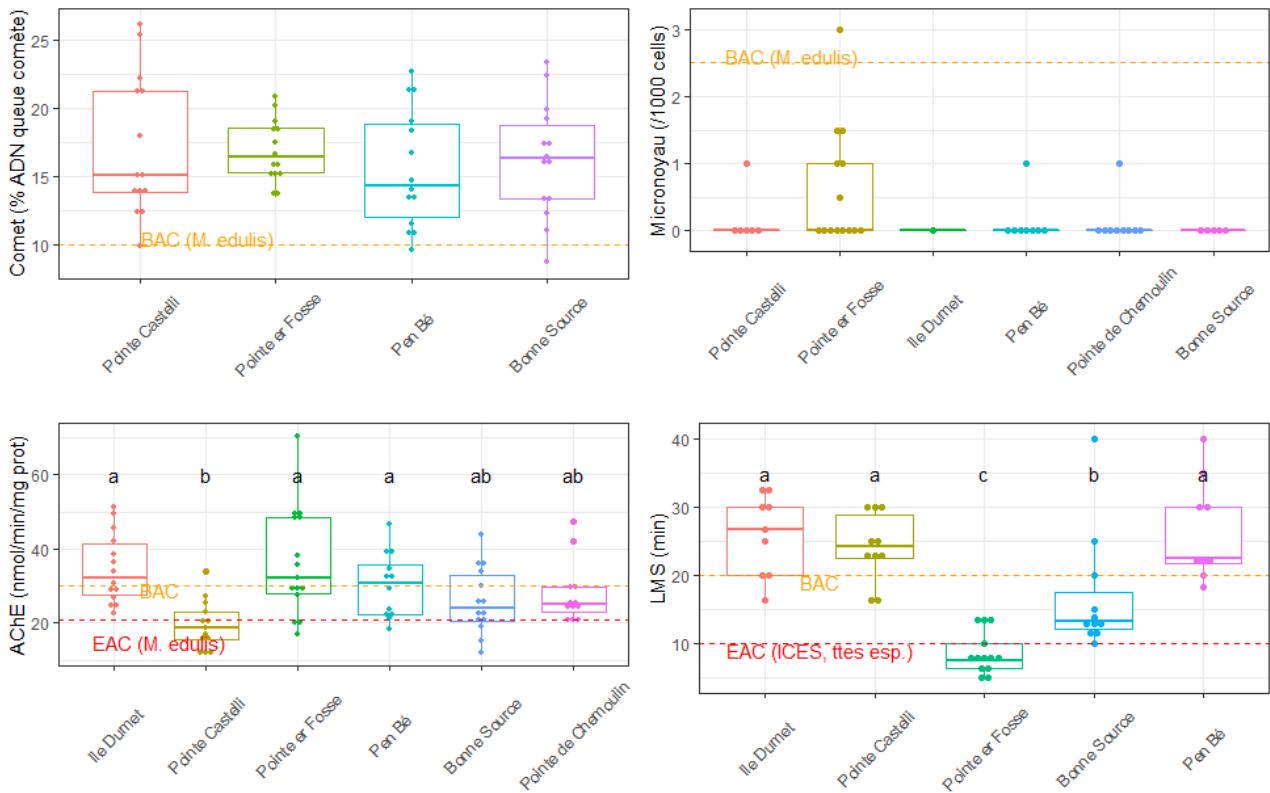


Figure 26 – Biomarqueurs de génotoxicité (cassures de brins de l’ADN (haut à gauche) et micronoyaux (haut à droite)), de neurotoxicité (inhibition de l’AChE, bas à gauche) et de stress général (temps de labilisation des lysosomes, bas à droite) chez les moules collectées aux 6 stations de la campagne SELILOIRE en février 2021. Les lignes horizontales indiquent les seuils (Tableau 1). Les lettres sur les plots de l’AChE et de la LMS indiquent les groupes significativement différents selon une ANOVA suivi d’un test post hoc de Tukey ($p < 0,05$, test Shapiro et Levene : $p > 0,05$). Pour le Comet, ANOVA : $p > 0,05$ (pas d’effet station), Micronoyaux : pas de test effectué (distribution des données).

4.3 Biomarqueurs de génotoxicité : tests des comètes et des micronoyaux

Les niveaux de cassures de brins de l’ADN ont été mesurés chez 56 moules de 4 stations ROCCH. Ils n’ont pas été mesurés à l’Ile Dumet et à Pointe de Chemoulin. Les niveaux varient de 8,7 à 22,2 % ADN présent dans la queue de la comète (% Tail DNA). Le niveau de dommage à l’ADN est similaire entre les 4 stations analysées ($p > 0,05$, Figure 26), les valeurs se situent entre 1,6 et 1,7 fois le BAC (10 %, (Davies and Vethaak, 2012)).

La présence de micronoyaux a été recherchée chez 43 moules de 6 stations ROCCH ; 34 individus ne présentaient pas de micronoyau (79 %). A l’Ile Dumet ($n = 1$) et à Bonne source ($n = 5$), peu d’individus ont été analysables, à cause de lames cassées lors du transport et du peu d’hémolymphe prélevé. Parmi les 9 individus présentant des micronoyaux, 7 venaient de Pointe er Fosse, 1 de Pen Bé et 1 de Pointe de Chemoulin. Le niveau de micronoyau moyen est inférieur au BAC pour ces 6 stations, bien qu’un individu à Pointe er Fosse présentait l’occurrence la plus élevée retrouvé sur la zone prospectée (3 micronoyaux/1000 cellules) qui soit supérieur à la valeur de fond (BAC = 2,5 micronoyaux/1000 cellules, Figure 26).

Ces données sur les dommages à l’ADN (cassures de brins, cassures chromosomiques) mettent en évidence un possible stress génotoxique précoce (cassures de brin de l’ADN > BAC) mais ne mettent pas évidence un stress génotoxique plus intégré et héréditaire comme le sont les micronoyaux (< BAC), en baie de Loire et Vilaine.

4.4 Biomarqueur de neurotoxicité : activité AChE

Dans les branchies des 80 moules prélevées sur les 6 stations prospectées, l'activité a été mesurée entre 11,9 et 70,4 (moyenne : 29,3) nmol/min/mg protéine (Figure 26). Les moules de Pointe Castelli présentent les niveaux d'activité enzymatique AChE les plus faibles et en moyenne plus faible que l'EAC (21 nmol/min/mg protéine) suggérant que les individus à Pointe Castelli sont exposés à un stress neurotoxique, pouvant provenir de substances tels que certains pesticides (*e.g.* organophosphates, carbamates et autres molécules similaires). A Bonne Source et Pointe de Chemoulin, les valeurs d'AChE étaient intermédiaires entre l'EAC et le BAC. L'activité AChE à l'Île Dumet, Pointe er Fosse et Pen Bé était similaire et supérieure au BAC.

4.5 Analyse histologique chez la moule

4.5.1 Sex-ratio et stades de maturité chez la moule

Sur l'ensemble des stations suivies, le sexe ratio est équilibré (39F+40M, Tableau 15). Selon l'analyse histologique des échantillons de gonades chez la moule, 17,7% des individus collectés durant la campagne SELILOIRE 2020 montraient un développement des gonades avancé ; 48,1% étaient matures ; 31,6% étaient en ponte et enfin 2,5% des individus étaient en période de post-ponte (Figure 27).

Tableau 15 - Proportion (%) de mâles et de femelles présents pour chaque station de la campagne SELILOIRE 2020 après identification histologique.

	SLL20 BS	SLL20 D	SLL20 PB55	SLL20 PC	SLL20 PCH	SLL20 PeF
Male	50	43	55	50	40	73
Femelle	50	57	45	50	60	27

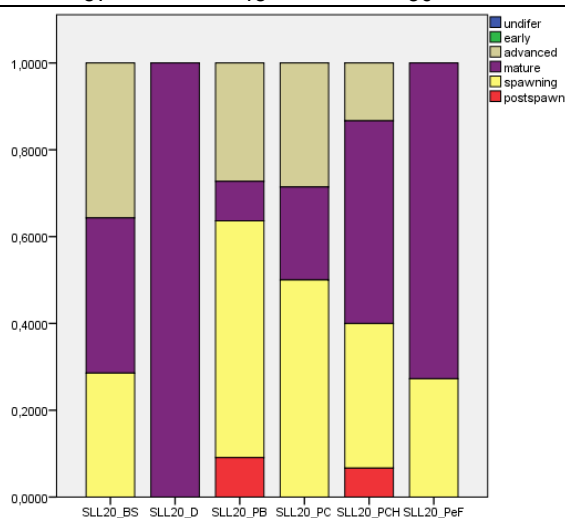


Figure 27- Proportions des stades de développement des gonades identifiés par analyses histologiques chez les moules collectées aux 6 stations de la campagne SELILOIRE 2020.

4.5.2 Pathologies chez la moule

Selon les analyses histopathologiques des échantillons de moules, les individus provenant des sites ID et PeF présentaient peu de lésions et/ou parasites, comme le montrent les niveaux de prévalence bas pour ces groupes (Tableau 16). Ce sont les seuls deux sites pour lesquels aucune infection par le trématode Digène n'a été décrite et les lésions identifiées ont été détectées à des niveaux inférieurs à 30% (à l'exception de l'atrésie qui est un phénomène habituellement observé durant le cycle des gonades des bivalves). Les niveaux les plus élevés de prévalence des différentes pathologies identifiées ont été détectés à PCH (6% *Bucephalus*

sp. ; 67% digenean ; 60% digestive gland brown cell infiltration ; 60% haemocytic infiltration). Ces deux réponses inflammatoires (infiltration de cellules brunes dans les tissus des glandes digestives et infiltration hémocytaire) peuvent être observées en réponses à différents facteurs environnementaux tels que la pollution, le parasitisme, la famine ou la reproduction (Garmendia et al., 2011, Benito et al., 2022). Également, le nombre de parasites digènes (10,9) et l'intensité d'atrésie étaient supérieurs pour les moules du site PCH (Tableau 16). Deux indices semi-quantifiés ont été mesurés chez la moule : l'indice cellulaire et l'indice d'atrophie.

L'indice cellulaire adipogranulaire (ADG) et l'indice d'atrophie. Le premier sert d'indicateur de matière énergétique de réserve dans le manteau, il informe sur la stratégie métabolique liée à la reproduction et aux changements bioénergétiques saisonniers (Bignell et al., 2008). Il est mesuré selon la classification de Bignell et al. (2008) :

- (0) Aucune cellule adipogranulaire apparente dans le tissu conjonctif vésiculeux ;
- (1) Les cellules adipogranulaire peuvent être vues, mais elles semblent rares ;
- (2) Les cellules adipogranulaire apparaissent dispersées dans le tissu du manteau ;
- (3) Il y a une augmentation marquée de l'abondance des cellules adipogranulaire et certaines zones peuvent ne pas sembler montrer une cohérence absolue ;
- (4) Les cellules adipogranulaire peuvent être considérées comme constituant la majorité du volume du tissu conjonctif.

L'indice d'atrophie mesure l'amincissement épithélial des alvéoles digestives des moules et sert d'indicateur de stress général (Kim et al., 2006, Garmendia et al., 2011). Il est mesuré selon la classification de Kim (Kim et al., 2006) :

- (0) Diverticules digestifs normaux avec une lumière presque obstruée ;
- (1) Co-occurrence de tubules normaux et partiellement atrophiés d'épaisseur d'épithélium supérieure à la moitié de la normale ;
- (2) Epaisseur de l'épithélium digestif équivalente à la moitié de l'épaisseur normale ;
- (3) Tubules significativement atrophiés avec un épithélium digestif inférieur à la moitié de l'épaisseur normale ;
- (4) Epithélium digestif extrêmement mince, presque tous les tubules affectés.

Les valeurs des indices chez des moules de SELILOIRE 2020 semblent similaires entre les 6 stations suivies ($p > 0,05$ selon KW avec test post hoc de Dunn, Figure 28).

Chez la moule, l'analyse histologique de l'intégrité de la glande digestive sert d'indicateur d'exposition à un stress chimique (Marigómez et al., 2006, Garmendia et al., 2011, Benito et al., 2017). L'indice semi-quantitatif CTD (Connective To Digestive tissue) évalue la densité des alvéoles digestives par rapport au tissu conjonctif interstitiel. Il est défini selon 4 scores :

- (1) La majorité du tissu de la glande digestive présente une densité élevée d'alvéoles digestives presque sans tissu conjonctif interstitiel visible ;
- (2) La majorité du tissu de la glande digestive présente une densité élevée d'alvéoles digestives, le tissu conjonctif interstitiel est visible, mais la distance entre les alvéoles digestives reste plus courte que le rayon alvéolaire moyen ;
- (3) Les parties du tissu de la glande digestive présentent une densité d'alvéoles digestives plus faible et la distance entre les alvéoles est similaire ou supérieure au rayon alvéolaire moyen ;
- (4) La majorité du tissu de la glande digestive présente une faible densité d'alvéoles digestives et la distance entre les alvéoles est similaire ou supérieure au rayon alvéolaire moyen.

En accord avec les niveaux de prévalence mentionnés précédemment, les valeurs de l'indice CTD (Connective to Digestive Tissue Index) étaient significativement supérieures chez les moules du site PCH tandis que les valeurs les plus basses ont été mesurées pour les moules provenant des sites PB et ID (Figure 29).

Tableau 16 - Prévalence (en %) des lésions et parasites identifiés, décompte des parasites type digènes et pourcentage de follicules présentant des cas d'atrésie chez les moules prélevées aux 6 stations de la campagne SELILOIRE 2020. Les valeurs en gras indiquent les groupes significativement différents au reste des sites selon un test z-score ($p < 0,05$). MPX : Parasites type Protozoaires.

Mussel alterations	BS	ID	PB	PC	PCH	PeF
Prévalence						
% de moules atteintes	(n=14)	(n=14)	(n=12)	(n=14)	(n=15)	(n=11)
<i>Bucephalus</i> sp.	0	0	0	0	6	0
Protozoaire X MPX	7	7	0	0	0	0
Digénean	43	0	33	29	67	0
Gregarine	36	0	0	0	0	0
Brown Cell infiltration (Digestive Gland)	36	14	42	57	60	0
Brown Cell infiltration (Gonades)	0	0	0	0	6	0
Digestive tissue degeneration	7	29	58	43	27	18
Atrésia	100	88	92	100	89	100
Granulocytoma	0	0	0	7	0	0
Haemocytic infiltration	14	7	58	36	60	18
Nombre moyen de parasite par individu						
Digénean parasites (count)	2,67	0	2,25	1	10,9	0
Stade moyen d'atrésie par individu						
Atrésia (0, 2 ou 4)	3,14	2,86	2,6	2,57	3,88	1,67

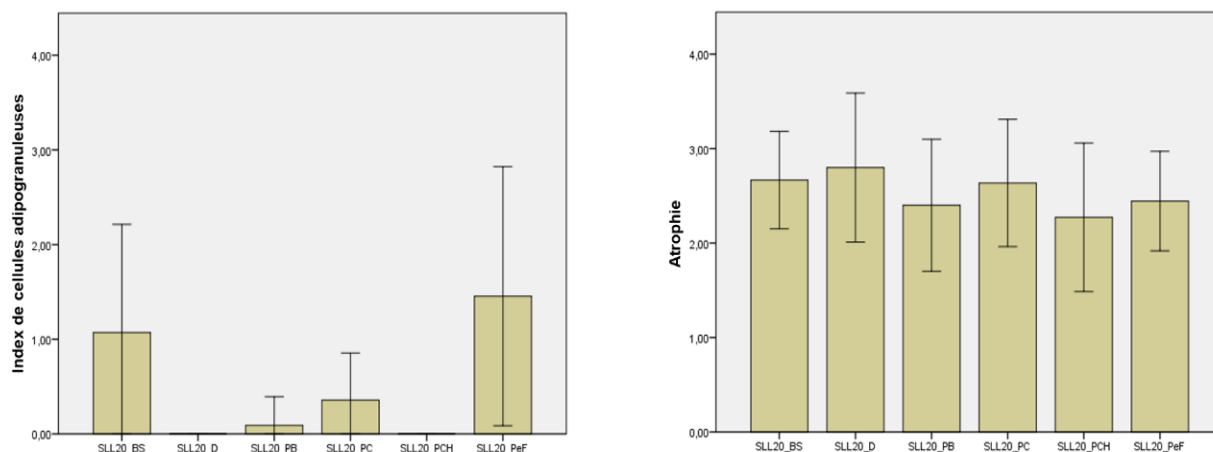


Figure 28 - Indices de cellules adipogranuleuses (gauche) et intensité d'atrésie (droite) mesurés dans la glande digestive chez les moules collectés aux 6 stations de la campagne SELILOIRE 2020. Différences analysées par l'approche non paramétriques (Kruskal Wallis) suivie du test post hoc Dunn ($p > 0,05$ pour les deux indices).

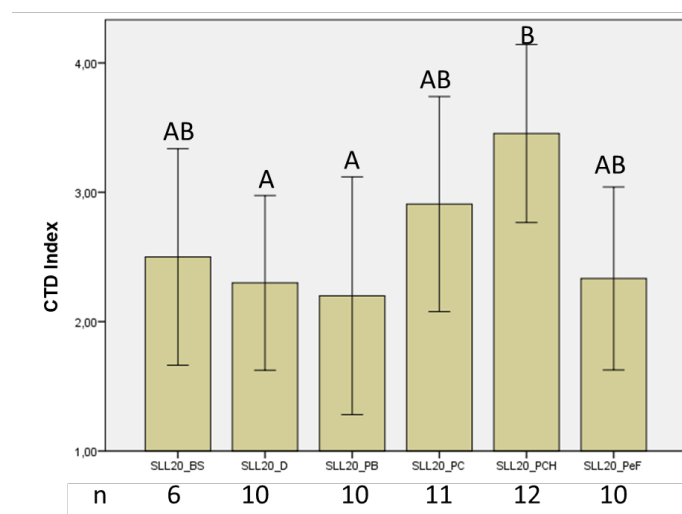


Figure 29 - Indices CTD (Connective to Digestive Tissue Index) mesurés dans la glande digestive chez les moules collectées aux 6 stations de la campagne SELILOIRE 2020. Différences analysées par l'approche non paramétrique (Kruskal Wallis) suivie du test post hoc Dunn ($p < 0,05$).

4.6 Approche intégrée par indice

Les contaminants sont mesurés dans le cadre du ROCCH et une partie des résultats est utilisée dans le cadre de cette étude (abréviations de la base données Quadrige utilisées dans les listes ci-après). Ils ne font pas l'objet d'une analyse spécifique dans le cadre du projet SELILOIRE 2020, mais ils sont utilisés pour l'analyse multiparamétrique CHASE (voir détail et définition ci-dessus : 3.4.2). L'approche multivariée telle qu'effectuée pour les soles 3.4.1 n'est pas possible pour les moules car les contaminants ne sont pas analysés sur des individus mais sur des groupes d'individus.

4.6.1 Approche par indice cumulé

4.6.1.1 Distance à la moyenne pour toutes les données disponibles

Description de la méthode : voir 3.4.2.1

L'indice moyen des biomarqueurs semble plus élevé à Pointe er Fosse, principalement du fait d'une altération de la stabilité de la membrane lysosomale (Figure 30). Ensuite, l'indice moyen à Bonne Source et Pointe Castelli étaient supérieures à celle de la zone Loire / Vilaine prospectée en 2020 (>1). Les indices moyens à Ile Dumet et Pointe Chemoulin n'était pas complets et ne sont pas comparables aux 3 autres stations.

L'accumulation des contaminants est plus élevée dans les moules de Bonne Source qu'aux 4 autres stations où le même nombre de contaminants a été observé. A Pointe de Chemoulin, la contamination cumulée est proche de 1, bien que la contamination cumulée soit sous-estimée par rapport aux autres stations du fait que les PCB dioxin-like et les dioxines n'y ont pas été mesurés, et contribuent à une part importante de la contamination cumulée aux autres stations.

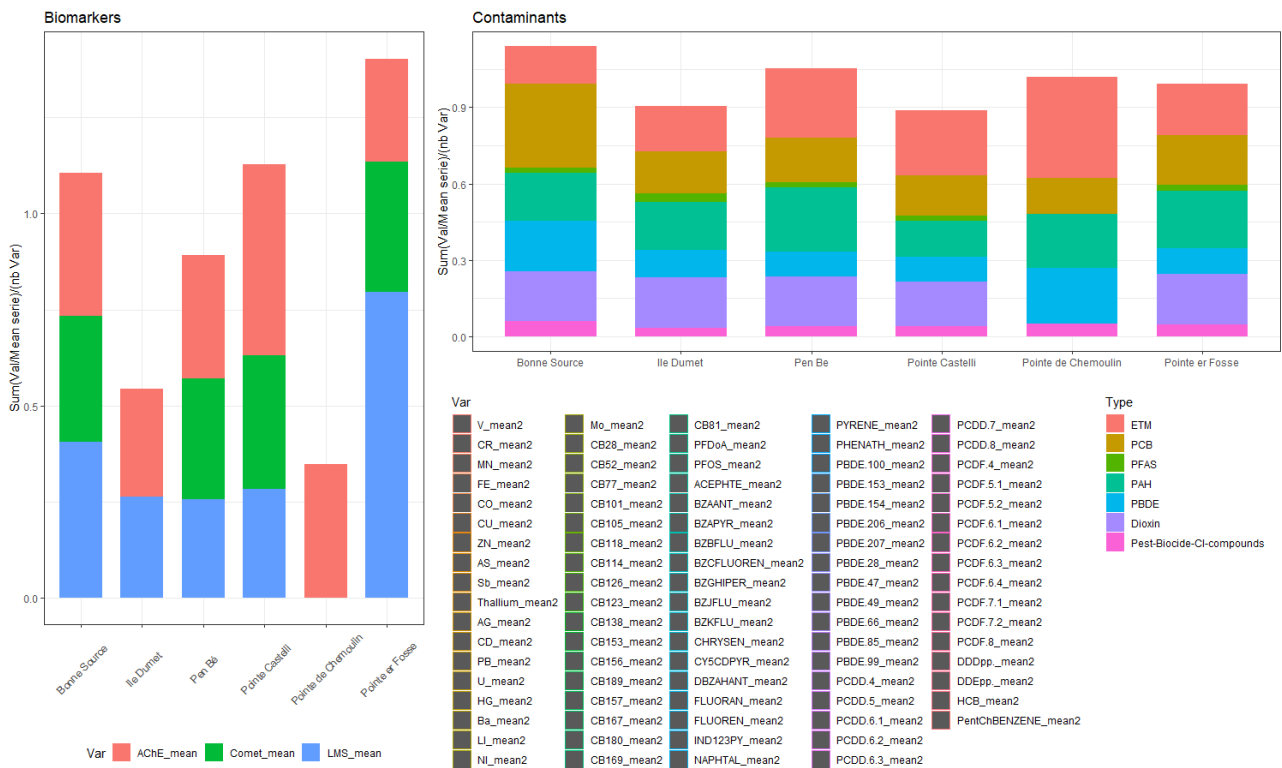


Figure 30 – L’indice moyen représentant la somme des rapports entre la moyenne d’une variable à une station par rapport à la moyenne à l’ensemble des stations, chez les moules prélevées durant la campagne SELLOIRE 2020. Les paramètres sont regroupés par type : biomarqueurs (gauche) et contaminants (droite). Chaque biomarqueur (gauche) ou famille de contaminants (droite) est représenté par une couleur dans le diagramme empilé. Les concentrations en contaminants se rapportent aux concentrations mesurées dans le cadre du ROCCH 2021, aux contaminants quantifiés dans plus de 50% des stations et mesurés dans au moins 5 stations. Les 88 contaminants sont mesurés sur 5 des 6 stations. A Pointe de Chemoulin, 52 des 88 contaminants sont suivis (substances non suivies : certains HAP (ACEPHTE, FLUOREN, NAPHTAL), les PCD dioxin-like et dioxins (CB105, CB114, CB123, CB126, CB156, CB157, CB167, CB169, CB189, CB77, CB81, PBDE-206, PBDE-207, PCDD-4, PCDD-5, PCDD-6-1, PCDD-6-2, PCDD-6-3, PCDD-7, PCDD-8, PCDF-4, PCDF-5-1, PCDF-5-2, PCDF-6-1, PCDF-6-2, PCDF-6-3, PCDF-6-4, PCDF-7-1, PCDF-7-2, PCDF-8), les 2 PFAS suivis et quantifiés aux autres stations (PFDoA, PFOS) ainsi que HCB).

4.6.1.2 Distance au seuil pour toutes les variables avec un seuil (CHASE)

Description de la méthode : voir 3.4.2.2

Pour les biomarqueurs, les seuils utilisés dans le CHASE sont l’EAC pour l’AChE, la LMS, les micronoyaux et le Comet (Tableau 1). Le nombre de variables était de 4 à Pointe Castelli, Pointe er Fosse, Pen Bé et Bonne Source, 3 à Ile Dumet (- Comet), 2 à Pointe de Chemoulin (- Comet et LMS). Pour la LMS et AChE, le sens de la dégradation est vers les valeurs faibles, ce qui a été pris en compte dans les CS calculés. La LMS, l’AChE et les micronoyaux ne dépassent pas le seuil EAC où des biomarqueurs sont mesurés. Le niveau de cassure des brins de l’ADN (Comet) dépasse l’EAC à Bonne Source et Pointe Er Fosse (1,7 fois l’EAC). De manière cumulée (CS), 4 des 6 stations sont classées en zone sans problème, une station, de très bonne qualité (Pointe de Chemoulin, mais seul 2 biomarqueurs mesurés) et 3 stations, de bonne qualité (Ile Dumet, Pen Bé, Pointe Castelli, Figure 31). Bonne Source et Pointe Er Fosse sont classées comme zone à problème, ayant une qualité environnementale modérée.

Pour les contaminants, l’évaluation présentée sur le OHAT d’OSPAR a été utilisée. Elle est disponible sur [Home Page - ICES.OHAT](#). Les seuils utilisés sont les MPC pour le Cd et le Pb (en l’absence de seuils environnementaux), la NQE (sec. pois.) pour le Hg, l’EAC pour les HAP (ANT, BAA, BAP, BGHIP, FLU, NAP, PA,

PYR), les seuils Canadiens FEQG pour les PBDE (BD100, BD153, BD154, BDE28, BDE47, BDE99), le seuil sanitaire 2023 pour le PFOS (seul différence de seuil avec l'OHAT) (Tableau 2). L'évaluation est effectuée en poids sec pour les bivalves selon les recommandations sur le OHAT ([methods contaminants biota \(ices.dk\)](#)). Le nombre de variables était de 25 à Ile Dumet et Pointe de Chemoulin, 24 à Pointe Castelli et Pointe er Fosse (- Naphtalène) et 23 à Pen Bé (- Naphtalène et PFOS). La station Bonne Source n'est pas évaluée sur l'OHAT. Pour les contaminants, les concentrations en Hg et le CB-118 sont supérieures aux seuils (1,3 à 2 fois la MPC pour le Hg aux 5 stations, et 1,3 à 1,7 fois l'EAC pour CB-118 à 4 stations (moins Pointe Castelli). Pour les autres contaminants, les concentrations sont sous les seuils. De manière cumulée (CS), 2 des 5 stations sont classées en zone sans problème de bonne qualité (Pointe er Fosse et Pointe Castelli, Figure 31). Les 3 autres stations (Ile Dumet, Pen Bé, Pointe de Chemoulin) sont classées comme zones à problème, ayant une qualité environnementale modérée.

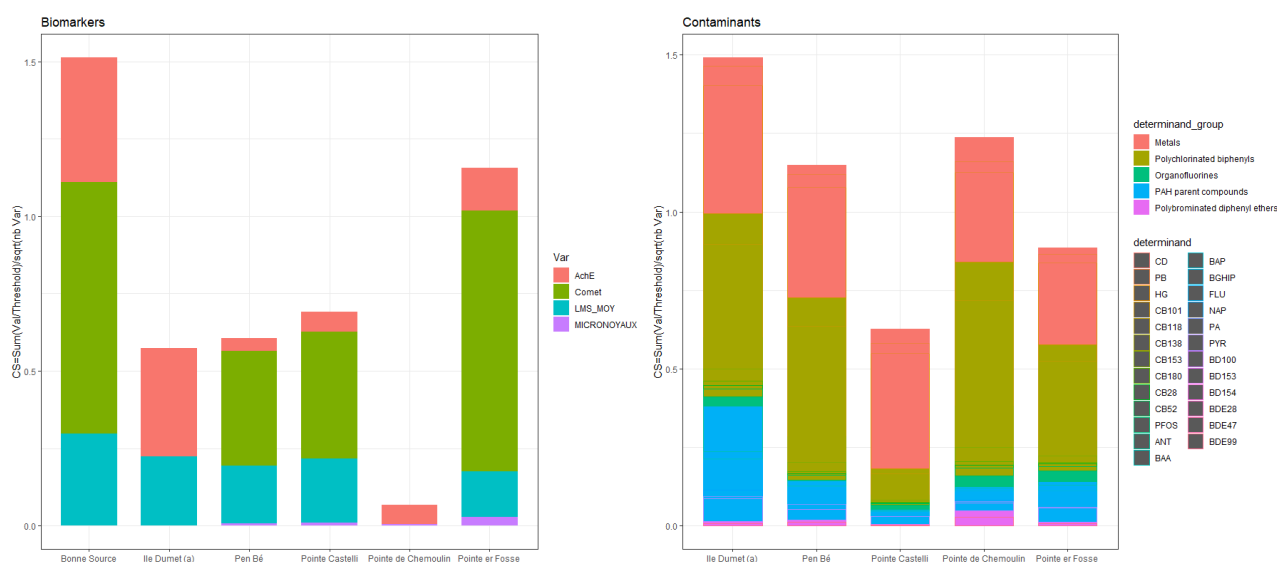


Figure 31 – Calcul de l'indice multiparamétrique CHASE pour les stations prospectées lors de la campagne SELILOIRE 20. Les paramètres sont regroupés par type : biomarqueurs (gauche) et contaminants (droite). Chaque biomarqueur ou famille de contaminants (droite) est représenté par une couleur dans le diagramme empilé. Pour les contaminants, le contaminant est indiqué pas un rectangle de couleur dans la famille à laquelle il est rattaché. Le nombre de biomarqueurs était de 4 à Pointe Castelli, Pointe er Fosse, Pen Bé et Bonne Source (liste « Var »), 3 à Ile Dumet (- Comet), 2 à Pointe de Chemoulin (- Comet et LMS). Le nombre de contaminants était de 25 à Ile Dumet et Pointe de Chemoulin (liste « determinand »), 24 à Pointe Castelli et Pointe er Fosse (- Naphtalène) et 23 à Pen Bé (- Naphtalène et PFOS). La station Bonne Source n'est pas évaluée sur l'OHAT.

4.6.2 Approche par taux de déclassement : Fiche Indicateur proposée pour l'évaluation DCSMM 2024

Les données de biomarqueurs mesurées lors des campagnes SELILOIRE 2017 et 2020 ont été utilisées avec des données similaires des autres pays Européens pour le Quality Status Report OSPAR (QSR 2023) : <https://oap.ospar.org/en/ospar-assessments/quality-status-reports/qsr-2023/other-assessments/integrated-biological-effects/>. Elles sont aussi à la base d'une proposition d'indicateur pour l'évaluation du bon état écologique au regard du D8C2 de la DCSMM en 2024, dans la suite de l'évaluation du D8C2 en 2018. Cette proposition a fait l'objet d'une fiche indicateur candidat qui n'a pas été retenue par la gouvernance pour le rapportage DCSMM et est consultable en ligne : D8C2-poissons : 10.13155/97213.

5 Conclusions

Les poissons plats vivants en contact avec les sédiments et s'alimentant d'organismes benthiques, sont particulièrement exposés aux contaminants chimiques, notamment les contaminants hydrophobes. Les bivalves étant des animaux sessiles vivants à proximité de nombreuses sources de contamination, sont également sujet à une forte pression chimique et peuvent en être impactés. Les poissons plats et les mollusques bivalves constituent donc des organismes sentinelles recommandés pour la surveillance en écotoxicologie.

La mesure de biomarqueurs permet d'interpréter une réponse biologique à des variations de contamination chimique. Néanmoins la réponse biologique à un stress chimique est la résultante de l'exposition (nature, durée) couplée à la physiologie de l'organisme étudié (*e.g.* âge, sexe, capacité métabolique). L'ensemble de ces paramètres peuvent également varier dans le temps et dans l'espace, et doivent être considérés lors de l'interprétation des différents biomarqueurs.

Cent-quarante-deux poissons plats ont été pêchés en Baie de Loire et Vilaine en septembre 2020. Une sélection de biomarqueurs ciblant plusieurs modes d'action toxique (génotoxicité, neurotoxicité, reprotoxicité) ou indicateurs de la santé de l'organisme ont été analysés chez ces individus lorsque les critères de qualité de l'échantillon et de l'analyse le permettaient. Les contaminants chimiques suivis dans le cadre OSPAR et de la DCSMM ont été mesurés sur une sélection d'individus de 1 ou 2 ans ($n=30, 37$ et 45 pour les contaminants organiques, les autres éléments traces et le Hg, respectivement). Pour les soles, la variabilité spatiale des biomarqueurs ou des contaminants a été analysée sur un sous-échantillonnage d'individus pour limiter l'effet de facteurs biologiques possiblement confondants : les individus sélectionnés avaient une taille entre 19 et 30 cm, un âge de 1 et 2 ans, un nombre d'échantillon par station supérieur à 5, et des données validées d'un point de vue analytique. L'effet de l'âge sur les biomarqueurs ou les contaminants a été analysé sur les individus de la station PITO, où la gamme d'âge des soles prélevées était la plus large (1 à 10 ans). Les biomarqueurs ont de plus été analysés chez des moules prélevées au niveau de 6 stations ROCCH MV de la Baie de Loire et de Vilaine en février 2021 (15 individus/station). Sur ces mêmes stations et le même jour, un lot de moules (50-60 individus par station) a été prélevé pour l'analyse de contaminants dans le cadre du ROCCH MV.

Les soles sont davantage abondantes en Baie de Loire et au large qu'en baie de Vilaine (115 individus pêchés à L1, L2, L3-THER, PTCR et PITO, et 27 individus pêchés aux stations V1, V2 et V3) ; les stations ROCCH sont plus nombreuses en Baie de Vilaine (4 des 6 stations suivies sont en Baie de Vilaine).

- Santé générale : La stabilité de la membrane lysosomale, indicatrice d'un état de santé générale des individus, semble altérée ($<EAC$) chez les soles de la Baie de Loire (L2 et PTCR) et chez les moules de la Baie de Vilaine (Pointe er Fosse). Concernant les stations L1 et V1, les valeurs de stabilité de la membrane lysosomale et de densité volumétrique (structure des lysosomes) sont moins altérées qu'aux mêmes sites en 2017 (SELILOIRE 2017) suggérant de meilleures conditions en 2020 qu'en 2017. La stabilité de la membrane lysosomale diminue avec l'âge des soles. L'altération de la stabilité de la membrane lysosomale et de la structure des lysosomes (densité volumétrique lysosomale (V_v) et ratio surface/volume, inversement proportionnel à la taille des lysosomes (S/V)) augmente avec l'âge.
- Génotoxicité : Les cassures de brins de l'ADN (biomarqueur précoce, test des comètes) présentent des niveaux supérieurs à la BAC (poissons et moules) et à des valeurs observées au large de la Baie de Seine au début des années 2000 (valeur prise comme référence pour la sole, complémentaire à la BAC). L'occurrence de micronoyaux (atteinte à l'ADN irréversible possiblement héréditaire) est faible avec 79% des soles et des moules qui ne présentaient pas de micronoyaux. Les individus

- restants présentaient jusque 1,4 micronoyaux pour 1000 cellules, des niveaux au-dessus de la BAC. Ces résultats suggèrent un stress génotoxique en baie de Loire et Vilaine. Le niveau de cassures de brins de l'ADN et l'occurrence de micronoyaux sont similaires entre stations (observé pour les soles et les moules), et ne semblent pas dépendre de l'âge chez les soles (observé à PITO).
- Neurotoxicité : L'activité AChE est plus faible que l'EAC chez les soles de Baie de Loire et Vilaine et chez les moules de Pointe Castelli suggérant une inhibition de l'acétylcholinestérase, une enzyme qui joue un rôle clef dans la transmission nerveuse, et donc un possible effet de composés neurotoxiques. Chez les soles et les moules, l'inhibition de l'AChE est plus importante aux stations à l'intersection Loire Vilaine (PTCR pour les soles et Pointe Castelli pour les moules) puis aux stations proches de la Loire (L1 et L2 pour les soles, Bonne source et Pointe de Chemoulin pour les moules). L'inhibition de l'AChE ne semble pas être dépendante de l'âge chez la sole (observé à la station PITO).
 - Exposition aux HAP : Les niveaux en métabolites de HAP dans la bile des soles sont inférieurs aux EAC. De manière générale, les niveaux en métabolites de HAP dans la bile des poissons plats sont supérieurs aux stations L1 et PTCR par rapport aux stations L2 et V1. Ils n'augmentent pas avec l'âge des individus (observé à PITO).
 - Reprotoxicité : Aucun mâle (sole) analysé ne présentait d'intersex. Cet indicateur est recommandé par l'ICES et semble pertinent pour le suivi des effets biologiques. Il est complété par l'analyse histologique des gonades. Dans le cas des femelles, les cas de nécrose et d'accumulation de lipides dans les ovocytes est plus fréquemment observés chez les individus des sites L2 (individus d'âges similaires). Ces lésions peuvent indiquer un stress général chez ces individus et ont été reportées chez la sole en réponse à une exposition en laboratoire à des sédiments contaminés (Briaudeau et al., 2020), au benzo(a)pyrène (BaP) (Briaudeau et al., 2021) et au Cd (Briaudeau et al., 2023). Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus sur la déstabilisation de la membrane lysosomale (L2). Les indices histopathologiques des gonades mâles sont similaires entre stations.
 - Pathologies hépatiques : Aucune sole analysée ne présentait de lésions néoplasiques. L'indice histopathologique total (foie) est similaire entre stations, bien que l'indice des gonades femelles soit plus élevé à L2 qu'aux 4 autres stations (à âge similaire). Les indices histopathologiques des gonades femelles et du foie (chez mâles+femelles, comme la LMS) augmentent avec l'âge des individus.
 - Contaminants organiques : Les principaux dépassements des seuils environnementaux chez les soles sont observés pour les PCB, notamment le CB-118 (type dioxine). Les concentrations en PCB, HBCDD, pesticides organochlorés et PFAS sont similaires entre stations. Les concentrations en PBDE sont plus élevées en Loire (L1 et L2, et dans une moindre mesure PTCR).
 - Contaminants inorganiques (éléments traces métalliques) : Les concentrations en Hg sont supérieures au seuil environnemental chez 30/45 soles analysées. Les dépassements sont plus importants en Loire qu'en Vilaine, même en prenant en compte l'effet de l'âge sur les concentrations en Hg. Certains éléments non-essentiels (e.g. Ag, Cd et Hg) montrent une tendance à l'augmentation des concentrations mesurées avec l'âge de individus. Globalement, peu de différences dans les concentrations en éléments traces chez les soles d'1 an sont observées entre stations à l'échelle de la campagne SELILOIRE 2020. Néanmoins, en combinant les stations, en 2020 comme lors de la campagne de 2017, les soles des stations en embouchure de la Loire présentent des concentrations significativement plus élevées que les stations en embouchure de Vilaine pour tous les éléments testés. En termes de différences avec l'estuaire de la Seine en 2018, les concentrations sont globalement inférieures en Cd, Cu et Pb pour les soles de la Seine alors que les concentrations en Hg chez les soles de Seine sont plus élevées que chez celles de Loire et Vilaine.

Différentes méthodes d'évaluation intégrée sont présentées dans ce rapport (analyse multivariée, approche par indice cumulé (écart à la moyenne ou écart au seuil (= CHASE)), puis approche par pourcentage de déclassement).

- Analyse multivariée : Chez les soles, nous n'avons pas observé de différence multivariée claire entre station. Un lien entre contamination et biomarqueurs est suggéré par l'analyse de redondance principale, mais la faible significativité de l'analyse ne permet pas discuter davantage cette relation avant d'avoir plus de données.
- Ecart cumulé à la moyenne : Chez les soles, la réponse cumulée des biomarqueurs semble plus élevée/altérée à PITO que la moyenne des réponses en Loire et Vilaine et moins élevée à L2, alors que la contamination cumulée aux stations PITO et V1 semble moins importante que la moyenne de la zone. A PITO l'importance des métaux dans la réponse cumulée des contaminants est plus importante qu'aux autres stations. Chez les moules, l'accumulation des contaminants est plus élevée dans les moules de Bonne Source qu'aux 4 autres stations où le même nombre de contaminants a été observé.
- Ecart cumulé au seuil (CHASE) : Chez les soles, les stations en Baie de Loire ou au large (L1, L2, PITO et PTCR) sont classées en zones à problème ayant une qualité environnementale modérée. La station V1 est classée en zone à problème ayant une qualité environnementale modérée pour les biomarqueurs et en bonne qualité pour les contaminants. Chez les moules, le classement est différent pour les biomarqueurs et les contaminants. Pour les biomarqueurs, 4 des 6 stations sont classées en zone sans problème de très bonne qualité (Pointe de Chemoulin, Ile Dumet, Pen Bé, Pointe Castelli), et 2 stations (Bonne Source et Pointe Er Fosse) sont classées comme zone à problème, ayant une qualité environnementale modérée. Par contre, pour les contaminants chez les moules, 2 stations (Pointe er Fosse et Pointe Castelli) sont classées en zone sans problème et 3 autres stations (Ile Dumet, Pen Bé, Pointe de Chemoulin) sont classées comme zones à problème, ayant une qualité environnementale « modérée » (=faible).
- Approche par taux de déclassement : voir le Quality Status Report OSPAR (QSR 2023) : <https://oap.ospar.org/en/ospar-assessments/quality-status-reports/qsr-2023/other-assessments/integrated-biological-effects/> et les fiches « indicateurs » : D8C2-poissons : 10.13155/97213 et D8C2-bivalves 10.13155/97215.

Le dispositif SELI est le seul permettant d'étudier simultanément la contamination et ses possibles effets sur les organismes de manière globale et dans l'environnement. Un tel dispositif doit être pérennisé pour atteindre ses objectifs, et produire des séries temporelles permettant

- 1) De suivre l'évolution des impacts écotoxicologiques de la contamination chimique diffuse,
- 2) De participer au travail mené au niveau international sur les approches couplées chimie/biologie, sur l'harmonisation des protocoles, et le développement/affinage des seuils.

Un axe d'amélioration du dispositif serait l'intégration de biomarqueur(s) de perturbation endocrine et de l'altération du système immunitaire, mais ces types de biomarqueurs sont encore à l'étape de développement. L'intégration des données des différentes campagnes et sur différentes années permettra peut-être de caractériser de manière plus robuste les tendances observées dans ce rapport, *e.g.* tendance spatio-temporelle, lien contamination et biomarqueurs. Les observations *in situ* sont pertinentes d'un point de vue écologique mais nécessitent beaucoup de données pour conclure quant aux effets qui pourraient être imputés aux contaminants chimiques.

Références

- Akcha, F., Tanguy, A., Leday, G., Pelluhet, L., Budzinski, H. and Chiffoleau, J. F. (2004). "Measurement of DNA single-strand breaks in gill and hemolymph cells of mussels, *Mytilus* sp., collected on the French Atlantic Coast." *Mar. Environ. Res.* **58**(2-5): 753-756. DOI: 10.1016/j.marenvres.2004.03.090.
- Akcha, F., Vincent Hubert, F. and Pfohl-Leskowicz, A. (2003). "Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **534**(1): 21-32. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00244-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00244-9).
- Alvarado, N. E., Buxens, A., Mazón, L. I., Marigómez, I. and Soto, M. (2005). "Cellular biomarkers of exposure and biological effect in hepatocytes of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu and Zn and after depuration." *Aquat. Toxicol.* **74**(2): 110-125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.024>.
- Andersen, J. H., Bork, N., Green, N., Harvey, T., Murray, C., Trier, X., Whaley, C. and Reker, J. (2019). Contaminants in Europe's Seas, European Environment Agency, EEA Report No 25/2018: 61.
- Andersen, J. H., Murray, C., Larsen, M. M., Green, N., Høgåsen, T., Dahlgren, E., Garnaga-Budrè, G., Gustavson, K., Haarich, M., Kallenbach, E. M., Mannio, J., Strand, J. and Korpinen, S. (2016). "Development and testing of a prototype tool for integrated assessment of chemical status in marine environments." *Environ. Monit. Assess.* **188**(2): 115. DOI: 10.1007/s10661-016-5121-x.
- Araújo, D. F., Ponzevera, E., Briant, N., Knoery, J., Bruzac, S., Sireau, T., Pellouin-Grouhel, A. and Brach-Papa, C. (2021). "Differences in Copper Isotope Fractionation Between Mussels (Regulators) and Oysters (Hyperaccumulators): Insights from a Ten-Year Biomonitoring Study." *Environ. Sci. Technol.* **55**(1): 324-330. DOI: 10.1021/acs.est.0c04691.
- Ballutaud, M., Drouineau, H., Carassou, L., Munoz, G., Chevillot, X., Labadie, P., Budzinski, H. and Lobry, J. (2019). "Estimating Contaminants tRansfers Over Complex food webs (ESCROC): An innovative Bayesian method for estimating POP's biomagnification in aquatic food webs." *Sci. Total Environ.* **658**: 638-649. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.058.
- Bateman, K. S., Stentiford, G. D. and Feist, S. W. (2004). "A ranking system for the evaluation of intersex condition in european flounder (<i>Platichthys flesus</i>)." *Environ. Toxicol. Chem.* **23**(12): 2831-2836. DOI: 10.1897/03-541.1.
- Baumann, P. C., Harshbarger, J. C. and Hartman, K. J. (1990). "RELATIONSHIP BETWEEN LIVER-TUMORS AND AGE IN BROWN BULLHEAD POPULATIONS FROM 2 LAKE ERIE TRIBUTARIES." *Sci. Total Environ.* **94**(1-2): 71-87. DOI: 10.1016/0048-9697(90)90365-2.
- Benito, D., Niederwanger, M., Izagirre, U., Dallinger, R. and Soto, M. (2017). "Successive Onset of Molecular, Cellular and Tissue-Specific Responses in Midgut Gland of *Littorina littorea* Exposed to Sub-Lethal Cadmium Concentrations." *International Journal of Molecular Sciences* **18**(8). DOI: 10.3390/ijms18081815.
- Benito, D., Palecek, D., Lekube, X., Izagirre, U., Marigómez, I., Zaldibar, B. and Soto, M. (2022). "Variability and distribution of parasites, pathologies and their effect on wild mussels (*Mytilus* sp) in different environments along a wide latitudinal span in the Northern Atlantic and Arctic Oceans." *Mar. Environ. Res.* **176**. DOI: 10.1016/j.marenvres.2022.105585.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. and Wahli, T. (1999). "Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution." *J. Fish Dis.* **22**(1): 25-34. DOI: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x.
- Bignell, J. P., Dodge, M. J., Feist, S. W., Lyons, B., Martin, P. D., Taylor, N. G. H., Stone, D., Travalent, L. and Stentiford, G. D. (2008). "Mussel histopathology: and effects of season, disease and species." *Aquatic Biology* **2**(1): 1-15. DOI: 10.3354/ab00031.
- Blazer, V. S. (2002). "Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes." *Fish Physiol. Biochem.* **26**(1): 85-101. DOI: 10.1023/a:1023332216713.
- Bocquene, G. and Galgani, F. (1998). "Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate compounds." *ICES Tech. Mar. Environ. Sci.* **22**: 1-12.

- Bocquené, G., Galgani, F., Burgeot, T., Le Dean, L. and Truquet, P. (1993). "Acetylcholinesterase levels in marine organisms along French coasts." *Mar. Pollut. Bull.* **26**(2): 101-106.DOI: [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(93\)90099-6](https://doi.org/10.1016/0025-326X(93)90099-6).
- Bocquené, G., Galgani, F. and Truquet, P. (1990). "Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring." *Mar. Environ. Res.* **30**(2): 75-89.DOI: [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(90\)90012-D](https://doi.org/10.1016/0141-1136(90)90012-D).
- Briant, N., Chouvelon, T., Martinez, L., Brach-Papa, C., Chiffolleau, J. F., Savoye, N., Sonke, J. and Knoery, J. (2017). "Spatial and temporal distribution of mercury and methylmercury in bivalves from the French coastline." *Mar. Pollut. Bull.* **114**(2): 1096-1102.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.018>.
- Briaudeau, T., Dos Santos, L. A. A., Zorita, I., Izagirre, U. and Marigomez, I. (2021). "Biological responses and toxicopathic effects elicited in *Solea senegalensis* juveniles by waterborne exposure to benzo a pyrene." *Mar. Environ. Res.* **170**.DOI: 10.1016/j.marenvres.2021.105351.
- Briaudeau, T., Guerrero-Limón, G., Zorita, I., Marigómez, I. and Izagirre, U. (2023). "Toxicopathic effects of waterborne Cd in sole juveniles, a prospective pollution monitoring sentinel for estuarine ecosystems." *Frontiers in Marine Science* **10**.DOI: 10.3389/fmars.2023.1182294.
- Briaudeau, T., Zorita, I., Cuevas, N., Franco, J., Marigomez, I. and Izagirre, U. (2019). "Multi-annual survey of health status disturbance in the Bilbao estuary (Bay of Biscay) based on sediment chemistry and juvenile sole (*Solea* spp.) histopathology." *Mar. Pollut. Bull.* **145**: 126-137.DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.05.034.
- Briaudeau, T., Zorita, I., Izagirre, U. and Marigómez, I. (2020). "Biological responses and toxicopathic effects elicited in *Solea senegalensis* juveniles on exposure to contaminated sediments under laboratory conditions." *Sci. Total Environ.* **731**.DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138849.
- Broeg, K., Zander, S., Diamant, A., Körting, W., Krüner, G., Paperna, I. and Westernhagen, H. v. (1999). "The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring." *Helgol. Mar. Res.* **53**(3): 171-194.DOI: 10.1007/s101520050023.
- Burgeot, T., Akcha, F., Ménard, D., Robinson, C., Loizeau, V., Brach-Papa, C., Martínez-Gómez, C., Le Goff, J., Budzinski, H., Le Menach, K., Cachot, J., Minier, C., Broeg, K. and Hylland, K. (2017). "Integrated monitoring of chemicals and their effects on four sentinel species, *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Nucella lapillus* and *Mytilus* sp., in Seine Bay: A key step towards applying biological effects to monitoring." *Mar. Environ. Res.* **124**: 92-105.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.10.009>.
- Champagnat, J., Lecomte, J. B., Rivot, E., Douchet, L., Martin, N., Grasso, F., Mounier, F., Labadie, P., Loizeau, V., Bacq, N. and Le Pape, O. (2021). "Multidisciplinary assessment of nearshore nursery habitat restoration for an exploited population of marine fish." *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **680**: 97-109.DOI: 10.3354/meps13881.
- Chiffolleau, J. F. (2017). La contamination chimique sur le littoral Loire-Bretagne. Résultats de 35 années de suivi du Réseau d'Observation de la Contamination Chimique. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00405/51617/>. RST.RBE-BE/2017.02.
- Cossa, D., Coquery, M., Nakhlé, K. and Claisse, D. (2002). Dosage du mercure et du monométhylmercure dans les organismes et les sédiments marins. E. Ifremer.
- Costa, P. M., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T. A. and Costa, M. H. (2011). "Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and *in situ* tested fish." *Mar. Pollut. Bull.* **62**(1): 55-65.DOI: 10.1016/j.marpolbul.2010.09.009.
- Costa, P. M., Diniz, M. S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T. A. and Costa, M. H. (2009). "Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach." *Aquat. Toxicol.* **92**(3): 202-212.DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.12.009.
- Coward, K., Bromage, N. R. and Little, D. C. (1998). "Inhibition of spawning and associated suppression of sex steroid levels during confinement in the substrate-spawning *Tilapia zillii*." *J. Fish Biol.* **52**(1): 152-165.DOI: 10.1006/jfbi.1997.0570.
- Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P. M., Quincoces, I., Larreta, J. and Franco, J. (2015). "Histopathological indices in sole (*Solea solea*) and hake (*Merluccius merluccius*) for implementation of the European Marine

- Strategy Framework Directive along the Basque continental shelf (SE Bay of Biscay)." Mar. Pollut. Bull. **94**(1-2): 185-198.DOI: 10.1016/j.marpolbul.2015.02.030.
- Dallas, L. J. and Jha, A. N. (2015). "Applications of biological tools or biomarkers in aquatic biota: A case study of the Tamar estuary, South West England." Mar. Pollut. Bull. **95**(2): 618-633.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.03.014>.
- Davies and Vethaak (2012). "Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects." ICES Coop. Res. Rep. **No 315**.
- Deniel, C. (1981). Les poissons plats en baie de Douarnenez : Reproduction - Croissance - Migrations, Thèse d'état, 476 pp., UBO.
- Deniel, C. and Tassel, M. (1985). "Reproduction et croissance de la limande *Limanda limanda* (Linnaeus, 1758) (Téléostéen, Pleuronectidae) en Manche orientale et Baie de Douarnenez. ICES report. C.M. 1985/G : 44. Cté Poissons démersaux. Digitalisation sponsored by Thünen-Institut." ICES Annu. Rep. **44**.
- Devier, M. H., Le Du-Lacoste, M., Akcha, F., Morin, B., Peluhet, L., Le Menach, K., Burgeot, T. and Budzinski, H. (2013). "Biliary PAH metabolites, EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from Seine Estuary (France)." Environmental Science and Pollution Research **20**(2): 708-722.DOI: 10.1007/s11356-012-1345-7.
- Feist, S. W., Lang, T., Stentiford, G. D. and Köfler, 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 Tech. Mar. Environ. Sci. **38**.
- García-López, A., Couto, E., Canario, A. V. M., Sarasquete, C. and Martínez-Rodríguez, G. (2007). "Ovarian development and plasma sex steroid levels in cultured female Senegalese sole *Solea senegalensis*." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **146**(3): 342-354.DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.11.014.
- García-López, A., Fernández-Pasquier, V., Couto, E., Canario, A. V. M., Sarasquete, C. and Martínez-Rodríguez, G. (2006). "Testicular development and plasma sex steroid levels in cultured male Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup." Gen. Comp. Endocrinol. **147**(3): 343-351.DOI: 10.1016/j.ygcen.2006.02.003.
- Garmendia, L., Izagirre, U., Cajaraville, M. P. and Marigómez, I. (2011). "Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the *Prestige* oil spill in Galicia and the Bay of Biscay: Lysosomal responses." J. Environ. Monit. **13**(4): 901-914.DOI: 10.1039/c0em00409j.
- Gilliers, C., Le Pape, O., Désaunay, Y., Bergeron, J. P., Schreiber, N., Guerault, D. and Amara, R. (2006). "Growth and condition of juvenile sole (*Solea solea* L.) as indicators of habitat quality in coastal and estuarine nurseries in the Bay of Biscay with a focus on sites exposed to the Erika oil spill." Scientia Marina **70**: 183-192.DOI: 10.3989/scimar.2006.70s1183.
- Hylland, K., Burgeot, T., Martínez-Gómez, C., Lang, T., Robinson, C. D., Svavarsson, J., Thain, J. E., Vethaak, A. D. and Gubbins, M. J. (2017). "How can we quantify impacts of contaminants in marine ecosystems? The ICON project." Mar. Environ. Res. **124**: 2-10.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.11.006>.
- ICES (1997). Special Meeting on the Use of Liver Pathology of Flatfish for Monitoring Biological Effects of Contaminants. ICES, Copenhagen.
- ICES (2004). "Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability. By M.N. Moore, D. Lowe, and A. Kohler. 31 pp." ICES Tech. Mar. Environ. Sci. **36**.
- Izagirre, U. (2007). Contribution to the interpretation of lysosomal biomarkers in marine organisms based on the mechanistic understanding of the lysosomal responses to pollutants. PhD, University of the Basque Country, Bilbao.
- Kammann, U., Akcha, F., Budzinski, H., Burgeot, T., Gubbins, M. J., Lang, T., Le Menach, K., Vethaak, A. D. and Hylland, K. (2017). "PAH metabolites in fish bile: From the Seine estuary to Iceland." Mar. Environ. Res. **124**: 41-45.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.02.014>.
- Kim, Y., Ashton-Alcox, K. A. and Powell, E. N. (2006). Gonadal analysis. In: Histological techniques for marine bivalve molluscs. NOAA Tech. Mem. NOS NCCOS 27, Silver Spring, pp. 1–10. <https://hdl.handle.net/1834/30810>.

- Köhler, A., Deisemann, H. and Lauritzen, B. (1992). "Histological and cytochemical indexes of toxic injury in the liver of dab *limanda limanda*." Mar. Ecol. Prog. Ser. **91**(1-3): 141-153.DOI: 10.3354/meps091141.
- Köhler, A., Wahl, E. and Söffker, K. (2002). "Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* (L.).)" Environ. Toxicol. Chem. **21**(11): 2434-2444.DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620211124>.
- Laffargue, P., Begout, M. L. and Lagardere, F. (2006). "Testing the potential effects of shellfish farming on swimming activity and spatial distribution of sole (*Solea solea*) in a mesocosm." ICES J. Mar. Sci. **63**(6): 1014-1028.DOI: 10.1016/j.icesjms.2006.03.018.
- Laurent, J., Le Berre, I., Armengaud, J., Kailasam, S., Couteau, J., Waeles, M., Laroche, J. and Pichereau, V. (2023). "Integration of environmental signatures and omics-based approaches on the European flounder to assist with health assessment of estuarine ecosystems in Brittany, France." Sci. Total Environ. **878**.DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.163195.
- Le Bec (1985). "Cycle sexuel et fécondité de la sole *Solea vulgaris* (quensel, 1806) du Golfe de Gascogne." Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes **47**(3 et 4): 179-189.
- Le Dû-Lacoste, M. (2008). Etude des phénomènes de biotransformation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons) ; thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux I sous la direction de Hélène Budzinski. <http://www.theses.fr/2008BOR13929/document>.
- Le Pape, O., Moderan, J., Beaunee, G., Riera, P., Nicolas, D., Savoye, N., Harmelin-Vivien, M., Darnaude, A. M., Brind'Amour, A., Le Bris, H., Cabral, H., Vinagre, C., Pasquaud, S., Franca, S. and KostECKI, C. (2013). "Sources of organic matter for flatfish juveniles in coastal and estuarine nursery grounds: A meta-analysis for the common sole (*Solea solea*) in contrasted systems of Western Europe." J. Sea Res. **75**: 85-95.DOI: 10.1016/j.seares.2012.05.003.
- Leaute, J.-P. and Mahe, K. (2008). Poissons du Golfe de Gascogne: courbes de croissance (taille et poids) et maturité sexuelle
- Lecomte, J.-B., Pape, O. L., Baillif, H., Nevoux, M., Vermard, Y., Savina, M., Veron, M., Lehuta, S., Hunter, E. and Rivot, E. (2020). "State-space modeling of multidecadal mark–recapture data reveals low adult dispersal in a nursery-dependent fish metapopulation." Can. J. Fish. Aquat. Sci. **77**(2): 342-354.DOI: 10.1139/cjfas-2019-0037.
- Lyu, X. Y., Xiao, F., Shen, C. Y., Chen, J. J., Park, C. M., Sun, Y. Y., Flury, M. and Wang, D. J. (2022). "Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Subsurface Environments: Occurrence, Fate, Transport, and Research Prospect." Rev. Geophys. **60**(3).DOI: 10.1029/2021rg000765.
- Marigómez, I., Soto, M., Cancio, I., Orbea, A., Garmendia, L. and Cajaraville, M. P. (2006). "Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the <i>Prestige</i> oil spill (Monitoring Campaign 2003)." Mar. Pollut. Bull. **53**(5-7): 287-304.DOI: 10.1016/j.marpolbul.2005.09.026.
- Martinez-Gomez, C., Bignell, J. P. and Lowe, D. (2015). "Lysosomal membrane stability in mussels." ICES Tech. Mar. Environ. Sci. **56**: 41.DOI: <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-240>.
- Mauffret, A., Brun, M., Bustamante, P., Chouvelon, T., Mendez-Fernandez, P., Mille, T., Poiriez, G., Spitz, J. and Wessel, N. (2023). Évaluation du descripteur 8 « Contaminants dans le milieu marin » en France métropolitaine. Rapport scientifique pour l'évaluation cycle 3 au titre de la DCSMM. , Ifremer RBE-CCEM / ODE-VIGIES.
- Mauffret, A., Wessel, N., Akcha, F., Munsch, C., Chouvelon, T., Couteau, J., Briaudeau, T., Izagirre, U., Aminot, Y., Pollono, C., Héas-Moisan, K., Olivier, N., Bély, N., Crochet, S., Thomas, B., Sireau, T., Menard, D. and Burgeot, T. (2019). Campagne dédiée à l'évaluation des effets biologiques induits par la contamination chimique en Baies de Loire et Vilaine. SELILOIRE 2017, Rapport final (65 pages) .
- Mauffret, A., Wessel, N., Roubéix, V., Akcha, F., Chouvelon, T., Aminot, Y., Munsch, C., Couteau, J., Briaudeau, T., Izagirre, U., Mahé, K., Godfrin, Y., Pollono, C., Héas-Moisan, K., Olivier, N., Bély, N., Bruzac, S., Crochet, S., Thomas, B., Sireau, T. and Burgeot, T. (2021). Campagne dédiée à l'évaluation des effets biologiques induits par la contamination chimique en baie de seine - Seliseine 2018, Rapport final (98 pages).

- Maulvault, A. L., Custodio, A., Anacleto, P., Repolho, T., Pousao, P., Nunes, M. L., Diniz, M., Rosa, R. and Marques, A. (2016). "Bioaccumulation and elimination of mercury in juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) in a warmer environment." *Environ. Res.* **149**: 77-85. DOI: 10.1016/j.envres.2016.04.035.
- Mounier, F., Pecquerie, L., Lobry, J., Sardi, A. E., Labadie, P., Budzinski, H. and Loizeau, V. (2020). "Dietary bioaccumulation of persistent organic pollutants in the common sole *Solea solea* in the context of global change. Part 1: Revisiting parameterisation and calibration of a DEB model to consider inter-individual variability in experimental and natural conditions." *Ecol. Model.* **433**. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2020.109224.
- Munsch, C., Bely, N., Heas-Moisan, K., Olivier, N. and Loizeau, V. (2017). "Tissue-specific distribution and maternal transfer of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their metabolites in adult common sole (*Solea solea* L.) over an entire reproduction cycle." *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **145**: 457-465. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.07.062.
- Munsch, C., Bely, N., Héas-Moisan, K., Olivier, N., Pollono, C., Hollanda, S. and Bodin, N. (2020). "Tissue-specific bioaccumulation of a wide range of legacy and emerging persistent organic contaminants in swordfish (*Xiphias gladius*) from Seychelles, Western Indian Ocean." *Mar. Pollut. Bull.* **158**: 111436. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111436>.
- Munsch, C., Bely, N., Pollono, C. and Aminot, Y. (2019). "Perfluoroalkyl substances (PFASs) in the marine environment: Spatial distribution and temporal profile shifts in shellfish from French coasts." *Chemosphere* **228**: 640-648. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.205>.
- Munsch, C., Bodin, N., Potier, M., Heas-Moisan, K., Pollono, C., Degroote, M., West, W., Hollanda, S. J., Puech, A., Bourjea, J. and Nikolic, N. (2016). "Persistent Organic Pollutants in albacore tuna (*Thunnus alalunga*) from Reunion Island (Southwest Indian Ocean) and South Africa in relation to biological and trophic characteristics." *Environ. Res.* **148**: 196-206. DOI: 10.1016/j.envres.2016.03.042.
- Munsch, C., Héas-Moisan, K., Tixier, C., Boulesteix, L. and Morin, J. (2011). "Classic and novel brominated flame retardants (BFRs) in common sole (*Solea solea* L.) from main nursery zones along the French coasts." *Sci. Total Environ.* **409**(21): 4618-4627. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.021>.
- Murua, H. and Motos, L. (2006). "Reproductive strategy and spawning activity of the European hake *Merluccius merluccius* (L.) in the Bay of Biscay." *J. Fish Biol.* **69**(5): 1288-1303. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2006.01169.x.
- Myers, M. S., Johnson, L. L. and Collier, T. K. (2003). "Establishing the causal relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and hepatic neoplasms and neoplasia-related liver lesions in English sole (*Pleuronectes vetulus*)." *Hum. Ecol. Risk Assess.* **9**(1): 67-94. DOI: 10.1080/713609853.
- Myers, M. S., Landahl, J. T., Krahn, M. M. and McCain, B. B. (1991). "RELATIONSHIPS BETWEEN HEPATIC NEOPLASMS AND RELATED LESIONS AND EXPOSURE TO TOXIC-CHEMICALS IN MARINE FISH FROM THE UNITED-STATES WEST-COAST." *Environ. Health Perspect.* **90**: 7-15. DOI: 10.2307/3430840.
- Oksanen, J. (2015). "Multivariate Analysis of Ecological Communities in R: vegan tutorial." Retrieved 2016, from <http://cc.oulu.fi/~jarioksa/opetus/metodi/vegantutor.pdf>.
- OSPAR (2012). JAMP Guidelines for Monitoring Contaminants in Biota (Agreement 1999-02, revised 2012).
- OSPAR (2021). "Strategy of the OSPAR Commission for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic 2030. (Agreement 2021-01: North-East Atlantic Environment Strategy NEAES (replacing Agreement 2010-03)). OSPAR 21/13/1. <https://www.ospar.org/convention/strategy>."
- OSPAR (2023). QSR 2023: Status and Trends of Polychlorinated Biphenyls (PCB) in Fish and Shellfish and Sediment.
- Reichert, W. L., Myers, M. S., Peck-Miller, K., French, B., Anulacion, B. F., Collier, T. K., Stein, J. E. and Varanasi, U. (1998). "Molecular epizootiology of genotoxic events in marine fish: Linking contaminant exposure, DNA damage, and tissue-level alterations." *Mutat. Res. - Rev. Mut. Res.* **411**(3): 215-225. DOI: 10.1016/s1383-5742(98)00014-3.
- Reynolds, W. J., Feist, S. W., Jones, G. J., Lyons, B. P., Sheahan, D. A. and Stentiford, G. D. (2003). "Comparison of biomarker and pathological responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) induced by ingested polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination." *Chemosphere* **52**(7): 1135-1145. DOI: 10.1016/s0045-6535(03)00332-1.

- Roubeix, V., Wessel, N., Akcha, F., Aminot, Y., Briaudeau, T., Burgeot, T., Chauvelon, T., Izagirre, U., Munsch, C. and Mauffret, A. (2023). "Differences in biomarker responses and chemical contamination among three flatfish species in the Bay of Seine (NE Atlantic)." *Mar. Pollut. Bull.* **197**: 115674. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115674>.
- Schiewe, M. H., Weber, D. D., Myers, M. S., Jacques, F. J., Reichert, W. L., Krone, C. A., Malins, D. C., McCain, B. B., Chan, S. L. and Varanasi, U. (1991). "INDUCTION OF FOCI OF CELLULAR ALTERATION AND OTHER HEPATIC-LESIONS IN ENGLISH SOLE (PAROPHRYS-VETULUS) EXPOSED TO AN EXTRACT OF AN URBAN MARINE SEDIMENT." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**(9): 1750-1760. DOI: 10.1139/f91-207.
- Simpson, M. G., Parry, M., Kleinkauf, A., Swarbreck, D., Walker, P. and Leah, R. T. (2000). "Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from a UK estuary Impacted by endocrine disrupting chemicals." *Mar. Environ. Res.* **50**(1-5): 283-287. DOI: 10.1016/s0141-1136(00)00089-1.
- Stentiford, G. D., Bignell, J. P., Lyons, B. P., Thain, J. E. and Feist, S. W. (2010). "Effect of age on liver pathology and other diseases in flatfish: implications for assessment of marine ecological health status." *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **411**: 215-230. DOI: 10.3354/meps08693.
- Stentiford, G. D., Viant, M. R., Ward, D. G., Johnson, P. J., Martin, A., Wei, W. B., Cooper, H. J., Lyons, B. P. and Feist, S. W. (2005). "Liver tumors in wild flatfish: A histopathological, proteomic, and metabolomic study." *Omics-a Journal of Integrative Biology* **9**(3): 281-299. DOI: 10.1089/omi.2005.9.281.
- Sussarellu, R., Chauvelon, T., Aminot, Y., Couteau, J., Loppion, G., Dégremont, L., Lamy, J.-B., Akcha, F., Rouxel, J., Berthelin, C., Briaudeau, T., Izagirre, U., Mauffret, A., Grouhel, A. and Burgeot, T. (2022). "Differences in chemical contaminants bioaccumulation and ecotoxicology biomarkers in *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* and their hybrids." *Environ. Pollut.* **292**: 118328. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118328>.
- UNEP/RAMOGÉ (1999). "Manual on the biomarkers recommended for the MEDPOL biomonitoring program, UNEP, Athens." 40.
- Vaccher, V., Ingenbleek, L., Adegboye, A., Hossou, S. E., Kone, A. Z., Oyedel, A. D., Kisito, C., Dembele, Y. K., Hu, R. W., Malak, I. A., Cariou, R., Venisseau, A., Veyrand, B., Marchand, P., Eyangoh, S., Verger, P., Dervilly-Pinel, G., Leblanc, J. C. and Le Bizec, B. (2020). "Levels of persistent organic pollutants (POPs) in foods from the first regional Sub-Saharan Africa Total Diet Study." *Environ. Int.* **135**. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105413.
- Vethaak, A. D., Davies, I. M., Thain, J. E., Gubbins, M. J., Martinez-Gomez, C., Robinson, C. D., Moffat, C. F., Burgeot, T., Maes, T., Wosniok, W., Giltrap, M., Lang, T. and Hylland, K. (2017). "Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment." *Mar. Environ. Res.* **124**: 11-20. DOI: 10.1016/j.marenvres.2015.09.010.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E. and Koehler, A. (2007). "The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **146**(3): 281-300. DOI: 10.1016/j.cbpc.2007.04.011.
- Vincent-Hubert, F., Arini, A. and Gourlay-Francé, C. (2011). "Early genotoxic effects in gill cells and haemocytes of *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, B[a]P and a combination of B[a]P and Cd." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **723**(1): 26-35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.03.008>.
- Vitale, F., Clausen, L. W. and Chonchúir, G. N. (2019). "Handbook of fish age estimation protocols and validation methods." *ICES Coop. Res. Rep.* DOI: <https://doi.org/10.17895/ices.pub.5221>.
- Wang, W. X. and Wong, R. S. K. (2003). "Bioaccumulation kinetics and exposure pathways of inorganic mercury and methylmercury in a marine fish, the sweetlips *Plectorhinchus gibbosus*." *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **261**: 257-268. DOI: 10.3354/meps261257.
- Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach, K., Buchet, V., Lebayon, N., Loizeau, V., Burgeot, T., Budzinski, H. and Akcha, F. (2010). "Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*)." *Mar. Environ. Res.* **69**: S71-S73. DOI: 10.1016/j.marenvres.2010.03.004.

Zorita, I. and Cuevas, N. (2014). Protocol for fish disease assessment in marine environmental monitoring using common sole (*Solea solea*, Linnaeus 1758) as sentinel organism: identification of externally visible diseases and liver histopathology. Revista de Investigación Marina, AZTI-Tecnalia. **21**: 1-18.

Annexe 1. Description des biomarqueurs sélectionnés dans le cadre des SELI

Pathologie.

Pathologie externe	Les pathologies externes chez les poissons telles que les lésions ou les parasites peuvent être évaluées par observation directe des échantillons. Elles sont l'indication que le système immunitaire est perturbé par des expositions chroniques au cours du cycle de vie des individus.
Pathologie hépatique	La majorité des polluants est métabolisée par le foie des poissons et certains polluants (lipophiles) peuvent de plus s'y accumuler et engendrer des lésions hépatiques. Les tumeurs ont une incidence directe sur la survie de l'individu.

Reprotoxicité.

Intersex	L'intersex est un biomarqueur d'effet mettant en évidence des perturbations du tissu reproducteur chez les poissons, induites par les contaminants (effet de mimétisme hormonal). La perturbation de la reproduction a une incidence directe au niveau populationnel.
----------	---

Neurotoxicité.

Inhibition de l'acétylcholinestérase	L'ACHé joue un rôle clef dans la transmission de l'influx nerveux. L'ACHé limite le temps de la contraction musculaire en hydrolysant l'acétylcholine. Certains polluants, tels que certains pesticides (<i>e.g.</i> organophosphates, carbamates et autres molécules similaires) peuvent inhiber l'activité catalytique de l'ACHé et être responsables de dysfonctionnements neurologiques, <i>e.g.</i> chez la moule : une faiblesse de la fixation byssale et un entrebâillement valvaire, pouvant entraîner une altération des capacités à assurer les fonctions vitales, <i>e.g.</i> se protéger des prédateurs, se nourrir...
--------------------------------------	--

Genotoxicité.

Commentaire générale sur la génotoxicité	L'exposition à des substances chimiques ainsi que leurs sous-produits issus de la biotransformation (métabolites ou oxyradicaux), peuvent interagir avec le matériel génétique. Lorsqu'ils ne sont pas réparés ces dommages peuvent avoir des conséquences sur l'expression du génome et sur la physiologie des organismes exposés.
Micronoyau	Les micronoyaux sont 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 reflètent une action génotoxique aboutissant à l'apparition de mutations chromosomiques stables et héréditaires.
Comètes	Lésions structurales primaires de l'ADN (cassures simples brins de l'ADN).

Stress général

Stabilité de la membrane lysosomale	Il existe peu de différence du niveau de base de stabilité de la membrane lysosomale entre les espèces ce qui fait de ce paramètre un biomarqueur universel de stress général et de l'intégrité de la cellule. Les mesures de l'activité de la membrane lysosomale sont fondées sur la mesure du temps que met la membrane à être altérée.
-------------------------------------	--

Biomarqueurs spécifiques d'une famille de contaminants

Métabolites de HAP dans la bile (poissons)	Ce biomarqueur permet de suivre l'assimilation puis la métabolisation des HAP par les poissons.
--	---

Annexe 2. MM. Age des soles, limandes et flets (Ifremer, RBE/HMMN/LRHBL)

Les otolithes, pièce calcifiée présente dans l'oreille interne, ont été prélevés à Nantes puis envoyés pour être traités au sein du pôle national de Sclérochronologie du laboratoire RBE/HMMN/LRHBL selon les procédures internationales en vigueur (Vitale et al., 2019, Figure 32).

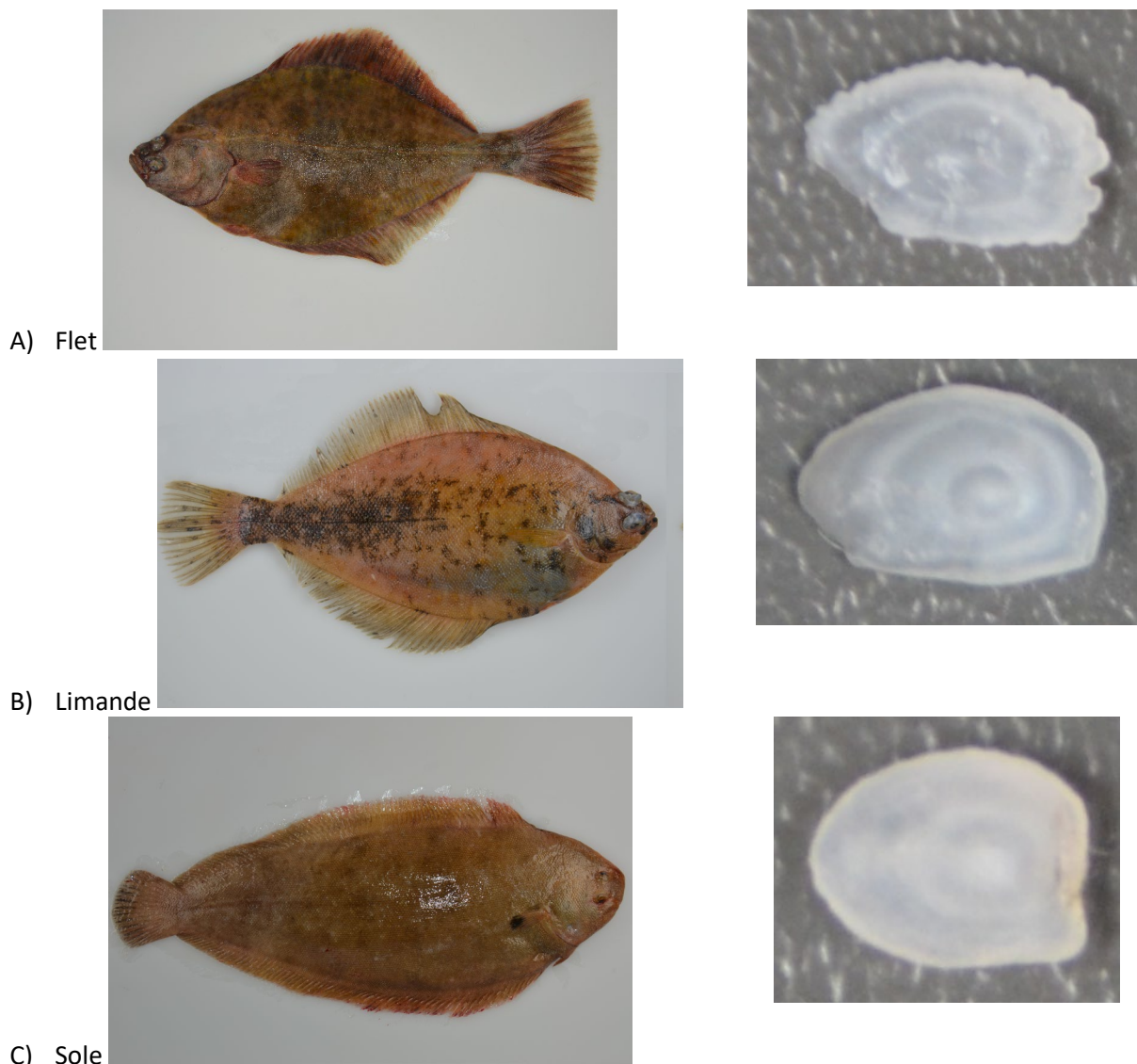


Figure 32- Présentation des 3 espèces de poissons plats analysées avec un de leurs otolithes présenté en face concave.

Une des propriétés des otolithes des poissons plats est leur finesse qui permet de pouvoir évaluer l'âge directement par transparence en utilisant l'otolithe entier sans préparation préalable. Il est à noter que la sole est l'une des seules exceptions et donc l'observation de ces otolithes nécessitent généralement de procéder à une coupe fine transversale de l'ordre de 0,3 mm.

L'âge de chaque individu a été estimé par un expert (ayant calibré ses estimations d'âge au niveau européen) à l'aide du système d'acquisition et de traitement d'images relié à une loupe binoculaire.

Annexe 3. MM. Test des comètes (Ifremer, RBE/CCEM/LEX)

Préparation des lames pour les érythrocytes de poisson. Au moment de la réalisation du test, les tubes contenant le sang dans son milieu de congélation sont rapidement décongelés. La suspension cellulaire est ensuite diluée au 1/10 dans du PBS 1X. Après homogénéisation, 30 µL de la solution diluée sont ajoutés dans 225 µL de LMPA (Low Melting Point Agarose, ou Agarose à faible point de fusion). Ce sont ensuite 80 µL de ce mélange qui sont déposés sur chacune des deux lames préalablement recouvertes d'un premier gel d'agarose (NMPA) à 0,5 %. Une fois le gel solidifié, un troisième gel est coulé sur la lame par l'étalement de 80 µL de LMPA à 0,5 %. La prise en masse des gels sur les lames de microscope est accélérée par le stockage des lames quelques minutes à 4°C.

Préparation des lames pour les hémocytes de moule. Les échantillons d'hémolymphe frais sont centrifugés à 2500 rpm pendant 5 min. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire qui contient les hémocytes est repris avec 160 µL d'agarose à faible point de fusion (LMPA à 0,5 %) préparé avec un sérum physiologique tamponné (PBS 1X : NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4). La suspension cellulaire est mélangée puis déposée sur 2 lames de verre (80 µL/ lame) préalablement recouvertes d'un premier gel d'agarose à point de fusion normal (NMPA à 0,5 % dans du PBS 1X) ; l'étalement est réalisé à l'aide d'une lamelle. Une fois pris en masse, un troisième gel est coulé sur la lame par l'étalement de 80 µL de LMPA à 0,5 %. La prise en masse des gels sur les lames de microscope est accélérée par stockage des lames quelques minutes à 4°C.

Lyse, dénaturation, électrophorèse et acquisition du signal. Le test des comètes a été réalisé comme précédemment décrit (Akcha et al., 2003 ; Barranger et al., 2014). La procédure détaillée ci-après est valable quel que soit le type cellulaire considéré (hémocytes ou érythrocytes). Une fois le dernier gel polymérisé, les lames sont immergées dans du tampon de lyse glacé (NaCl 2,5M, EDTA-Na₂ 0,1 M, Trizma base 0,01 M, N-Laurylsarcosine sodium salt à 1 %, DMSO à 10 %, Triton X-100 à 1 %, pH 10) pendant au moins une heure à l'obscurité. Cette étape permet la digestion des membranes cellulaires et nucléaires. Après l'étape de lyse, les lames sont incubées pendant 20 min dans le tampon d'électrophorèse qui sert également de tampon de dénaturation. La dénaturation permet la digestion des histones et le passage de l'ADN d'une forme super enroulée à une forme relaxée facilitant la migration électrophorétique. Après la période de dénaturation, l'électrophorèse est réalisée pendant 15 (hémocytes) et 20 min (érythrocytes) à 23 V (390 mA, E = 0,66 V / cm). A la fin de l'électrophorèse, les lames sont rincées par incubation 2x7 min dans du tampon Tris (Trizma base 0,4 M, pH 7,5). Ensuite, elles sont plongées dans un bain d'éthanol absolu pendant 10 min. Après séchage, les lames sont stockées à température ambiante jusqu'à analyse.

Avant analyse des lames par lecture au microscope, les lames sont marquées avec 75 µL de Gel Red 1X et incubées à 4°C pendant au moins une heure dans l'obscurité. Les lames sont ensuite observées à l'aide d'un microscope optique à épifluorescence (Olympus BX60, × 40) couplé à une caméra CCD (Luca-S, Andor Technology) et à un système d'analyse d'image (Komet 6, Kinetic Imaging Ltd.). Sur chaque lame, 50 noyaux sont analysés pour la mesure du pourcentage de l'ADN présent dans la queue de la comète (% Tail DNA). La valeur finale retenue pour chaque individu est le pourcentage de l'ADN moyen (n = 100) contenu dans la queue de la comète (Tail DNA) (Figure 33).

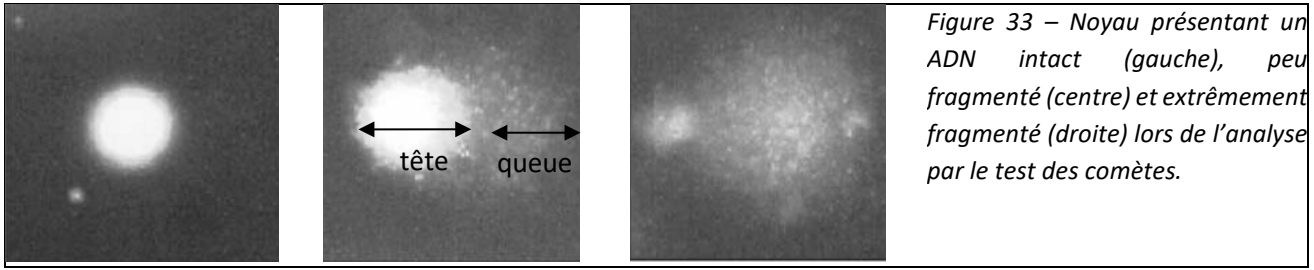
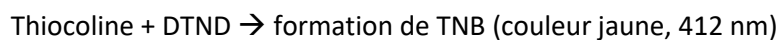


Figure 33 – Noyau présentant un ADN intact (gauche), peu fragmenté (centre) et extrêmement fragmenté (droite) lors de l'analyse par le test des comètes.

Annexe 4. MM. Analyse de l'activité AChE (Ifremer, RBE/CCEM/LEX)

L'activité acétylcholinestérase a été analysée dans les muscles des poissons et les branchies des moules selon le protocole Bocquené et Galgani (1998). Le tissu, placé dans un microtube de 1,5 ml stocké dans l'azote liquide jusqu'à extraction protéique, est broyé à l'aide d'un turax dans 2 mL tampon Tris/g tissu (100 mM, pH8, 0,1% triton, 4°C). Après centrifugation pendant 20 min à 9 000 g, le surnageant (fraction S9) est récupéré. La concentration en protéines dans la fraction S9 est réalisée par spectrophotométrie en microplaque selon la technique de Bradford (Bradford, 1976). L'activité AChE est déterminée sur des extraits de 100 µg de protéines totales. L'acetylthiocholine iodide (ACTC, 2,63 mM) est ajouté comme substrat pour l'enzyme et l'ion dithiobisnitrobenzoate (DTNB, 0,53 nM) est ajouté afin de colorer le produit de la réaction:



Après 2 min d'incubation à température ambiante (la réaction démarre à l'ajout du substrat ACTC), l'activité de l'AChE est mesurée à 412 nm pendant 2 min dans chacun des puits (3 par échantillon) au TECAN infinite M200 avec 8 cycles de lecture de 30 secondes. Des blancs techniques en triplicats sont ajoutés aux séries d'analyse (à chaque plaque) et le blanc est ensuite retiré des valeurs d'absorbance. Le calcul de l'activité AChE se fait selon la formule suivante (Ellman et al., 1961).

Formule originale du calcul de l'activité spécifique (AS) en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$:

$$\text{AChE activity } (\mu\text{mol ACTC min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}) = \frac{\Delta A_{412} \times Vol_T \times 1000}{1.36 \times 10^4 \times \text{lightpath} \times Vol_S \times [\text{protein}]}$$

where:

ΔA_{412} = change in absorbance (OD) per min, corrected for spontaneous hydrolysis

Vol_T = total assay volume (0.380 ml)

1.36×10^4 = extinction coefficient of TNB ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

lightpath = microplate well depth (1 cm)

Vol_S = sample volume (in ml)

$[\text{protein}]$ = concentration of protein in the enzymatic extract (mg ml^{-1}).

- ΔA_{412} : delta d'absorbance par min :
 - $\Delta A_{412} = (\Delta A_{412 \text{ t2min}}^{\text{échantillon}} - \Delta A_{412 \text{ t0}}^{\text{échantillon}}) - (\Delta A_{412 \text{ t2min}}^{\text{blanc}} - \Delta A_{412 \text{ t0}}^{\text{blanc}}) / 2 \text{ min}$ (ou sur le temps choisi)
- Vol_T : Volume réactionnel total dans le puit. Dans le protocole actuel : 380 µL = **0,38 ml**
- ϵ_{TNB} : **$1,36 * 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} = \text{mmol}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$**
- Lightpath : Calcul
 - Formule du volume d'un cylindre : $V = \pi/4 \times d^2 \times h$ alors $h = 4V / (\pi \times d^2)$ avec
 - h : Hauteur du mélange réactionnel dans le puit (light path, en cm)
 - V : Volume total dans le puit (mL, pour ce protocole AChE : $V = 0.380 \text{ mL}$)
 - d : Diamètre du puit (cm, pour les plaques Greiner utilisées : 0,677 cm)
 - Dans les plaques Greiner utilisées
 - **$h = 1,06 \text{ cm}$**
- Vol_S : Volume de la solution de S9 ajouté.

- Pour le protocole pour les soles et le flet, on ajoute 0,350 ml et 0,100 mL, respectivement, d'une solution de S9 diluée à 1mg.ml⁻¹. Cette quantité est à déterminer pour chaque type d'échantillon.
- **[proteines]** : Concentration en protéines dans l'extrait S9 (*Vol s*), en mg.ml⁻¹.

Calcul de l'activité spécifique de l'AChE (AS) :

$$AS = \frac{\Delta DO * Vt * 1000}{1,36 * 10^4 * 1,06 * Vol s * [proteines]}$$

Calcul de l'unité finale :

$$AS = \frac{\Delta DO * Vt * 1000}{1,36 * 10^4 * 1,06 * Vol s * [proteines]} = \frac{min^{-1} * ml * 1000}{ml * mmol^{-1} * cm^{-1} * cm * ml * mg * ml^{-1}}$$

$$AS = 1000 * mmol * min^{-1} * mg^{-1} = \mu mol * min^{-1} * mg^{-1}$$

Remarque : il est possible de directement mettre dans l'équation la quantité (en mg) de protéines contenues dans chaque puit, et de supprimer *Vol s* ainsi que *[proteines]*.

$$AS = \frac{\Delta DO * Vt * 1000}{1,36 * 10^4 * 1,06 * quantité p} = \frac{min^{-1} * ml * 1000}{ml * mmol^{-1} * cm^{-1} * cm * mg}$$

Annexe 5. MM. Métabolites de HAP dans les biles de poissons plats (Université de Bordeaux, LPTC)

Les métabolites de HAP mono-hydroxylés (OH-HAP) sont analysés dans des échantillons de biles de poissons par extraction sur phase solide (SPE) et couplage Chromatographie en phase Liquide et Spectrométrie de masse en tandem (LC/MSMS) selon un protocole adapté de Le Dû-Lacoste (2008). Les analyses sont faites au LPTC à l'Université de Bordeaux avec Hélène Budzinski et Karyn Le Menach.

Préparation des échantillons, extraction et purification

Les échantillons de bile (10-50 µL) sont homogénéisés avec 2 mL de tampon acétate pH5. Après ajout d'une solution d'étalonnage interne (1OH-Pyrène-d9 et 4OH-Biphényl-d9), une étape de déconjugaison enzymatique est réalisée à 37°C pendant 18 h (β -glucuronidase from *Helix pomatia* type HP2 et 2-mercaptoéthanol). Après déconjugaison, les échantillons de biles sont extraits par extraction sur phase solide (SPE, cartouche C18 500 mg 3 mL). L'extrait organique est élué avec 2 x 2 mL de méthanol, concentré sous flux de gaz à 50 µL puis repris dans 1 mL de mélange 80/20, v/v dichlorométhane / méthanol. L'extrait obtenu est purifié par extraction sur phase solide (SPE, cartouche NH2, 500 mg, 3 mL), élué avec 2 x 2,5 mL d'un mélange 80/20, v/v dichlorométhane / méthanol puis concentré sous flux de gaz à 100 µL de méthanol.

Analyse par Chromatographie en phase Liquide et Spectrométrie de Masse en tandem (LC/MSMS)

Les métabolites HAP mono-hydroxylés sont analysés par couplage LC/MSMS en mode d'ionisation négative (Infinity 1290 LC / 6460 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies). La colonne utilisée pour les analyses est une Acquity UPLC BEH C18 (1,7µm x 2,1mm x 50mm, Waters), la température de la colonne est fixée à 45°C. Le volume injecté d'extrait organique est fixé à 5 µL. Les solvants d'élution sont un mélange de 100% eau ultra pure et 100% méthanol selon un gradient de concentration des 2 solvants. Les molécules recherchées sont quantifiées par dilution isotopique (composés deutérés) :

- 2 OH-Naphthalène, 1 OH-Naphtalène, exprimés par la somme de ces 2 pics (**S2 OH-Naptht**)
- 2+3 OH-Phénanthrène (Coélution chromatographique 2 OH-Phénanthrène et 3 OH-Phénanthrène),
1+9 OH-Phénanthrène (Coélution chromatographique 1 OH-Phénanthrène et 9 OH-Phénanthrène),
4 OH-Phénanthrène, exprimé par la somme de ces 3 pics (**S3 OH-Phenant**)
- **1 OH-Pyrène**,
- 9 OH-Benzo(a)pyrène, 1 OH-Benzo(a)pyrène, exprimés séparément (**9-OH-BaP** et **1-OH-BaP**).

Différents contrôles qualité ont été effectués pour valider la procédure d'analyse. Les limites et rendements de quantification ont été réalisés par ajouts dosés avec une matrice modèle. Des blancs protocole ont été réalisés afin de vérifier l'absence de contaminations croisées lors du processus de traitement des échantillons en laboratoire.

Annexe 6. MM. Analyses des lysosomes (Université de Bilbao)

Intégrité de la membrane lysosomale (LMS)

L'intégrité de la membrane lysosomale dans les foies de poissons a été analysée selon Broeg et al. (1999) et UNEP/RAMOGÉ (1999) et dans les glandes digestives de moules selon (Martinez-Gomez et al., 2015). L'intégrité de la membrane lysosomale est testée par application de différents temps de labilisation acide (12 temps pour *S. solea* et 8 temps pour *Mytilus* sp.). La procédure requiert la préparation de 8 à 12 coupes en série de 10 μm à partir d'échantillons congelés. Avant la coloration, les sections gardées à -40°C sont progressivement amenées à température ambiante ; elles sont laissées à 4°C pendant 30 min puis transférées à température ambiante pendant 5 min. La labilisation acide des échantillons se fait dans un tampon citrate 0,1 M (2,5 % NaCl, pH 4,5) à 37°C avec agitation, en appliquant différents intervalles de temps (*Mytilus* sp.: 0, 3, 5, 10, 15, 20, 30 et 40 min et *S. solea* : 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40 et 50 min). Les coupes sont ensuite transférées au milieu d'incubation contenant le substrat permettant de révéler l'activité d'enzymes lysosomales, la N-acetyl- β -hexosamidase (Hex, *Mytilus* sp.) et la phosphatase acide (AcP, *S. solea*). Le milieu utilisé pour les échantillons de glandes digestives contient 20 mg de naphthol AS-BI N-acetyl- β -hexosaminidine dissout dans 2,5 ml de 2-methoxyethanol. L'incubation des échantillons de poisson se fait dans un milieu contenant 10 mg de naphthol AS-BI phosphate, dissout dans 1 ml de DMSO. Dans les deux cas, le milieu est complété avec un tampon citrate 0,1 M (2,5 % NaCl, pH 4,5) et 3,5 g de polypeptide à basse viscosité. L'incubation dure 20 min et se fait à 37°C avec agitation. Une solution saline à 2,5% NaCl est utilisée pour rincer les sections (37°C , 5 min) avant de les transférer dans un milieu de post-couplage pendant 9 min (0,1 g de sels Fast Violet B dissous dans 100 ml de tampon phosphate 0,1 M, à pH 7,4, contenant 2,5% NaCl). Les sections sont ensuite rincées à l'eau pendant 10 min et fixées dans une solution de Baker, contenant 2,5% NaCl) à 4°C pendant 10 min. Enfin, les échantillons sont rincés à l'eau distillée et montés dans de la glycérine de Kaiser.

Les sections histochimiques sont ensuite analysées au microscope optique afin de déterminer l'intégrité de la membrane lysosomale (Figure 34). Elle est exprimée en période de labilisation (LP, en min) et est identifiée par une augmentation d'intensité de coloration (Broeg et al., 1999, UNEP/RAMOGÉ, 1999, ICES, 2004). Au microscope, 4 zones différentes sont analysées par échantillon. La valeur finale de LP pour chaque individu est calculée à partir de la moyenne des 4 zones.

Les analyses histochimiques de cette espèce vont être complétées par l'analyse d'altérations structurales des lysosomes (test LSC basé sur l'activité de l'enzyme β -glucuronidase) et par l'analyse de l'accumulation de lipides neutres dans le foie (coloration ORO).

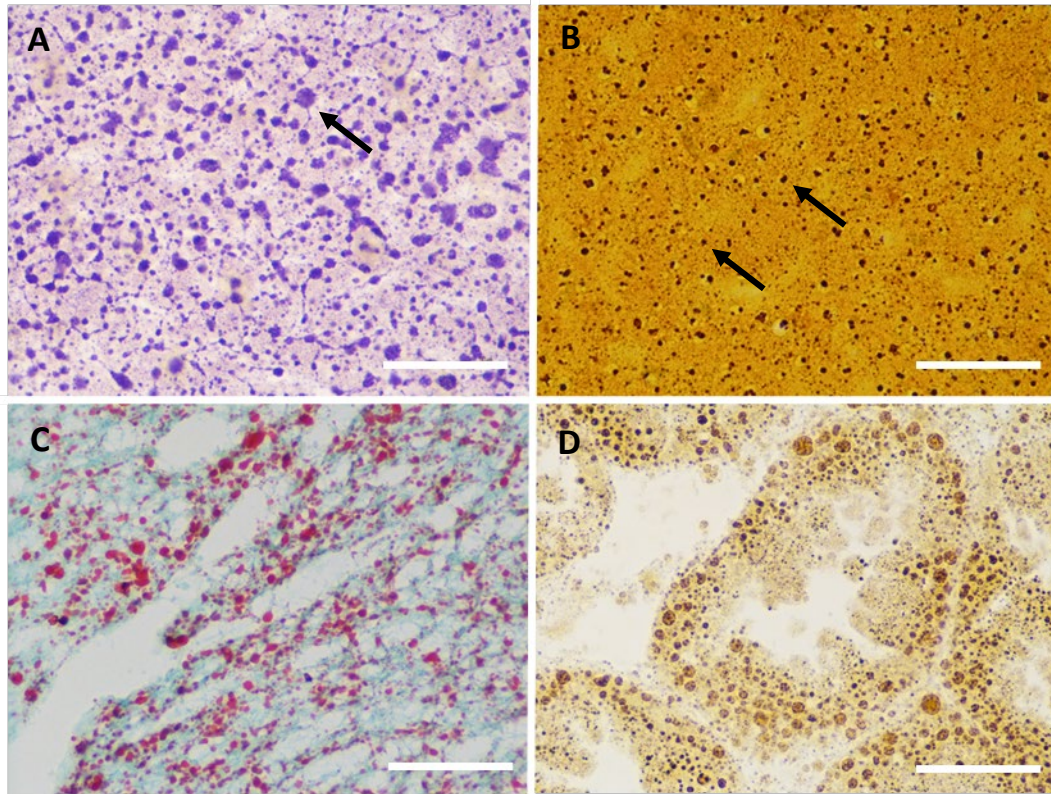


Figure 34 – Section cryotome d'échantillons de foie de (A-C) et de glande digestive de *Mytilus sp.* (D) prélevées lors de la campagne SELILOIRE 2017. Les flèches indiquent les lysosomes dans les hépatocytes ; barre d'échelle : 50 μm (A) histochimie à l'acide phosphatase ; (B) histochimie à la 6- glucuronidase ; (C) Oil Red O (lipides neutres) ; (D) histochimie à N-acetyl- β -hexosamidase.

Annexe 7. MM. Histologie

Annexe 7.1. Procédure

Tissue fixation

4% neutral buffered formol, pH 7.2:

57.84g Na₂HPO₄·H₂O + 5.12g NaH₂PO₄·H₂O + 200ml of Formaldehyde (37%), to be completed with dH₂O (Vol_{Tot}: 2 l). Samples fixed in formalin should be kept in the solution at 4°C for 24 hr. They can be preserved in 70% ethanol.

Tissue processing

After fixation, samples are dehydrated following procedure as below, before being embedded in paraffin:

70% ethanol	1 hr
96% ethanol	1 hr
96% ethanol	1 hr
100% ethanol	1 hr
100% ethanol	1 hr
IMS	1 hr
Xylene	1 hr
Xylene	1 hr
Paraffin	2 hr
Paraffin	2 hr
Paraffin	2 hr

IMS: ratio 1:1 100% ethanol and Xylene

Hematoxylin-eosin (H-E) staining

Xylene	10 min
Xylene	10 min
100% ethanol	2 min
100% ethanol	2 min
96% ethanol	2 min
70% ethanol	2 min
dH ₂ O	5 min
Hematoxylin	4 min
dH ₂ O	4 min
Acid alcohol	10 s
dH ₂ O	5 min
Lithium carbonate	10 s
dH ₂ O	1 min
Eosin	1 min 30 sec
dH ₂ O	5 sec
dH ₂ O	1 min 30 sec
70% ethanol	5 sec
96% ethanol	10 sec
100% ethanol	15 sec
100% ethanol	20 sec
Xylene	1 min
Xylene	1 min

Annexe 7.2. Characterisation of the reproductive cycle for male flatfish

Gamete developmental stages in males were determined according to García-López et al. (2006) and were classified into the following stages :

- **Immature (or resting).** The seminiferous lobules are forming. Spermatogonia (SPG) and spermatocytes (SPC) can be detected at this stage.
- **Stage I. Early spermatogenesis.** This stage is characterised by the presence of numerous germinal cysts in the testis cortex containing SPG. It is possible to identify few spermatids (SPD) in the lumen of seminiferous lobules and some SPD and spermatozoa (SPZ) in the medullar efferent ducts. Empty spaces can be observed in the cortex and the medullar areas.

- **Stage II. Mid spermatogenesis.** At this stage, germ cells at all developmental stages can be observed, from SPG to SPZ. In the cortex, the number of SPG is decreasing as they differentiate into SPC (initiation of the meiosis). In comparison with the previous stage, no empty spaces are observed in the seminiferous lobule. Instead, the small central lumen is filled with SPD. It is possible to identify some SPD and SPZ in the medullar efferent ducts.
- **Stage III. Late spermatogenesis.** The number of SPC in germinal cysts decreases and SPD become the main cell type. They are found in the lumen of the seminiferous lobule (semi-cystic spermatogenesis). More SPZ are observed in the medullar efferent ducts.
- **Stage IV. Functional maturation.** SPD are becoming less abundant in the cortex as they are differentiated into SPZ, which accumulate in the lumen of the medullar efferent ducts. SPG associated with Sertoli cells can be identified in the cortex.
- **Stage V. Recovery (or post-spawning).** The number of SPD in the cortex and SPZ in the lumen of the medullar efferent ducts decreases. Numerous SPG and Sertoli cells can be observed in the distal part of the cortical seminiferous lobules showing the initiation of germ cell proliferation.

Annexe 7.3. Characterisation of the reproductive cycle for female flatfish

The determination of gonad developmental stages in female soles was based on the identification and frequency of the different oocyte phases present in gonad samples. Gamete phases were identified following the description made by García-López et al. (2007) (Tableau 18).

Tableau 17 - Classification of oocyte developmental stages in female soles from García-López et al. (2007).

Oocyte stage	Diameter (μm)	Appearance
Oogonia	8–12 (10 ± 0.4)	Large and slightly basophilic N with a prominent central nu. Clear and scarce C. Found isolated or in small nests in the ovarian epithelium.
S1 (chromatin nucleolar stage)	12–23 (16 ± 0.8)	Moderately basophilic C. N containing a prominent nu surrounded by chromatin threads.
S2 (early perinucleolus stage)	17–51 (32 ± 0.6)	Highly basophilic C. Zones with less basophilia (pallial substance of Balbiani's body) close to N. One highly basophilic and big nu.
S3 (late perinucleolus stage)	32–184 (101 ± 2.3)	C basophilia started to decrease. N occupied by numerous, relatively large, basophilic nu with a peripheral disposition. Developing follicular layer.
S4 (cortical alveoli stage)	124–287 (193 ± 3.4)	Appearance of numerous vacuoles (cortical alveoli) at the periphery of the C, which also contained several L. The ZR was visible for the first time. A clearly distinguishable follicular layer surrounding the oocyte.
S5 (early vitellogenic stage)	240–413 (309 ± 3.8)	Appearance of small and acidophilic YG in the outer cortex of the C. Numerous larger L scattered within the C. The ZR increased in thickness.
S6 (late vitellogenic stage)	325–569 (458 ± 4.5)	YG spread inwards as they increased in number and in size occupying almost totally the C. L and the ZR reached their maximum development.
S7 (early maturation stage)	443–597 (528 ± 6.0)	As S6, except for the position of the N, which started to migrate towards the animal pole, and the incipient coalescence of YG and L. Maturation was not completed.
Atresia	Not measured	Fragmentation of nuclear membrane and the ZR. Disorganised and highly vacuolated C. Follicular layer hypertrophied invading the oocyte C.

Based on Coward et al. (1998).

C, Cytoplasm; L, lipid inclusions; N, Nucleus; nu, Nucleolus; YG, Yolk granules; ZR, Zona radiata.

Gonad developmental stages in females were determined according to Murua and Motos (2006) and were classified into four categories, based on the frequency of each oocyte phase detected in the gonads:

- **Stage I. Growth (or pre-vitellogenesis).** The growing oocyte progresses from a Central Nucleolar Stage (Oogonia and S1) with a small nucleus and a unique and central nucleolus to a Perinuclear Nucleoli Stage (S2 and S3) with a larger nucleus, larger ooplasm and several nucleoli placed in the periphery

of the nucleus. Several types of germ cells can be detected at this stage including oogonia, S1, S2 and S3 oocytes, cortical alveolar oocytes (S4) and early vitellogenic oocytes (S5).

- **Stage II. Early vitellogenesis.** This stage is characterised by the presence of S5 oocytes, which are bigger in size and show a wide zona radiata, small yolk inclusions and lipid vesicles. The nucleus of S5 oocytes is central and surrounded by several nucleoli located at its periphery.
- **Stage III. Late vitellogenesis.** S6 oocytes can be identified at this stage. They typically present a larger zona radiata, lipid granules and yolk granules occupying most of the ooplasm. At this stage, the presence of the theca and granular layer is indicative of the development of the follicular layer. The nucleus starts migrating towards the animal pole and the nuclear membrane starts breaking. Atretic oocytes may be detected at this stage.
- **Stage IV. Maturation.** Mature female gonads are characterised by the presence of S7 oocytes showing a migrating nucleus towards the animal pole and nuclear membrane breakage. Atretic oocytes may be detected at this stage.

Annexe 7.4. Catégories de pathologies hépatiques chez les poissons plats selon Bernet et al. (1999)

Tableau 18 - Classification of liver lesions in flatfish (Bernet et al., 1999)

Lesion categories	Lesions	w
Circulatory disturbances	Haemorrhage/Hyperaemia	1
	Intercellular oedema	1
Regressive changes	Architectural and structural alterations	1
	Plasma alterations	1
	Deposits	1
	Nuclear alterations	2
	Atrophy	2
Progressive changes	Necrosis	3
	Hypertrophy	1
Inflammatory responses	Hyperplasia	2
	Exudate	1
Tumours (neoplasms)	Activation of RES	1
	Infiltration	2
	Benign tumour	2
	Malignant tumour	3

w: lesion importance factor; RES: Reticuloendothelial system

Tableau 19 - Correspondances entre la classification utilisée pour les campagnes précédentes (Davies and Vethaak, 2012) et les résultats présents (Bernet et al. (1999) adapté par Costa et al. (2009)). La première nomenclature précise les notes de gravité attribuées par catégorie alors que la deuxième nomenclature les précise entre parenthèses par lésion quand applicable

Lesions names	Lesion category according to SELILOIRE 2017	Lesion category adapted from (Bernet et al. (1999) for SELILOIRE 2020	
		Note De gravité	Lesion importance w
Necrosis	Non Specific Lesions	1	Regressive changes (3)
Apoptosis	Non Specific Lesions	1	Not analysed in SLL2020
Lipidosis	Non Specific Lesions	1	Progressive changes (1)
Haemosiderosis	Non Specific Lesions	1	Circulatory disturbances (1)
Variable glycogen content	Non Specific Lesions	1	Progressive changes (2)
MMC	Non Specific Lesions	1	Inflammatory responses (1)
Lymphocytic infiltration	Non Specific Lesions	1	Inflammatory responses (2)
Granuloma & Abscess	Non Specific Lesions	1	Progressive changes (2)
Fibrosis	Non Specific Lesions	1	Progressive changes (2)

Regeneration	Non Specific Lesions	1	<i>Not analysed in SLL2020</i>	
Phospholipidosis	Early Tox. non-neopl. lesions	2	<i>Not analysed in SLL2020</i>	
Fibrillar inclusion	Early Tox. non-neopl. lesions	2	<i>Not analysed in SLL2020</i>	
Hepatocellular & nuclear polymorphism	Early Tox. non-neopl. lesions	2	Regressive changes	2
Hydropic vacuolation	Early Tox. non-neopl. lesions	2	Progressive changes	2
Peliosis and spongiosis hepatis	Early Tox. non-neopl. lesions	2	Progressive changes	2
Clear cell foci	FCA	3	FCA	2
Vacuolated foci	FCA	3	FCA	2
Eosinophilic foci	FCA	3	FCA	2
Basophilic foci	FCA	3	FCA	2
Mixed cell foci	FCA	3	FCA	2
Hepatocellular adenoma	Benign Neoplasms	4	Benign Neoplasms	2
Cholangiomas	Benign Neoplasms	4	Benign Neoplasms	2
Hemangiomas	Benign Neoplasms	4	Benign Neoplasms	2
Pancreatic acinar & cell adenomas	Benign Neoplasms	4	Benign Neoplasms	2
Cholangiocarcinoma	Malignant Neoplasms	5	Malignant Neoplasms	3
Pancreatic acinar cell carcinoma	Malignant Neoplasms	5	Malignant Neoplasms	3
Mixed cell carcinoma	Malignant Neoplasms	5	Malignant Neoplasms	3
Other	Malignant Neoplasms	5	Malignant Neoplasms	3

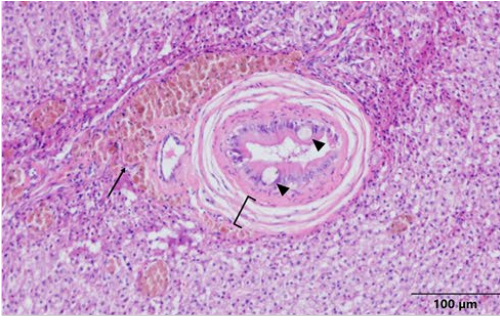
MMC: Increased numbers and size of macrophage aggregates; Early Tox. non-neopl. Lesions: Early Toxicopathic non-neoplastic lesions; FCA: Foci of cellular alteration

Annexe 7.5. Catégories de pathologies de la gonade chez les poissons plats selon Bernet et al. (1999)

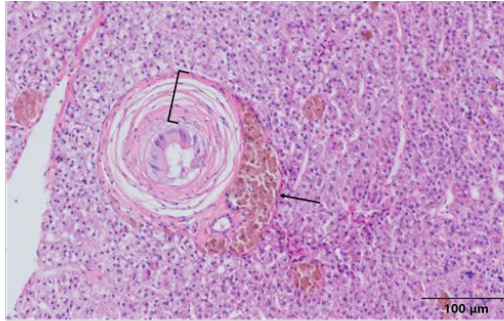
Tableau 20 - Classification of gonadal lesions in flatfish (Bernet et al., 1999)

Lesion categories	Lesions	w
Circulatory disturbances	Haemorrhage/Hyperaemia	1
Regressive changes	Architectural and structural alterations	1
	Plasma alterations	1
	Deposits	1
	Nuclear alterations (pyknotic oocytes/spermatocytes)	2
	Atresia	3
	Intersex	3
	Necrosis	3
Progressive changes	Hypertrophy	1
	Hyperplasia	2
Inflammatory responses	Exudate	1
	Activation of RES	1
	Granulomatosis	2
	Infiltration	2
Tumours (neoplasms)	Benign tumour	2
	Malignant tumour	3

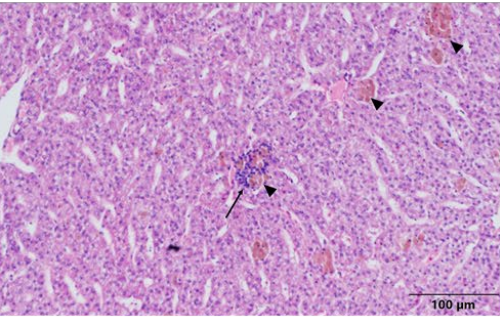
w: lesion importance factor



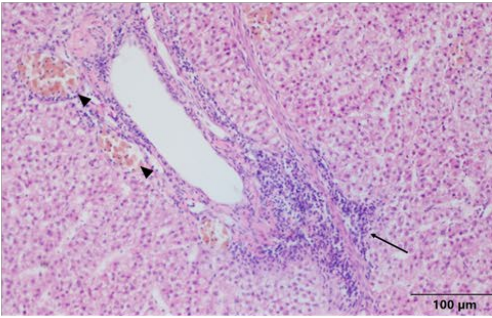
Fibrose (crochet), vacuolisation hydropique des cellules épithéliales d'un duct biliaire (pointes) et agrégats mélanomacrophagiques (flèche) observés dans un échantillon de foie chez la sole



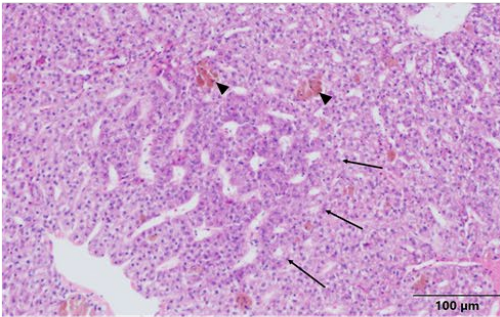
Fibrose (crochet) et agrégats mélanomacrophagiques (flèche) observés dans un échantillon de foie chez la sole



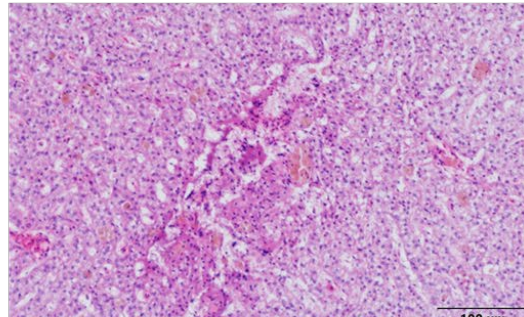
Infiltration lymphocytaire (flèche) et agrégats mélanomacrophagiques (pointe) observés dans un échantillon de foie chez la sole



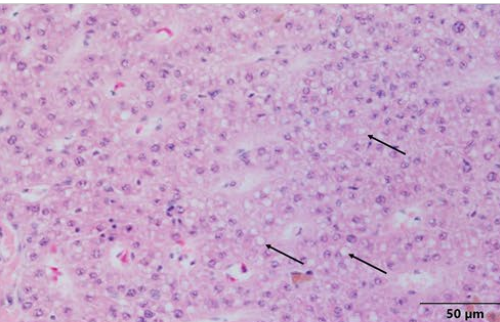
Infiltration lymphocytaire (flèche) et agrégats mélanomacrophagiques (pointe) observés dans un échantillon de foie chez la sole



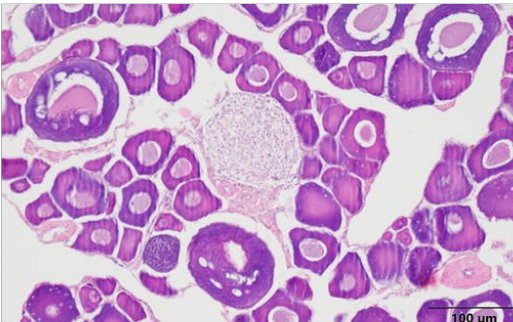
Foyer d'altération cellulaire (flèche) et agrégats mélanomacrophagiques (pointe) observés dans un échantillon de foie chez la sole



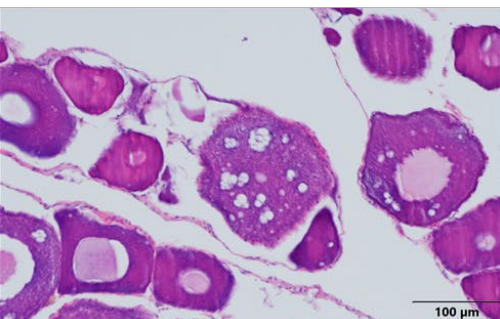
Zone nécrotique observée dans un échantillon de foie chez la sole



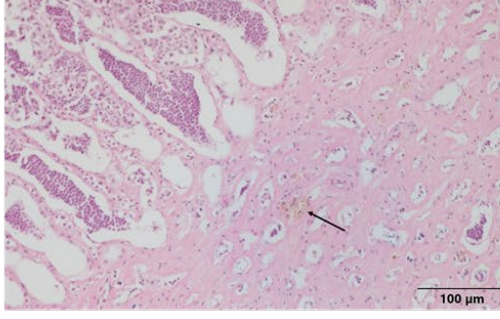
Vacuolisation hépatocytaire (flèches)



Granulome observé dans un échantillon de gonade femelle chez la sole.



Accumulation de gouttelettes lipidiques dans un ovocyte de sole.



Présence d'agrégats mélanomacrophagiques (flèche) dans un échantillon de gonade male chez la sole.

Figure 35 – Observation au microscope de différentes lésions histo(patho)logique dans le foie ou les gonades de soles.
Photo : Tifanie Briaudeau.

Annexe 7.4. Lésions et parasites analysés chez la moule

Tableau 21 - Lésions et parasites analysés chez la moule (Garmendia et al., 2011, Davies and Vethaak, 2012, Benito et al., 2022)

Paramètre	Libellé	Description	Valeurs qualitatives	
			Libellé	Description
EOS	Corps éosinophiles	Présence de corps éosinophiles dans le tissu	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
DEG	Dégénérescence	Dégénérescence des cellules dans les tubules digestifs	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
Agg_mel	Agrégats mélanisés	Présence d'agrégats mélanisés	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
HAE	Agrégats d'hémocytes	Présence d'agrégats d'hémocytes	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
HNEO	Hémocytes néoplasiques	Présence d'hémocytes néoplasiques	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
NEO	Cellules néoplasiques	Présence de cellules néoplasiques	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
Apoptose	Apoptose	Cellules en apoptose (GON)	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
Inflammation	Inflammation	Présence de signes d'inflammation dans les tissus	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
GRN	Granulocytome	Présence d'un ou plusieurs granulocytome(s) dans les tissus	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
Perles	Formation de perles		0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
INT	Intersex		0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
RLO/CLO	Microcolonies intracellulaires de bactéries	Observation de la présence de microcolonies intracellulaires de bactéries type Rickettsia/Chlamydia	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence (ou comptés)
Parasite_sp	Présence de parasites dans les tissus	Observation de la présence de parasites dans les tissus (e.g. Tubellarié ; Trématode buccéphalide)	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
Parasite_Buc	Trématode buccéphalide	Infection des tissus par des trémaodes buccéphalides	0 à 4	0 : Absence ; 1 : Présent dans la GON 2 : Rempli la GON et faible présence dans GD ou BR 3 : Rempli la GON et invasion de la GD et/ou des BR 4 : Rempli la GON et la GD et/ou les BR
Parasite_Turb	parasite : Turbellaria	Présence de parasites de type turbellaria dans les tissus	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
Parasite_Mpx	Parasite : Protozoaire	Présence de parasites de type protozoaire dans les tissus (GD)	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence (ou comptés)
Parasite_Haplo	Parasite : <i>Haplosporidium</i>	Présence de parasites de type protozoaire dans les tissus (GD)	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
Parasite_Myt	Parasite - <i>Mytilicola intestinalis</i>	Présence de parasites de type <i>Mytilicola intestinalis</i> dans les tissus	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
Parasite_Stn	Parasite - <i>Steinhausia mytilovum</i>	Présence de parasites de type <i>Steinhausia mytilovum</i> dans les tissus (GON)	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
Parasite_Mar	Parasite - <i>Marteilia</i> sp.	Présence de parasites de type <i>Marteilia</i> sp dans les tissus (DG)	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
Parasite_DIG	Parasite - Digènes	Présence de parasites de type <i>Digenea</i> sp dans les tissus	0 ; 1	0 : Absence ; 1 : Présence
ADG_Index	indice de cellules adipogranuleuses	Observation de l'occurrence de cellules adipogranuleuses	0 à 4	0 : Absent ; 1 : Présent ; 2 : Dispersé ; 3 : Fréquent ; 4 : Abondant
Atrophie_Index	Présence de cellules atrophiées	Paramètre couplant : Epaisseur de l'épithélium (thickwall) des tubules (tb) comparée à l'épaisseur normale (thicknorm) Quantité de tb considérés comme atrophiés (tbat)	0 à 4	0: thickwall=thicknorm majoritairement, <i>Lumen occlus</i> , pas d'atrophie 1: thickwall >50 et <100% thicknorm, majorité de tbat 2: thickwall = environ 50% thicknorm 3: thickwall <50% thicknorm, nbx tbat 4: thickwall très fine, quasi 100% de tbat
CTD_Index	Proportion de tissu conjonctif sur tissu digestif	Paramètre couplant : Densité d'alvéoles digestives (Dens.ad), Quantité de tissu conjonctif (tc) Distance entre alvéoles digestives (Dis.ad) par rapport au rayon alvéolaire moyen (RAM)	1 à 4	1: Dens.ad élevée, presque sans tc 2: Dens.ad élevée, tc visible, Dis.ad < RAM 3: Dens.ad faible, Dis.ad = ou > RAM 4: majorité de la glande digestive avec Dens.ad faible, et Dis.ad = ou > RAM
Atresie_Num	Pourcentage de follicules présentant des cas d'atresie	Paramètre semi-quantitatif évaluant le pourcentage de follicules présentant des cas d'atresie	0 à 4	0 : absence ; 1 : 0-25% ; 2 : 25-50% ; 3 : 50-75% ; 4 : 75-100%

Tbat : tubules considérés comme atrophiés ; GD : glande digestive, BR : branchies ; GON : gonade

Annexe 8. MM. Catégorisation des rangs d'intersex chez les poissons

Bateman et al. (2004) ont décrit pour le flet un Ovotestis Severity Index (OSI) calculé à partir des analyses histologiques de gonade d'un individu. Le développement de cet indice permet de disposer d'un outil robuste pour déterminer le stade d'intersexualité (de 0 à 3) chez le flet mais aussi probablement chez de nombreuses espèces de poissons (Davies and Vethaak, 2012). Il correspond à la somme des stades de sévérité de chaque champ d'observation dans une section de gonades, divisé par le nombre de champ d'observation.

$$OSI = \frac{\sum D1 * D2}{X} \text{ (équation 1)}$$

D1 correspond au stade de développement ovocytaire le plus avancé observé dans un champ d'observation (stade de 1 à 5),
D2 correspond à la distribution des ovocytes sur le champ d'observation (stade de 1-4),
X correspond au nombre de champs d'observation.

La grille de lecture suivante permet de déterminer la sévérité du phénomène pour une gonade donnée :

- OSI = 0 = Absence d'intersexualité,
- OSI > 0-5 = Stade 1,
- OSI > 5-10 = Stade 2,
- OSI > 12-20 = Stade 3.

Tableau 22 – Rang d'ovotestis (Davies and Vethaak, 2012).

SEVERITY CATEGORY	HISTOLOGY	PROPORTION OF FIELDS OF VIEW WITH OOCYTES	DISTRIBUTION AND DEVELOPMENTAL STAGE OF OOCYTE
Absent (score 0)	Testis structure is normal, with no oocytes present in section		
Stage 1 (score >0–5)	Structure of the majority of the testis appears normal	Generally below 50%	Single or multiple previtellogenic oocytes. Cortical alveolar or fully vitellogenic oocytes rarely are present
Stage 2 (score >5–10)	Regions of the testis are altered, replacement of testicular material with oocytes	Up to 75%	Majority of oocytes are previtellogenic, present in clusters or zones in high proportion of fields of view. Single or multiple vitellogenic oocytes
Stage 3 (score >10–20)	Majority of testis is disrupted, replacement of testicular material with oocytes in various stages of development	Above 75%	Associated previtellogenic or vitellogenic oocytes through majority of section

Annexe 9. MM Contaminants organiques dans les muscles de soles et flets (Ifremer, RBE/CCEM/LBCO)

Les contaminants organiques ciblés ont été analysés selon différents protocoles décrits dans Munsch et *al.*, 2016 (PCB), Munsch et *al.*, 2017 (PBDE), Munsch et *al.*, 2018 (HBCDD et PFAS). Les techniques de détection et de quantification par dilution isotopique sont la CPG-SMHR et la CL-SMSM. Les méthodes analytiques sont brièvement décrites ci-après.

Lipides totaux

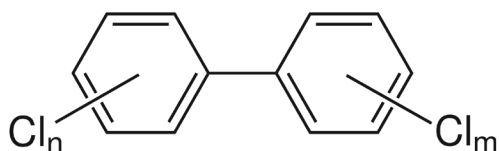
La matière extractible aux solvants organiques (proxy des lipides totaux) a été déterminée par méthode gravimétrique après extraction accélérée par solvant (ASE, Dionex) par un mélange de solvants (hexane/acétone 80%/20%) et séchage à l'étuve à 50°C jusqu'à poids constant. Les résultats sont exprimés en % de pf.

PCB, OCP et PBDE

Les échantillons lyophilisés (2 à 5 g) sont extraits après ajout d'étalons de rendement marqués au ^{13}C par extraction accélérée par solvant (ASE, Dionex), puis, l'extrait est purifié séquentiellement par chromatographie de perméation de gel et chromatographie d'adsorption sur colonne de silice/alumine (récupération de deux fractions F1 et F2).

Pour l'analyse des PCB, OCP et PBDE présents dans la fraction F1, les échantillons subissent une purification par ajout d'acide sulfurique permettant d'éliminer les lipides résiduels puis une purification par chromatographie en phase liquide équipée d'une colonne de type silice greffée nitrophénylpropyl (Nucléosil, 5 μm , 250 x 4,6 mm) en série avec une colonne de type 2-(1-pyrenil) ethyldimethyl silylated silica (PYE) 150 x 4,6 mm. Les analyses quantitatives sont réalisées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (SMHR) par dilution isotopique.

Les analyses quantitatives des PBDE sont réalisées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (SMHR) par dilution isotopique. Chaque composé est quantifié par rapport à son homologue marqué au ^{13}C à l'exception du BDE-49 quantifié par rapport au ^{13}C BDE-47. Cette technique permet la détection d'un plus grand nombre de composés que la technique plus classiquement utilisée de CPG-SM en mode d'ionisation chimique négative, et avec des LOQ plus basses.



HBCDD

Une quantité de 2 g de lyophilisat est extraite après ajout d'étalons de rendement marqués au ^{13}C par extraction accélérée par solvant (ASE, Dionex) avec 100% de dichlorométhane, puis l'extrait est purifié par chromatographie de perméation de gel (colonne 460 x 26 mm) sur une phase de Bio-Beads SX-3 avec élution par 100% de dichlorométhane. Les échantillons subissent ensuite une purification par ajout d'acide sulfurique permettant d'éliminer les lipides résiduels. Enfin une dernière étape de purification est réalisée par extraction liquide/liquide à l'hexane après ajout d'hydroxyde de sodium. L'analyse quantitative des 3 isomères α -, β - et γ -HBCDD a été réalisée par chromatographie liquide (CL) couplée à la spectrométrie de

masse en tandem (SM/SM) avec une colonne BEH C18 (Waters® 1.7 µm 2.1 x 150 mm) en utilisant la dilution isotopique. Les phases mobiles utilisées sont l'acétonitrile et un mélange eau/acétate d'ammonium à 20 mM ; le mode d'ionisation est de type électrospray négatif. Chaque composé est quantifié par rapport à son homologue marqué au ¹³C.

PFAS

Une quantité d'1 g de lyophilisat est extraite après ajout d'étalons de rendement marqués au ¹³C par extraction solide/liquide avec une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium 0.01 M, puis l'extrait est purifié sur colonne SPE échangeuse d'anions (Waters® Oasis Wax, 150 mg, 6 mL) avec élution par un mélange méthanol/ammoniac (99.5/0.5 v/v). Enfin les échantillons subissent une purification sur colonne SPE Envi Carb (Supelco® Envi Carb, 500 mg, 6 mL) avec élution par un mélange méthanol/acide acétique (80/1 v/v). L'analyse quantitative des composés perfluorés a été réalisée par chromatographie liquide (CL) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) avec une colonne BEH C18 (Waters® 1.7 µm 2.1 x 50 mm). Les phases mobiles utilisées sont l'acétonitrile et un mélange eau/acétate d'ammonium à 20 mM ; le mode d'ionisation est de type électrospray négatif. La quantification est réalisée par dilution isotopique.

Synthèse des performances analytiques

PCB

Rendements moyens des composés isotopiquement marqués : entre 67% (¹³C-PCB 28) et 92% (¹³C-PCB 180)

LQ moyennes : inférieures à 53 pg/g ps (PCB 153)

Blancs moyens : inférieurs à 24 pg/g ps (PCB 153)

Justesse sur matériau de contrôle qualité interne : entre -34% (PCB 123) et +21% (PCB 189)

OCP

Rendements moyens des composés isotopiquement marqués : entre 37% (¹³C-Isodrin) et 100% (¹³C-Endrin)

LQ moyennes : inférieures à 21 pg/g ps (dieltrin)

Blancs moyens : inférieurs à 10 pg/g ps (dieltrin)

Justesse sur matériau de contrôle qualité interne : entre -14% (dieltrin) et +30% (pp'DDT)

BFR

Rendements moyens des composés isotopiquement marqués : entre 58% (¹³C-PBDE 28) et 85% (¹³C-PBDE 153)

LQ moyennes : inférieures à 8 pg/g ps (PBDE 47)

Blancs moyens : inférieurs à 4 pg/g ps (PBDE 47)

Justesse sur matériau de contrôle qualité interne : entre -16% (PBDE 183) et +15% (PBDE 28)

PFAS

Rendements moyens des composés isotopiquement marqués : entre 62% (¹³C-PFOA) et 97% (¹³C-PFDoDA)

LQ moyennes : inférieures à 55 pg/g ps (PFOA)

Blancs moyens : inférieurs à 24 pg/g ps (PFOA)

Justesse sur matériau de contrôle qualité interne : entre -24% (PFHpS) et +26% (PFHxA)

HBCDD

Rendements moyens des composés isotopiquement marqués : entre 71% (¹³C-β-HBCDD) et 84% (¹³C-α-HBCDD)

LQ moyennes : inférieures à 17 pg/g ps (γ-HBCDD)

Blancs moyens : inférieurs à 7 pg/g ps (γ-HBCDD)

Justesse sur matériau de contrôle qualité interne : entre -5% (β-HBCDD) et +8% (γ-HBCDD)

Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS; C_nF_{2n+1}-R)

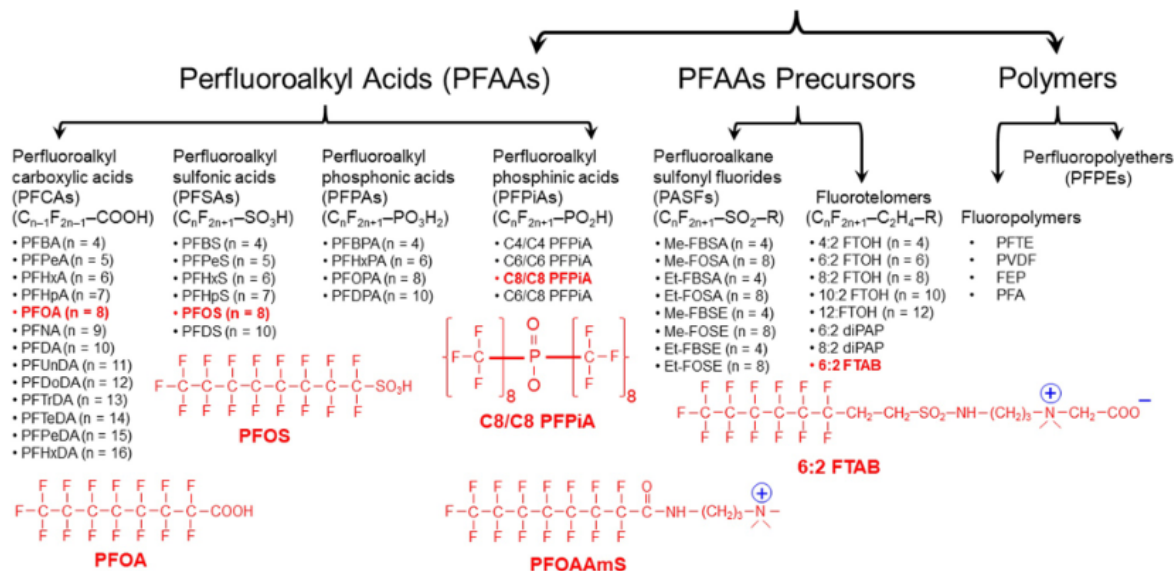


Figure 1. Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) family tree including perfluoroalkyl acids (PFAAs), PFAA precursors (e.g., perfluoroalkane sulfonyl fluorides and fluorotelomers), and polymers (e.g., fluoropolymers and perfluoropolyethers). PFAAs include perfluoroalkyl carboxylic acids, perfluoroalkyl sulfonic acids, perfluoroalkyl phosphonic acids (PFPA), perfluoroalkyl phosphinic acids, perfluoroalkyl ether carboxylic acids, and perfluoroether sulfonic acids. Molecular structures of typical PFAS compounds (in red) including anionic PFOA and perfluorooctanesulfonic acid, C8/C8 PFPIA, cationic perfluorooctaneamido ammonium iodide, and zwitterionic 6:2 fluorotelomer sulfonamide alkylbetaine are highlighted.

Figure 36- PFAS Extrait de (Lyu et al., 2022)

Annexe 10. MM Contaminants inorganiques (Ifremer, RBE/CCEM/ LBCM)

Hg. Les concentrations en mercure total (Hg) dans les muscles de soles ont été déterminées par spectrométrie d'absorption atomique avec une amalgamation par un piège d'or (Advanced Mercury Analyser AMA-254, Altec Ltd.), suivant une méthode interne appliquée au laboratoire Ifremer CCEM et adaptée de Cossa et al. (2002). Brièvement, la procédure analytique se compose des séquences suivantes : (1) combustion à haute température (550°C) de l'échantillon solide (30 à 65 mg de matière sèche) qui le réduit en cendres, et volatilise le Hg qu'il contient ; (2) amalgamation du Hg sur un piège d'or ; et (3) mesure du Hg collecté par spectrométrie d'absorption atomique après chauffage du piège à 800°C. Des matériaux de référence certifiés (MRC) ont été analysés suivant la même procédure que les échantillons : NIST-2976 (homogénat de moules, National Institute of Standards and Technology, USA, NIST) et IAE4-407 (homogénat de poissons, International Atomic Energy agency/IAEA). Les taux de recouvrement étaient supérieurs à 90%, pour ces 2 MRC. Avec cette méthode, la LOQ pour le Hg total mesuré est de 0,015 mg/kg ps.

Autres ETM. Les contaminants inorganiques (autres que le Hg) analysés dans les foies de soles sont deux des indicateurs communs d'OSPAR (éléments non-essentiels et/ou ayant une toxicité particulièrement élevée chez les bivalves et les poissons) : le cadmium (Cd) et le plomb (Pb), ainsi que d'autres éléments non-essentiels comme l'argent (Ag) et l'étain (Sn). Ils incluent également des éléments essentiels, avec un rôle biologique avéré, mais pouvant être toxiques sous certaines formes chimiques et/ou à des concentrations élevées : l'arsenic (As), le cobalt (Co), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le nickel (Ni), le sélénium (Se), le vanadium (V) et le zinc (Zn). Les concentrations en ces éléments ont été déterminées par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS, modèle ICAP-Qc de ThermoFisher), après minéralisation des échantillons par voie humide et acide assistée par micro-ondes (ETHOS-UP, Milestone), suivant une méthode interne multi-élémentaire développée et appliquée au laboratoire LBCM, et adaptée de la méthode ANSES/LSA/Aliments/LSA-INS-0084 (ex ANSES CIME 08). Brièvement selon cette méthode interne, si possible 200 mg ± 20 % de matière sèche (homogénat de tissu lyophilisé) sont mis en solution dans une mixture d'acide nitrique (HNO₃, 65% Suprapur®) et d'eau de qualité milli-Q dans des bombes en téflon adaptées, pour minéralisation (solubilisation de l'échantillon) par micro-ondes. Les minéralisats sont ensuite complétés à 50 mL avec de l'eau milli-Q puis stockés à l'abri de la lumière jusqu'à analyse. Une solution d'étalons internes (In) est ajoutée aux échantillons minéralisés juste avant analyse par ICP-MS, afin de suivre (et corriger) les éventuelles dérives de l'appareil au cours des analyses. Les concentrations en ETM ainsi mesurées sont corrigées des blancs réactifs et converties mg/kg poids sec (ps) selon la prise d'essai de départ (en mg), le volume de reprise (50 mL), et le facteur de dilution éventuel. Tout comme pour le Hg, des MRC ont été analysés selon la même procédure que les échantillons pour s'assurer de la validité des résultats : DOLT-5 (foie de roussette, National Research Council Canada/NRCC), DORM-4 (protéine de poisson, NRCC), et CE 278K (tissus de moules, Joint Research Center/Commission Européenne). Les taux de recouvrement des MRC se sont tous montrés satisfaisants par rapport aux attentes de la méthode, avec des taux de recouvrement moyens situés entre 78% et 127% selon le MRC et l'ETM ciblé (i.e. dans la limite des 30% d'écart acceptable). Seuls le Cr et le Ni ont montré un taux de recouvrement vraiment faible pour le CRM DOLT-5 (de 61% en moyenne dans les deux cas), mais corrects pour les deux autres MRC (entre 80 et 94%). Enfin, avec cette méthode, les limites de quantification (LOQ) pour une prise d'essai moyenne de 200 mg ps étaient de 0,001 mg/kg ps pour Ag, 0,21 mg/kg ps pour As, 0,002 mg/kg ps pour Cd, 0,012 mg/kg ps pour Co, 0,012 mg/kg ps pour Cr, 0,13 mg/kg ps pour Cu et Ni, 1,0 mg/kg ps pour Fe, 0,04 mg/kg ps pour Mn, 0,004 mg/kg ps pour Mo, 1,33 mg/kg ps pour Se, 0,031 mg/kg ps pour Sn, 0,021 mg/kg ps pour Pb, 0,003 mg/kg ps pour V et 2,3 mg/kg ps pour Zn.

Annexe 11. Complément aux analyses statistiques

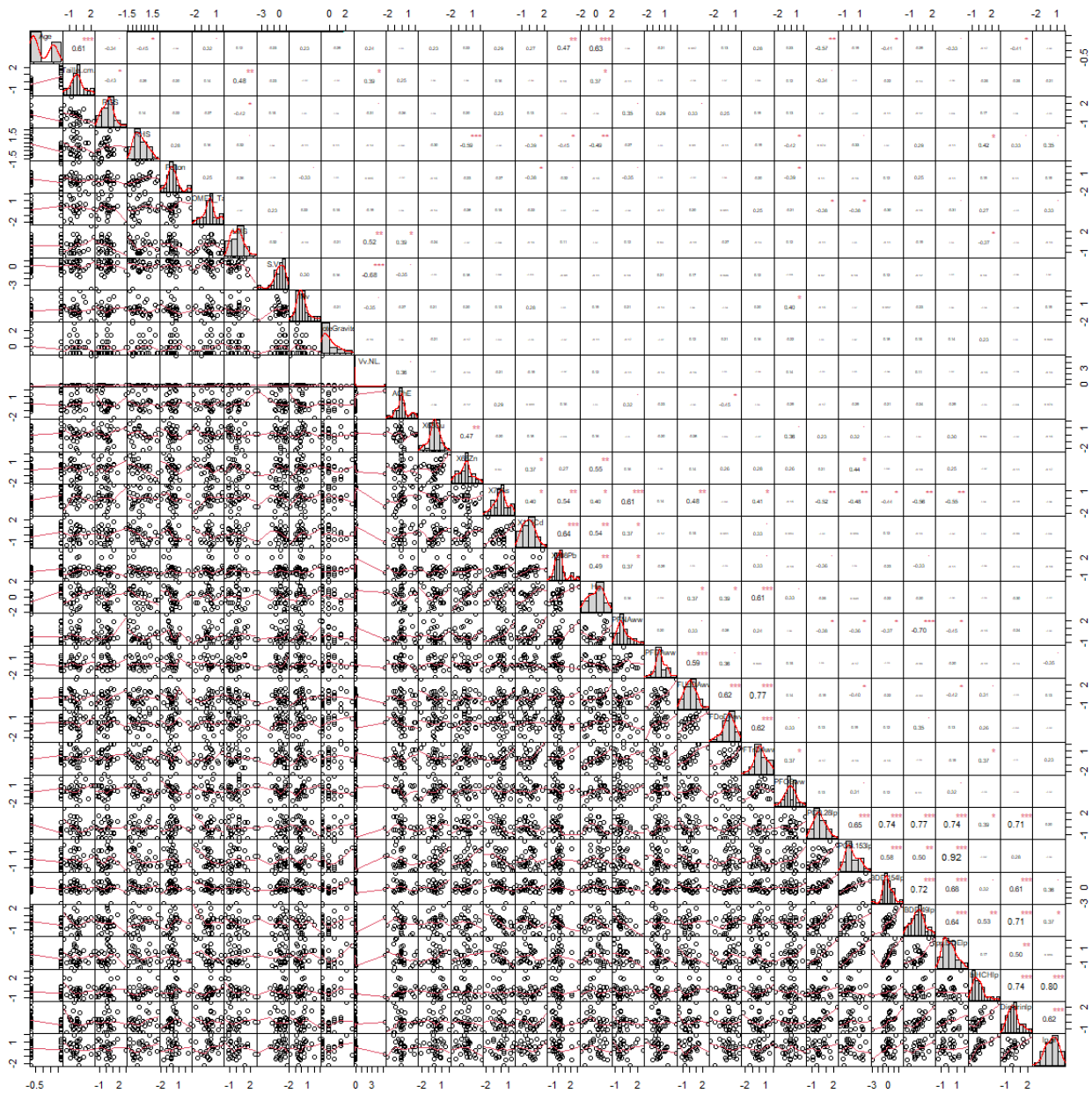


Figure 37 - Corrélations de Pearson pour les paramètres considérés dans les analyses multivariées et p-value associée.

Variables et transformations utilisées pour le chartplot (scale : variables centrées – réduites (moyenne=0 et écart type=1) pour comparer les variations de variables d'ordres de grandeur différents, et log : pour rapprocher les données de concentrations vers une distribution gaussienne)

Age	Taille	RGS	RHS	Fulton	Comet	LMS	S.V	Nv	Vv	NL	Note Grav.	AchE	Cu	Zn	As	Cd	Pb	Hg	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFDoDA	PFTrDA	PFOS	CB28	CB153	BDE154	BDE49	Pp'DDE	B HCH	Dield	Taux lip		
												log	log	log	log	log	log	log	log	log	log	log	log	log	log	log	log	log	log	log	log	log	log	
scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale	scale
												ps	ps	ps	ps	ps	ps	ps	pf	pf	pf	pf	pf	pf	pf	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pl	pf



Figure 38 – Distance à la moyenne de la zone pour chaque individu par paramètre et par station $(\sum \frac{\text{valeur}_{\text{paramètre}}}{\text{moyenne}_{\text{paramètre}}})$.